



Identifizierung und Charakterisierung von Adhäsionsproteinen des humanpathogenen Erregers *Chlamydia pneumoniae*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Gido Murra

aus Aurich

Düsseldorf

November 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. Rüdiger Simon

Tag der mündlichen Prüfung: 20.01.2010

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	8
SUMMARY	10
1 EINLEITUNG	12
1.1 Taxonomische Einteilung	12
1.2 Durch Chlamydien verursachte Erkrankungen	13
1.2.1 <i>Chlamydia pneumoniae</i>	13
1.2.2 <i>Chlamydia trachomatis</i>	14
1.3 Die Biologie des chlamydialen Entwicklungszyklus	14
1.3.1 Die chlamydiale Adhäsion	16
1.3.2 Differenzierung der EBs in RBs und Verhinderung der Phago-Lysosomalen Fusion	16
1.3.3 Vermehrung der RBs und Inklusionsmodifikation	17
1.3.4 Re-Differenzierung von RBs in EBs und Freisetzung der Chlamydien	18
1.4 Adhäsine und Proteinsekretionssysteme Gram-negativer Pathogene	18
1.5 Zelluläre Adhäsion und Invasion humanpathogener Bakterien	20
1.6 Die chlamydiale Adhäsion und beteiligte Wirtszellrezeptoren	22
1.6.1 Der chlamydiale Außenmembrankomplex (cOMC)	26
1.6.1.1 Major outer membrane protein (MOMP)	26
1.6.1.2 Outer membrane complex protein B (OmcB)	27
1.6.1.3 GroEL1, polymorphe Membranproteine und PorB	28
1.7 Clathrin-vermittelte Endozytose und Chlamydien	29
1.8 Die Sorting Nexin Proteinfamilie und SNX9	29
1.9 Durch EspF und SNX9 ausgelöste Wirtszellmodulationen	31
1.10 Organisation chlamydialer Gene in Operons	32
1.11 Der Gencluster <i>Cpn0678</i> – <i>Cpn0676</i>	33
1.12 Präsentationssysteme zur Identifizierung bakterieller Adhäsine	33
1.12.1 Das Hefe-Oberflächen-Präsentationssystem („yeast surface display“)	34
1.13 Zielsetzung	35
2 MATERIAL	36
2.1 Gebrauchsmaterial	36
2.2 Geräte und Maschinen	36
2.3 Chemikalien	37
2.4 Enzyme	38
2.5 Antikörper	38
2.6 Kits, Sepharosen, Beads	39
2.7 DNA- und Proteingrößenstandards	39
2.8 Oligonukleotide	39
2.8.1 Oligonukleotide zur Amplifikation	39
2.8.2 Oligonukleotide zur Sequenzierung	41
2.9 Plasmide	41

2.10 Zellen, Stämme und Zelllinien	42
2.10.1 Prokaryotische Zellen und Zelllinien	42
2.10.2 Eukaryotische Zellen und Zelllinien	43
2.11 Medien und Medienzusätze	43
Medien für <i>Escherichia coli</i>	43
Medien für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
3 METHODEN	45
3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen	45
3.1.1 Herstellung des Zellkulturmediums	45
3.1.2 Passagieren adhärenter Zellen durch Trypsinbehandlung	45
3.1.3 Einfrieren eukaryotischer Zellen	45
3.2 Chlamydienkultur	46
3.2.1 Herstellung von Stammlösungen	46
3.2.2 Passage von Chlamydien in 25 cm ² Zellkulturflaschen	46
3.2.3 Sedimentation und Einfrieren von Chlamydien	47
3.2.4 Reinigung von Chlamydien mittels Gastrografin-Gradient	47
3.2.5 Bestimmung der Infektiösität von Chlamydien	47
3.2.6 Fluoreszenzmarkierung von Chlamydien durch CFSE	48
3.2.7 Stationäre Infektion mit Chlamydien	48
3.2.8 Detektion von EB-Oberflächenantigenen mittels FACS	49
3.3 Kultivierung der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
3.3.1 Induktion von Oberflächen-präsentierten Proteinen und SDS-PAGE	49
3.3.2 α -Mannosidase Verdau Oberflächen-präsentierter Proteine	50
3.3.3 Indirekte Immunfluoreszenz Oberflächen-präsentierter Proteine	50
3.3.4 Adhäsionstest mit Hilfe des Hefe-Oberflächen-Präsentationssystems	51
3.4 Zellbiologische Methoden	52
3.4.1 Transfektion von HEK293T-Zellen mittels Calciumphosphat	52
3.4.2 Transferrin Endozytose Assay	52
3.4.3 Adhäsion Protein-beschichteter Latexkugeln mittels Mikroskopie	52
3.4.4 Quantifizierung der Adhäsion Protein-beschichteter Latexkugeln mittels FACS	53
3.4.5 Internalisierungstest von Latexkugeln	53
3.4.6 Bestimmung der Adhäsion CFSE-markierter Chlamydien mittels FACS	54
3.4.7 Durchflusszytometrie	54
3.4.8 Konventionelle Fluoreszenzmikroskopie und Konfokalmikroskopie	55
3.5 Molekularbiologische Methoden	55
3.5.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	55
3.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	55
3.5.2.1 Amplifikation von Plasmid-DNA und chlamydialen/humanen Gensequenzen	55
3.5.2.2 PCR auf Hefezellen	56
3.5.3 Transformation und homologe Rekombination in <i>S. cerevisiae</i>	56
3.5.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	57
3.5.5 Transformation in <i>E. coli</i>	57
3.5.5.1 Ein-Minuten Transformation	57

3.5.5.2	Transformation durch Elektroporation	57
3.5.6	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung und Sequenzierung	57
3.5.7	Transkriptkopplungsanalysen	57
3.5.8	Real Time PCR	58
3.5.8.1	Plasmid-Standard zur Bestimmung der Molekülanzahl	58
3.5.8.2	Real Time PCR zur Bestimmung der Kopienzahl RNA/DNA	58
3.6	Biochemische Methoden	59
3.6.1	Induktion der Genexpression in <i>E. coli</i>	59
3.6.2	Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen	59
3.6.2.1	Aufreinigung von His ₆ -Fusionsprotein unter denaturierenden Bedingungen	59
3.6.2.2	Aufreinigung von nativen GST-Fusionsproteinen mittels FPLC	60
3.6.3	Auftrennung von Proteinproben mittels SDS-PAGE	60
3.6.3.1	Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliantblau	61
3.6.3.2	Westernblot und Immundetektion	61
3.6.4	Proteinmengenbestimmung mittels Bradford-Reagenz	62
3.6.5	GST-Pulldown Experimente	62
3.6.6	NHS-Pulldown Experimente	63
3.6.7	Co-Immunpräzipitation nach extrazellulärem Crosslinking mittels DTSSP	63
3.6.8	Markierung von Proteinen mit Biotin und FITC	64
3.6.9	Interaktionsstudien mittels Far-Western Blot	64
3.6.10	Analyse der EB-Oberflächenzugänglichkeit chlamydialer Proteine mittels „Dot-Blot“	65
3.6.11	Beschichtung von Latexkugeln mit Protein	65
3.6.11.1	Bestimmung der Beschichtungsqualität	66
3.6.12	Behandlung von <i>C. pneumoniae</i> EBs mit Detergenzien	66
3.6.13	Generierung polyklonaler Cpn0678 – Cpn0676 _{6His} Antikörper	66
3.6.14	Aufreinigung polyklonaler Antikörper mittels NHS-Sepharose	67
4	ERGEBNISSE	68
4.1	Identifikation Stadien-spezifisch regulierter Gene von <i>C. pneumoniae</i>	68
4.1.1	Verifikation des spät exprimierten Genclusters <i>Cpn0676 - Cpn0678</i> mittels Real Time rt-PCR	68
4.1.2	Transkriptkopplungsanalysen führen zur Identifikation von <i>Cpn0678 – Cpn0676</i> als Operon	70
4.1.3	Bioinformatische Analyse des <i>Cpn0678 – Cpn0676</i> Genlokus	71
4.2	Aga2p-Cpn0676 – Cpn0678 exprimierende Hefezellen binden an Humanzellen	73
4.2.1	Mit rCpn0677 _{6His} oder rCpn0678 _{6His} beschichtete Latexkugeln zeigen moderate bzw. starke Adhäsion an Humanzellen	75
4.2.2	Mit rCpn0677 _{6His} oder rCpn0678 _{6His} beschichtete Latexkugeln zeigen eine konzentrationsabhängige Adhäsion an Humanzellen	76
4.2.3	FITC-markiertes rCpn0678 _{6His} bindet konzentrationsabhängig an Zellen	77
4.3	rCpn0677_{6His} und rCpn0678_{6His} verstärken die <i>C. pneumoniae</i> Infektion, rCpn0676_{6His} dagegen reduziert die Infektion	78
4.3.1	Charakterisierung der Infektionsstimulation durch rCpn0678 _{6His}	80
4.3.2	rCpn0677 _{6His} und rCpn0678 _{6His} haben eine gegenläufige Wirkung auf die EB-Adhäsion bei 4°C	81
4.3.3	rCpn0677 _{6His} und rCpn0678 _{6His} erhöhen die EB-Adhäsion bei 37°C	83

4.3.4	Die parallele Inkubation von rCpn0677 _{6His} oder rCpn0678 _{6His} mit EBs induziert die starke Infektionserhöhung	84
4.4	Cpn0676 – Cpn0678 werden spät im Infektionszyklus exprimiert und kodieren für EB-spezifische Proteine	86
4.4.1	Cpn0676 – Cpn0678 sind in chlamydialen Inklusionen frühestens nach 60 hpi detektierbar	87
4.4.2	Cpn0677 und Cpn0678 sind auf der Oberfläche von EBs detektierbar	90
4.4.3	Lokalisierungsanalysen von Cpn0678 – Cpn0676 in EBs durch Behandlung mit Detergenzien	91
4.5	Cpn0678 und Cpn0677 - Antikörper neutralisieren signifikant die <i>C. pneumoniae</i> Infektion	93
4.5.1	Lokalisation von Cpn0676 - Cpn0678 in späten Inklusionen	94
4.6	Cpn0677 und Cpn0678 kolokalisieren mit MOMP früh in der Infektion	96
4.7	Nur rCpn0677_{6His} zeigt einen Effekt auf die <i>C. trachomatis</i> L2 Infektion	97
4.7.1	rCpn0678 _{6His} interagiert mit rCpn0676 _{6His} <i>in vitro</i>	98
4.8	Domänenanalyse von Cpn0678	99
4.8.1	Der N-Terminus von Cpn0678 zeigt Adhäsion und erhöht die Infektion	100
4.9	Lokalisation von Cpn0677 und Cpn0678 in Hefe und Humanzellen	102
4.10	Cpn0677 und Cpn0678 interagieren mit SNX9 <i>in vitro</i>	104
4.10.1	Interaktionen von Cpn0677/Cpn0678 mit SNX9 durch Far-Western Blots	106
4.10.2	Endogenes SNX9 lokalisiert an der Zelloberfläche von Humanzellen	107
4.10.3	Kotransfektion von Cpn0678 und SNX9 induziert tubuläre Strukturen	109
4.11	SNX9 ist an der Aufnahme von <i>C. pneumoniae</i> beteiligt	111
4.12	Identifikation humaner Interaktionspartner von rCpn0678_{6His} aus HEp-2 Zelllysaten	112
4.13	Transfektion von Cpn0678 inhibiert die Aufnahme von Transferrin	113
4.14	rCpn0677_{6His} und rCpn0678_{6His} erhöhen nicht die Endozytose von Transferrin, jedoch wird rCpn0677_{6His} internalisiert	115
4.15	Mit rCpn0677_{6His}-beschichtete Latexkügelchen werden internalisiert	116
4.15.1	Die Internalisierung von rCpn0677 _{6His} -beschichtete Latexkügelchen ist abhängig von einem intakten Zytoskelett	117
5	DISKUSSION	119
5.1	<i>Cpn0678 – Cpn0676</i> stellen ein neues <i>C. pneumoniae</i> Operon dar	120
5.2	Cpn0677 und Cpn0678 zeigen Adhäsion an Humanzellen	122
5.2.1	Der Einfluss der rekombinanten Protein Cpn0676, Cpn0677 und Cpn0678 auf die <i>C. pneumoniae</i> Infektion	123
5.3	Cpn0676 – 678 werden spät im Infektionszyklus exprimiert und kodieren für EB-spezifische Proteine	126
5.3.1	Cpn0677 und Cpn0678 lokalisieren auf der EB-Oberfläche	126
5.3.2	Cpn0677 und Cpn0678 vermitteln die chlamydiale Infektion	127
5.4	Cpn0677 und Cpn0678 interagieren mit SNX9 <i>in vitro</i> und mit endogenem SNX9 an der Plasmamembran	127
5.4.1	Intrazellulär exprimiertes Cpn0678 oder Cpn0677 interagiert mit SNX9, jedoch nur Cpn0678 induziert Membrantubulationen	128
5.4.2	SNX9 ist an der Aufnahme von <i>C. pneumoniae</i> beteiligt	130
5.4.3	Der N-Terminus von Cpn0678 und CT694 weist ein gemeinsames GxxxG-Motiv auf	131

5.5	Die intrazelluläre Expression von Cpn0678 inhibiert die Endozytose von Transferrin	131
5.6	rCpn0677 induziert Internalisierung in HEp-2 Zellen	132
5.7	Cpn0677 und Cpn0678-Beads induzieren die Bildung von Aktinringen	133
5.8	Ist eine Sekretion von Cpn0678 und Cpn0677 möglich ?	134
5.9	Identifikation potentieller humaner Interaktionspartner von Cpn0678	135
5.10	Cpn0677 und Cpn0678 stellen eine <i>C. pneumoniae</i> spezifische Expansion des Genoms dar	136
5.11	Modell der Cpn0677 und Cpn0678 vermittelten Adhäsion und Internalisierung von <i>C. pneumoniae</i>	137
6	ANHANG	138
6.1	Zusätzliche Abbildungen zum Ergebnisteil und der Diskussion	138
6.2	Abbildungsverzeichnis	140
6.3	Tabellenverzeichnis	142
7	LITERATURVERZEICHNIS	143
8	DANKSAGUNG	151
9	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	152

Zusammenfassung

Chlamydiaceae sind Gram-negative, obligat intrazelluläre Bakterien, wobei vor allem die Spezies *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydia pneumoniae* ein breites Spektrum an Erkrankungen bei Mensch und Tier auslösen. *C. trachomatis* Serovare sind die häufigste Ursache für sexuell übertragbare Erkrankungen weltweit. *C. pneumoniae* verursacht Infektionen des respiratorischen Traktes die zur Ausbildung von Pneumonien, Bronchitis und Sinusitis führen und wird mit chronischen Erkrankungen wie Asthma und Arteriosklerose assoziiert. *C. pneumoniae* Infektionen sind häufig und abhängig vom Alter haben 50 – 80 % der Bevölkerung Antikörper gegen *C. pneumoniae* entwickelt, aufgrund eines Kontaktes mit dem Erreger. Im Laufe des biphasischen Entwicklungszyklus treten Chlamydien in Form infektiöser, metabolisch inaktiver Elementarkörperchen (EBs) und nicht-infektiöser, metabolisch aktiver Retikularkörperchen (RBs) auf.

Für die Etablierung der *C. pneumoniae* Infektion ist die Adhäsion infektiöser EBs der erste initiale Schritt, der zur Aufnahme der Chlamydien führt. Für *C. pneumoniae* konnten bislang nur wenige Proteine identifiziert werden, die an der Adhäsion beteiligt sind. Für das Adhäsin OmcB wurde ein Heparinbindemotiv identifiziert, mit dem es an Glykosaminoglykane der Wirtszelle bindet (Moelleken and Hegemann 2008). Auch das *C. pneumoniae* Chaperon GroEL1 und der Auto-transporter Pmp21 zeigen Adhäsion an Humanzellen, wobei im Falle von Pmp21 charakteristische Motive eine prominente Rolle spielen, jedoch sind die humanen Interaktionspartner noch unbekannt (Wuppermann, Molleken et al. 2008) (Schmidt 2009). Viele Pathogene nutzen jedoch multiple Eintrittspforten für die Infektion, was die Existenz entsprechender bakterieller Adhäsine voraussetzt. Daher existieren auch für *C. pneumoniae* vermutlich weitere Adhäsine-Rezeptor Kombinationen, die für eine spezifische Adhäsion chlamydialer EBs an verschiedene Zelltypen verantwortlich sind.

Ausgehend von einer genomweiten Transkriptanalyse wurden in der vorliegenden Arbeit weitere *C. pneumoniae* Adhäsine identifiziert, die für eine Spezies-spezifische Bindung an Humanzellen verantwortlich sind. Eine Beladung infektiöser EBs spät im chlamydialen Entwicklungszyklus, mit Proteinen die eine wichtige Rolle in der Adhäsion und Internalisierung in einer neuen Infektionsrunde einnehmen, diente dabei als Arbeitshypothese für die Analyse differentiell exprimierter Gene. Basierend auf Microarray-Transkriptdaten wurde daher das spät in der Infektion exprimierte Gencluster *Cpn0678 – Cpn0676* untersucht. Die drei Gene zeigten ein koreguliertes Genexpressionsmuster und wurden als neues *C. pneumoniae* Operon identifiziert.

Hefezellen, die auf ihrer Oberfläche die Proteine Cpn0678, Cpn0677 oder Cpn0676 exprimieren, zeigten Adhäsion an humane HEp-2 Zellen. Latexkügelchen beschichtet mit rekombinantem Cpn0678 oder Cpn0677-Protein zeigten ebenfalls eine Adhäsion an HEp-2 Zellen. Cpn0678, Cpn0677 und Cpn0676 sind EB-spezifische Proteine, deren Lokalisation erstmalig nach 60 h und damit in der späten Infektion mikroskopisch detektierbar war und sich nur auf die Chlamydien innerhalb der Inklusion beschränkte. Während der Adhäsion und Internalisierung von infektiösen EBs zeigten Cpn0678 und Cpn0677 eine Kollokation mit dem Außenmembranprotein MOMP und lokalisieren damit auf der EB-Oberfläche. Die Oberflächenlokalisation von Cpn0678 und Cpn0677

wurde durch biochemische und FACS-Analysen bestätigt. Eine Vorbehandlung von EBs mit einem spezifischen Cpn0678- und Cpn0677-Antikörper führte zu einer signifikanten Reduktion der Infektion.

Während rekombinantes Cpn0678 (rCpn0678) nur Adhäsion zeigte, konnte rCpn0677 zusätzlich noch die eigene Aufnahme in humane HEp-2 Zellen vermitteln, da mit rCpn0677 beschichtete Latexkügelchen und auch lösliches Protein internalisiert wurden. Zudem deuten erste Daten darauf hin, dass mit rCpn0677 und rCpn0678 beschichtete Latexkügelchen die Bildung von F-Aktin Taschen induzieren.

In GST-Pulldown und Crosslinking Experimenten konnte eine Interaktion von rCpn0677 und rCpn0678 mit dem humanen Sorting Nexin 9 (SNX9) Protein gezeigt werden, welches ein zentrales Protein an der Schnittstelle von Clathrin-vermittelter Endozytose und damit assoziierter Reorganisation des Aktinzytoskeletts darstellt. Mit Hilfe einer SNX9 „knock-down“-Zelllinie sowie Neutralisationsexperimenten mit einem spezifischen SNX9-Antikörper wurde erstmals eine funktionelle Rolle von SNX9 für die *C. pneumoniae* Infektion gezeigt.

Somit wurde in dieser Arbeit das neue *C. pneumoniae* Operon *Cpn0678* - *Cpn0676* identifiziert und eine Funktionsanalyse der hypothetischen Proteine Cpn0678 – Cpn0676 durchgeführt. Die *C. pneumoniae* spezifischen Proteine Cpn0678 und Cpn0677 lokalisieren auf der Oberfläche infektiöser EBs und vermitteln Adhäsion, wobei Cpn0677 zusätzlich noch Internalisierung vermittelt. Beide Proteine sind durch eine Interaktion mit humanem SNX9 möglicherweise an der Verknüpfung von Aktinassemblierung und Membranremodellierung während der Endozytose von *C. pneumoniae* beteiligt.

Summary

Chlamydiaceae are obligate intracellular Gram-negative bacteria and are associated with a wide variety of infections in humans and animals. *C. trachomatis* serovars are the leading cause for sexually transmitted diseases worldwide. *C. pneumoniae* causes infections of the respiratory tract leading to pneumoniae, bronchitis and sinusitis and is associated with chronic diseases like asthma and atherosclerosis. Infections with *C. pneumoniae* are very common and 50 – 80 % of the population show detectable antibody levels as a result of contact with the pathogen. During the biphasic developmental cycle *Chlamydia* exist as infectious, metabolically inactive elementary body (EB) and as non-infectious, metabolically inactive reticulate body (RB).

The establishment of the *C. pneumoniae* infection requires adhesion of infectious EBs, in combination with the secretion of effector proteins to modulate host cell function, leading to uptake of the pathogen. A few *C. pneumoniae* proteins with a role in adhesion have been identified so far. The adhesin OmcB mediates adhesion to glycosaminoglycans on human cell via a heparin binding motif (Moelleken and Hegemann 2008). The *C. pneumoniae* chaperone GroEL1 and the autotransporter Pmp21 show adhesion to human cells and Pmp21 contains characteristic repetitive motifs that play an important role, but the human interaction partners of these proteins remain unknown until now (Wuppermann, Molleken et al. 2008) (Schmidt 2009).

In this study new *C. pneumoniae* adhesins were identified that mediate species-specific adhesion to human cells. Gene products expressed during the late-stage of infection might represent a potential source of entry-related proteins, as proteins synthesized in RBs could be retained within EBs and contribute during subsequent infection events. Based on microarray transcript data the late expressed gene cluster *Cpn0678 – Cpn0676* was identified and the three genes showed a co-regulated expression pattern and represent a new *C. pneumoniae* operon.

Yeast cells surface expressing Cpn0678, Cpn0677 or Cpn0676 mediate adhesion and additionally Cpn0678 or Cpn0677 coated latex beads bind to human HEp-2 cells. Cpn0678, Cpn0677 and Cpn0676 represent EB-specific proteins that are detected microscopically starting from 60 h post infection and are found solely within the chlamydial inclusion. During adhesion and internalization of infectious EBs a colocalization of Cpn0678 and Cpn0677 with the outer membrane protein MOMP was observed, indicating a surface localization for these proteins. The surface localization of Cpn0678 and Cpn0677 was further substantiated by biochemical and FACS analysis. The functional inhibition of Cpn0678 and Cpn0677 by pre-incubation of infectious EBs with specific antibodies led to a significant decrease of infectivity.

Whereas recombinant Cpn0678 (rCpn0678) mediates only adhesion, rCpn0677 is able to induce internalization. Soluble rCpn0677 and rCpn0677 coated latex beads were internalized showing that Cpn0677 displays a function in adhesion and internalization. Preliminary data showed that rCpn0677 and rCpn0678 coated latex beads led to the formation of F-actin rings beneath attached beads.

GST-pulldown and crosslinking experiments showed an interaction of Cpn0678 and Cpn0677 with the human protein sorting nexin 9 (SNX9). SNX9 plays a central role during clathrin-mediated

endocytosis and the reorganization of the actin cytoskeleton. Experiments with SNX9 knock-down cells and neutralization studies with a specific SNX9-antibody resulted in a significant reduction of infection, showing for the first time a functional role of SNX9 in the *C. pneumoniae* infection.

In summary the new *C. pneumoniae* operon *Cpn0678 - Cpn0676* was identified and a functional analysis of the hypothetical proteins Cpn0678, Cpn0677 and Cpn0676 was performed. The *C. pneumoniae* specific proteins Cpn0678 and Cpn0677 are located on the surface of infectious EBs and mediate adhesion and Cpn0677 also mediates internalization. These proteins are possibly involved in linking actin assembly and membrane remodeling during endocytosis of *C. pneumoniae* through an interaction with the human SNX9 protein.

1 Einleitung

1.1 Taxonomische Einteilung

Chlamydien sind Gram-negative Bakterien mit einer obligat intrazellulären Lebensweise, die ein breites Erkrankungsspektrum bei Mensch und Tier hervorrufen. Aufgrund ihres einzigartigen biphasischen Entwicklungszyklus und einer 16S-rRNA und 23S-rRNA Sequenzidentität von > 80% wurden sie in die eigene Ordnung *Chlamydiales* eingeteilt, die aus den 4 Familien *Chlamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Waddliaceae* und *Simkaniaceae* besteht, wobei die Familie *Chlamydiaceae* 9 Spezies beinhaltet (Abb. 1) (Everett, Bush et al. 1999) (Horn, Fritsche et al. 1999). Eine Einteilung der Familie *Chlamydiaceae* in die zwei Gattungen *Chlamydomphila* und *Chlamydia* basierte auf 16S-rRNA Ähnlichkeiten, berücksichtigte jedoch nicht das biologische System und wurde von der Wissenschaftsgemeinde mehrheitlich nicht akzeptiert (Everett, Bush et al. 1999) (Stephens, Myers et al. 2009). Eine neue phylogenetische Studie bestätigt die enge evolutionäre Verbindung der zwei Gattungen und proklamiert daher die Verwendung der einzigen Gattung *Chlamydia*, die auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wird (Abb. 1) (Stephens, Myers et al. 2009). Gegenwärtig sind 16 chlamydiale Spezies sequenziert, die sich in Genomgröße und Zeitdauer der Entwicklungszyklen unterscheiden. Auch variieren die aus einer Infektion resultierenden Krankheitsbilder und auch ihre Wirtsspezifität. Chlamydiale Spezies leben in einer isolierten wirtsspezifischen Nische, welches den Zugang zu einem exogenem mikrobiellen Genpool minimiert, sodass nur ein geringer horizontaler Gentransfer stattfinden kann (Stephens, Myers et al. 2009).

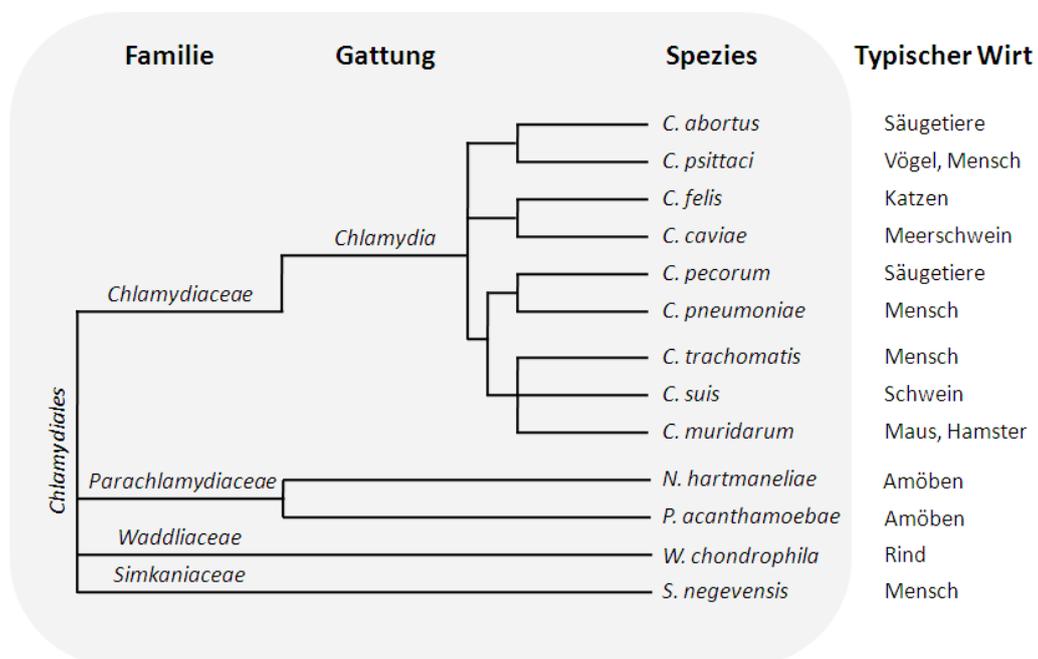


Abbildung 1: Taxonomie der Ordnung Chlamydiales

Darstellung der taxonomischen Eingruppierung mit Angabe der typischen Wirtsorganismen (modifiziert nach Everett et al., 1999 und unter Berücksichtigung von Stephens et al., 2009). Die Länge der Linien ist nicht proportional zu den tatsächlichen phylogenetischen Abständen.

1.2 Durch Chlamydien verursachte Erkrankungen

Chlamydien gehören mit über 600 Millionen infizierten Menschen weltweit, durch die humanpathogenen Spezies *C. trachomatis* und *C. pneumoniae*, zu den verbreitetsten Pathogenen (Ojcius, Darville et al. 2006). *C. psittaci* ist ein Tierpathogen, kann jedoch durch Vögel auf den Menschen übertragen werden und respiratorische Erkrankungen wie die Ornithose bzw. Psittakose verursachen, wobei die Zahl der Humaninfektionen gegenwärtig noch unterschätzt wird (Peeling and Brunham 1996) (Harkinezhad, Verminnen et al. 2009). Die tierpathogenen Spezies sind in Nutztieren wie Rindern, Schafen, Pferden und Schweinen (*C. abortus*, *C. pecorum* und *C. suis*), sowie auch bei Haus- und Nagetieren wie Meerschweinchen, Katzen, Mäusen und Hamstern (*C. caviae*, *C. felis* und *C. muridarum*) zu finden. Besonders *C. abortus* und *C. pecorum* verursachen respiratorische Infektionen sowie Infertilität und Fehlgeburten in Tierbeständen und führen zu einem erheblichen wirtschaftlichen Schaden (Longbottom 2004).

1.2.1 *Chlamydia pneumoniae*

C. pneumoniae verursacht akute und chronische Infektionen der oberen und unteren Atemwege und ist verantwortlich für 5 - 20 % aller erworbenen Pneumonien, sowie 5 % aller Bronchitis- und Sinusitisfälle (Kuo, Jackson et al. 1995). 70 % aller *C. pneumoniae* Infektionen verlaufen asymptomatisch, daher ist die Verbreitung sehr hoch und die Antikörperprävalenz in der Bevölkerung beträgt 50 % bei 20 Jährigen und 70 - 80 % bei Menschen im Alter von 65 Jahren (Hahn, Azenabor et al. 2002) (Grayston 2000). *C. pneumoniae* wird mit einer Reihe chronischer Erkrankungen wie Asthma, Alzheimer, multiple Sklerose und reaktive Arthritis in Verbindung gebracht (Hahn, Dodge et al. 1991) (Balin, Gerard et al. 1998) (Sriram, Stratton et al. 1999) (Hannu, Puolakkainen et al. 1999). Allerdings ist bei diesen Krankheitsbildern bislang ungeklärt, ob eine *C. pneumoniae* Infektion der alleinige Auslöser für die Erkrankung oder nur eine Folge der Erkrankung durch sekundäre Besiedlung des geschädigten Gewebes ist. Eine Vielzahl von Zelltypen wie Lungenepithel, glatte Aortenmuskelzellen, vaskuläres Endothelium, Monozyten, Fibroblasten, T-Zellen und Makrophagen können durch *C. pneumoniae* infiziert werden und ermöglichen so eine Verbreitung im menschlichen Körper (Belland, Ouellette et al. 2004) (Kern, Maass et al. 2009). Auch eine Assoziation von *C. pneumoniae* Infektionen und Arteriosklerose wird vermutet, da man *C. pneumoniae* in atherosklerotischen Plaques nachweisen und auch lebensfähig aus Gefäßläsionen in Kultur bringen konnte (Kuo, Shor et al. 1993) (Maass, Bartels et al. 1998). Denkbar wäre, dass *C. pneumoniae* über Monozyten im Blut vaskuläre Endothelzellen infiziert und so die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (z.B. TNF- α , IFN- γ und IL-6) und Leukozyten-Adhäsionsmoleküle (z.B. E-Selektin und VCAM-I) stimuliert (Watson and Alp 2008). Dies führt zur trans-endothelialen Migration von T-Zellen und Monozyten, die in Makrophagen differenzieren und resultiert in einer inflammatorischen Antwort und Läsion der Gefäßwand.

1.2.2 *Chlamydia trachomatis*

Chlamydia trachomatis ist gegenwärtig in 19 Serovaren aufgeteilt und für das Jahr 1999 ermittelte die WHO 340 Millionen Infektionen weltweit. Davon sind 146 Millionen durch *C. trachomatis* Serovaren A - C ausgelöste Augeninfektionen (Trachoma), welche bei Nichtbehandlung zu follikulärer Bindehautentzündung und Erblindung führt (Whitcher, Srinivasan et al. 2001). Mit 7 - 9 Millionen aufgrund eines Trachoms erblindeten Menschen weltweit, sind *C. trachomatis* Infektionen der Hauptgrund für vermeidbare Blindheit, vor allem in Entwicklungsländern aufgrund mangelnder medizinischer Versorgung (Ojcius, Darville et al. 2006). *C. trachomatis* verursacht bis zu 90 Millionen Neuinfektionen jährlich weltweit, davon schätzungsweise 300.000 Fällen in Deutschland und ist somit der häufigste Erreger sexuell übertragener Krankheiten (Ojcius, Darville et al. 2006). Bei den sexuell übertragenen Serovaren unterscheidet man aufgrund der unterschiedlichen Infektionsausbreitung zwischen den nicht-dissimilierenden Serovaren D – K und den dissimilierenden Serovaren L1 – L3. Die Serovaren D – K infizieren lokal epitheliale Gewebe und rufen Entzündungen des Gebärmuttereinganges/-halses (Cervicitis/Endometritis), der Eileiter (Salpingitis) und der Harnröhre (Urethritis) hervor. Dies kann bei Frauen aufgrund von Vernarbungen zu Unfruchtbarkeit führen und jährlich treten allein in den USA 10.000 Fällen neue auf (Ojcius, Darville et al. 2006) (Bebear and de Barbeyrac 2009). Die dissimilierenden LGV-Serovaren L1 – L3 sind invasiver und nutzen Epithelgewebe des Urogenitaltraktes als Eintrittspforte, um so in tieferliegende Gewebe wie den urogenitalen Lymphknoten vorzudringen und Erkrankungen des lymphatischen Systems zu verursachen (Bebear and de Barbeyrac 2009).

1.3 Die Biologie des chlamydialen Entwicklungszyklus

Chlamydien besitzen ein relativ kleines, reduziertes zirkuläres Genom als Folge einer Anpassung an die Wirtszelle. Es wurden 798 Gene identifiziert, die in allen chlamydialen Genomen auftauchen und sie bilden vermutlich die minimale Genanzahl, die für den Entwicklungszyklus und das intrazelluläre Überleben notwendig sind (Read, Myers et al. 2003). Die Genome von *C. pneumoniae* CWL029 und *C. pneumoniae* AR39 zeigen mit 99,9 % Sequenzhomologie eine sehr hohe Konservierung der genetischen Information (Read, Brunham et al. 2000). Das Genom von *C. trachomatis* Serovar D ist mit 1.042.519 bp und 894 ORFs (open reading frames) etwa 20 % kleiner als *C. pneumoniae* CWL029 mit 1.230.230 bp und 1073 ORFs. Orthologe zu Genen von *C. trachomatis* konnten für 80 % der kodierenden Sequenzen von *C. pneumoniae* identifiziert werden (Kalman, Mitchell et al. 1999). *C. pneumoniae* enthält 214 proteinkodierende Sequenzen, die bei *C. trachomatis* nicht auftauchen und davon haben 154 keine Homologie zu bisher bekannten bakteriellen Genomen. Viele dieser zusätzlichen Gene sind in der sogenannten Plastizitätszone lokalisiert, die zu einem höheren Ausmaß genetische Reorganisation durchlaufen hat als der Rest des Chromosoms (Read, Brunham et al. 2000).

Ein wesentliches Charakteristikum aller Chlamydien ist ihr biphasischen Entwicklungszyklus, bei dem zwei Differenzierungsprozesse durchlaufen werden, deren Endpunkte durch zwei funktionell und morphologisch unterschiedliche Zelltypen charakterisiert sind. Dabei unterscheidet man das ca. 0,3 μm große und infektiöse, metabolisch inaktive Elementarkörperchen (EB oder elementary body) und das ca. 1 μm große und nicht infektiöse, aber metabolisch aktive Retikularkörperchen (RB oder reticulate body), entstanden als evolutionäre Adaptation an die extra- und intrazelluläre Umgebung. Der chlamydiale Entwicklungszyklus beginnt mit der Adhäsion infektiöser EBs und Aufnahme vermutlich über Rezeptor-vermittelte Endozytose. Anschließend verbleiben die Chlamydien während des gesamten intrazellulären Zyklus im phagosomalen Einschlusskörper (Inklusion), der nicht mit Lysosomen fusioniert (Abb. 3) (Wyrick and Richmond 1989). Im Falle von *C. pneumoniae* beginnt nach 8 h die Differenzierung der EBs in metabolisch aktive RBs, die sich nun durch binäre Teilung vermehren (Wolf, Fischer et al. 2000). Während der Vermehrung sind die Chlamydien auf die Zufuhr zusätzlicher Energie der Wirtszelle in Form von ATP angewiesen, erhöhen die Glukoseaufnahme des Wirtes und beziehen Lipide vom Golgi-Apparat (Ojcius, Degani et al. 1998) (Cocchiario and Valdivia 2009). Nach 48 h beginnt im Falle von *C. pneumoniae* die asynchrone Redifferenzierung von RBs zurück in infektiöse EBs und dies kann morphologisch beobachtet werden (Wolf, Fischer et al. 2000). Der Infektionszyklus von *C. pneumoniae* endet mit der Lyse der Wirtszelle und der Freisetzung infektiöser EBs für eine neue Infektionsrunde nach etwa 84 h (Wolf, Fischer et al. 2000).

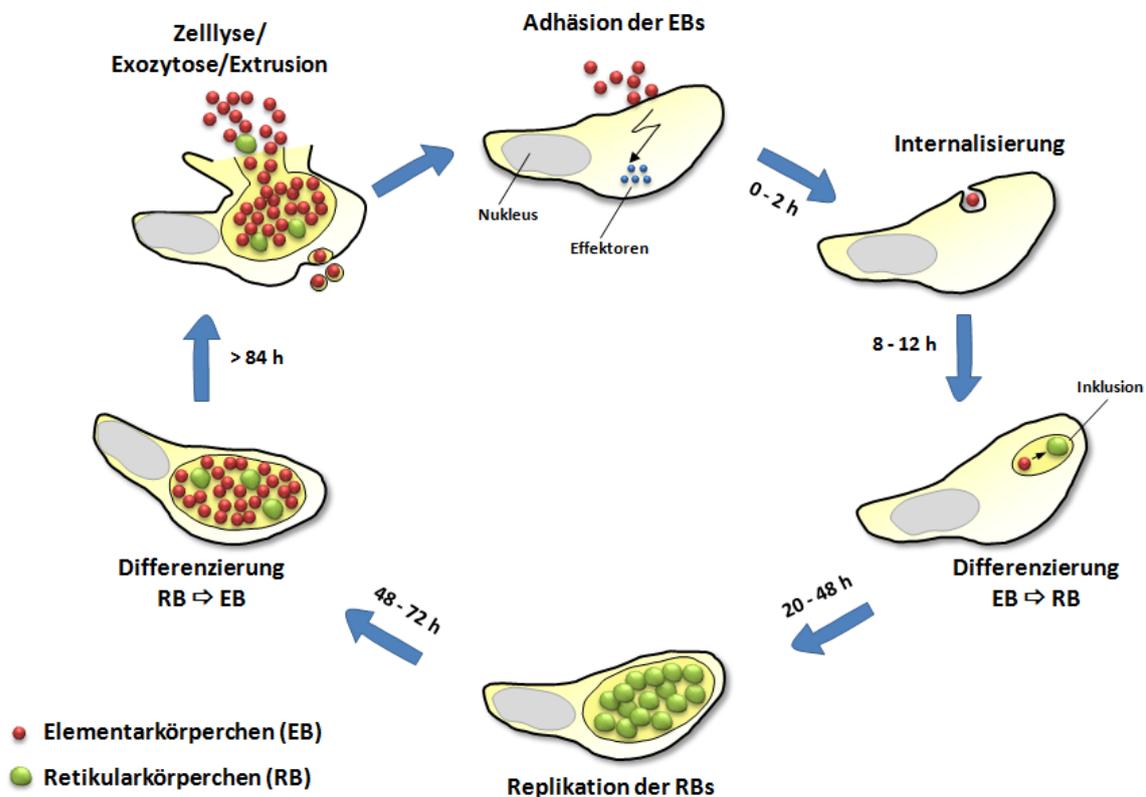


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von *C. pneumoniae*

Die einzelnen Ereignisse sind im Text erklärt und die Zeitangaben beziehen sich auf elektronenmikroskopische Beobachtungen aus (Wolf, Fischer et al. 2000).

1.3.1 Die chlamydiale Adhäsion

Die initiale Interaktion fast aller chlamydialer Stämme mit der Wirtszelle erfolgt durch reversible, elektrostatische Interaktion mittels Heparansulfat ähnlichen Glykosoaminoglykanen (GAG) (Dautry-Varsat, Balana et al. 2004). Es wurde ein trimolekularer Mechanismus für die GAG-abhängige Adhäsion der EBs postuliert, wobei GAGs als Brücke zwischen der EB-Oberfläche und der humanen Wirtszelle dienen (Stephens, Fawaz et al. 2000). Eine Entfernung der GAGs von der EB-Oberfläche oder von Humanzellen sowie eine Vorbehandlung der EBs mit Heparin oder Heparansulfat, führt zu einer signifikanten Infektionsreduktion durch *C. pneumoniae* und zeigt, dass Glykosaminoglykane essentiell für die Infektion sind (Wuppermann, Hegemann et al. 2001) (Beswick, Travelstead et al. 2003). In einem zweiten Schritt erfolgt eine vermutlich irreversible Interaktion von Adhäsinen der unterschiedlichen chlamydialen Spezies mit verschiedenen Wirtszellrezeptoren, was möglicherweise zu den pathologischen Unterschieden beiträgt (Carabeo and Hackstadt 2001). Während *C. pneumoniae* eine Vielzahl von Zelltypen infiziert, ist *C. trachomatis* Serovar E deutlich beschränkt auf Epithelzellen des Urogenitaltraktes (Krull, Maass et al. 2005) (Davis and Wyrick 1997).

1.3.2 Differenzierung der EBs in RBs und Verhinderung der Phago-Lysosomalen Fusion

Phagozytierte EBs weisen ein stark kondensiertes Genom auf, jedoch findet nach 2 h eine Dekondensation statt, resultierend in transkriptionell aktiven Chlamydien (Christiansen, Pedersen et al. 1993) (Shaw, Dooley et al. 2000). Ein Metabolit der Isoprenoid-Biosynthese löst die Interaktion des Histons Hc1 mit der chlamydialen DNA und ermöglicht so die Dekondensation der DNA (Grieshaber, Fischer et al. 2004). Die Differenzierung in RBs beginnt 2 h bzw. 8 h nach der Infektion im Falle von *C. trachomatis* L2 und *C. pneumoniae*. Bei der Differenzierung von EBs in RBs wird vermutlich die Hüllstruktur durch eine Reduktion der Disulfidbrücken cysteinreicher Oberflächenproteine aufgelockert (Hackstadt, Todd et al. 1985). Die frühe Genexpression dient der Expression von Proteinen zur Translokation und Umwandlung von Metaboliten und der Modifikation der Inklusionsmembran mit sog. Inc-Proteinen zur Nährstoffversorgung der Chlamydien im Einschluss (Scidmore-Carlson, Shaw et al. 1999) (Belland, Zhong et al. 2003).

Die Membran der chlamydialen Inklusion spielt eine Schlüsselrolle im intrazellulären Überleben von Chlamydien, da sie einerseits ATP-Zugang erlaubt und andererseits einen physikalischen Schutz gegenüber einer Fusion mit Lysosomen der Wirtszelle darstellt (Eisenberg, Wyrick et al. 1983). Die Chlamydien verhindern aktiv die Fusion des Phagosoms mit den Lysosomen und entgehen so ihrer Zerstörung durch den Wirtszell-Abwehrmechanismus (Scidmore, Rockey et al. 1996). Die Modifikation der Inklusionsmembran spielt eine wichtige Rolle für das intrazelluläre Überleben und unterscheidet sich vermutlich zwischen chlamydialen Spezies. *C. pneumoniae* Inklusionen haben einen kleineren Durchmesser als *C. trachomatis* Inklusionen, enthalten jedoch eine große Zahl an EBs die sehr eng gepackt auftreten (Wolf, Fischer et al. 2000). Durch Infektion mit einer

hohen MOI (multiplicity of infection) an *C. pneumoniae* kommt zur Bildung multipler Inklusionen pro Zelle, da Inklusionen nicht miteinander fusionieren (Wolf, Fischer et al. 2000). Frühe *C. trachomatis* Inklusionen dagegen fusionieren miteinander und können dadurch mehrere EBs enthalten (Wyrick 2000). Bei paralleler Infektion von zwei chlamydialen Spezies wurde keine Fusion der frühen *C. trachomatis* und *C. psittaci* Inklusionen untereinander beobachtet (Matsumoto, Bessho et al. 1991).

1.3.3 Vermehrung der RBs und Inklusionsmodifikation

Die RBs vermehren sich innerhalb der Inklusion während der Replikationsphase, die im Falle von *C. pneumoniae* nach 19 h beginnt und bis etwa 48 h andauert, bis nach 9 – 11 Zellteilungen die Inklusion fast die gesamte Zelle ausfüllt (Wolf, Fischer et al. 2000). Chlamydien interferieren während ihrer intrazellulären Entwicklung mit verschiedenen Wirtszellprozessen. So inhibieren Chlamydien die Apoptose infizierter Wirtszellen durch Degradation proapoptotischer Faktoren ((Rajalingam, Al-Younes et al. 2001). Zudem sekretieren Chlamydien die Protease CPAF (chlamydia proteasome-like activity factor) in das Wirtszellzytoplasma um Transkriptionsfaktoren zu degradieren, die wichtig für die Regulation der Immunantwort sind (Zhong, Fan et al. 2001) (Dong, Sharma et al. 2004). Auch Regulatoren des Membranverkehrs wie Rab GTPasen werden zur Inklusionsmembran rekrutiert und regulieren eventuell die fusogenen Eigenschaften der Inklusion (Abdelrahman and Belland 2005). Die Inklusion von *C. trachomatis* wandert von der Wirtszelloberfläche mit Hilfe des Motorproteins Dynein entlang der Mikrotubuli zum MTOC (microtubule organizing center) und dies führt mit zunehmender Infektionsdauer zu Zentrosomdefekten (Clausen, Christiansen et al. 1997) (Grieshaber, Grieshaber et al. 2003). Zudem induziert *C. trachomatis* eine Defragmentierung des Golgi-Apparates und die Bildung von sog. Golgi-Ministacks um die Inklusion herum, um so einen besseren Zugang zu Wirtzelllipiden zu haben (Heuer, Rejman Lipinski et al. 2009). Zusätzliches Membranmaterial der Wirtszelle (z.B. Sphingolipide) wird durch Rekrutierung von Vesikeln zur Vergrößerung der Inklusionsmembran von den Chlamydien herangezogen (Wolf and Hackstadt 2001).

Aktiv wachsende RBs von *C. trachomatis* sammeln sich an der Inklusionsperipherie und adhären an die Inklusionsmembran, um an benötigte Energie und Nährstoffe der Wirtszelle zu gelangen (Wyrick 2000). Dagegen treten RBs und EBs von *C. pneumoniae* eng gepackt überall in der Inklusion verteilt auf (Wolf, 2000). Für *C. caviae* und *C. trachomatis* wurde die Assoziation von Typ III Sekretionssystem (TTSS)-Projektionen tragenden RBs mit der Inklusionsmembran gezeigt (Hackstadt, Fischer et al. 1997). Für *C. pneumoniae* CWL029 wurden durch in silico Untersuchung von Hydrophobizitätsprofilen 93 Inc-ähnliche ORFs identifiziert (Toh, Miura et al. 2003). Die große Anzahl an Inc-Proteinen lässt vermuten, dass sie eine wichtige Rolle im chlamydialen Wachstum innerhalb der Wirtszelle spielen und sie vermutlich auch über das TTSS in die Inklusionsmembran oder das Wirtszellzytoplasma transloziert werden (Subtil, Parsot et al. 2001). Das IncA-Protein ist möglicherweise beteiligt an der Vesikelfusion, da die Mikroinjektion von IncA-Antikörper während

der frühen *C. trachomatis* Infektion nach 21 h zur Ausbildung multipler kleiner Inklusionen führte (Hackstadt, Scidmore-Carlson et al. 1999).

Eine Antibiotika-Behandlung oder ein durch Gamma Interferon (IFN- γ) induzierter Mangel an Tryptophan in Zellen, resultierte in aberranten und vergrößerten RBs mit verändertem Metabolismus und dem Unvermögen sich in EBs zu re-differenzieren (Beatty, Belanger et al. 1994) (Hogan, Mathews et al. 2004). Dieser Zustand wird als Persistenz bezeichnet und wird mit dem Auftreten chronischer Erkrankungen assoziiert.

1.3.4 Re-Differenzierung von RBs in EBs und Freisetzung der Chlamydien

Die RBs von *C. pneumoniae* produzieren etwa 48 h nach der Infektion vermehrt EB-spezifische Proteine und stellen ihre metabolische Aktivität ein. Signale, die den Endpunkt des Infektionszyklus bestimmen und die Reifung von RBs zurück in infektiöse EBs steuern, sind unbekannt. Jedoch wird eine Kombination aus verschiedenen Ereignissen postuliert, wie der Abnahme von Wirtszellnährstoffen und der Aktivierung von Histon-Proteinen (Wyrick 2000). Eine progressive Ablösung der RBs von der Inklusionsmembran aufgrund abnehmender Wirtszellnährstoffe, könnte eine Erklärung für die Asynchronität in der späten Infektion sein (Peters, Wilson et al. 2007). Es kommt zur Ausbildung einer rigiden Hüllstruktur der äußeren EB-Membran durch Bildung von Disulfidbrücken zwischen cysteinreichen Proteinen, wie durch Inhibitionsstudien mit Penicillin und Ampicillin gezeigt werden konnte (Hackstadt, Todd et al. 1985).

Der Infektionszyklus von *C. pneumoniae* und den *C. trachomatis* Serovaren A – K ist nach etwa 84 - 96 h beendet, während die *C. trachomatis* LGV Serovare sich wesentlich schneller vermehren und bereits nach 48 - 72 h die Zellen verlassen (Wolf, Fischer et al. 2000) (Davis and Wyrick 1997) (Hybiske and Stephens 2007). *C. pneumoniae* vermehrt sich innerhalb der Wirtszelle dabei etwa um den Faktor 1000 (Willger 2004). In einer eleganten Studie wurde gezeigt, dass die Freisetzung von infektiösen EBs, durch Ruptur der Wirtszelle (Exozytose) oder Abschnürung der Inklusionen unter Bewahrung der Intaktheit der Wirtszelle (Extrusion) erfolgen kann (Hybiske and Stephens 2007). Die Extrusionen enthalten Chlamydien umhüllt von Zytoplasma und Plasmamembran, wobei zur Ausbildung der Extrusionen die Aktinpolymerisation sowie N-WASP, Myosin II und Rho-GTPasen benötigen werden, was eine mechanistische Überlappung der Extrusion mit Zytokineseprozessen vermuten lässt (Hybiske and Stephens 2007).

1.4 Adhäsine und Proteinsekretionssysteme Gram-negativer Pathogene

Adhäsine sind spezialisierte bakterielle Oberflächenproteine, die sehr spezifisch mit Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche interagieren, dadurch die bakterielle Kolonisation sowie Infektion vermitteln und so den Zelltropismus des Pathogens bestimmen. Um der Erkennung durch das Immunsystem und einer Phagozytose zu entgehen, exprimieren viele Pathogene Adhäsine auf polymeren Strukturen der Zelloberfläche und dies ermöglicht eine initiale Wirtszell-Interaktion in „sicherer“ Distanz. Adhäsine können dabei in Form pilus-artiger Fimbrien, als Bestandteil von Sekretionsnadeln oder direkt mit der bakteriellen Außenmembran assoziiert, mit spezifischen

Wirtszellrezeptoren oder Komponenten der extrazellulären Matrix (z.B. Proteoglykanen, Kollagen, Laminin) interagieren.

Die Expression von Adhäsionsproteinen auf der Oberfläche Gram-negativer Bakterien erfordert die Funktion von Sekretionssystemen (Typ I – VI). Dadurch wird eine Durchquerung der inneren Membran, des Periplasmas und der äußeren Membran ermöglicht und es wird zwischen Sec-abhängiger und Sec-unabhängiger Sekretion unterschieden (Gerlach and Hensel 2007). Im Falle der Typ I, III und IV Sekretion werden Proteine direkt vom bakteriellen Zytoplasma in die extrazelluläre Umgebung transportiert. Bei der Typ II und V Sec-abhängigen Sekretion werden Proteine über eine N-terminale Signalsequenz in das Periplasma transportiert und prozessiert. Bei der Typ II Sekretion wird nun ein Kanalkomplex in der äußeren Bakterienmembran gebildet, durch den ein Protein transportiert wird. Bei der Typ V Sekretion (Autotransporter) ermöglicht das Protein seine eigene Sekretion, indem die C-terminale Tranlokationseinheit eine β -barrel Struktur in die Außenmembran bildet, durch die eine N-terminale Passagierdomäne transportiert wird. Das Typ III Sekretionssystem (TTSS) wurde nur in Gram-negativen Bakterien (z.B. *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*) gefunden. Das TTSS ist eine komplexe Assemblierung von mehr als 20 Proteinen und ermöglicht die Sekretion von Effektorproteinen direkt in das Wirtszellzytoplasma. Aufgrund der Form und Fähigkeit in Zellkontakt-abhängiger Weise Proteine zu translozieren wird es auch als „Injektisom“ oder „molekulare Nadel“ bezeichnet (Cornelis 2006).

Uropathogene *E. coli* (UHEC) verfügen über bis zu 1 μm lange Pili, an deren Spitze sich das Adhäsion PapG befindet und an Zucker von Glykolipiden der Wirtszelle bindet (Abb. 3). Das Intimin/Tir System repräsentiert einen einzigartigen Mechanismus, bei dem enteropathogene *E. coli* (EPEC) das Protein Tir (translozierter Intimin Rezeptor) mittels TTSS sekretieren. Tir wird in die Wirtszellmembran integriert, dimerisiert und dient als Rezeptor für das bakterielle Membranprotein Intimin (Pizarro-Cerda and Cossart 2006). Die Tir/Intimin Interaktion führt zu einer Phosphorylierung von Tir durch die Kinasen Fyn und Abl, zur Rekrutierung von N-WASP und des Arp2/3 Komplexes und resultiert in Bakterien-assoziiertes lokales Aktinpolymerisation. Zahlreiche Pathogene interagieren mit Wirtszellrezeptoren nicht nur zur Adhäsion, sondern auch um das Aktinzytoskelett zu modulieren und so die Invasion zu begünstigen.

Das erste beschriebene bakterielle Invasionsprotein ist das integrale Membranprotein Invasin aus *Y. pseudotuberculosis*, welches mit hoher Affinität an Vertreter der β 1-Integrin Familie bindet (Isberg and Leong 1990). Invasin besteht aus N-terminalen β -barrel Membrananker, 4 Domänen der Ig Superfamilie (D1-D4) und der strukturell zu den Lektinen gehörenden D5 Domäne (Abb. 3) (Niemann, Schubert et al. 2004). YadA ist ein trimeres Autotransporter Adhäsion (TAA) von *Yersinia*, besteht aus einem C-terminalen Membrananker, einem Serotyp-spezifischen langen Stiel und einem N-terminalen lollipop-förmigen Kopf, mit dem es an Kollagen, Laminin und Fibronectin der extrazellulären Matrix bindet (Abb. 3) (Gerlach and Hensel 2007). Das filamentöse Hämagglutinin (FHA) von *Bordetella pertussis* existiert in Membran-gebundener Form und durch die Aktivität der SphB1-Protease liegt auch ein großer Teil des Proteins in sekretierter Form vor

(Abb. 3). Das Typ I sekretierte Protein LapA ist mit ca. 900 kDa das bislang größte sekretierte Adhäsın.

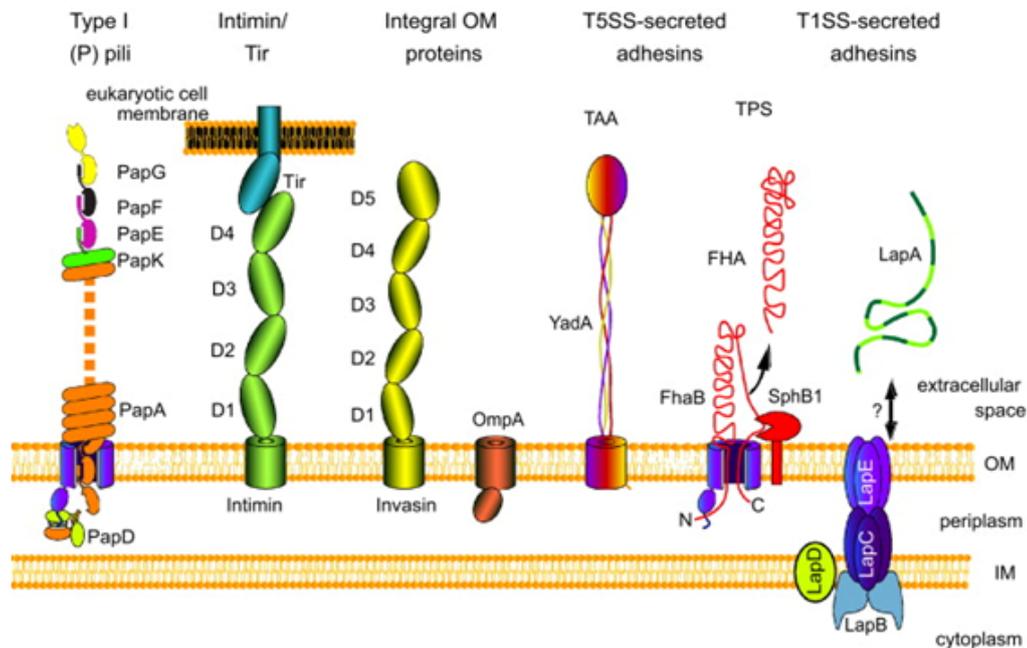


Abbildung 3: Hauptklassen adhäsiver Proteine auf der Oberfläche Gram-negativer Bakterien

Entnommen aus (Gerlach and Hensel 2007).

Hypothesen wie sekretierte Proteine eine Adhäsion vermitteln existieren, jedoch sind sie noch nicht experimentell belegt. Ein sekretiertes Adhäsın könnte an einen humanen Rezeptor binden und durch parallele Interaktion mit bakteriellen Oberflächenstrukturen eine Brückenfunktion ausüben (Gerlach and Hensel 2007). Denkbar wäre auch wie im Falle des FHA, dass ein Protein in sekretierter und oberflächenassoziiierter Form vorliegt, wobei Oberflächen-gebundenes Protein nun direkt an die Wirtszelle adhärert oder mit dem sekretierten Protein interagiert.

Damit ein sekretiertes oder an der bakteriellen Membran verankertes Protein ein *bona fide* Adhäsın darstellt, muss es verschiedene Kriterien erfüllen. Das aufgereinigte Protein sollte in einer spezifischen und saturierenden Art und Weise an Wirtszellen binden, denn Sättigung deutet darauf hin, dass es einen spezifischen Rezeptor in einer endlichen Anzahl gibt. Die Bindekonstante für die Interaktion sollte in einer plausiblen Größenordnung und die Konzentration in einer *in vivo* Situation erreichbar sein (Nougayrede, Fernandes et al. 2003). Weiterhin sollte durch Inhibition der Ligand-Rezeptor Interaktion die Bindung der Mikroorganismen an die Wirtszelle negativ beeinflusst sein.

1.5 Zelluläre Adhäsion und Invasion humanpathogener Bakterien

Für die erfolgreiche Etablierung einer Infektion induzieren pathogene invasive Bakterien ihre eigene Phagozytose und haben ein Repertoire an Strategien evolviert, um in unterschiedliche Zell- und Gewebetypen des Wirts einzudringen, der Immunantwort des Wirts zu entgehen, den Wirt zu

schädigen, sich in der Wirtszelle zu multiplizieren und sich von Zelle zu Zelle zu verbreiten. Bei der Invasion können mehrere Zellschichten durchdrungen werden, um so auch tiefere Gewebeschichten und Organe des Wirts zu infizieren. Zur Gruppe der obligat intrazellulären Bakterien, die extrazellulär nicht überleben und völlig abhängig von der Wirtszellmaschinerie sind, gehören Chlamydien, Rickettsien und Mykoplasmen. Zur Gruppe der fakultativ intrazellulären Bakterien, die sowohl intrazellulär als auch extrazellulär überleben können, gehören Shigellen, Salmonellen, Yersinien, Listerien und pathogene *E. coli* Stämme. Mittels bakterieller Oberflächenproteine wird die Adhäsion und Internalisierung vermittelt sowie eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts induziert. Hierbei lassen sich die unterschiedlichen Invasionsmechanismen von Bakterien in den „Zipper“ und „Trigger“-Mechanismus einteilen (Cossart and Sansonetti 2004).

Der von *Yersinia* und *Listeria* verwendete „Zipper“-Mechanismus beginnt mit der Adhäsion bakterieller Liganden an Rezeptoren der Wirtszelle. Dadurch ausgelöste transiente Signale führen zur Aktinpolymerisation, Membrandeformation an der Eintrittsstelle und der Abschnürung des Phagosoms (Cossart and Sansonetti 2004). *Yersinia pseudotuberculosis* verursacht Gastroenteritis und dringt dabei in humane intestinale Epithelzellen ein. Die Adhäsine Invasin und YadA interagieren direkt sowie indirekt über Fibronectin mit dem β_1 -Integrin Rezeptor. Dies führt zur Aktivierung eines Rac1-abhängigen Signaltransduktionsweges und benötigt multiple Kinasen wie FAK (focal adhesion kinase), c-Src, PI3 und deren downstream Effektoren Akt und Phospholipase C γ 1 (Abb. 3 A) (Uliczka, Kornprobst et al. 2009). *Listeria monocytogenes* internalisiert in nicht-phagozytotische Zellen durch Kombination von zwei Signalwegen (Pizarro-Cerda and Cossart 2006). Mit dem Oberflächenprotein Internalin A bindet *Listeria* an das Glykoprotein E-Cadherin, welches über α - und β -Catenin mit dem Aktinzytoskelett verankert ist, wobei zusätzlich über Myosin VIIA die Kontraktionskraft für die Phagozytose generiert wird (Abb. 3 D) (Bonazzi, Lecuit et al. 2009). Das nur schwach mit der Zellwand assoziierte Internalin B bindet die transmembrane Rezeptor-Tyrosinkinase Met. Dies führt zur Rekrutierung von Adaptermolekülen wie der PI3-Kinase sowie der Induktion Aktin-reicher Membranausstülpungen, und ermöglicht so die Endozytose über einen Clathrin-abhängigen Mechanismus (Abb. 3 E) (Bonazzi, Lecuit et al. 2009).

Der von *Salmonella* und *Shigella* verwendete „Trigger“-Mechanismus beruht auf der Herstellung des Kontaktes zwischen Bakterium und der epithelialen Wirtszelle über das Typ III Sekretionssystem (TTSS) und findet in vier sukzessiven Stufen statt (Cossart and Sansonetti 2004). In der Prä-Interaktionsstufe assoziieren im bakteriellen Zytoplasma die Effektorproteine mit ihren zugehörigen Chaperonen. In der Interaktionsstufe kommt es zur Rezeptorinteraktion an Membrandomänen, die mit Lipiden und Signalmolekülen angereichert sind sowie zur Ausbildung einer Translokationspore, durch die Effektoren in die Wirtszelle geschleust werden. Nun erfolgt die Bildung einer makropinozytotischen Tasche durch Ausbildung filopodiale und lamellipodiale Strukturen unter Reorganisation des Aktinzytoskeletts an der Eintrittsstelle. Abschließend kommt es zu einer Depolymerisation des Aktins und Abschnürung des Phagosoms, in dem eine Vermehrung des Erregers stattfinden kann (Cossart and Sansonetti 2004).

Bei *Salmonella* inserieren die Proteine SipB und SipC in die Wirtszellplasmamembran und bilden eine Translokationspore durch die Effektorproteine geschleust werden. Dadurch kann SipA durch Blockierung des Aktindepolymerisationsfaktors Cofilin, SipC durch direkte Aktinpolymerisation, sowie SopB, SopE und SopE2 durch Aktivierung von Signalkaskaden (z.B. Rho GTPasen) das Aktinzytoskeletts für die Endozytose manipulieren (Abb. 3 B) (Schlumberger and Hardt 2006).

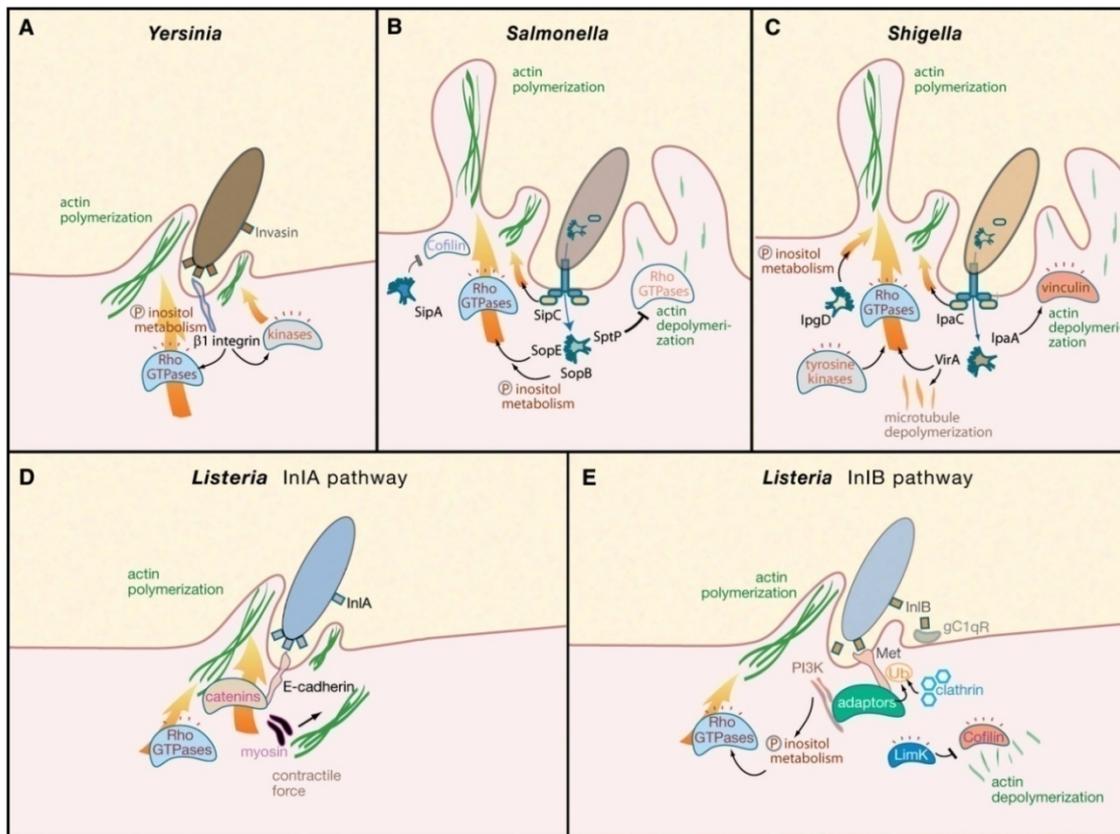


Abbildung 4: Invasionsstrategien verschiedener pathogener Bakterien

Gezeigt sind die Invasionsstrategien von *Yersinia* und *Listeria* über den "Zipper"-Mechanismus und von *Salmonella* und *Shigella* über den "Trigger"-Mechanismus. Entnommen aus (Pizarro-Cerda and Cossart 2006).

Shigella interagiert über das TTSS-Protein IpaB mit den Rezeptoren CD44 und $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin und die translozierten Effektoren IpaC und IpgB1 initiieren die Aktinnukleation, Rac1 und Cdc42 Stimulation sowie die Ausbildung von Filopodien (Abb. 3 C) (Schroeder and Hilbi 2008). IpgD beeinflusst den Phosphoinositid-Metabolismus und unterstützt die Ausbildung von Membrandeformationen, während IpaA das Wirtszellprotein Vinculin aktiviert, Aktindepolymerisation induziert und für eine Wiederherstellung der Plasmamembranarchitektur sorgt (Pizarro-Cerda and Cossart 2006). Nach der Invasion verbleiben die Bakterien entweder im Phagosom (z.B. *Salmonella*, *Chlamydia*) oder verlassen das Phagosom und vermehren sich im Zytosol der Wirtszelle (z.B. *Shigella*, *Listeria*, *Rickettsia*) (Cossart and Sansonetti 2004).

1.6 Die chlamydiale Adhäsion und beteiligte Wirtszellrezeptoren

Die initiale Interaktion fast alle chlamydialer Stämme mit der Wirtszelle erfolgt durch reversible, elektrostatische Interaktion mittels Heparansulfat ähnlichen Glykosoaminoglykanen (GAG)

(Dautry-Varsat, Balana et al. 2004). Es wurde ein trimolekularer Mechanismus für die GAG-abhängige Adhäsion der EBs postuliert, wobei GAGs als Brücke zwischen der EB-Oberfläche und der humanen Wirtszelle dienen (Stephens, Fawaz et al. 2000). Eine Entfernung der GAGs von der EB-Oberfläche oder von Humanzellen sowie eine Vorbehandlung der EBs mit Heparin oder Heparansulfat, führt zu einer signifikanten Infektionsreduktion durch *C. pneumoniae* und zeigt, dass Glykosaminoglykane essentiell für die Infektion sind (Wuppermann, Hegemann et al. 2001) (Beswick, Travelstead et al. 2003). In einem zweiten Schritt erfolgt eine vermutlich irreversible Interaktion von Adhäsinen der unterschiedlichen chlamydialen Spezies mit verschiedenen humanen Wirtszellrezeptoren, was möglicherweise zu den pathologischen Unterschieden beiträgt (Carabeo and Hackstadt 2001).

Als erstes chlamydiales Adhäsion wurde das OmcB-Protein identifiziert, welches mit Heparin-ähnlichen Glykosaminoglykanen auf der Wirtszelle interagiert (Abb. 4) (Moelleken and Hegemann 2008). Neben OmcB werden weitere Proteine wie MOMP (major outer membrane proteins), GroEL1 (Hsp60) und DnaK (Hsp70) für die Adhäsion in Betracht gezogen. Rekombinantes MOMP von *C. trachomatis* bindet an Heparansulfat-Strukturen der Wirtszelle und eine N-Glykosylierung des Proteins ist dabei wichtig für die Adhäsion und Infektion der Chlamydien (Su, Raymond et al. 1996) (Kuo, Lee et al. 2004). Für das *C. pneumoniae* Chaperon GroEL1 wurde eine Oberflächenlokalisation auf EBs und Adhäsion an Humanzellen gezeigt (Wuppermann, Molleken et al. 2008). Antikörper gegen *C. trachomatis* DnaK neutralisieren die Infektion, jedoch konnte eine Assoziation mit der Außenmembran von EBs sowie die Oberflächenzugänglichkeit nur nach Reduktion der Disulfidbrücken zwischen Außenmembranproteinen nachgewiesen werden (Danilition, Maclean et al. 1990) (Raulston, Davis et al. 2002).

Bei der Suche nach möglichen Wirtszellrezeptoren wurden Experimente mit mutagenisierten CHO6-Zellen durchgeführt, die einen Defekt in der Prozessierung der Protein Disulfid Isomerase (PDI) aufweisen und eine Beteiligung der PDI an einer effektiven Adhäsion sowie Infektion mit *C. trachomatis* und *C. psittaci* zeigen (Conant and Stephens 2007). PDI ist beteiligt an Thiol-Disulfid Austauschreaktionen und interagiert mit Komponenten des Östrogenrezeptors, sodass PDI einen Rezeptor sowie ein universeller Trigger für die Reduktion des stark über Disulfidbrücken quervernetzten cOMCs der EBs darstellen könnte (Davis, Raulston et al. 2002) (Conant and Stephens 2007). *C. pneumoniae* interagiert mit dem Mannose-6-Phosphat Rezeptor und die Beteiligung des Rezeptors an der Aufnahme der Chlamydien zeigt Spezies-spezifische Unterschiede (Puolakkainen, Kuo et al. 2005).

Ein RNA-Interferenz Screen in *Drosophila melanogaster* S2 Zellen identifizierte PDGFR β (platelet-derived growth factor receptor) als möglichen Rezeptor bei der *C. trachomatis* Infektion, da eine Inhibition von PDGFR β durch RNA-Interferenz sowie durch neutralisierende Antikörper die Bindung der EBs signifikant reduzierte (Elwell, Ceesay et al. 2008). Bei Infektionen von humanen glatten Muskelzellen aus der Aorta (AoSMC) mit *C. pneumoniae* wurde eine reduzierte Synthese von PDGFR β beobachtet und dies könnte zu verringerter AoSMC-Proliferation in arteriosklerotischen Plaques führen (Coombes, Chiu et al. 2002) (Rodel, Lehmann et al. 2007).

Eine indirekte Interaktion von Heparansulfat-ähnlichen GAGs mit PDGFR β wäre denkbar, da PDGF (platelet-derived growth factor) spezifisch an Glykosaminoglykane bindet (Garcia-Olivas, Hoebeke et al. 2003). Die Beteiligung Cholesterol-reicher Lipidmikrodomänen (Lipid-Rafts) an Bindung und Internalisierung intrazellulärer Bakterien wurde gezeigt und 5 h nach der Infektion sind chlamydiale Inklusionen angereichert mit Lipid-Rafts (Lafont and van der Goot 2005) (Jutras, Abrami et al. 2003). Lipid-Rafts sind charakterisiert durch einen hohen Anteil an Cholesterol, Glykosphingolipiden sowie Molekülen involviert in der Signaltransduktion (Helms and Zurzolo 2004) (Dautry-Varsat, Balana et al. 2004). *C. trachomatis* L2 und *C. caviae* GPIC sind assoziiert mit Lipid-Rafts an der Wirtszelloberfläche und die Zerstörung der Lipid-Rafts durch Depletion von Cholesterin inhibierte die Internalisierung, jedoch nicht die Bindung der Chlamydien (Jutras, Abrami et al. 2003) (Gabel, Elwell et al. 2004).

Das humane Apolipoprotein E4 fördert die Bindung von *C. pneumoniae*, aber nicht *C. trachomatis* EBs an Humanzellen und könnte einen Zusammenhang zwischen *C. pneumoniae* Infektionen und dem Auftreten von Alzheimer und Arteriosklerose unterstützen (Gerard, Fomicheva et al. 2008).

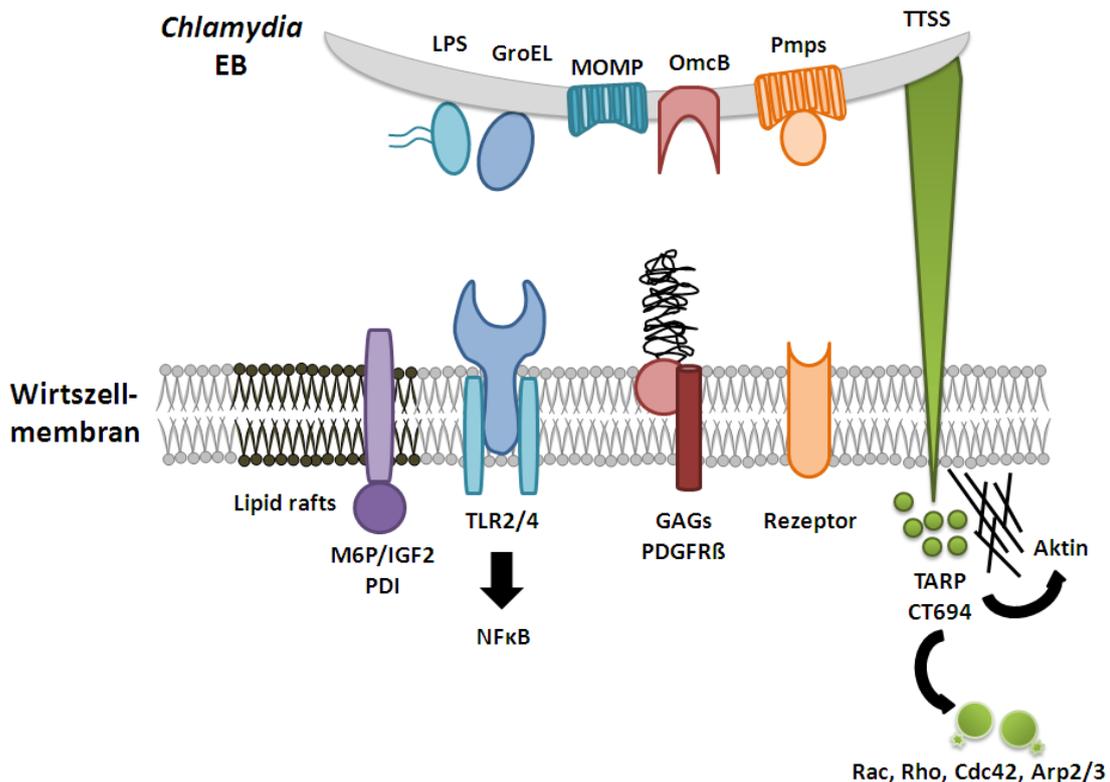


Abbildung 5: Modell der Interaktionen chlamydialer EBs mit der epithelialen Wirtszelle

Die initiale Interaktion der meisten chlamydialen Spezies mit der Wirtszelle ist eine reversible elektrostatische Interaktion mit Heparansulfat-ähnlichen Glykosaminoglykanen (GAGs) der Zelloberfläche. Es folgen irreversible Interaktionen mit Wirtszellrezeptoren die vermutlich in Cholesterol-reichen Membrandomänen (lipid rafts) lokalieren. Nach Bindung der Chlamydien werden Signalwege aktiviert die zur Internalisierung der EBs führt. Parallel werden Effektormoleküle wie TARP oder CT694 über das Typ III Sekretionssystem (TTSS) in die Wirtszelle sekretiert, dies führt zur Aktivierung von GTPasen (z.B. Rac, Rho), zur Phosphorylierung von Wirtszellproteinen und der Polymerisation sowie Rekrutierung von Aktin zur Eintrittsstelle.

M6P/IGF2 = Mannose-6-Phosphat/Insulin-like growth factor 2 receptor

PDI = Protein-Disulfid-Isomerase

PDGFR β = Platelet-derived growth factor receptor β

Die Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigen die Induktion von Mikrovilli der Wirtszellmembran durch Bindung von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* EBs und der Tyrosin-Phosphorylierung von Wirtszellproteinen (Wolf, Fischer et al. 2000) (Carabeo, Grieshaber et al. 2002). Innerhalb weniger Minuten kommt es zur Anhäufung von Lipid-Rafts und Aktinpolymerisierung an der Bindungsstelle der Chlamydien (Dautry-Varsat, Balana et al. 2004). Dies wird begleitet von einer Remodulierung des Aktin-Zytoskeletts durch Aktivierung der GTPasen Rac, Rho und Cdc42 (Carabeo, Dooley et al. 2007) (Dautry-Varsat, Balana et al. 2004). Durch die Assoziation phosphorylierter Proteine mit Komponenten des Zytoskeletts, könnte dies die Internalisierung der Chlamydien durch Generierung einer Interaktion zwischen Rezeptor und Aktinzytoskelett der Wirtszelle begünstigen (Swanson, Crane et al. 2007). Eine Zerstörung des Aktinzytoskeletts durch Cytochalasin D verhindert die Internalisierung, aber nicht die Adhäsion von *C. trachomatis* L2 + D, *C. caviae* und *C. pneumoniae* (Boleti, Benmerah et al. 1999) (Carabeo, Grieshaber et al. 2002). Bei der durch *C. trachomatis* L2 induzierten Aktinrekrutierung wird eine Signaltransduktionskaskade aktiviert, bestehend aus Rac und den downstream Effektoren WAVE2 und Abi-1. Dies führt zur Aktivierung des Arp2/3 Komplexes, der essentiell für die Nukleation sowie Polymerisierung des Aktins ist (Carabeo, Dooley et al. 2007). Die Internalisierung von *C. trachomatis* könnte durch direkte Interaktion der EBs mit dem Rezeptor PDGFR β erfolgen und es so zu einer Aktivierung der Abi Kinase kommen. Dies führt dann zur Phosphorylierung des Rac Guanidin Nukleotid Austauschfaktors Vav2 und den Aktinnukleatoren WAVE2 und Cortactin (Elwell, Ceesay et al. 2008).

Das bislang einzige chlamydiale Protein mit einer Funktion in der Aktinmodulierung ist das *C. trachomatis* Tarp (translocated actin-recruiting phosphoprotein), welches vermutlich über das Typ III Sekretionssystem in die Wirtszelle transloziert wird und zur Rekrutierung von Aktin an die EB-Eintrittszelle führt (Clifton, Fields et al. 2004) (Clifton, Dooley et al. 2005). Tarp führt zur Nukleation von Aktin und wird Spezies-spezifisch durch multiple Wirtszellkinasen phosphoryliert, wobei die Phosphorylierung nicht essentiell für die Aufnahme von *C. trachomatis* ist (Clifton, Dooley et al. 2005) (Jewett, Fischer et al. 2006) (Lane, Mutchler et al. 2008). Das zu Tarp homologe Protein in *C. pneumoniae* Cpn0572 wird nicht Tyrosin-phosphoryliert und hat vermutlich eine duale Funktion, denn es führt zur Aktinnukleation und Stabilisierung von Aktinfilamenten durch Konkurrenz mit Cofilin, einem Depolymerisationsfaktor von F-Aktin (Clifton, Dooley et al. 2005) (Zrieq 2009). Für das *C. trachomatis* Protein CT694 konnte eine heterologe Expression in *Y. pseudotuberculosis* über einen TTSS-abhängigen Mechanismus gezeigt werden, sowie die Interaktion mit dem humanen AHNK-Protein, welches als Gerüstprotein in membranassoziierten Signalwegen dienen könnte (Hower, Wolf et al. 2009).

Die Bindung von *C. pneumoniae* führt durch Reorganisation der Wirtszellmembran zur Bildung von Mikrovilli. Dies ist temporär gekoppelt mit einer MEK (mitogen-activated protein kinase) vermittelten Aktivierung von ERK1/2 (extracellular-signal regulated kinase). Das Auftreten intrazellulärer Chlamydien nach 40 min koinzidiert mit einer PI3K (phosphoinositide-3-kinase) vermittelten Aktivierung der Akt-Kinase, welche an zellulären Prozessen wie Proliferation und Apoptose beteiligt ist (Coombes and Mahony 2002). Die für die effiziente Aufnahme der

Chlamydien notwendigen Änderungen des Zytoskeletts könnten auch durch Phosphorylierung von FAK (focal adhesion kinase) erfolgen. Somit lässt sich für die effiziente Invasion von *C. pneumoniae* ein biphasisches Ereignis spekulieren, wobei es nach initialer EB-Adhäsion zu einer Aktivierung von Wirtszellrezeptoren kommt und so die PI3K und MEK-ERK Signalwege initiiert werden, welche zur Aktinpolymerisation führen (Coombes and Mahony 2002).

1.6.1 Der chlamydiale Außenmembrankomplex (cOMC)

Chlamydiale EBs besitzen eine für Gram-negative Bakterien charakteristische Membranarchitektur, bestehend aus einer inneren und äußeren Membran, die durch einen periplasmatischen Raum voneinander getrennt sind (Everett and Hatch 1995). EBs sind aufgrund einer starken Quervernetzung von Cystein-reichen Außenmembranproteinen osmotisch stabil. Diese vernetzte Struktur wird als chlamydialer Außenmembrankomplex (cOMC) bezeichnet und bildet so ein funktionelles Äquivalent zu Peptidoglykan (PG) (McCoy and Maurelli 2006). Penicillin und andere β -Laktame inhibieren chlamydiales Wachstum und führen zu großen und aberranten RBs (Ghuysen and Goffin 1999). Alle sequenzierten *Chlamydiaceae* Genome enthalten Gene zur PG-Synthese, jedoch konnte Peptidoglykan weder in RBs noch EBs nachgewiesen werden und dieser Widerspruch wird daher als „chlamydiale Anomalie“ bezeichnet (Abdelrahman and Belland 2005) (Pavelka 2007). RBs sind osmotisch fragil, existieren nur in der membranumhüllten Inklusion, die als isotonische Nische dienen könnte und enthalten weniger quervernetzte Membranproteine, sodass Peptidoglykan vermutlich in replizierenden RBs wichtig ist (McCoy and Maurelli 2006). Es wird vermutet, dass sich der cOMC hauptsächlich aus den Proteinen MOMP, OmcB und OmcA zusammensetzt, die eine supramolekulare Struktur bilden (Everett and Hatch 1995) (Fadel and Eley 2007). Als zusätzliche an der Adhäsion beteiligte Proteine werden weitere Komponenten des chlamydialen Außenmembrankomplexes (cOMC) in Betracht gezogen (Su, Watkins et al. 1990) (Ting, Hsia et al. 1995).

Wie auch andere Gram-negative Bakterien besitzen Chlamydien ein in der äußeren Membran verankertes Genus-spezifisches Lipopolysaccharid (LPS), welches endotoxische Aktivität aufweist und durch Interaktion mit Toll-like Rezeptoren (TLR) als Stimulator der angeborenen Immunität gilt (Nurminen, Leinonen et al. 1983) (Heine, Muller-Loennies et al. 2003). Das LPS von *C. trachomatis* L1 vermittelt über TLR2 eine Aktivierung des NF κ B-Signalweges und auch die *C. pneumoniae* Infektion ausgelöste frühe Immunantwort hängt von TLR2 ab (Erridge, Pridmore et al. 2004) (Netea, Kullberg et al. 2002; Rodriguez, Wantia et al. 2006).

1.6.1.1 Major outer membrane protein (MOMP)

Ein Cystein-reiches 40 kDa Protein, das bei allen Human- und Tierpathogenen chlamydialen Spezies vorhanden ist und 60 % des cOMC ausmacht, ist das major outer membrane protein (MOMP) (Raulston 1995). Das MOMP Protein in *C. trachomatis* verfügt über 5 konstante und 4 variable Domänen (VD1-4) deren Sequenzen zwischen chlamydialen Serovaren variieren und so eine Einteilung in verschiedene *C. trachomatis* Serotypen ermöglicht (Baehr, Zhang et al. 1988)

(Su, Morrison et al. 1990). Für *C. trachomatis* wurde ein Epitop der variablen Domäne VD1 von MOMP als oberflächenlokalisiert sowie stark immunodominant beschrieben und eine Immunisierung mit Antikörper gegen das MOMP von *C. trachomatis* MoPn schützte Mäuse vor einer chlamydialen Infektion (Zhong and Brunham 1990) (Pal, Bravo et al. 2008). Nur für das *C. trachomatis* Serovar B wurde in Neutralisationsstudien gezeigt, dass MOMP am Adhäsionsprozess der Chlamydien beteiligt sein könnte (Su, Watkins et al. 1990). In verschiedenen *C. pneumoniae* Stämmen sind die für MOMP-kodierenden Gene identisch und damit konserviert (Jantos, Heck et al. 1997). Für das *C. pneumoniae* MOMP konnte keine Adhäsion an Humanzellen gezeigt werden, da vermutlich die notwendige Glykosylierung fehlt (Mölleken 2005). Epitope des *C. pneumoniae* MOMP sind oberflächenlokalisiert jedoch schwächer immunogen als MOMP von *C. trachomatis* und *C. psittaci*, wobei VD2 und VD3 als spezies-spezifische Domänen identifiziert wurden (Campbell, Kuo et al. 1990) (Wolf, Fischer et al. 2001) (Klein, Kotz et al. 2003). Natives *C. psittaci* MOMP oligomerisiert, führte bei Integration in eine planare Lipiddoppelschicht zur Ausbildung von Poren, durch die ATP transportiert wird und diese porenbildende Eigenschaft konnte auch für rekombinantes *C. pneumoniae* MOMP gezeigt werden (Wyllie, Ashley et al. 1998) (Wyllie, Longbottom et al. 1999). Aus *C. muridarum* EBs wurde MOMP als natives Trimer mit prädominanter β -Faltblatt-Struktur isoliert, dass auch als Porin mit einer Porengröße von ca. 2 nm fungiert, jedoch nicht über Disulfidbrücken mit den homologen Proteinen zu OmcB und OmcA verlinkt ist (Sun, Pal et al. 2007).

1.6.1.2 Outer membrane complex protein B (OmcB)

Das Cystein-reiche 60 kDa OmcB-Protein ist das zweithäufigste Protein der chlamydialen Außenmembran und mit 70 – 80 % Identität unter den chlamydialen Spezies hoch konserviert (Fadel and Eley 2007) (Moelleken and Hegemann 2008). Lokalisationsstudien sind bislang nicht für alle chlamydialen Spezies eindeutig, da OmcB sowohl im Periplasma als auch auf der Oberfläche von *C. pneumoniae* EBs beschrieben ist (Watson, Lambden et al. 1994) (Stephens, Koshiyama et al. 2001) (Moelleken and Hegemann 2008). OmcB ist ein starkes Antigen und 95 % aller Patienten mit nachgewiesener *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* Infektion weisen OmcB-Antikörper auf, was die Oberflächenlokalisierung unterstützt (Cunningham and Ward 2003) (Portig, Goodall et al. 2003). In unabhängigen Studien wurde durch Verwendung von rekombinantem Protein sowie neutralisierenden Antikörpern das OmcB von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* als oberflächenlokalisiertes Adhäsion identifiziert, welches durch ein Heparin-Bindemotiv mit Glykosaminoglykanen der Wirtszelle interagiert und so möglicherweise die spezifische Interaktion weiterer Adhäsine mit entsprechenden Wirtszellrezeptoren ermöglicht (Fadel and Eley 2007) (Moelleken and Hegemann 2008). Zudem konnte eine Aminosäure im Heparinbindemotif des OmcB-Proteins der *C. trachomatis* Serovare E und L1 identifiziert werden, die für eine Heparin-abhängige bzw. Heparin-unabhängige Bindung verantwortlich ist (Moelleken and Hegemann 2008).

1.6.1.3 GroEL1, polymorphe Membranproteine und PorB

GroEL1 (Hsp60) wurde als Chaperon aufgrund von Homologie zum Hitzeschockprotein GroEL von *E. coli* identifiziert und als oberflächenlokalisiertes Protein beschrieben (Raulston, Paul et al. 1998) (Wuppermann, Molleken et al. 2008). Rekombinantes *C. pneumoniae* GroEL1 kann die Translokation des Transkriptionsfaktor NF- κ B in den Kern aktivieren, sodass intrazelluläre Signalwege durch initialen Kontakt chlamydialer Partikel ausgelöst werden können (Wuppermann, Molleken et al. 2008). In serologischen Studien tritt GroEL1 als immundominantes Antigen in Erscheinung und der Antikörpernachweis gegen *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* GroEL1 wird mit unterschiedlichen Krankheiten in Verbindung gebracht (Peeling, Bailey et al. 1998) (Jantos, Krombach et al. 2000). GroEL1 zeigt stimulatorische Effekte auf verschiedene Zelltypen und dies erfolgt über Assoziation mit TLR2 und TLR4 Rezeptoren, was eine Aktivierung verschiedener Signalkaskaden zur Folge hat (Sasu, LaVerda et al. 2001) (Costa, Kirschning et al. 2002) (Bulut, Faure et al. 2002).

Durch vergleichende bioinformatische Genomanalysen wurde eine einzigartige Proteinfamilie des cOMC identifiziert, die polymorphen Membranproteine (Pmps), die in *C. pneumoniae* aus 21 Pmps und in *C. trachomatis* aus 9 Pmps besteht (Henderson and Lam 2001). Gemeinsam haben alle Pmps die charakteristischen repetitiven Motive GGA(I,L,V) und FxxN im N-terminalen Bereich sowie eine konservierte β -barrel Struktur im C-terminalen Bereich. Aufgrund weiterer Kriterien gehören Pmp-Proteine zur Gruppe der Autotransporter (Henderson and Lam 2001). Autotransporter sind modular aufgebaut und besitzen die 3 Domänen Signalsequenz, Passagierdomäne und Translokationseinheit, um durch autokatalytische Aktivität die eigene Translokation ins extrazelluläre Milieu zu bewerkstelligen (Henderson, Navarro-Garcia et al. 1998). Für verschiedene *C. pneumoniae* Pmps wurde eine Oberflächenlokalisierung gezeigt sowie die Ausschüttung proinflammatorischer Faktoren nach Aktivierung des NF κ B-Signalweges durch rekombinantes Pmp20 und Pmp21 nachgewiesen (Vandahl, Pedersen et al. 2002) (Niessner, Kaun et al. 2003). Das *C. pneumoniae* Pmp21 zeigt Adhäsion an Humanzellen, Antikörper gegen Pmp21 reduzieren die Infektion signifikant und das Protein ist vermutlich am Internalisierungsprozess der Chlamydien beteiligt, wobei die repetitiven Motive eine prominente Rolle spielen (Wehr, Brinkmann et al. 2004) (Schmidt 2009). Das zu Pmp21 homologe *C. trachomatis* PmpD wird posttranslational prozessiert und existiert als oberflächenassoziiertes Oligomer auf den Chlamydien und wird als lösliche Form vermutlich in das Inklusionslumen sekretiert (Swanson, Taylor et al. 2009) (Kiselev, Skinner et al. 2009).

Das 39 kDa Protein Porin B (PorB) wurde durch Sequenzvergleich als hoch konserviert in allen chlamydialen Spezies identifiziert und zeigt mit 20 % nur eine geringe Homologie zu MOMP. PorB stellt ein oberflächenlokalisiertes Protein des cOMC dar, welches Poren in die Außenmembran generiert, die eine unspezifische Transportfunktion besitzen und PorB-Antikörper zeigen einen neutralisierenden Effekt auf die Infektion (Kubo and Stephens 2000).

1.7 Clathrin-vermittelte Endozytose und Chlamydien

Clathrin-vermittelte Endozytose („clathrin-mediated endocytosis“ CME) ist vermutlich der am Besten charakterisierte Endozytosemechanismus, über den Transmembranrezeptoren und ihre Liganden durch Verpackung in sog. „clathrin coated vesicle“ (CCV) mit einer Größe von 30 – 150 nm internalisiert werden (Veiga, Guttman et al. 2007) (Cheng, Boll et al. 2007). Für *Yersinia* und *Listeria*, die zur Endozytose den Zipper-Mechanismus verwenden, wird eine Clathrin-abhängige Aufnahme postuliert. Dies wurde durch eine stark reduzierte Infektion nach Depletion von Clathrin und Dynamin mittels siRNA sowie Kollokalisationsstudien belegt (Veiga, Guttman et al. 2007). Während kleine Liganden wie LDL oder Transferrin mit 40 – 180 sek sehr schnell endozytiert werden, zeigte sich anhand der Rekrutierung von Clathrin, dass die bakterielle Aufnahme mit 4 – 12 min deutlich langsamer ist (Veiga, Guttman et al. 2007) (Ehrlich, Boll et al. 2004). Anhand der Infektion mit Listerien konnte gezeigt werden, dass die Clathrinrekrutierung unabhängig von und zeitlich vor der Aktinpolymerisation stattfindet, und interessanterweise wurde auch eine nicht-endozytotische Rolle für Clathrin bei der nicht-invasiven Infektion mit EPEC beobachtet (Veiga, Guttman et al. 2007).

Die Internalisierung der Chlamydien mittels CME wird kontrovers diskutiert und bis dato werden multiple Eintrittswege für die Chlamydien vermutet. Mittels dominant negativer Eps15 und Dynamin-1 Mutanten der Clathrin-vermittelten Endozytose wurde gezeigt, dass die Aufnahme von *C. trachomatis* L2 und *C. caviae* GPIC nicht gestört ist (Boleti, Benmerah et al. 1999). Dagegen wurde durch RNA-Interferenz von Clathrin eine um 50 % reduzierte Internalisierung und subsequente Inklusionszahl für *C. trachomatis* Servore L2 und D beobachtet (Hybiske and Stephens 2007). Eine verminderte Internalisierung der Chlamydien wurde auch durch RNA-Interferenz von Regulatoren der CME wie Hsc70, Dynamin-2, Arp2 und Cortactin erhalten (Hybiske and Stephens 2007). Eine Kollokalisierung von Clathrin mit *C. trachomatis* EBs und elektronenmikroskopische Beobachtungen der Internalisierung von EBs mittels „clathrin coated pits“ bekräftigten die Hypothese einer Clathrin-vermittelten Endozytose von Chlamydien, wie sie auch bei vielen anderen pathogenen Bakterien und Viren stattfindet (Hodinka, Davis et al. 1988) (Majeed and Kihlstrom 1991) (Veiga and Cossart 2006). Vermutlich hängt es von der verwendeten chlamydiale Spezies, der Wirtszelle und der Infektionsart ab, ob die Chlamydien über Zipper-ähnliche und Mikrofilament-abhängige Phagozytose oder über Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert werden.

1.8 Die Sorting Nexin Proteinfamilie und SNX9

Die Interaktion zwischen der Plasmamembran und dem Aktinzytoskelett benötigt eine Vielzahl an regulatorischen Proteinen und geschieht in zeitlich regulierter Weise, dort wo clathrin-coated pits gebildet werden (Doherty and McMahon 2008) (Merrifield, Feldman et al. 2002). Proteine der Sorting Nexin (SNX) Familie sind Modulatoren, die einen Einfluss auf eine Vielzahl unter-

schiedlicher Prozesse wie der Endozytose von Rezeptoren, Proteinsortierung, Proteintransport und Signaltransduktion einnehmen (Worby and Dixon 2002) (Carlton, Bujny et al. 2005).

Sorting Nexine sind eine Familie aus peripheren Membranproteinen, die von Säugern (SNX1 - SNX33) bis zur Hefe auftreten und durch die Anwesenheit eines Phosphoinositol-Bindemotivs (PX-Domänfamilie Lipid-bindender Proteine) gruppiert wurden (Carlton, Bujny et al. 2005). Zusätzlich zur PX-Domäne besitzen 12 Sorting Nexine eine Bin-Amphiphysin-Rvs (BAR) Domäne, die eine membranmodulierende Aktivität besitzt. Die Kombination beider Domänen erhöht die Spezifität für die Lokalisation dieser Proteine an zellulären Membranen (Peter, Kent et al. 2004) (Pylypenko, Lundmark et al. 2007). Nach Assemblierung an der Lipidoberfläche können Proteine mit BAR-Domänen zur Ausbildung und Stabilisierung von Membrandeformationen führen und so die Bildung vesikulärer oder tubulärer Strukturen bei der Endozytose unterstützen (Pylypenko, Lundmark et al. 2007). Einige der PX-BAR enthaltenden Sorting Nexine besitzen zusätzlich eine Src Homologie 3 (SH3)-Domäne und werden daher in die „SNX9-Familie“ eingruppiert, bestehend aus SNX9, SNX18 und SNX33, die unterschiedlich in Humanzellen lokalisieren und keine orthologen Proteine in Hefe aufweisen (Haberg, Lundmark et al. 2008).

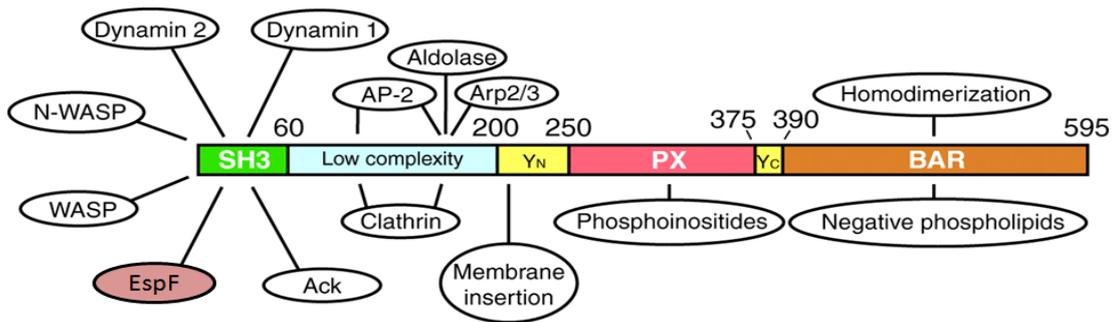


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Domänen und Interaktionspartner von SNX9

Nicht alle der gezeigten Interaktionen wurden durch Experimente spezifisch mit SNX9 bestätigt und müssen daher als potentielle Interaktionspartner betrachtet werden. Das EspF-Protein (rot) ist das bislang einzige bakterielle Protein, für das eine Interaktion mit SNX9 beschrieben wurde. Entnommen aus (Lundmark and Carlsson 2009).

SNX9 lokalisiert an endozytotischen Orten der Plasmamembran und die kleinste funktionale Einheit ist ein Homodimer (Lundmark and Carlsson 2009). Die SH3-Domäne von SNX9 interagiert mit Klasse I Polyprolinsequenzen (PxxP), wie sie in Dynamin 1 und 2, dem TTSS-Effektorprotein EspF, sowie dem Aktinregulator N-WASP zu finden sind und unterstützt die zentrale Position von SNX9 an der Schnittstelle zwischen Endozytose und Reorganisation des Zytoskeletts (Abb. 6) (Alto, Weflen et al. 2007) (Haberg, Lundmark et al. 2008).

Die Beteiligung von SNX9 an der Signaltransduktion und dem turnover von Rezeptoren wurde gezeigt in der CME-abhängigen Aufnahme des T-Zellantigens CD28, sowie bei der Degradation des epidermal growth factor receptors (EGFR) vermittelt durch SNX9 (Badour, McGavin et al. 2007) (Lin, Lo et al. 2002). SNX9 ist notwendig für die effiziente Clathrin-vermittelte Endozytose, in dem es die Aktivität von Dynamin reguliert (Soulet, Yarar et al. 2005). Durch mikroskopische Analyse lebender Zellen wurde gezeigt, dass SNX9 simultan mit Dynamin zu Clathrin-angereicherten Spots rekrutiert wird. Dies geschieht zeitlich bevor es zur Abschnürung der Clathrinvesikel von der

Plasmamembran kommt, durch die GTPase Aktivität des Dynamins in Kombination mit einer Destabilisierung der Lipiddoppelschicht (Soulet, Yarar et al. 2005) (Lundmark and Carlsson 2003). Die dafür notwendige Kraft wird vermutlich durch lokal kontrollierte Aktinpolymerisation generiert, sodass an tubulären Membranstrukturen assembliertes SNX9, mittels der SH3-Domäne N-WASP bindet sowie aktiviert und es subsequent durch den Arp2/3-Komplex zu einer Aktinnukleation und -polymerisation kommt (Abb. 6) (Lundmark and Carlsson 2009).

SNX9 interagiert nicht direkt mit Aktin, aber es bindet den Arp2/3 Komplex mit der low complexity (LC) Domäne (Shin, Ahn et al. 2008). Es wird vermutet, dass die SH3-Domäne von SNX9 in ihrer Funktion zwischen Rekrutierung sowie Assemblierung von Dynamin und Bindung sowie Aktivierung von N-WASP wechselt (Lundmark and Carlsson 2009). Bei Überexpression von SNX9 Δ SH3 findet keine Interaktion mehr mit Dynamin und N-WASP statt. Dies resultiert in fehlender Rekrutierung sowie Aktivierung von Komponenten die zur Abschnürung des endozytotischen Vesikels wichtig sind, was zu Mikrometer langen tubulären Membranstrukturen führt (Shin, Ahn et al. 2008) (Lundmark and Carlsson 2009).

1.9 Durch EspF und SNX9 ausgelöste Wirtszellmodulationen

EspF ist ein TTSS-Effektorprotein von enteropathogenen *E. coli* (EPEC), das mit der SH3-Domäne von Sorting Nexin 9 (SNX9) interagiert und beide Proteine kolokalisieren in infizierten Zellen (Marches, Batchelor et al. 2006). Die spezifische Interaktion mit SNX9 erfolgt über die Prolin-reichen Wiederholungen (PRR) des EspF und hat eine hohe Affinität (Alto, Weflen et al. 2007).

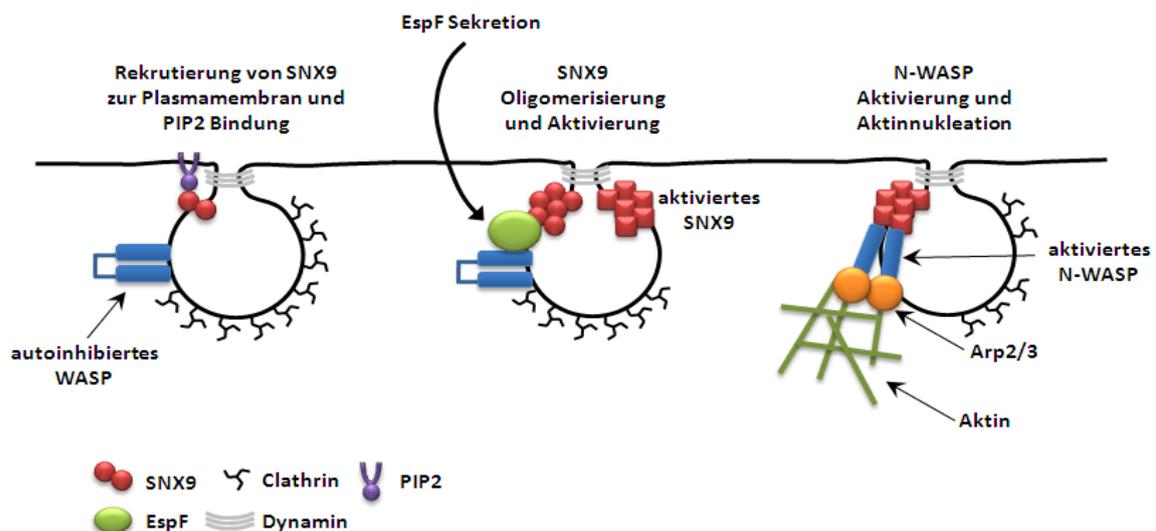


Abbildung 7: Interaktionen von EspF, SNX9 und N-WASP bei der Clathrin-vermittelten Endozytose

SNX9 kann über die PX-BAR Struktureinheit mit verschiedenen Membranlipiden (PIP2) interagieren. Die Oligomerisierung von SNX9 an der Membran führt vermutlich zur Aktivierung von N-WASP. Wird in einer EPEC-Infektion das TTSS-Effektorprotein EspF in die Wirtszelle sekretiert, so lokalisiert es dynamisch an „clathrin-coated pits“ und bindet über seine Prolin-reichen Wiederholungen direkt die SH3-Domäne von SNX9. Zudem kann EspF wie auch SNX9 mit N-WASP interagieren und es aktivieren, wodurch die Arp2/3 abhängige Aktinpolymerisation stimuliert wird. EspF kann somit durch Mimikry der SNX9/N-WASP Interaktion die F-Aktin Nukleation induzieren, notwendige Membrandeformationen generieren und in Kombination mit Dynamin für die Abschnürung des endozytotischen Vesikels sorgen. Modifiziert und erweitert nach (Yarar, Waterman-Storer et al. 2007) (Alto, Weflen et al. 2007).

EspF induziert Tubulationen der Wirtszellmembran, die direkt mit einer N-WASP/Arp2/3-abhängigen Nukleation von Aktin gekoppelt sind (Abb. 7). EspF verlinkt daher vermutlich bei der Clathrin-vermittelten Endozytose benötigte membranassoziierte Proteine mit der Maschinerie der Aktinpolymerisation. Auch EspF_U von enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) ist ein TTSS-Effektorprotein mit 4 PRRs, welches durch Mimikry eines autoinhibitorischen Elementes von N-WASP einen effizienten Weg zur Induktion der Aktinpolymerisation in der Wirtszelle gefunden hat (Sallee, Rivera et al. 2008).

1.10 Organisation chlamydialer Gene in Operons

Das Typ III Sekretionssystem (TTSS) bedient eine Vielzahl an Prozessen während der Infektion wie Bindung, Internalisierung, Verhinderung humaner Immunantwort und Überleben in der Inklusion (Galan and Collmer 1999). Die Translokation von Effektorproteinen durch das TTSS anderer pathogener Spezies wie *Yersinia* und *Shigella* wurde auch bereits für chlamydiale Proteine gezeigt (Fields and Hackstadt 2000) (Subtil, Parsot et al. 2001). Dabei beruhte die Identifikation von Proteinen die über das TTSS sekretiert werden, auf dem Vorhandensein eines Sekretionssignals in den ersten 15 Aminosäuren des Proteins. Bei vielen bakteriellen Pathogenen sind TTSS-Gene in großen sog. Pathogenitätsinseln organisiert. Dagegen sind sie in chlamydialen Genomen weit verteilt in mehreren Clustern und erschweren so die Vorhersage von Effektoren. Die Komponenten des Sekretionsapparates sind so reguliert, dass durch die zeitlich richtige Expression eine Assemblierung und Sekretion ermöglicht wird (Mota, Sorg et al. 2005). *Chlamydiae* kodieren für den DNA-abhängigen RNA Polymerase σ -Faktor (σ^{66}) der homolog zu σ^{70} ist, einem Indikator für konstitutive Genexpression (Engel and Ganem 1990). Für *C. trachomatis* L2 wurden 10 Operons bestehend aus 37 TTSS-assoziierten Genen identifiziert, deren Transkriptionsinitiation durch σ^{70} -ähnliche Promotorelemente reguliert wird. Jedoch müssen noch weitere unbekannte Modulatoren für die Stadien-spezifische Expression von TTSS-Genen verantwortlich sein (Hefty and Stephens 2007). Auch für *C. pneumoniae* wurden zwei Operons bestehend aus TTSS-Genen und jeweils einem Chaperon identifiziert, die σ^{66} -abhängig zu unterschiedlichen Infektionszeitpunkten exprimiert werden und so für die Beladung der EBs spät in der Infektion sowie das intrazelluläre Überleben der Chlamydien wichtig sind (Ouellette, Abdelrahman et al. 2005).

Für die Hitzeschockproteine Dank und GrpE sowie dem Transkriptionsrepressor HrcA aus *C. trachomatis* wurde die Organisation als *hrcA-grpE-dnaK* Operon gezeigt. Die Transkription dieses Operon sowie auch des *groES-groEL* Operons wird vermutlich über σ^{70} -ähnliche Promotorelemente reguliert (Tan, Wong et al. 1996). Auch die vier Gene *incD-incG* wurden als Operon identifiziert und kodieren alle für Inklusionsmembranproteine (Scidmore-Carlson, Shaw et al. 1999). Für das Adhäsin OmcB wurde gezeigt, dass das *omcB*-Gen mit dem benachbarten *omcA*-Gen in einem bicistronischen Operon vorliegt (Watson, Clarke et al. 1995). In Transkriptanalysen mit *C. trachomatis* wurden beide Gene spät im Entwicklungszyklus, während der Differenzierung von RBs in EBs, stark hochreguliert (Shaw, Dooley et al. 2000) (Belland, Zhong et al. 2003).

1.11 Der Gencluster *Cpn0678 – Cpn0676*

Bei der Suche nach Stadien-spezifisch exprimierten *C. pneumoniae* Gene wurde in dieser Arbeit der Gencluster *Cpn0678 – Cpn0676* identifiziert und charakterisiert (Abb. 8). Dabei handelt es sich um Gene, die für hypothetische Proteine unbekannter Funktion kodieren, wobei für *Cpn0677* und *Cpn0678* keine orthologen Proteine in *C. trachomatis* existieren. In 2D-PAGE Proteomanalysen von *C. pneumoniae* CWL029 EBs wurden 16 Proteine identifiziert, die mehr als 1 % der totalen Proteinmenge des Gels ausmachen. Neben MOMP als abundantestes Protein mit 20,5 % wurde auch *Cpn0677* mit 1,1 % gefunden (Vandahl, Birkelund et al. 2001). Bei der heterologen Expression der ersten 38 Aminosäuren von *Cpn0676* in *Shigella flexneri* konnte keine Sekretion beobachtet werden und *Cpn0677* sowie *Cpn0678* wurden nicht untersucht (Subtil, Delevoe et al. 2005).



Abbildung 8: Schematische Darstellung des *Cpn0679 – Cpn0675* Lokus in *C. pneumoniae* CWL029

Gezeigt sind die *C. pneumoniae* CWL029 Gene *Cpn0679 – Cpn0675* und ihre Genomlokalisierung. Die 3 grün markierten Gene *Cpn0678 – Cpn0676* wurden in dieser Arbeit untersucht. Das 5' liegende Gen *Cpn0679* kodiert für eine Phosphoglyceratkinase (*pgk*), die mit 72 % bzw. 81 % Identität im Vergleich zu *C. trachomatis* D und *C. caviae* sehr konserviert ist. Eine detaillierte Charakterisierung des Genclusters ist dem Ergebnisteil (Kapitel 4.1.3) zu entnehmen.

1.12 Präsentationssysteme zur Identifizierung bakterieller Adhäsine

Da Chlamydien genetisch nicht manipulierbar sind, können zur Untersuchung der adhäsiven Eigenschaften chlamydialer Proteine nur heterologe Testsysteme verwendet werden, die keine Limitation in Größe und Funktion der Proteine aufweisen. Zur Präsentation von Peptiden wurde das „phage-display“ System entwickelt, indem fremde Peptide durch Fusion mit Hüllproteinen von Phagen auf deren Oberfläche präsentiert werden. Dadurch ist die Generierung von Peptidbibliotheken zur genomweiten Untersuchung von Protein-Ligand Interaktionen, Enzym-Substrat Spezifitäten und Kartierung von Epitopbindestellen möglich (Azzazy and Highsmith 2002). Die Beschichtung von Latexkügelchen (Beads) mit rekombinantem Protein hat im Gegensatz zum „phage-display“ keine Limitation in der Größe verwendeter Proteine, eignet sich aber nicht für ein genomweites Screening aufgrund zeitaufwendiger Aufreinigungen der rekombinanten Proteine. Jedoch ermöglicht dies neben Adhäsionsstudien auch die einfache Quantifizierung der Internalisierung von beschichteten Beads, wie bereits für das Invasin-Protein von *Y. pseudotuberculosis* gezeigt wurde (Dersch and Isberg 1999). Die Expression von mehr als 10^5 rekombinanten Proteinmolekülen sowie eine Multimerisierung von Untereinheiten auf der Oberfläche von *E. coli* wird ermöglicht, indem heterologe Proteine mit der Domäne des Autotransporterproteins (AIDA-I) von *E. coli* fusioniert werden, was Hochdurchsatz-Analysen mittels ELISA oder FACS erlaubt (Jose 2006).

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist einfach genetisch manipulierbar, leicht kultivierbar, gefahrlos in Lebensmittel- und Pharmaproduktion einsetzbar und erlaubt das Screening von Bibliotheken mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS). Die Sekretionsmaschinerie der eukaryotischen Hefe ermöglicht eine effiziente Proteinfaltung sowie N-Glykosylierung. Daher wird die Präsentation von z.B. Enzymen, Antikörpern und Rezeptoren auf der Hefezelloberfläche („yeast surface display“) vielfältig in der medizinischen Forschung und für biotechnologische Zwecke eingesetzt (Kondo and Ueda 2004) (Gai and Wittrup 2007).

1.12.1 Das Hefe-Oberflächen-Präsentationssystem („yeast surface display“)

In dieser Arbeit wurde ein „yeast surface display“ System verwendet, welches zur Präsentation von Fusionsproteinen den α -Agglutininrezeptor der Hefe *S. cerevisiae* nutzt (Boder and Wittrup, 1997). Hefen besitzen die zwei Rezeptoren α -Agglutinin und α -Agglutinin, die für die Einleitung der Zell-Zell Adhäsion von α und α haploiden Zellen und deren spätere Fusion wichtig sind, wobei α -Agglutinin aus den zwei Untereinheiten Aga1p und Apa2p besteht und kovalent mit Glukanen der Zellwand verankert ist (Cappellaro, Baldermann et al. 1994). Das 73 kDa O-glykosylierte Mannoprotein Aga1p lokalisiert auf der Zelloberfläche und ist über einen GPI-Anker in der Zellwand verankert (Abb. 9). Das 7 kDa O-glykosylierte Protein Aga2p wird nach der Sekretion über zwei Disulfidbrücken kovalent mit dem Aga1p auf der Zelloberfläche verbunden (Shen, Wang et al. 2001). Das hier verwendete System besteht aus dem modifizierten Hefestamm YKM2, der das *AGA1*-Gen unter Kontrolle des *tetO7-CYC1*-Promotors im Hefegenom trägt und dem pEG6-Expressionsvektor mit dem *AGA2*-Gen unter Kontrolle des *tetO7-CYC1*-Promotors. Mit Hilfe dieses Systems wurden bereits Rezeptor-Ligand Interaktionen untersucht und erstmalig die chlamydialen Adhäsine OmcB und Pmp21 identifiziert und charakterisiert (Moelleken and Hegemann 2008) (Schmidt 2009).

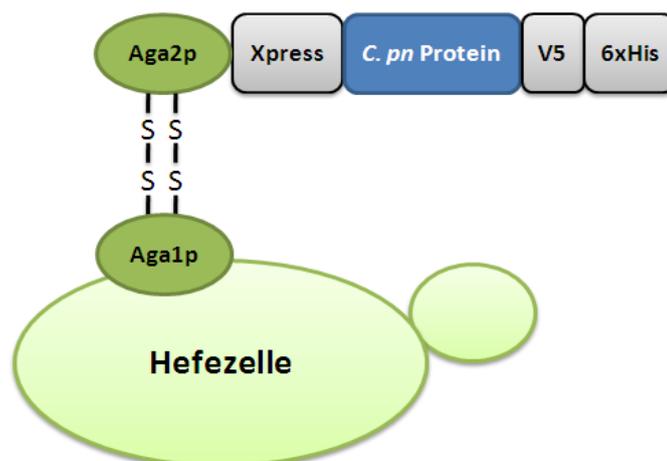


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Hefe-Oberflächen-Präsentationssystems

Das in der Hefezellwand verankerte Aga1 Protein ist mit dem Aga2 Protein über zwei Disulfidbrücken kovalent verknüpft. Das zu untersuchende Protein wird C-terminal an das Aga2p fusioniert, wobei N-terminal vom Xpress-Epitop und C-terminal vom V5-Epitop sowie His₆-Tag flankiert ist, wodurch die Proteinexpression und Oberflächenlokalisation nachgewiesen werden kann.

1.13 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, durch die Identifikation neuer *C. pneumoniae* Proteine mit einer Funktion in der Adhäsion zu einem besseren Verständnis der Interaktion von *C. pneumoniae* mit der humanen Wirtszelle beizutragen. Genomweite Transkriptanalysen über den Entwicklungszyklus von *C. pneumoniae* wurden bereits durchgeführt (Murra 2005).

Basierend auf diesen Expressionsdaten sollten im Rahmen dieser Arbeit Stadien-spezifisch regulierte Gene identifiziert werden, die *C. pneumoniae* spezifisch sind und eine mögliche Funktion in der Adhäsion infektiöser EBs einnehmen könnten. Kandidatenproteine sollten nun einer detaillierten Funktionsanalyse unterzogen werden. Dabei wurden die Proteine zunächst mit Hilfe des Hefe-Oberflächen-Präsentationssystems auf ihre adhäsiven Eigenschaften untersucht. Weiterhin sollte eine Adhäsion anhand von Experimenten mit rekombinantem Protein verifiziert werden. In Neutralisationsexperimenten mit rekombinantem Protein und spezifischen Antikörpern wurde der Beitrag der Proteine für die chlamydiale Infektion untersucht. Zudem sollten Lokalisationsstudien der Proteine in infizierten Zellen sowie biochemische Charakterisierungen durchgeführt werden.

Die Identifikation wichtiger Proteindomänen und mögliche Interaktionen der Kandidatenproteine untereinander sowie mit Proteinen der humanen Wirtszelle, sollten somit zum Verständnis der Funktion dieser Proteine in der Infektion beitragen. Mögliche humane Interaktionspartner sollten im Detail charakterisiert und deren Beitrag in der *C. pneumoniae* Infektion näher untersucht werden. Dies könnte zu einer detaillierten funktionellen Charakterisierung neuer *C. pneumoniae* Proteine mit einer Rolle in der chlamydialen Adhäsion und/oder Internalisierung führen.

2 Material

2.1 Gebrauchsmaterial

Tabelle 1: Verwendete Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsartikel	Hersteller
Chromatographiepapier für Westernblots	Whatman
Dialyseschlauch 3,5 bzw. 12-15 kDa Ausschluss	Serva
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad
Falcon (15 ml und 50 ml), steril	Sarstedt
Glasperlen ($\varnothing \sim 0,5$ mm)	Braun
Glasplättchen für Zellkultur (Deckgläschen \varnothing 12 mm)	Roth
Kryo-Röhrchen (1,8 ml)	Nunc
Latexkügelchen (\varnothing 1 μ m/ \varnothing 1,5 μ m)	Sigma / Polysciences
Multiwell-Objekträger (10 Wells)	Dunn Labortechnik
PVDF-Membran für Westernblots (Immobilon-P)	Millipore
Zellkulturflaschen (Polystyrol 25 cm ² /50 ml), steril	Nunc
Zellkulturflaschen (Polystyrol 80 cm ² /260 ml), steril	Nunc
Zellkulturplatte (24-Well)	Nunc
Zellkultur-Zentrifugationsröhrchen (12 ml)	Greiner
Zellschaber (23 cm), steril	Nunc

2.2 Geräte und Maschinen

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Maschinen

Gerät/Maschine	Hersteller
ÄKTAprime plus	GE Healthcare
Blotapparatur Fastblot B44	Biometra
Brutschrank HEPA Class 100	Thermo Scientific
Elektroporationsapparatur Gene Pulser	Bio-Rad
FACSAria	BD Biosciences
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 50 + 12 Bit CCD-Kamera	Zeiss
Geldokumentationssystem	Bio-Rad
Konfokalmikroskop LSM 510 Meta	Zeiss
PCR-Thermocycler PTC-200	MJ Research
Proteingelsystem SE-260	Hofer
Real Time PCR ABI PRISM 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Spektralphotometer DU-800	Beckman Coulter
Sicherheitswerkbank Herasafe	Heraeus
Speed-Vac Vakuum-Konzentrator	Savant
Ultraschallstab Sonoplus HD2200	Bandelin
Ultraschallwasserbad RK102H	Bandelin
Ultrazentrifuge TL-100, Rotor TLA 45	Beckman
Vibrax VXR	IKA
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Zentrifuge Avanti J-25, Rotoren JLA10.500, JA25-50	Beckman Coulter
Zentrifuge J2-21, Rotoren JA 10, JA 20	Beckman Coulter
Zentrifuge Biofuge Pico, Rotor # 3324	Heraeus
Zentrifuge Biofuge Primo R, Rotor # 7593	Heraeus
Zentrifuge Megafuge 1.0R, Rotor #3360	Heraeus
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich

2.3 Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)	Sigma
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth
Agar	Difco
Agarose	Biozym
Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck
Ammoniumsulfat	Roth
Ampicillin	Sigma
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva
Bradford-Reagenz	Biorad
Bromphenolblau	Fluka
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth
Calcium Phosphat (CaHPO ₄ x 2H ₂ O)	Difco
Casein Pepton	Difco
Cell Trace CFSE Cell Proliferation Kit	Invitrogen
Coomassie Brilliant Blau G250	Serva
Cycloheximid	Sigma
D(+)-Galaktose	Roth
Desoxynucleosid-5`-Triphosphate (dNTPs)	MBI Fermentas
Dimethylformamid (DMF)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
DTSSP (3,3`-dithiobis[sulfosuccinimidylpropionate])	Thermo Scientific
Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)	Roth
Ethylendiamintetraacetat (Na ₂ -EDTA)	Roth
EZ-Link® Sulfo-NHS-Biotin	Thermo Scientific
Gastrografin	Schering
Glucose Monohydrat	Roth
Glycerin	Roth
Guanidinhydrochlorid	Sigma
Harnstoff	J. T. Baker
Hefe Nitrogen Basis (YNB)	Difco
Hefeextrakt	Difco
Heparin (Natriumsalz aus Schweinedarmschleimhaut)	Sigma
Imidazol	Sigma
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Fermentas
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Lithiumacetat (LiOAc)	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth
Methanol	Riedel-deHaën
Milchpulver	Roth
N,N-bis[2-hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonat (BES)	Sigma
N-Laurylsarcosine sodium salt (Sarkosyl)	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Ni-NTA-Agarose	Qiagen

Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma
ortho-Phosphorsäure	Merck
para-Formaldehyd	Serva
Phenylmethylsulfonyl Fluorid (PMSF)	Sigma
Polyethylenglycol 3350 (PEG)	Roth
Poly-L-Lysin	Sigma
Reduziertes Glutathion	Sigma
Saccharose	Roth
Syto 17	Invitrogen
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Merck
Trypton Pepton	Difco
Tween 20	Merck
Vectashield (Anti-fade, mounting fluid)	Linaris

2.4 Enzyme

Tabelle 4: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller	Enzym	Hersteller
RNAse A	Qiagen	Lysozym	Sigma
Platinum Pfx DNA-Polymerase	Invitrogen	Proteinase K	Roche
Taq-Polymerase	Frau Volfson	α -Mannosidase	Sigma
Trypsin/EDTA	Invitrogen		

2.5 Antikörper

Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper

Primär-Antikörper	Spezifität/ gerichtet gegen	Ursprung	Verdünnung	Referenz
Pathfinder	<i>Chlamydia</i> LPS	Maus	IF 1:4	Bio-Rad
Anti-MOMP	MOMP	Kaninchen	WB 1:500	(Wuppermann)
Anti-MOMP	<i>C. pn</i> MOMP	Maus	IF 1:5	(Wolf, 2001)
Anti-MOMP	<i>C. pn</i> MOMP	Maus	IF 1:50	Dako
Anti-DnaK	<i>C. tr</i> DnaK	Maus	IF 1:50 , WB 1:500	(Birkelund, 1996)
Anti-S1	<i>C. tr</i> S1	Maus	IF 1:50 , WB 1:500	(Birkelund)
Penta-His	His ₆ -Tag	Maus	IF 1:40, WB 1:1000	Qiagen/Roche
Anti-GST	GST-Tag	Kaninchen	WB 1:1000	Santa Cruz
Anti-Xpress	Xpress-Epitop	Maus	IF 1:500	Invitrogen
Anti-LPS	<i>Chlamydia</i> LPS	Maus	IF 1:20	USBiological
Anti- β -Aktin	β -Aktin (human)	Maus	IF 1:50, WB 1:1000	Sigma
rat-SNX9 6C6	GST-SNX9	Ratte	WB 1:1000	(Schoebel,2008)
control-rat 7H8	mouse C1g	Ratte	WB 1:1000	(Schoebel,2008)
Anti-SNX9	GST-SNX9	Kaninchen	IF 1:50, WB 1:2000	(Soulet, 2005)
Anti-GST	Anti-GST	Kaninchen	Anti-GST	Anti-GST
Anti-Cpn0676, antigengereingt	His ₆ -Cpn0676	Kaninchen	IF 1:1, WB 1:50	diese Arbeit
Anti-Cpn0677, antigengereingt	His ₆ -Cpn0677	Kaninchen	IF 1:1, WB 1:50	diese Arbeit
Anti-Cpn0678, antigengereinigt	His ₆ -Cpn0678	Kaninchen	IF 1:1, WB 1:100	diese Arbeit

Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper

Sekundär-Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Referenz
FITC Anti-Maus	Kaninchen	IF 1:200	Dako
FITC Anti-Kaninchen	Maus	IF 1:200	Dako
Cy3 Anti-Maus	Kaninchen	IF 1:5	Sigma
Cy3 Anti-Kaninchen	Maus	IF 1:50	Sigma
Anti-Maus AP	Kaninchen	WB 1:7500	Promega
Anti-Kaninchen AP	Maus	WB 1:7500	Promega
Streptavidin-APC	Maus	IF 1:40	
Streptavidin-AP	Kaninchen	WB 1:1000	Sigma
Anti-Ratte IgG TexasRed	Ziege	IF 1:40	Southern Biotech
WGA, Alexa Fluor 633		IF 1:5	Invitrogen

2.6 Kits, Sepharosen, Beads

Tabelle 7: Verwendete Kits, Sepharosen und Beads

Kits (Hersteller)	Sepharosen / Beads (Hersteller)
Plasmid Midi Kit (Qiagen)	NHS-activated Sepharose (GE Healthcare)
QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen)	GammaBind Plus Sepharose (GE Healthcare)
Fluorescein Labeling Kit (Roche)	Glutathione Agarose (Sigma)
RealMasterMix SYBR ROX 2.5x (5 Prime)	1 µm Latexbeads yellow-green, carboxyl. (Sigma)
PolyLink Protein Coupling Kit (Polysciences)	1,5 µm Latexbeads yellow-green, carboxyl. (Polysciences)
	1 µm Latexbeads blue, sulfated (Sigma)

2.7 DNA- und Proteingrößenstandards

1 kb DNA-Ladder Mix von 10.000 bis 100 bp (Fermentas)

50 bp DNA-Ladder Mix von 1.000 bis 50 bp (Fermentas)

PageRuler™ Prestained Protein Ladder mit 170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17, 11 kDa (Fermentas)

SeeBlue® Plus 2 Prestained Protein Ladder mit 250, 148, 98, 64, 50, 36, 22,16,6,4 kDa (Invitrogen)

2.8 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurde durch Sigma Genosys synthetisiert, lyophilisiert geliefert und durch Lösen in entsprechenden Volumina an ddH₂O auf einer Konzentration von 50 pmol/µl eingestellt.

2.8.1 Oligonukleotide zur Amplifikation

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide

Nr. intern	Name	Sequenz (5' -> 3')
C-680	Cpn0676Dox-for	TACGACGATGACGATAAGGTACCAGGATCCAGTGTGGT GGAAATGGGAACCTATATCTGGC
C-681	Cpn0676Dox-rev	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCGA GGTCTTTGGGCTCTATTGATGT
C-662	Cpn0677Dox-for	TACGACGATGACGATAAGGTACCAGGATCCAGTGTGGT GGAAATGGGAATCAATCCTTCGGGT

C-663	Cpn0677Dox-rev	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCGA GTTCAAAAAGATCCCCGATTA
C-682	Cpn0678Dox-for	TACGACGATGACGATAAGGTACCAGGATCCAGTGTGGT GGAAATGTCTGTTAATCCATCAGGA
C-683	Cpn0678Dox-rev	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCGA GATCTTCGTGACACCAGCTGA
C-740	676pKM32hin	CCATCACCATCACCATACGGATCCGCATGCGAGCTCGG TAATGGGAACTCCTATATCTGG
C-741	pKM32+676rev	CAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTGGCTGCAGG TCCTAGTCTTTGGGCTCTATTG
C-699	pKM32+677for	CCATCACCATCACCATACGGATCCGCATGCGAGCTCGG TAATGGGAAATCAATCCTTCGGG
C-700	pKM32+677rev	CAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTGGCTGCAGG TCTTATTCAAAAGATCCCCGAT
C-701	pKM32+678for	CCATCACCATCACCATACGGATCCGCATGCGAGCTCGG TAATGTCTGTTAATCCATCAGGA
C-702	pKM32+678rev	CAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTGGCTGCAGG TCTTAATCTTCGTGACACCAGC
C-884	Cpn0678N_pUG34_for	TGGTATGGATGAATTGTACAAATCTAGAACTAGTGGAT CCATGTCTGTTAATCCATCAGGA
C-885	Cpn0678N_pUG34_rev	GGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGC AGTTACGTGCTACCTGATGAACG
C-886	Cpn0678C_pUG34_for	GGTATGGATGAATTGTACAAATCTAGAACTAGTGGATC CACACTAAAGCCTACGCGTCC
C-887	Cpn0678C_pUG34_rev	GGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGC AGTTAATCTTCGTGACACCAGCT
C-888	676_pBYE_for	GGATGAGCTCTACAAAAGCGTTCCGGACCGGTGCTA GCGATGGGAACTCCTATATCTGGC
C-889	676_pBYE_rev	GAATTCCACCACACTGGACTAGTGGATCCGAGCTCGGT ACCTAGTCTTTGGGCTCTATTGA
C-890	677_pBYE_for	GGATGAGCTCTACAAAAGCGTTCCGGACCGGTGCTA GCGATGGGAAATCAATCCTTCGGGT
C-891	677_pBYE_rev	GAATTCCACCACACTGGACTAGTGGATCCGAGCTCGGT ACTTATTCAAAAGATCCCCGATT
C-892	678_pBYE_for	GGATGAGCTCTACAAAAGCGTTCCGGACCGGTGCTA GCGATGTCTGTTAATCCATCAGGAA
C-893	678_pBYE_rev	GAATTCCACCACACTGGACTAGTGGATCCGAGCTCGGT ACTTAATCTTCGTGACACCAGCT
C-927	Cpn0678N_pBYE_rev	GAATTCCACCACACTGGACTAGTGGATCCGAGCTCGGT ACTTACGTGCTACCTGATGAACG
C-928	Cpn0678C_pBYE_for	GGATGAGCTCTACAAAAGCGTTCCGGACCGGTGCTA GCGACTAAAGCCTACGCGTCC
C-933	Cpn0677N_pBYE_rev	GAATTCCACCACACTGGACTAGTGGATCCGAGCTCGGT ACTTACGCCGTAGGAGGTTGAG
C-934	Cpn0677C_pBYE_for	GGATGAGCTCTACAAAAGCGTTCCGGACCGGTGCTA GCGGGGTCTTCTCAGGATCAGAG
C-992	SNX9dSH3_pKM36_hin	CCATCCTCCAAAATCGGATCTGATCGAAGGTCGTGGGA TCAGTTCGTGCGCTGCCAGCAA
C-993	SNX9dSH3_pKM36_her	GAAACGCGGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCACGATGA ATTCATCACTGGAAAGCGGCTGA
C-1092	pKM32+677Nrev	CAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTGGCTGCAGG TCTTACGCCGTAGGAGGTTGAG
C-1093	pKM32+678Nrev	CAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTGGCTGCAGG

C-1094	pKM32+678Cfor	TCTTACGTGCTACCTGATGAAC CCATCACCATCACCATACGGATCCGCATGCGAGCTCGG TAACACTAAAGCCTACGCGTCC
--------	---------------	--

2.8.2 Oligonukleotide zur Sequenzierung

Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide zur Sequenzierung

Nr.	Name	Sequenz (5' -> 3')
C-192	Aga2-Seq2	ATGCAAGGAGTTTTTGAATAT
C-203	Aga2-Seq3	TCAGCGGGTTTAAACTC
C-369	Cpn38 (pUG34 for)	GTTACTGCTGCTGGTATTAC
C-373	Cpn22 (pUG34 rev)	ACTTCAGTTGTCTAACTCC
C-637	Seq KM vorne (pKM32 for)	TCACACAGAATTCATTAAGAG
C-638	Seq KM hinten (pKM32 rev)	GAGGTCATTACTGGATCTATC
C-665	SeqCpn0676	CGACTCCCTAAAGAACTGC
C-666	SeqCpn0677	GGGTCTTCTCAGGATCAGA
C-673	seq pKM33 vorne (pKM36 for)	TACTTGAAATCCAGCAAGTAT
C-803	GST GenX His seq (pKM36 rev)	CAAGCTGTGACCGTCTCCG
C-894	Seq_pBYE_for	TGGCATGGATGAGCTCTACA
C-895	Seq_pBYE_rev	TGCAGAATTCCACCACACTG

2.9 Plasmide

Tabelle 10: Verwendete und in der Arbeit generierte Plasmide

Nr intern	Name	Konstruktion, Referenz
# 848	pUG34	Laborkollektion (U. Güldener)
# 1104	pYD1	Laborkollektion (Invitrogen)
# 1133	pSW1	Laborkollektion (S. Willger)
# 1353	pBYE	Laborkollektion (R. Zrieq)
# 1183	pEG6	pYD1 geschnitten mit <i>PvuII</i> , Integration des <i>tetO7-CYC1</i> -Promotors (E. Schmidt)
# 1332	pEG18	pEG6 geschnitten mit <i>NotI</i> , Integration von Pmp21-D (E. Schmidt)
# 1382	pAF4	<i>Cpn0676</i> mit <i>SpeI</i> , <i>EcoRI</i> aus Plasmid # 1315 ausgeschnitten und 1206 bp in den mit <i>SpeI</i> , <i>EcoRI</i> geöffneten pUG34 (#848) ligiert (A. Kerres)
# 1383	pAF5	<i>Cpn0677</i> mit <i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i> aus Plasmid # 1312 ausgeschnitten und 1179 bp in den mit <i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i> geöffneten pUG34 (#848) ligiert (A. Kerres)
# 1408	pAF7	<i>Cpn0678</i> mit <i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i> aus Plasmid #1311 ausgeschnitten und 672 bp in den mit <i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i> geöffneten pUG34 (#848) ligiert (A. Kerres)
# 1625	pKM32	pQE-31 geschnitten mit <i>XbaI</i> / <i>PvuII</i> . Integration von CEN6 ARS URA3 mit Oligos C-613/C-614. Expressionsvektor mit N-terminal His ₆ -Tag (Mölleken)
# 1626	pKM36	pGEX-3X geschnitten mit <i>Van91I</i> . Integration von CEN6 ARS TRP1 mit den Oligos C-593/C-594 (interne Laborsammlung). Expressionsvektor mit einem N-terminalem GST-Tag (Mölleken)
# 1740	pKM50	Integration von <i>Inv497</i> aus <i>Y. pseudotuberculosis</i> in pKM32 (K. Mölleken)
# 1323	pGM1	Integration von <i>Cpn0677</i> generiert auf <i>Cpn</i> GiD gen. DNA mit den Oligos C-662/C-663 in den mit <i>NotI</i> geschnittenen pEG6-Vektor
# 1324	pGM2	Integration von <i>Cpn0676</i> generiert auf <i>Cpn</i> GiD gen. DNA mit den Oligos C-680/C-681 in den mit <i>NotI</i> geschnittenen pEG6-Vektor
# 1325	pGM3	Integration von <i>Cpn0678</i> generiert auf <i>Cpn</i> GiD gen. DNA mit den Oligos C-682/C-683 in den mit <i>NotI</i> geschnittenen pEG6-Vektor
# 1327	pGM5	Integration von <i>Cpn0677</i> generiert auf <i>Cpn</i> GiD gen. DNA mit den Oligos C-699/C-700 in den mit <i>SmaI</i> geschnittenen pKM32-Vektor

# 1328	pGM6	Integration von <i>Cpn0678</i> generiert auf <i>Cpn</i> GiD gen. DNA mit den Oligos C-701/C-702 in den mit <i>SmaI</i> geschnittenen pKM32-Vektor
# 1725	pGM7	Integration von <i>Cpn0676</i> generiert auf <i>Cpn</i> GiD gen. DNA mit den Oligos C-740/C-741 in den mit <i>SmaI</i> geschnittenen pKM32-Vektor
# 1726	pGM12	Integration von <i>Cpn0678N</i> generiert auf <i>Cpn</i> GiD gen. DNA mit den Oligos C-884/C-885 in den mit <i>SmaI</i> geschnittenen pUG34-Vektor
# 1727	pGM13	Integration von <i>Cpn0678C</i> generiert auf <i>Cpn</i> GiD gen. DNA mit den Oligos C-886/C-887 in den mit <i>SmaI</i> geschnittenen pUG34-Vektor
# 1728	pGM14	Integration von <i>Cpn0676</i> generiert auf <i>Cpn</i> GiD gen. DNA mit den Oligos C-888/C-889 in den mit <i>Acc65I</i> geschnittenen pBYE-Vektor
# 1729	pGM15	Integration von <i>Cpn0677</i> generiert auf <i>Cpn</i> GiD gen. DNA mit den Oligos C-890/C-891 in den mit <i>Acc65I</i> geschnittenen pBYE-Vektor
# 1730	pGM16	Integration von <i>Cpn0678</i> generiert auf <i>Cpn</i> GiD gen. DNA mit den Oligos C-892/C-893 in den mit <i>Acc65I</i> geschnittenen pBYE-Vektor
# 1731	pGM17	Integration von <i>Cpn0678N</i> generiert auf <i>Cpn</i> GiD gen. DNA mit den Oligos C-892/C-927 in den mit <i>Acc65I</i> geschnittenen pBYE-Vektor
# 1732	pGM18	Integration von <i>Cpn0678C</i> generiert auf <i>Cpn</i> GiD gen. DNA mit den Oligos C-928/C-893 in den mit <i>Acc65I</i> geschnittenen pBYE-Vektor
# 1733	pGM22	Integration von <i>SNX9ΔSH3</i> generiert auf Plasmid GST-SNX9-pGEX mit den Oligos C-992/C-993 in den mit <i>NotI</i> geschnittenen pKM36-Vektor
# 1734	pGM25	Integration von <i>Cpn0677N</i> generiert auf das Plasmid # 1327 mit den Oligos C-699/C-1092 in den mit <i>SmaI</i> geschnittenen pKM32-Vektor
# 1735	pGM27	Integration von <i>Cpn0678N</i> generiert auf das Plasmid # 1328 mit den Oligos C-701/C-1093 in den mit <i>SmaI</i> geschnittenen pKM32-Vektor
# 1736	pGM28	Integration von <i>Cpn0678C</i> generiert auf das Plasmid # 1328 mit den Oligos C-1094/C-702 in den mit <i>SmaI</i> geschnittenen pKM32-Vektor
# 1737	pGM29	GST-SNX9_pGEX5.1 (zur Verfügung gestellt von Lichtenthaler, 2008)
# 1738	pGM30	GST-SNX9-SH3_pGEX (zur Verfügung gestellt von Alto, 2008)
# 1739	pGM31	mcherry-SNX9 (zur Verfügung gestellt von Alto, 2008)

2.10 Zellen, Stämme und Zelllinien

2.10.1 Prokaryotische Zellen und Zelllinien

Chlamydia pneumoniae

***C. pneumoniae* GiD:** Giessener Isolat eines Patienten mit akuter Bronchitis (Jantos *et al.* 1997)

Chlamydia trachomatis

***C. trachomatis* LGV L2/434/BU:** ATCC Nr: VR-902B

Escherichia coli

XL₁-blue *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac-[F' proAB lacI^q ZΔM15 Tn10(tetr)]*
(Strategene)

Rosetta *F ompT hsdSB(r_B⁻m_B⁻) gal dcm* (DE3) pRARE (*argU, argW, ileX, glyT, leuW, proL*)
(Novagen)

BL21: *F ompT hsdSB(r_B⁻m_B⁻) gal dcm* (DE3) (Invitrogen)

2.10.2 Eukaryotische Zellen und Zelllinien

Adhärente Zellkulturlinien

- HEp-2** humane epitheliale Larynxcarzinom-Zelllinie, HeLa Morphologie, 46 Chromosomen (ATCC Nr.: CCL-23)
- HEK-293** humane embryonale Nierenzellen (ATCC Nr.: CRL-1573, Graham *et al.*, 1977)
- HEK-293T** humane embryonale Nierenzellen, Wildtypkontrollzelllinie für die siRNA-Experimente, exprimieren eine non-targeting Kontroll shRNA und zusätzlich EGFP (Lichtenthaler und Dietlich, München, unpubliziert)
- HEK-293Tsh1** humane embryonale Nierenzellen, exprimieren eine shRNA1 gegen SNX9 (sog. Yarar Zellen) und zusätzlich EGFP (Lichtenthaler und Dietlich, unpubliziert)
- HEK-293Tsh2** humane embryonale Nierenzellen, exprimieren eine shRNA2 gegen SNX9 (sog. Lundmark Zellen) und zusätzlich EGFP (Lichtenthaler und Dietlich, unpubliziert)
- CHO-K1** Hamsterzelllinie, Wildtypkontrolle für andere CHO-Zelllinien (ATCC Nr.: CCL-61)
- CHO-pgsA-745** Hamsterzelllinie, Defizient in GAG-Biosynthese, Defekt in Xylosyltransferase (Esko *et al.*, 1988), (Lidholt *et al.*, 1992). (ATCC Nr.: CRL-2242)
- CHO-pgsD-677** Hamsterzelllinie, Heparansulfat-defizient, akkumuliert aber Chondroitinsulfat, Defekte in den Enzymen N-Acetylglucosaminyltransferase und Glucuronosyltransferase (Esko *et al.*, 1988), (Lidholt *et al.*, 1992). (ATCC Nr.: CRL-2244)

Saccharomyces cerevisiae

- CEN.PK 2-1C:** MAT_a *leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2*
(Entian, Schuster *et al.* 1999)
- YKM1:** MAT_a *ura 3-52 trp1 leu2Δ1 his3Δ200 pep4:HIS3::GAL1p loxP-KanMx-loxP-YEGFP prb1Δ.6Rcan1 GAL1p AGA1::pIU21(URA3)*
- YKM2:** MAT_a *ura 3-52 trp1 leu2Δ1::pCM149(LEU2) his3Δ200 pep4:HIS3:: loxP-KanMx-loxP-Met25p-GFP prb1Δ.6Rcan1 tetO₇ AGA1::pIU211(URA3)*

2.11 Medien und Medienzusätze

Medien für *Escherichia coli*

LB-Medium:

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

In 1 l deionisiertem Wasser lösen, autoklavieren und bei ca. 50 °C Zugabe von 50 mg/l Ampicillin.

Medien für *Saccharomyces cerevisiae*

YPD⁺-Medium:

20	g	Glucose
10	g	Hefeextrakt
20	g	Casein Hydrolysat (Pepton)
13,5	g	Agar (nur bei Platten)
2	ml	Adeninstocklösung (2 mg/ml)
4	ml	Tryptophanstocklösung (5 mg/ml)

In einem Liter deionisierten Wasser lösen und autoklavieren.

SD-Minimalmedium (Platten):

20 g	Glucose
20 g	Agar
1,7 g	Hefe Nitrogen Base (YNB)
5 g	Ammoniumsulfat
2 g	Aminosäuremix

SD-Minimalmedium (flüssig):

1,7 g	Hefe Nitrogen Base (YNB)
5 g	Ammoniumsulfat
2 g	Aminosäuremix

Für Agarplatten die Komponenten in 1 l deionisierten Wasser lösen und vor dem Autoklavieren mit 1 M NaOH auf pH 6 einstellen. Zur Selektion wird die entsprechende Aminosäure oder Nukleo-Base nicht mit in den Aminosäure-Mix gegeben. Für das Flüssigmedium wird die Kohlenstoffquelle als 20 %ige Stocklösung separat autoklaviert und dem Medium nachträglich zugefügt.

Aminosäuremix +24:

Der Aminosäure-Mix ist eine Kombination aus den folgenden Aminosäuren, Nukleo-Basen und Chemikalien, wobei zur Plasmidselektion die entsprechende Komponente weggelassen wird.

Komponente (Hersteller)	Menge	Komponente (Hersteller)	Menge
Adenin (Roth)	0,5 g	Leucin (Roth)	10,0 g
Alanin (Merck)	2,0 g	Lysin (Roth)	2,0 g
Arginin (Fluka)	2,0 g	Methionin (Merck)	2,0 g
Asparagin (Merck)	2,0 g	para-Aminobenzoessäure (Fluka)	2,0 g
Asparaginsäure (Merck)	2,0 g	Phenylalanin (Acros)	2,0 g
Cystein (Merck)	2,0 g	Prolin (Merck)	2,0 g
Glutamin(Merck)	2,0 g	Serin (Merck)	2,0 g
Glutaminsäure (Sigma)	2,0 g	Threonin (Merck)	2,0 g
Glycin (Roth)	2,0 g	Tryptophan (Roth)	2,0 g
Histidin (Roth)	2,0 g	Tyrosin (Merck)	2,0 g
Inositol (Sigma)	2,0 g	Uracil (Roth)	2,0 g
Isoleucin (Roth)	2,0 g	Valin (Merck)	2,0 g

3 Methoden

3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

3.1.1 Herstellung des Zellkulturmediums

Zu 500 ml Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) wird 50 ml FKS gegeben und für die Kultivierung von HEK293T-Zellen, HEK293-Kontrollzellen sowie HEK293 shRNA1/2-Zellen verwendet.

Zu 500 ml F-12K Nutrient mixture Medium wird 50 ml FKS gegeben und für die Kultivierung von CHO-Zellen verwendet.

500 ml Minimal Essential Medium (MEM) + HEPES (25 mM) + Earle's salts (ohne Glutamin) wird um folgende Zusätze erweitert (MEM+7) und für die Kultivierung von HEp-2 Zellen verwendet:

50 ml FKS (hitzeinaktiviert 1 h bei 56 °C)	Endkonzentration: 10 %
7,5 ml Glukose (75 % in ddH ₂ O)	Endkonzentration: 56 mM
5 ml L-Glutamin (200 mM, 100X)	Endkonzentration: 2 mM
5 ml MEM nicht essentielle Aminosäuren (100X)	Endkonzentration: 1 x
5 ml MEM Vitamine (100X)	Endkonzentration: 1 x
0,5 ml Gentamycin (50 mg/ml)	Endkonzentration: 50 µg/ml
5 ml Amphotericin B (250 mg/ml)	Endkonzentration: 2,5 µg/ml

3.1.2 Passagieren adhärenter Zellen durch Trypsinbehandlung

- Konfluente Zellen in 80 cm² Zellkulturflaschen nach Entfernen des Mediums mit 10 ml HBSS (Invitrogen) waschen, mit 5 ml 0,5 X Trypsin/ETDA-Lösung bis zum Ablösen bei RT inkubieren.
- 5 ml Medium zufügen, die Zellen im 12 ml Zentrifugenröhrchen für 10 min. bei 43,3 g (500 Upm, Rotanta 460R) sedimentieren. und die Zellen in 5 ml Medium resuspendieren.
- Zur Passage in 25 cm² Zellkulturflaschen wird zu 0,5 – 0,8 ml der Zellsuspension 6 ml Medium gegeben und die Zellen für 3 – 4 Tage bis zum Erreichen eines konfluenten Zellrasens bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert.
- Zur Passage in 80 cm² Zellkulturflaschen zu 1 - 1,5 ml Zellsuspension 15 ml Medium geben.
- Zur Passage in 24-Well Platten wird jeweils ein steriles Glasplättchen in jedes Well gelegt und zwischen 5 x 10⁴ und 5 x 10⁵ Zellen in jedes Well pipettiert.

3.1.3 Einfrieren eukaryotischer Zellen

- Sedimentierte Zellen in 1 ml Einfriermedium (90% FKS + 10% DMSO) resuspendieren und in ein Kryo-Röhrchen überführen.
- Die Zellen werden schonend in einer Isopropanol-Einfrierbox bei -80°C eingefroren.

3.2 Chlamydienkultur

Chlamydien sind obligat intrazellulärer Erreger und benötigen die Wirtszelle für eine erfolgreiche Propagation. Ein HEP-2 Zellrasen wird mit einer Chlamydien suspension durch Zentrifugation infiziert, um das Eindringen der Chlamydien zu erleichtern. Im Chlamydienmedium befindet sich Cycloheximid, ein Inhibitor der eukaryotischen Proteinsynthese durch Inhibition der Funktion des 80S Ribosoms, wodurch die Zellteilung der Humanzellen deutlich verringert wird. Zusätzlich produziert die humane Wirtszelle so vermehrt ATP, welches sich positiv für die Entwicklung und Zellteilung der Chlamydien auswirkt.

3.2.1 Herstellung von Stammlösungen

- Eine Cycloheximid-Lösung (Sigma, 100 mg/ml) wird mit HBSS auf eine 100 µg/ml Cycloheximid verdünnt und bei -20 °C gelagert. Das Chlamydienmedium besteht aus MEM+7 und 1,2 µg/ml Cycloheximid.
- Zum Einfrieren von Chlamydien wird eine Saccharose-Phosphat-Glutaminsäure (SPG) Puffer verwendet. Dazu werden 75 g Saccharose, 0.52 g KH_2PO_4 , 1.53 g Na_2HPO_4 und 0.72 g Glutaminsäure eingewogen und auf 1000 ml mit ddH_2O aufgefüllt, der pH-Wert der Lösung auf 7,5 eingestellt, autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

3.2.2 Passage von Chlamydien in 25 cm² Zellkulturflaschen

- Von konfluenten HEP-2 Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen wird das Medium entfernt.
- 1 ml Chlamydien suspension (ca. 10⁷ IFU/ml) in SPG-Puffer wird aufgetaut, 6 ml Zellkulturmedium MEM+7 zugefügt und vorsichtig in die Zellkulturflaschen pipettiert.
- Die Flaschen werden verschlossen und für 60 min bei 1560 g (3000 Upm / Rotanta 460R) und 30 °C zentrifugiert und nun 60 min zur Adsorption bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.
- Das Medium wird abgenommen, durch 6 ml Chlamydienmedium (1,2 µg/ml Cycloheximid) ersetzt und infizierte Zellen für 84 – 96 h bei 37 °C und 6 % CO_2 im Brutschrank inkubiert.
- Der Grad der Infektion wird mikroskopisch begutachtet, wobei ein Ablösen der Zellen und das Auftreten vieler Inklusionen auf eine starke Infektion hinweist. In diesem Fall können die Chlamydien aus einer Flasche nun auf 4 neue Flaschen mit konfluenten HEP-2 Zellen aufgeteilt werden (6 ml + 18 ml MEM+7).
- Mit Hilfe eines sterilen Zellschabers werden infizierte Zellen vom Flaschengrund abgelöst und die Suspension von bis zu 6 Flaschen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert.
- Die Suspension wird 45 sek bei 40 % Leistung mit einem Ultraschallstab beschallt und für 10 min bei 1560 g (3000 Upm / Rotanta 460R) und 20 °C zum Pelletieren von Humanzelltrümmern zentrifugiert (Differentialzentrifugation).
- Der Überstand wird in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und erneut zentrifugiert.
- Der Überstand des zweiten Zentrifugationsschrittes wird zur Infektion neuer Zellkulturflaschen verwendet oder zur Sedimentation der Chlamydien weiterverarbeitet.

3.2.3 Sedimentation und Einfrieren von Chlamydien

- Die Chlamydien suspension nach der Differentialzentrifugation wird in ein steriles Ultrazentrifugationsröhrchen (Beckman) überführt und 1 h bei 30000 g (15000 Upm/ Beckman Avanti J-25) und 4 °C zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen und das Chlamydienpellet in 1 ml SPG-Puffer im Ultraschallbad resuspendiert, in ein Kryo-Röhrchen überführt und bei -80 °C gelagert.

3.2.4 Reinigung von Chlamydien mittels Gastrografin-Gradient

Zur Aufreinigung von Chlamydien werden mittels Dichtegradientenzentrifugation eukaryotische Zelltrümmer abgetrennt und es erlaubt die Trennung von RBs und EBs. Zur Reinigung der Chlamydien werden die geernteten Chlamydien von bis zu 30 Zellkulturflaschen (25 cm²) über einen Gradienten aufgereinigt.

- Die Chlamydien suspension in SPG-Puffer wird aufgetaut und für 30 min bei 21885 g (15000 Upm / Hereaus Biofuge Primo R) und 4 °C sedimentiert und das SPG-Medium abgenommen.
- Die Pellets werden in HBSS im Ultraschallbad resuspendiert, auf ein Totalvolumen von 1 ml vereinigt und mit dieser Suspension eine 9 ml 30 % Gastrografin-Lösung in ddH₂O in einem sterilem Zentrifugenröhrchen (Korex) überschichtet.
- Chlamydien werden sedimentiert durch Zentrifugation für 1 h bei 30000 g (15000 Upm/ Beckman Avanti J-25) und 4 °C, das Pellet in 1,5 ml HBSS resuspendiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und für 30 min bei 15000 Upm (Hereaus Biofuge Primo R) und 4 °C erneut pelletiert.
- Das Pellet wird in 200 µl SPG im Ultraschallbad resuspendiert, auf 1 ml mit SPG aufgefüllt und in 4 x 250 µl Aliquots in Kryoröhrchen bei - 80 °C eingefroren.

3.2.5 Bestimmung der Infektiösität von Chlamydien

Zur Bestimmung der Infektiösität von Chlamydien wird die Anzahl an einschlussbildenden Einheiten (IFU) pro ml einer Chlamydien suspension durch Titration bestimmt.

- In einer 96-Well Platte werden HEp-2 Zellen zu einem konfluenten Zellrasen angezogen, die aufgetaute Chlamydien suspension in SPG-Puffer wird jeweils 1:10 bis zur Verdünnungsstufe 10⁻⁸ mit Zellkulturmedium verdünnt und 100 µl jeder Verdünnung als 3fach Bestimmung in jede Vertiefung pipettiert.
- Die Platte wird für 60 min bei 1560 g (3000 Upm / Rotanta 460R) und 30 °C zentrifugiert und anschließend 60 min zur Adsorption bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.
- Das Medium wird abgenommen, durch 200 µl Chlamydienmedium/Vertiefung ersetzt (1,2 µg/ml Cycloheximid) und infizierte Zellen für 60 - 72 h bei 37 °C und 6 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.
- Der Überstand wird abgenommen und die Zellen mit 100 µl Methanol pro Vertiefung für mindestens 10 min fixiert und die gebildeten Einschlüsse durch einen FITC-konjugierten Antikörper gegen das chlamydiale LPS (Pathfinder, 1:4 verdünnt) detektiert.

- Alle gebildeten Einschlüsse von 2 verschiedenen Verdünnungen werden mittels Fluoreszenzmikroskop bei 20 x Vergrößerung in 3-fach Bestimmung gezählt und so die Zahl einschlussbildender Einheiten (IFU/ml) der Ausgangssuspension bestimmt.

3.2.6 Fluoreszenzmarkierung von Chlamydien durch CFSE

Lebende Chlamydien werden mit Carbofluorescein-diacetat-succinimidylester (CFSE) gefärbt. Dabei diffundiert nicht-fluoreszierendes CFSE in Chlamydien und bildet durch Reaktion mit intrazellulären Aminen ein bei 517 nm detektierbares fluoreszierendes Konjugat, welches bei FACS-Analysen im FITC-Filter messbar ist.

- Ein 250 µl Aliquot Gastrografin-gereinigter Chlamydien wird auf ein Gesamtvolumen von 1 ml mit PBS + 0,1 % BSA aufgefüllt, CFSE in DMSO (Molecular Probes) mit einer Endkonzentration von 25 µM zugefügt und die Suspension für mind. 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.
- CFSE-markierte Chlamydien werden für 15 min bei 21885 g (15000 Upm / Hereaus Biofuge Primo R) und 4 °C pelletiert, das Pellet 2 x mit 1 ml PBS + 1 % BSA gewaschen und erneut pelletiert.
- Das Pellet wird in 250 µl SPG durch Ultraschall resuspendiert und bei -80 °C eingefroren.

3.2.7 Stationäre Infektion mit Chlamydien

Bei den sog. Neutralisationsexperimenten, in denen die veränderte Adhäsion CFSE-markierter EBs bzw. die veränderte Infektion durch Inkubation mit Protein oder Antikörper untersucht wurde, erfolgte die Infektion mit gradientengereinigten *C. pneumoniae* EBs ohne Zentrifugation in 24-Well Platten. Für Heparin konnte eine dosisabhängige starke Blockierung der Infektion beobachtet werden, die jedoch mit Zentrifugation deutlich schwächer ausfielen, sodass Unterschiede nicht so deutlich hervortraten (Dissertation, Wuppermann 2001).

- Die Proteinlösung in Zellkulturmedium wird in einem Totalvolumen von 200 µl für 2 h bei 37 °C mit den Zellen inkubiert, anschließend gradientengereinigten *C. pneumoniae* EBs zugegeben und für 2 h bei 37 °C inkubiert oder Protein und EBs in Zellkulturmedium für 2 h bei 37 °C parallel inkubiert.
- In einigen Experimenten wurde nach Inkubation mit der Proteinlösung der Überstand abgenommen, mehrfach mit Medium gewaschen und nun EBs in 200 µl Medium auf die Zellen gegeben und für 2 h bei 37 °C inkubiert.
- Im Falle einer Antikörpervorbehandlung von Chlamydien findet eine Inkubation für 1 h bei 4 °C statt in einem Totalvolumen von 200 µl Zellkulturmedium, gefolgt von einer Überschichtung von HEp-2 Zellen mit dieser Suspension und Inkubation für 2 h bei 37 °C.
- Nach 2 h Inkubation mit EBs wurde die Lösung abgenommen und durch Cycloheximid-haltiges Zellkulturmedium (Chlamydienmedium) ersetzt.
- Im Falle der veränderten Bindung CFSE-markierter Chlamydien durch Vorbehandlung der HEp-2 Zellen wurde die Chlamydien durch leichte Zentrifugation für 5 min bei 700 Upm (Rotanta 460R) und 4 °C in Kontakt mit den Zellen gebracht

- Bei Experimenten mit rekombinantem Protein und Antikörperbehandlung von EBs wurde eine veränderte relative Infektion quantifiziert. Dazu wurden Zellen für mind. 60 h mit Chlamydienmedium inkubiert, Zellen mit Methanol für mind. 10 min fixiert, gebildeten Einschlüsse durch einen FITC-konjugierten Antikörper gegen das chlamydiale LPS (Pathfinder, 1:4) detektiert und mind. 15 Gesichtsfelder pro Deckgläschen ausgezählt.

3.2.8 Detektion von EB-Oberflächenantigenen mittels FACS

Der Farbstoff Syto 17 (Emission = 634 nm) interkaliert in die DNA der Chlamydien und ermöglicht so eine Färbung von EBs. Nun folgt eine Detektion von Oberflächenantigenen auf lebenden EBs mit spezifischen *C. pneumoniae*-Antikörpern und einem FITC-konjugiertem Antikörper.

- Jeweils 1×10^7 gradientengereinigte EBs wurden für 15 min bei 21885 g (15000 Upm / Hereaus Biofuge Primo R) und 4 °C pelletiert.
- Das Chlamydienpellet wird in 100 µl DNase „functional Assay buffer“ (50 mM NaOAc pH 6.5, 10 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂) resuspendiert.
- Der Suspension werden 2,5 µl DNase I (Sigma, 50 U/µg) zugesetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert und nun 150 µl Puffer P1 (10 mM EDTA pH 8.0, 50 mM Tris/HCl, 0.1 mg/ml RNase A) zugegeben und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert.
- Die Chlamydien werden für 15 min bei 21885 g pelletiert und in 1 ml PBS resuspendiert.
- Es werden 4 µl der Syto 17 Farbstofflösung (5 mM Stocklösung) zu der Chlamydien-suspension gegeben (Endkonzentration 20 µM) und für 30 min bei RT inkubiert.
- Die Chlamydien werden durch 3 maliges Sedimentieren und resuspendieren in PBS + 0.1 % BSA von überschüssigem Farbstoff befreit.
- Die gefärbten EBs werden mit Primärantikörper in 50 µl PBS + 0.1 % BSA für 30 min bei 4°C inkubiert, nach Pelletieren bei 21885 g und Waschen mit PBS die EBs mit FITC-konjugierten Sekundärantikörper in 50 µl PBS + 0.1 % BSA für 30 min bei 4°C inkubiert.
- Die EBs wurden erneut pelletiert und in 100 µl PBS resuspendiert und durch Zugabe von 900 µl 3 % para-Formaldehyd für 30 min bei RT fixiert.
- Die EBs werden pelletiert, in 300 µl PBS resuspendiert und mittels FACSAria analysiert.

Dabei wurde mit Hilfe der Syto17-Färbung die Parameter Größe (forward scatter) und Granulärität (side scatter) so eingestellt, dass ein Detektion der EBs möglich war. Die relative FITC-Fluoreszenz, verursacht durch die Antikörperfärbung, wurde nun bestimmt.

3.3 Kultivierung der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

3.3.1 Induktion von Oberflächen-präsentierten Proteinen und SDS-PAGE

Zur Induktion der Genexpression Oberflächen-präsentierter Proteine werden Hefezellen in Induktionsmedium kultiviert. Das hier verwendete System besteht aus dem modifizierten Hefestamm YKM2, der das *AGA1*-Gen unter Kontrolle des *tetO7-CYC1*-Promotors im Hefegenom trägt und dem pEG6-Expressionvektor mit dem *AGA2*-Gen unter Kontrolle des *tetO7-CYC1*-Promotors (Diplomarbeit, Georgoudis 2004). Der Hefestamm YKM2 reguliert die Expression von

GFP über dem *MET25*-Promotor, daher enthält das Induktionsmedium (2.11) kein Methionin, kein Tryptophan zur Selektion auf das pEG6-Plasmid und Glukose als Kohlenstoffquelle.

- Hefen werden in 5 ml Minimalmedium (SD Trp-, Met-) mit einer Start OD₆₀₀ von 0.1 angeimpft und über Nacht unter rotierendem Schütteln bei 30 °C inkubiert.
- Zum Nachweis der Proteinexpression werden eine OD₆₀₀ von 4 an Zellen für 1 min bei 13000 Upm (Hereaus Biofuge pico) pelletiert und mit 1 ml dest. H₂O gewaschen.
- Das Zellpellet wird in 32.5 µl dest. H₂O resuspendiert sowie 12.5 µl 4 x SDS-Ladegelpuffer (50 mM Tris/HCl pH 6.9, 2 % SDS, 0.1 % Bromphenolblau, 5 % Glycerin) und 5 µl 1 M DTT zugefügt.
- Die Zellen werden für 30 min bei 100 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und können nun mittels Westernblot analysiert werden.

3.3.2 α -Mannosidase Verdau Oberflächen-präsentierter Proteine

Da das Aga2p des Hefe-Oberflächen-Präsentationssystems stark O-glykosyliert ist (Shen, Wang *et al.*, 2001), zeigt sich im Westernblot ein großer Unterschied zwischen dem theoretisch erwartetem und dem apparenten Laufverhalten. Daher wurden Zellextrakte Aga2p und Aga2p-Fusionsprotein exprimierender Hefezellen mit α -Mannosidase behandelt.

- Für die α -Mannosidase Behandlung werden eine OD₆₀₀ von 10 an Zellen für 2 min bei 13000 Upm (Hereaus Biofuge pico) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert und mit 1 ml PBS gewaschen.
- Das Zellpellet wird in 150 µl PBS + 50 µl Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche) resuspendiert, 2/3 der Probevolumens an Glasperlen zugefügt und der Zellaufschluss für 20 min bei 4 °C auf dem Vibrax durchgeführt.
- Die Glasperlen werden für 1 min bei 3000 Upm und 4 °C pelletiert, der Überstand für 10 min bei 13000 Upm und 4 °C zentrifugiert.
- Der klare Überstand wird in neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 U α -Mannosidase für mind. 2 h bei 37 °C inkubiert.
- Es wird 50 µl 4 x SDS-Ladegelpuffer und 20 µl 1 M DTT zugegeben, für 10 min bei 100 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und mittels Westernblot analysiert.

3.3.3 Indirekte Immunfluoreszenz Oberflächen-präsentierter Proteine

- Ein Multiwell-Objektträger wird mit ddH₂O gewaschen, getrocknet, in jede Vertiefung 20 µl Poly-L-Lysin (0,5 mg/ml) gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Das Poly-L-Lysin wird mit dest. Wasser vom Objektträger abgewaschen und getrocknet.
- 1 OD₆₀₀ an Hefe einer Induktionskultur werden geerntet, mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS aufgenommen. Bei Bedarf werden die Zellen durch Inkubation in Methanol fixiert.
- Pro Vertiefung werden 20 µl Hefezellen aufgetragen und für 10 min bei RT in einer feuchten, geschlossenen Kammer inkubiert.

- Die Zellen werden abgenommen und auf jede Vertiefung 20 µl Blockierungslösung (1 % BSA, 0.5 % Tween in PBS pH 7.4) getropft und für 30 min in der feuchten Kammer inkubiert.
- Der primäre Antikörper (α -Xpress) wird 1:500 in Blockierungslösung verdünnt und 20 µl pro Vertiefung aufgetragen und für 2 h bei RT (oder ü/N bei 4 °C) in der feuchten Kammer inkubiert.
- Die Vertiefungen werden 3 x mit je 20 µl Blockierungspuffer gewaschen, der sekundären Antikörper (α -Maus Cy3) wird 1:200 in Blockierungslösung verdünnt, pro Vertiefung 20 µl aufgetragen und für 1 h bei RT in der feuchten Kammer inkubiert.
- Die Vertiefungen werden 3 x mit je 20 µl Blockierungspuffer gewaschen, die Zellen angetrocknet, mit 1 µl Vectashield beschichtet, mit einem Deckglas abgedeckt und durch Nagellack versiegelt.
- Die Oberflächenpräsentation von Proteinen kann nun mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden.

3.3.4 Adhäsionstest mit Hilfe des Hefe-Oberflächen-Präsentationssystems

Durch den Hefe-Adhäsionstest wurde das Bindeverhalten von Proteinen, die auf der Hefezelloberfläche präsentiert werden, an eukaryotische Zellen untersucht. Adhärente epitheliale HEp-2 Zellen wurden verwendet und daran adhärenzte Hefezellen quantifiziert, die Aga2p bzw. Aga2p-Fusionsproteine exprimieren, wobei das Protein C-terminal mit dem Aga2p fusioniert ist.

- Eine 24-Well Platte wird mit sterilen Glasplättchen bestückt, jeweils 5×10^4 HEp-2 Zellen ausgesät und 48 h im Brutschrank bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert.
- Eine Übernachtskultur induzierten Hefezellen wird mikroskopisch quantifiziert und für den Adhäsionstest 10^6 Hefezellen (10 Hefezellen/HEp-2 Zelle) in 1 ml PBS für 1 h bei 4 °C unter leichtem Schwenken mit den HEp-2 Zellen inkubiert.
- Die Hefezellen werden abgenommen und HEp-2 Zellen unter mikroskopischer Beobachtung vorsichtig mit PBS gewaschen bis Zellzwischenräume frei von ungebundenen Hefezellen sind.
- Die Zellen werden mit 0.5 ml 3 % para-Formaldehyd in PBS für mindestens 10 min fixiert, die Fixierungslösung entfernt und die Glasplättchen aus der 24-Well Platte entnommen und getrocknet.
- Auf einen Objektträger werden 3 µl Glycerin/PBS-Lösung (1:9) gegeben und das Glasplättchen mit den Zellen nach unten in die Glycerinlösung gelegt.
- Bei 63 x Vergrößerung werden pro Deckgläschen 1000 HEp-2 Zellen und die daran gebundenen Hefezellen ausgezählt.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Transfektion von HEK293T-Zellen mittels Calciumphosphat

Bei der Transfektion von Plasmid-DNA bindet die zu übertragende DNA an ausgefallenes Calciumphosphat, wird von humanen Zellen endozytiert und zum Kern transportiert.

- 10^5 HEK293T-Zellen werden 24 h vor der Transfektion in 24-Well Platten mit Deckgläschen ausgesät.
- 1 μ g Plasmid-DNA, 10 μ l 1 M CaCl_2 und 30 μ l ddH_2O mischen.
- DNA/ CaCl_2 Lösung tropfenweise unter Vortexen zu 40 μ l 2 x BBS (50 mM BES pH 6.96, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na_2HPO_4) geben, 15 - 20 min bei RT inkubieren und tropfenweise unter leichtem Schwenken zu den Zellen in Medium pipettieren.
- Nach 6 h Inkubation bei 37 °C und 6 % CO_2 den Überstand abnehmen, Zellen mit Medium waschen und mit frischem Medium überschichten.
- Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 6 % CO_2 das Medium abnehmen, 2 x mit HBSS waschen und Zellen mit 3 % para-Formaldehyd für die Mikroskopie fixieren.

3.4.2 Transferrin Endozytose Assay

- Konfluente adhärenente HEp-2 Zellen werden in Serum-freiem Medium + 0,1 % BSA für 30 min bei 37 °C, anschließend 10 min bei 4 °C inkubiert und das Medium abgenommen.
- 10 μ g/ml biotinyliertem Transferrin in 150 μ l Serum-freiem Medium + 0,1 % BSA wird für 1 h bei 4 °C mit den Zellen inkubiert.
- Dazu wird nun His₆-Fusionsprotein in PBS mit einer Endkonzentration zugegeben und in einer Zeitkinetik von 2 – 60 min bei 37 °C mit den Zellen inkubiert.
- Die Zellen werden mit PBS gewaschen und extrazelluläres Transferrin durch zweimaliges Waschen mit saurem Puffer (0.5 M NaCl, 0.2 M NaAcetat pH 4.5) entfernt.
- Zellen werden mit Accutase abgelöst, pelletiert und 30 min bei 4 °C in 65 μ l Ripa-Puffer (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 2 % SDS, 0.5 % Na-deoxycholat) lysiert
- Es wird 25 μ l 4 x SDS-Ladegelpuffer und 10 μ l 1 M DTT zugegeben, für 10 min bei 100 °C gekocht, 25 μ l für einen Westernblot geladen und endozytiertes biotinyliertes Transferrin mit einem Streptavidin-AP konjugierten Antikörper nachgewiesen.

HEK293-Zellen werden für 24 h mit verschiedenen Plasmiden transfiziert, der Transferrin Endozytose Assay wie beschrieben durchgeführt und adhärenente Zellen mit 3 % para-Formaldehyd fixiert. Die Detektion von Transferrin erfolgt mit einem Streptavidin-APC Antikörper (1:40 in PBS).

3.4.3 Adhäsion Protein-beschichteter Latexkügelchen mittels Mikroskopie

Die Quantifizierung des Adhäsionsverhaltens Protein-beschichteter Latexkügelchen an humane HEp-2 Zellen erfolgte mit dem FACSaria Durchflusszytometer.

- 10^5 HEp-2 Zellen werden auf Deckgläschen ausgesät und für 2 Tage inkubiert.

- Protein_{6His}-beschichtete Latexkugeln (200 µg/ml) in Zellkulturmedium werden mit 20 x Überschuss für 5 min bei 700 Upm und 30 °C auf die Zellen zentrifugiert und es folgt eine Inkubation für 1 h bei 37 °C und 6 % CO₂.
- Nicht gebundene Latexkugeln werden durch Waschen mit PBS entfernt bis die Zellzwischenräumen frei von Latexkugeln sind und Zellen für mind. 20 min mit 3 % para-Formaldehyd fixiert.
- Bei der Mikroskopie mit einem 63 x Objektiv werden pro Deckgläschen von 10 Gesichtsfeldern Bildausschnitte mit 1120 x 960 Pixeln fotografiert. In diesen Bildern werden die Zahl an HEp-2 Zellen und daran gebundener Beads quantifiziert und so die durchschnittliche Zahl an Latexkugeln/HEp-2 Zellen bestimmt (n = 3).

3.4.4 Quantifizierung der Adhäsion Protein-beschichteter Latexkugeln mittels FACS

Die schnelle Quantifizierung der Adhäsion von Protein-beschichteten Latexkugeln an humane HEp-2 Zellen erfolgte mit dem FACSAria Durchflusszytometer.

- 10⁵ HEp-2 Zellen werden auf Deckgläschen ausgesät und für 2 Tage inkubiert.
- Protein_{6His}-beschichtete Latexkugeln (200 µg/ml) in Zellkulturmedium werden mit 20 x Überschuss für 5 min bei 700 Upm und 30 °C auf die Zellen zentrifugiert und es folgt eine Inkubation für 1 h bei 37 °C und 6 % CO₂.
- Nicht gebundene Latexkugeln werden durch Waschen mit PBS entfernt bis die Zellzwischenräumen frei von Latexkugeln sind, durch Zugabe von 250 µl Accutase (PAA) und Inkubation für 10 min bei RT werden die Zellen abgelöst.
- Es werden 750 µl Zellkulturmedium zugegeben, die Zellen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 3 min bei 3000 Upm (Hereaus Biofuge Pico) sedimentiert.
- Die Zellen werden vorsichtig in 200 µl PBS resuspendiert, 800 µl 3.7 % para-Formaldehyd zugegeben, gemischt und 30 min bei Raumtemperatur fixiert.
- Die Zellen werden für 3 min bei 4000 Upm pelletiert, in 300 µl PBS resuspendiert und es werden im FACSAria von jeweils 10.000 HEp-2 Zellen und daran gebundene Latexkugeln die mittlere FITC-Fluoreszenz bestimmt.
- Einzelne Latexkugeln werden mit derselben Verstärkung im FITC-Kanal analysiert. Die Division der Fluoreszenz der HEp-2 Zellen und der mittleren Fluoreszenz eines Latexkugels, ermöglicht die Bestimmung der Anzahl Latexkugeln/HEp-2 Zelle (n = 3).

3.4.5 Internalisierungstest von Latexkugeln

Zur Untersuchung des Internalisierungsverhaltens von Proteinen in Abwesenheit anderer bakterieller Faktoren werden blau fluoreszierende 1 µm Latexkugeln (Sigma) verwendet.

- 10⁵ HEp-2 Zellen werden auf Deckgläschen ausgesät und für 2 Tage inkubiert.
- Protein_{6His}-beschichtete Latexkugeln (200 µg/ml) in Zellkulturmedium werden mit 20 x Überschuss für 5 min bei 700 Upm und 30 °C auf die Zellen zentrifugiert und es folgt eine Inkubation für 3 h bei 37 °C und 6 % CO₂.

- Nicht gebundene Latexkugeln werden durch Waschen mit PBS entfernt, bis Zellzwischenräumen frei von Latexkugeln sind und Zellen für 20 min mit 3 % para-Formaldehyd fixiert.
- Eine Immunfluoreszenz mit primärem His- oder antigengereinigtem Antikörper in Kombination mit einem sekundären FITC-markierten Antikörper, dient der Differenzierung von adhären und internalisierten Latexkugeln.
- Nur außen, gebundene Latexkugeln werden ohne Permeabilisierung der Zellen gefärbt. Durch Quantifizierung im Fluoreszenzmikroskop ergibt der Quotient aus der totalen Zahl (blau) und der Zahl gebundener Latexkugeln (blau und grün) die Zahl internalisierter Latexkugeln.

3.4.6 Bestimmung der Adhäsion CFSE-markierter Chlamydien mittels FACS

- Es wird zuvor mit einer Verdünnungsreihe ermittelt, mit welchem Volumen die im FACS gemessene Fluoreszenz linear zur Menge gebundener Chlamydien ist.
- 5×10^5 HEp-2 Zellen werden ausgesät und für 48 Std. im Brutschrank inkubiert bis sich ein konfluenter Zellrasen gebildet hat.
- Die Zellen werden mit 200 μ l Proteinlösung variabler Konzentrationen in Zellkulturmedium für 1 h bei 37 °C und 6 % CO₂ im Brutschrank inkubiert, für 30 min bei 4 °C abgekühlt, da nur die Adhäsion und keine Internalisierung der Chlamydien bestimmt werden soll.
- 5 - 10 μ l CFSE-markierte gradientengereinigte Chlamydien werden zur Proteinlösung gegeben, für 5 min bei 700 Upm (Hereaus Rotanta 460R) und 4 °C zentrifugiert und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Im Falle von Heparin wurden CFSE-Chlamydien für 20 min bei 4 °C mit 500 μ g/ml Heparin vorhanden.
- Die Zellen werden nun mehrfach mit PBS gewaschen, durch Zugabe von 250 μ l Accutase (PAA) oder Trypsin/EDTA und Inkubation für 10 min bei RT werden die Zellen abgelöst.
- Es werden 750 μ l Zellkulturmedium zugegeben, die Zellen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 3 min bei 3000 Upm (Hereaus Biofuge Pico) sedimentiert.
- Die Zellen werden vorsichtig in 200 μ l PBS resuspendiert, 800 μ l 3.7 % para-Formaldehyd zugegeben, gemischt und 30 min bei Raumtemperatur fixiert.
- Die Zellen werden für 3 min bei 4000 Upm pelletiert, in 300 μ l PBS resuspendiert und können nun direkt mittels FACS analysiert oder ü/N bei 4 °C gelagert werden.

3.4.7 Durchflusszytometrie

Sämtliche Analysen mittels Durchflusszytometrie (Adhäsion von CFSE-markierten Chlamydien, Latexkugeln und FITC-markiertem Protein) wurde mit Hilfe des FACSAria (BD Biosciences) durchgeführt. Dabei werden Fluoreszenzfarbstoffe gebunden an Zellen einer Einzelzellsuspension durch monochromatisches Laserlicht (488 oder 633 nm) angeregt, resultierend in der Emission von Licht eines definierten Wellenlängenspektrums, welches mit Hilfe von Sensoren detektiert und rechnergestützt aufgearbeitet wird. Je nach Beschaffenheit der Zellen kommt es zu einer

Streuung des Laserlichtes in das Vorwärtsstreulicht (FSC = forward scatter) und das Seitwärtsstreulicht (SSC = sideward scatter) und erlaubt so Rückschlüsse auf Größe und Granularität der Zelle.

3.4.8 Konventionelle Fluoreszenzmikroskopie und Konfokalmikroskopie

Sämtlich Fluoreszenzmikroskopie wurde entweder mit dem Zeiss Axioskop 50 in Kombination mit der Software Image Pro Plus (Media Cybernetics) oder am Institut für Genetik der Universität Düsseldorf mit dem Konfokalmikroskop Zeiss LSM 510 und der mitgelieferten Software durchgeführt.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Spaltung von Plasmid-DNA und zur Überprüfung einer korrekten Integration nach einer homologen Rekombination werden Restriktionsendonukleasen mit Hersteller-spezifischen Puffern verwendet und die DNA für 2- 5 h oder ü/N verdaut. Die erhaltene Fragmente werden im Agarosegel aufgetrennt und gegebenenfalls mittels QIAEX II Gel Extraction Kit aus dem Agarosegel eluiert.

3.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe von synthetisierten Oligonukleotiden (Primern), die komplementär zu den Randbereichen der zu amplifizierenden Sequenz sind, wird der Bereich zwischen den Primern durch eine thermostabile DNA-Polymerase dupliziert. Durch mehrfache Zyklen von Denaturierung der DNA-Stränge, Anlagerung der Primer (Annealing) und DNA-Synthese (Elongation) wird ein exponentielle Vermehrung eines DNA-Fragments erreicht, da jeder neu gebildete Strang als Matrize für die Synthese eines weiteren Stranges genutzt wird.

3.5.2.1 Amplifikation von Plasmid-DNA und chlamydialen/humanen Gensequenzen

Die Elongationstemperatur wurde abhängig von der verwendeten thermostabilen DNA-Polymerase gewählt. Um fehlerfreie chlamydiale Gensequenzen für Klonierungen zu generieren sollte die Amplifikationsgenauigkeit sehr hoch sein und wird durch Verwendung einer Pfx-Polymerase mit Korrekturlesefunktion („proof-reading“) erzielt, deren Temperaturoptimum bei 68 °C liegt. Für PCR-Reaktionen die keine Korrekturlesefunktion benötigen wird die Taq-Polymerase bei einer Elongationstemperatur von 72 °C verwendet, wobei die Zeit des Elongationsschrittes mit 1 min pro 1000 Nukleotide festgesetzt wird.

Tabelle 11: PCR-Ansätze für Plasmid-DNA bzw. chlamydiale genomische DNA

Pfx-Polymerase PCR		Taq-Polymerase PCR	
x µl	10 -100 ng Plasmid/Cpn-gDNA	x µl	10 -100 ng Plasmid/Cpn-gDNA
1 µl	Oligonukleotid 1 (50 pmol/µl)	1 µl	Oligonukleotid 1 (50 pmol/µl)
1 µl	Oligonukleotid 2 (50 pmol/µl)	1 µl	Oligonukleotid 2 (50 pmol/µl)
2,5 µl	dNTPs (4 mM)	5 µl	dNTPs (4 mM)
5 µl	Pfx-Puffer (10 x)	5 µl	Taq-Puffer (10 x)
1 µl	Pfx-Polymerase (1 U/µl)	1 µl	Taq-Polymerase (1 U/µl)
3 µl	MgSO ₄ (50 mM)	4 µl	MgCl ₂ (25 mM)
5 µl	Enhancer (10 x)		
ad 50 µl	ddH ₂ O	ad 50 µl	ddH ₂ O

Tabelle 12: PCR-Bedingungen

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
initiale			
Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	1 min	35 x
Annealing	50-56 °C	1 min	
Elongation	68 °C / 72 °C	1-3 min	
finale Elongation	68 °C / 72 °C	7 min	
Abkühlen	4 °C	∞	

3.5.2.2 PCR auf Hefezellen

Zur Verifikation positiver Hefeklone nach einer homologen Rekombination werden mit einer Pipettenspitze Zellen von Einzelkolonien in 10 µl ddH₂O resuspendiert und eine PCR mit Taq-Polymerase (Tabelle 1) in einem Gesamtvolumen von 25 µl durchgeführt unter Zusatz von DMSO und Tween 20 als Enhancer. Wurde Hefezellen längere Zeit bei 4 °C gelagert, wurden die Zellen vor der PCR-Reaktion in 0,02 M NaOH für 10 min gekocht.

3.5.3 Transformation und homologe Rekombination in *S. cerevisiae*

Um Plasmide und Integrationskassetten in Hefe zu transformieren, wurde ein hocheffizientes Transformationsprotokoll basierend auf der Lithiumacetat-Methode angewandt (Gietz, Schiestl et al. 1995). Ein gewünschtes DNA-Fragment kann dabei über homologe *in vivo* Rekombination in einen zuvor linearisierten Zielvektor integriert werden. Dabei wird das gewünschte DNA-Fragment über PCR amplifiziert, unter Verwendung von zwei spezifischen Oligonukleotiden die jeweils 40 Nukleotide Homologie zum Zielplasmid sowie 18-22 Nukleotide Homologie zum Zielgen besitzen. Das erhaltene PCR-Produkt und das zuvor linearisierte Plasmid werden in einem Verhältnis von 3:1 eingesetzt und in der Hefe 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.

3.5.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Das Verfahren beruht auf einer von der Firma Qiagen modifizierten Methode der alkalischen Lyse (Sambrook, Maniatis *et al.*, 1989). Für die Gewinnung sauberer Plasmid-DNA in Mengen von bis zu 100 µg wurde eine 50 ml ü/N - *E. coli* Kultur mit dem QIAGEN Plasmid-Midi Kit aufgereinigt.

3.5.5 Transformation in *E. coli*

3.5.5.1 Ein-Minuten Transformation

Zur Transformation in *E. coli* wurde einerseits eine schnelle 1-Minuten-Transformation durchgeführt, die aber aufgrund der niedrigen Effizienz nur für die Transformation von Plasmid-DNA geeignet ist.

- 7 µl DMSO kompetente *E. coli* Zellen (XL₁, BL21, Rosetta, Origami) hergestellt wie beschrieben in Sambrook, Maniatis *et al.*, 1989 werden auf Eis aufgetaut und mit 10 – 100 ng Plasmid-DNA gemischt.
- Der Ansatz wird für 1 min bei 42°C erhitzt, die Probe in 200 µl LB aufgenommen, auf einer LB-Ampicillin Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.5.5.2 Transformation durch Elektroporation

Die Transformation von *E. coli* durch Elektroporation wird verwendet für Plasmid-DNA isoliert auf *S. cerevisiae* und basiert auf einem hoch effizienten Protokoll (Sambrook, Maniatis *et al.*, 1989). Die dafür verwendeten elektrokompenten *E. coli* XL₁-blue Zellen werden in der Arbeitsgruppe selbst hergestellt und 1 – 10 ng DNA einer Hefe-DNA-Isolation in 20 µl Zellen eingebracht mit folgenden Geräteparametern des Biorad Gene Pulser: 2,1 kV, 200 Ω und 25 µF.

3.5.6 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung und Sequenzierung

Die DNA-Lösung wird 1:20 in einem Endvolumen von 100 µl mit ddH₂O verdünnt, in eine Quarzküvette gefüllt und die gemessene Absorption bei 260 nm entspricht der Menge DNA in µg/µl in der Ausgangslösung. Die Reinheit der DNA-Lösung wird durch den Absorptionsquotienten 260/280 nm ermittelt und sollte zwischen 1,8 und 2 liegen. Alle generierten Plasmide wurden von der Firma GATC-Biotech sequenziert.

3.5.7 Transkriptionskopplungsanalysen

Nach reverser Transkription chlamydialer mRNA wird eine PCR auf die generierte cDNA durchgeführt, die ein PCR-Produkt liefert wenn 2 benachbarte Gene als eine transkriptionelle Einheit (Operon) exprimiert werden und somit zusammen die cDNA bilden.

- In eine RNase freies Reaktionsgefäß werden 1 µg chlamydiale RNA (72 hpi), 9 µl ddH₂O und 500 ng pd(N)₆ random hexamer Oligonukleotide gemischt um cDNA zu generieren.
- Das Gemisch wurde 10 min bei 70 °C inkubiert um RNA-Sekundärstrukturen aufzulösen und dann 5 min auf Eis abgekühlt.
- Ein Mastermix aus Erststrang-Puffer, DTT, MgCl₂, dNTPs und SuperScript III RT wird dem Ansatz zugefügt, gemischt und kurz zentrifugiert.

- Nach Inkubation für 60 min bei 50 °C wird der Ansatz zur Inaktivierung der reversen Transkriptase für 15 min bei 70 °C inkubiert und dann auf Eis gestellt.
- RNase H wird zugesetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert um verbliebene RNA abzubauen.

Tabelle 13: Reaktionsansatz für die reverse Transkription

Komponente	Volumen
<i>C. pneumoniae</i> RNA 72 hpi [DNA frei] (1 µg)	1 µl
pd(N) ₆ random hexamer (0,5 µg/µl)	1 µl
Erststrang-Puffer (5 x)	4 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
dNTP-Mix (2,5 mM)	4 µl
SuperScript III Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl
<i>E. coli</i> RNase H (2 U/µl)	1 µl
ddH ₂ O	84 µl
Total	100 µl

3.5.8 Real Time PCR

Die quantitative Real-Time-PCR ermöglicht es, über die Fluoreszenzintensität eines in dsDNA interkalierenden Farbstoffes kontinuierlich die Menge an Produkt während einer PCR zu bestimmen. Die Messung erfolgt am Ende jedes PCR-Zyklus bei einer Temperatur unterhalb der Schmelztemperatur der Amplifikate. Dadurch erreicht man, dass nur das Produkt doppelsträngig vorliegt und ein Fluoreszenzsignal aussendet. Der Zyklus, bei dem die gemessene Amplifikationskurve den festgesetzten Schwellenwert übersteigt, wird als CT-Wert (Threshold-Cycle) definiert und befindet sich immer in der exponentiellen Phase der Amplifikation. Die Quantifizierung erfolgte durch einen klonierten Standard in bekannter Ausgangskonzentration, so dass sich durch die parallele Amplifikation von cDNA und gDNA desselben Infektionszeitpunktes die Kopienzahl (RNA/DNA) bestimmen lässt.

3.5.8.1 Plasmid-Standard zur Bestimmung der Molekülanzahl

Als Standard-DNA dient das Plasmid pSW1 (Willger, Diplomarbeit 2004), in dem ein Teil des AGA2-Lokus der Hefe von *C. pneumoniae*-spezifischen ompA-Sequenzen flankiert ist. Nach Amplifikation mit den ompA-spezifischen Oligonukleotiden C-225 und C-226 entsteht ein PCR-Produkt von 158 bp, auf chlamydialer genom. DNA wird ein 83 bp-langes DNA-Fragment des ompA-Gens amplifiziert. Die Konzentration des Plasmids pSW1 beträgt 0,416 pmol (0,858 µg/µl Plasmid-DNA von 3122 bp) und Verdünnungen von 10⁻⁴ (5 x 10⁷ Moleküle) bis 10⁻⁹ (5 x 10² Moleküle) werden angesetzt. Durch den Plasmidstandard wird so ein erhaltener CT-Wert einer definierten Molekülanzahl zugeordnet.

3.5.8.2 Real Time PCR zur Bestimmung der Kopienzahl RNA/DNA

Zur Überprüfung einzelner *C. pneumoniae* Gene während des gesamten Entwicklungszyklus werden nun für jeden Infektionszeitpunkt 2 µl des cDNA-Ansatzes (Tabelle 14) bzw. 100 ng gDNA als Template eingesetzt.

Tabelle 14: Reaktionsansatz für die Real Time PCR

Komponente	Volumen/Menge	Programm
<i>C. pneumoniae</i> cDNA / gDNA	2 µl / 100 ng	10 min 95 °C
<i>C. pneumoniae</i> genspez. Primermix (500 nM)	4 µl	15 sek 95 °C
20 x SYBR-Green Solution	1 µl	15 sek 60 °C 45 Zyklen
2.5 x RealMasterMix SYBR ROX	8 µl	30 sek 68 °C
ddH ₂ O	5 µl	
Total	20 µl	

Die Datenaufzeichnung fand während des Elongationsschritts statt und wurde mit dem Real Time PCR ABI Prism 7000 von Applied Biosystems durchgeführt. Über die erhaltenen CT-Werte kann nun die jeweilige Molekülanzahl berechnet werden und das Verhältnis beider Molekülanzahlen ergibt die Kopienzahl (RNA/DNA).

3.6 Biochemische Methoden

3.6.1 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 0.4 – 0.6 IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM zugefügt und die Induktion der Genexpression durch Aufarbeitung von Proteinproben für SDS-PAGE überprüft.

- Präparative 1 l Kulturen werden nach Zugabe von IPTG für 4 h bei 37 °C induziert und die Zellen für 10 min bei 5000 Upm (Beckman J2-21) und 4 °C pelletiert.
- Das Pellet wird in 20 ml sterilem PBS gewaschen, für 5 min bei 6000 Upm (Hereaus Megafuge 1.0) und 4 °C pelletiert und das Zellpellet bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

3.6.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen

Durch Affinitätschromatographie können His₆- oder GST-Fusionsproteine mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose bzw. Glutathion-Agarose aus *E. coli* Zellextrakten aufgereinigt werden. Proteine ohne His₆- oder GST-Tag binden nicht an das Trägermaterial und werden durch mehrmaliges Waschen entfernt. Im finalen Schritt der Elution werden die über den Tag gebundenen Proteine durch Zugabe eines spezifischen Kompetitors (Imidazol bzw. reduziertes Glutathion) vom Trägermaterial gelöst, gesammelt und mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert.

3.6.2.1 Aufreinigung von His₆-Fusionsprotein unter denaturierenden Bedingungen

- Das Zellpellet einer 1 l Induktionskultur wird aufgetaut, zur Lyse in 20 ml Puffer B (8 M Harnstoff, 0.1 M NaH₂PO₄, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0) + 2 % Sarkosyl resuspendiert, unter rotierendem Schütteln für 60 min bei RT inkubiert und 3 x 10 sek mit dem Ultraschallstab sonifiziert.

- Das Lysat wird für 20 min bei 12000 Upm (Beckman Avanti J-25) in einem Ultrazentrifugationsefäß zentrifugiert und der geklärte Überstand kann nun für die affinitätschromatographische Reinigung eingesetzt werden.
- Zum Lysat wird 1.5 ml Ni-NTA-Agarose gegeben, mit Puffer B auf 40 ml aufgefüllt, Imidazol mit einer Endkonzentration von 20 mM zugefügt und 2 h auf dem Rad inkubiert.
- Es wird eine Säule verwendet die unten durch eine Fritte verschlossen wird, sodass die Ni-NTA Agarose nicht durchlaufen kann. Die Säule wird 2 x mit dem Lysat beladen und die Säule nun mit 15 ml Puffer B + 20 mM und 40mM Imidazol gewaschen und die Waschfraktion aufgefangen.
- Die Säule wird mit 15 ml Puffer C (8 M Harnstoff, 0.1 M NaH₂PO₄, 10 mM Tris/HCl, pH 6.3) + 20 mM Imidazol gewaschen und die Waschfraktion aufgefangen. Achtung: pH-Wert von Puffer C überprüfen.
- Das His₆-Fusionsprotein wird durch Inkubation mit 6 ml Puffer C (+ 250 mM Imidazol) für 5 min eluiert und jeweils 2 ml Elutionsfraktionen (E1-E3) aufgefangen.
- Es erfolgt eine Totalelution (TE) mit 2 ml Puffer C (+ 500 mM Imidazol).
- Nach Überprüfung der Elutionsfraktionen in einem Coomassie gefärbten SDS-Gel werden die Proteine in gekochten Dialysenschläuchen (Ausschlussgröße 3 kDa bzw. 12 -15 kDa) zur Renaturierung und Rückfaltung 2 x gegen jeweils 2 Liter 1 x PBS pH 7.4 oder andere Puffer bei 4 °C dialysiert.

3.6.2.2 Aufreinigung von nativen GST-Fusionsproteinen mittels FPLC

- Das Zellpellet einer 1 l Induktionskultur wird aufgetaut, in 20 ml PBS + 1 mM PMSF resuspendiert, 0,5 mg/ml Lysozym hinzugegeben und die Lyse erfolgt für 1 h auf Eis.
- Das Lysat wird in vorgekühlte Metallbecher überführt und 3 x 10 sek mit dem Ultraschallstab auf Eis sonifiziert mit Pausen von 30 sek zur Abkühlung des Lysates.
- Das Lysat wird 20 min bei 15000 Upm (Avanti J-25) und 4 °C zentrifugiert und der geklärte Überstand vor der affinitätschromatographische Reinigung mittels ÄKTA Prime Plus durch einen Filter mit 0.45 µm Porengröße sterilfiltriert.
- Es wurden die ÄKTAprime™ Plus und 1 ml GSTrap™ HP Säulen (GE Healthcare) mit dem Programm „GST purification“ verwendet und als Bindepuffer 1 x PBS pH 7.4 sowie als Elutionspuffer 50 mM Tris/HCl + 10 mM red. Glutathion pH 8 verwendet.

3.6.3 Auftrennung von Proteinproben mittels SDS-PAGE

In der eindimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) werden Proteine nach Größe aufgeteilt. Dabei erhalten die Proteine durch gebundenes SDS eine negative Ladung, die proportional zu ihrem Molekulargewicht ist, sodass die SDS-Protein-Komplexe in der Gelmatrix nach ihrer molaren Masse aufgetrennt werden. Bei der verwendeten Methode nach Lämmli werden die Proteine zunächst in einem Sammelgel für eine saubere Bandenbildung an der Front zum Trenngel konzentriert und dann in 10 – 14 % igen Trenngelen aufgetrennt. Dazu wurden vertikale Minigel-Elektrophoresekammern Hoefer SE 260 verwendet.

- Die Komponenten des Trenngels werden gemischt und zwischen 7 x 9 cm große Glas- und Aluminiumplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet.
- Nach dem Auspolymerisieren des Gel wird das Isopropanol abgegossen, mehrfach mit Wasser gespült und nun das Sammelgel luftblasenfrei auf das Trenngel gegossen und mit einem Kamm versehen.
- Nach dem Auspolymerisieren wird das Gel in die Apparatur mit Laufpuffer (0.2 M Glycin, 0.05 M Tris/HCl pH 8.3, 0.1 % SDS) aufgefüllt, 10 - 30 µl Probe/Ladetasche aufgetragen und bei 120 – 170 V (ca. 20 mA) für 1 – 3 h aufgetrennt.

Tabelle 15: Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel

Trenngel	Acrylamid (30:0,8)	4 x Trenngel-puffer pH 8,8	Ammoniumper-sulfat (10%)	TEMED	ddH ₂ O
10 %	13,3 ml	10 ml	200 µl	50 µl	16,5 ml
12 %	16,0 ml	10 ml	200 µl	50 µl	13,8 ml
14 %	18,6 ml	10 ml	200 µl	50 µl	11,2 ml
Sammelgel	Acrylamid (30:0,8)	4 x Sammelgel-puffer pH 6,8	Ammoniumper-sulfat (10%)	TEMED	ddH ₂ O
	1,5 ml	2,5 ml	200 µl	20 µl	6 ml

Trenngelpuffer: 1.5 M Tris pH 8,8 + 0,4 % SDS Sammelgelpuffer: 0.5 M Tris pH 6,8 + 0,4 % SDS

3.6.3.1 Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliantblau

- Das SDS-Polyacrylamidgel in Wasser wird für 30 sek bei 600 Watt in der Mikrowelle erwärmt, 10 min auf dem Schüttler gewaschen und dies noch einmal wiederholt.
- Die Färbung mit Coomassie-Lösung (0.02 % CBB-G250, 5 % Al₂(SO₄)₃, 10 % Ethanol, 2 % ortho-Phosphorsäure in ddH₂O) erfolgt für 30 min bis 2 h unter leichtem Schwenken.

3.6.3.2 Westernblot und Immundetektion

Das Verfahren beruht auf dem Transfer von Proteinen aus einem Acrylamidgel auf eine PVDF-Membran mittels „semi-dry blotting“ unter Verwendung der FastBlot B44 Apparatur (Biometra) und die immobilisierten Proteine können nun mittels Antikörperreaktion nachgewiesen werden.

- 4 Filterpapiere (Whatman, 7 x 9 cm) werden für 1 min in Transferpuffer (48 mM Tris , 39 mM Glycin, 20 % Methanol, 0.037 % SDS) inkubiert.
- Der Transfer der Proteine auf eine Immobilon PVDF-Membran (vorinkubiert in Methanol) erfolgt für 30 min bei 300 mA.
- Die PVDF-Membran wird 1 h bei RT unter Schütteln mit Blockierungslösung (3 % Milchpulver, 0.05 % Tween-20 in PBS pH 7.4) inkubiert und nun für 1 h bei RT mit Primäntikörper in 5 ml Blockierungslösung inkubiert.
- Die Membran wird 3 x mit PBS gewaschen und nun für 1 h bei RT mit einem alkalische Phosphatase-konjugierten Sekundäntikörper in 5 ml Blockierungslösung inkubiert.
- Die Membran wird 2 x mit PBS und 1 x mit Detektionspuffer (100 mM Tris/HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) gewaschen, mit 20 ml Farbsubstrat-Lösung (Detektionspuffer + 33 µl BCIP-Lösung (0,5 g BCIP in 10 ml ddH₂O) + 66 µl NBT (0,5 g NBT

in 10 ml 70 % DMF) bei RT inkubiert bis die Banden sichtbar sind und die Detektion mit ddH₂O abgestoppt.

3.6.4 Proteinmengenbestimmung mittels Bradford-Reagenz

Die Proteinmengenbestimmung nach Bradford basiert auf einer spezifischen Farbreaktion, bei der Coomassie Brilliantblau G250 verwendet wird. Dieser Farbstoff reagiert mit den Proteinen und bildet Komplexe mit einem Absorptionsmaximum bei $\lambda = 595$ nm, während der ungebundene Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei 465 nm zeigt. Das Verfahren eignet sich um Proteinmengen im Bereich von 0.1 - 10 μ g Gesamtprotein zu bestimmen. Die Proteinbestimmung erfolgt mit dem BioRad®-Proteinassay (BioRad) unter paralleler Erstellung einer Standardkurve bekannten Proteingehaltes mit Rinderserumalbumin (BSA Fraktion V, Serva).

- Je nach Proteinkonzentration werden 800 – x μ l ddH₂O, 200 μ l Bradford-Reagenz und x μ l Proteinlösung gemischt und 10 min bei RT inkubiert (x = 1 – 10 μ l) und die Absorption bei 595 nm mit dem Beckman DU-800 Spektralphotometer bestimmt.
- Die Absorptionswerte von Lösungen mit 0 – 10 μ g BSA liefern die Steigung einer Eichkurve.
- Die Proteinendkonzentration bei Einsatz von 10 μ l Proteinlösung errechnet sich folgendermaßen: **Proteingehalt [μ g/ml] = Absorption_{595 nm} x 18,64 x 100**

3.6.5 GST-Pulldown Experimente

- *E. coli* Induktionskulturen die chlamydale His₆-Fusionsproteine exprimieren werden für 1 h in 10 ml Lysispuffer (PBS pH 7.4, 0.2% Triton, 0.5 mg/ml Lysozym, 35 mg/ml PMSF) bei 4 °C inkubiert und 3 x 10 sek mit dem Ultraschallstab auf Eis sonifiziert.
- Das Lysat wird 20 min bei 15000 Upm (Avanti J-25) und 4 °C zentrifugiert, Glycerin mit einer Endkonzentration von 2 % zugefügt und mittels Bradford-Reagenz der Gesamtproteingehalt des Zelllysats für das Pulldown-Experiment bestimmt.
- 10 mg Glutathione Agarose (Bindekapazität 5 – 10 mg/ml) in 2 ml Wasser für 30 min bei RT quellen lassen, Agarose bei 13.000 Upm pelletieren und mit 1 ml 1 x PBS pH 7.4 waschen.
- Es werden jeweils 1.5 nM GST (40 μ g) und GST-Fusionsprotein mit 100 μ l Agarose in 2 ml GST-Bindepuffer (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 10 % Glycerin) für 1 h bei 4°C in der Säule auf dem Rad inkubiert.
- Agarose in 1 ml 5 % BSA-Lösung in 20 mM Tris pH 8.0 ü/N bei 4°C inkubieren, mit 500 μ l GST- Bindepuffer waschen und mit 2.5 mg *E. coli* Zelllysats in 2 ml GST-Bindepuffer für 2 h bei 4°C unter rotierendem Schütteln inkubiert
- Die Agarose 2 x mit 2 ml GST-Bindepuffer waschen und für 5 min mit 75 μ l eluiert (Elutionspuffer: 50 mM Tris pH 8.0 + 10 mM red. Glutathion).
- Es werden 20 μ l 4 x SDS-Ladegelpuffer und 10 μ l 1 M DTT zugegeben, für 10 min bei 100 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und 25 μ l mittels Westernblot analysiert.

3.6.6 NHS-Pulldown Experimente

Auf der Suche nach Interaktionspartnern von Cpn0678 wurde das His-Fusionsprotein an NHS-Sepharose gekoppelt und mit Gesamtzelllysaten von HEp-2 Zellen inkubiert. Die Durchführung erfolgte dabei wie unter 3.6.13 Aufreinigung Antikörper beschrieben, unter Verwendung von 200 μ l NHS-Sepharose, 200 μ g His-Fusionsprotein und HEp-2 Zelllysate einer $\frac{1}{2}$ konfluenten 80 cm^2 Flasche.

- Eine konfluente 80 cm^2 Flasche wird 3 x mit PBS gewaschen um Medienreste zu entfernen.
- Es wird 4 ml NOPS-Puffer (10 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 % NP-40, 1 mM CaCl_2 , 1 mM PMSF) zugegeben, für 1 h bei 4°C inkubiert und das Zelllysate in Reaktionsgefäße überführt und 10 sek im Ultraschallbad sonifiziert.
- Es wird für 15 min bei 21885 g (15000 Upm / Hereaus Biofuge Primo R) und 4 °C zentrifugiert und der Überstand als Lysat für den Pulldown eingesetzt.

Die Elutionsfraktionen wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Proteinbanden aus dem Coomassie-gefärbten Gel ausgeschnitten, mittels Peptid Mass Fingerprinting (PMF) an der Universität Köln analysiert und die Peptide als Mascot-Suchergebnisse zur Verfügung gestellt.

3.6.7 Co-Immunpräzipitation nach extrazellulärem Crosslinking mittels DTSSP

Für Interaktionsstudien wurden rekombinante Proteine mit adhärenenten HEp-2 Zellen inkubiert und gebundenes Protein auf der Oberfläche der Zellen mit dem membranunlöslichen Crosslinker DTSSP vernetzt. Anschließend wird mittels NOPS-Puffer ein Zelllysate generiert, welches in einer Co-Immunpräzipitation eingesetzt wird.

- Eine konfluente 25 cm^2 Flasche mit HEp-2 Zellen wird mit 1 ml 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cpn0678_{6His} bzw. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cpn0678_{6His} in MEM für 1 h bei 37°C inkubiert, die Proteinlösung abgenommen und 2 x mit HBSS gewaschen.
- Der Crosslink erfolgt durch Inkubation der Zellen mit 1 ml einer 2 mM DTSSP-Lösung in PBS für 30 min. bei RT, nun wird bis auf Endkonzentration von 20 mM Tris pH 8.0 zugeben und 5 min. bei RT inkubiert.
- Zellen werden in 1 ml NOPS-Puffer (siehe 3.6.6) mit einem Zellschaber abgelöst, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 h bei 4°C auf dem Rad lysiert.
- Es wird für 15 min bei 21885 g (15000 Upm / Hereaus Biofuge Primo R) und 4 °C zentrifugiert und der Überstand als Lysat mit dem Antikörper (60 μg IgG) eingesetzt und für 1 h bei 4 °C inkubiert.
- Protein G Sepharose mit einer entsprechenden Bindekapazität in 100 mM Tris pH 8.0 wird mit dem Antikörper-Lysat Gemisch für 3 h bei 4°C auf dem Rad inkubiert.
- Die Protein G Sepharose für 2 min bei 13000 Upm (Hereaus Biofuge pico) pelletieren und den Überstand abnehmen, 2 x mit 500 μ l NOPS-Puffer waschen (nicht vortexen) und erneut pelletieren.
- Den Antikörper-Antigen Komplex in 70 μ l Glycin pH 2.5 für 5 min eluieren, nach Zugabe von 20 μ l 4 x SDS-Ladegelpuffer und 10 μ l 1 M DTT 10 min kochen und im Westernblot untersuchen.

3.6.8 Markierung von Proteinen mit Biotin und FITC

- Die Biotinylierung von Proteinen für Far-Western Blot Analysen erfolgte durch Biotin EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin (Pierce) in einem 20 fach molaren Überschuss nach Herstellerangaben.
- Für Adhäsionsstudien wurde eine Markierung von Proteinen mit Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimide = FLUOS (einem FITC-Derivat) an freie Aminogruppen des Proteins vorgenommen und erfolgte mit dem Fluorescein Labeling Kit (Roche) nach Herstellerangaben. Nur Protein mit einem Fluorochrom/Protein (F/P)-Ratio von kleiner 2 wurde verwendet, da sonst die Funktionalität des Proteins zu stark beeinträchtigt sein könnte.

3.6.9 Interaktionsstudien mittels Far-Western Blot

Zur Detektion direkter Protein-Protein Interaktionen *in vitro* (z.B. Rezeptor-Ligand Interaktionen) und für das Screening eines Proteins gegen eine genomweiten Expressionsbibliothek werden Far-Western Blot Analysen eingesetzt. Auch ist die Analyse post-translationaler Modifikationen auf die Interaktion möglich, sowie eine einfache Domainanalyse mit Hilfe synthetischer Peptide und es werden keine Antigen-spezifischen Antikörper benötigt. Es werden Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Nun werden die Proteine auf der Membran mit Guanidin komplett denaturiert Proteine, durch Waschen mit abnehmendem Gradienten an Guanidin die Proteine renaturiert und so die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins wiederhergestellt. Nun wird die Membran z.B. mit nativem biotinyliertem Protein inkubiert und mit einem Antigen-spezifischen oder Streptavidin-konjugierten Antikörper die Interaktion auf der Membran detektiert.

Es wurden in dieser Arbeit 0.075 nM = 2 µg GST bzw. GST-Fusionproteine als Target auf der Membran renaturiert und mit 4 µg/ml biotinyliertem His-Fusionprotein über Nacht bei 4 °C inkubiert und dabei ein Protokoll von Wu *et al.*, 2007 verwendet.

Tabelle 16: Puffer mit variierendem Guanidin-Anteil für die Renaturierung

Guanidin-HCl (M)	6	3	1	0,1	0
Glycerin (ml)	5	5	5	5	5
5 M NaCl (ml)	1	1	1	1	1
1 M Tris, pH 7.5 (ml)	1	1	1	1	1
0.5 M EDTA (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
10 % Tween-20 (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Milchpulver (g)	1	1	1	1	1
1 M DTT (ml)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
8 M Guanidin-HCl (ml)	37,5	18,6	6,3	0,6	0
ddH ₂ O (ml)	4,9	12,8	36	41,8	42,4
Total (ml)	50	50	50	50	50
Zeit/Temperatur	30 min/RT	30 min/RT	30 min/RT	30 min/4°C	2 h/4°C

3.6.10 Analyse der EB-Oberflächenzugänglichkeit chlamydialer Proteine mittels „Dot-Blot“

Bei der „Dot-Blot“-Analyse wurden gradientengereinigte EBs auf eine PVDF-Membran getropft und mit spezifischen Antikörpern inkubiert wurden. Sollten die Proteine auf der Oberfläche nachweisbar sein, müsste durch Vorbehandlung der EBs mit steigender Konzentration an Proteinase K das Signal verschwinden.

- Jeweils 5×10^9 gradientengereinigte EBs (300 μ l in sterilem PBS) wurden für 30 min bei 37°C mit 10 bzw 200 μ g/ml Proteinase K verdaut und die Proteinase durch Zugabe von 2 mM PMSF für 10 min bei RT inaktiviert. (PBS pH 7.4: 137 mM NaCl, 7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄)
- Nach Pelletieren der EBs für 20 min bei 21885 g (15.000 Upm / Heraeus Biofuge Primo R) und 4 °C wurden die EBs 30 sek durch Ultraschall in 150 μ l PBS resuspendiert und jeweils 15 μ l auf die eine PVDF-Membran getropft und für 10 min bei RT die EBs getrocknet.
- Eine Immobilon PVDF-Membran (vorinkubiert in Methanol) wurde zuvor mit Wasser und PBS gewaschen und auf ein trockenes Whatman-Filterpapier platziert.
- Die PVDF-Membran wurde ü/N bei 4°C mit dem Primärantikörper in Blockierungslösung (1 % BSA in PBS pH 7.4) inkubiert, 3 x mit PBS gewaschen, für 2 h bei RT mit dem AP-konjugierten Sekundärantikörper in Blockierungslösung inkubiert und durch BCIP/NBT detektiert.

Zur Ladekontrolle gleicher EB-Mengen wurde ein Aliquot in 2 % SDS für 30 min bei RT lysiert.

3.6.11 Beschichtung von Latexkugeln mit Protein

Zur Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von Proteinen in Abwesenheit anderer bakterieller Faktoren mittels Mikroskopie und Durchflusszytometrie wurden grün fluoreszierende 1 μ m Latexkugeln (Sigma) verwendet und die Beschichtung mit Protein erfolgte nicht kovalent nach Dersch and Isberg, 1999.

- 22 μ l carboxylierte Latexkugeln (10^9 , \varnothing 1 μ m) werden in 1 ml PBS für 5 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge Pico) pelletiert und mit 1 ml PBS gewaschen.
- Die Latexkugeln werden in 1 ml Bindungspuffer (0.5 M NaCl, 0.2 M NaHCO₃, pH 8.6) resuspendiert und für 5 min bei 13000 Upm zentrifugiert.
- Die Latexkugeln werden in 200 μ l Totalvolumen, bestehend aus nativer Proteinlösung in Bindungspuffer resuspendiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert.
- Es wird 500 μ l Bindungspuffer hinzupipettiert, die Suspension wird für 3 min im Ultraschallwasserbad sonifiziert und 500 μ l BSA (40 mg/ml in Bindungspuffer) zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert.
- Die Latexkugeln werden 5 min bei 13000 Upm pelletiert und mit 1 ml BSA (1 mg/ml in PBS) gewaschen.
- Die Latexkugeln werden in 500 μ l BSA (0,2 mg/ml in PBS) resuspendiert und bei 4 °C gelagert.

In Experimenten mit variierenden Proteinkonzentrationen von rCpn0677 und rCpn0678 wurden grün fluoreszierende 1.5 µm Latexkugeln (Polysciences) nach Herstellerangaben kovalent gekoppelt.

3.6.11.1 Bestimmung der Beschichtungsqualität

Zur Bestimmung der Beschichtungsqualität werden 2×10^7 Latexkugeln mittels Westernblot untersucht.

- 5×10^7 Latexkugeln werden für 5 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge Pico) pelletiert.
- Das Pellet wird in 32.5 µl H₂O, 12.5 µl 4 x SDS-Ladegelpuffer und 5 µl 1 M DTT resuspendiert, für 10 min bei 100 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt.
- 20 µl wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine mit einem His-Antikörper detektiert.

3.6.12 Behandlung von *C. pneumoniae* EBs mit Detergenzien

- Für die Detergenzien-Behandlung werden gradientengereinigte *C. pneumoniae* EBs (10^9 IFU/ml) verwendet.
- Jeweils 75 µl gradientengereinigte EBs werden für 30 min bei 21885 g (15000 Upm / Heraeus Biofuge Primo R) und 4 °C in einem Reaktionsgefäß pelletiert.
- Das Pellet wird in 100 µl PBS im Ultraschallbad resuspendiert und mit PBS oder Detergenzien (1 % Triton X-100, 2 % Sarkosyl) auf 150 µl aufgefüllt und für 1 h bei 37 °C inkubiert.
- Die Suspension wird für 1 h bei 100.000 g (42.000 Upm, Ultrazentrifuge TL-100) und 4 °C pelletiert und der lösliche Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 35 µl 4 x SDS-Ladegelpuffer und 10 µl 1 M DTT zugefügt und 10 min bei 100 °C erhitzt.
- Das Chlamydienpellet wird in 70 µl H₂O, 20 µl 4 x SDS-Ladegelpuffer und 10 µl 1 M DTT resuspendiert und für 10 min bei 100 °C erhitzt.
- Für den Westernblot werden jeweils 12,5 µl der Pelletfraktion (P) und 25 µl des Überstandes (S) geladen und die Blots mit verschiedenen Antikörpern detektiert.

3.6.13 Generierung polyklonaler Cpn0678 – Cpn0676_{6His} Antikörper

Für die Immunisierungen von Kaninchen wird rCpn0678 – rCpn0676_{6His} Fusionsprotein unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt und gegen PBS dialysiert. Jeweils 800 µg werden von jedem Antigen für jeweils 4 Immunisierungen von 2 Kaninchen benötigt und von der Firma Eurogentec durchgeführt. Dazu werden 600 µg Protein über ein 10%iges Coomassie gefärbtes SDS-Gel aufgetrennt, zeigten sich zusätzliche Degradationsbanden wurde nur das Volllängenprotein aus dem Gel ausgeschnitten und für die erste 3 Immunisierungen verwendet. Die letzte Immunisierung erfolgte mit jeweils 100 µg nativer Proteinlösung. Generiert wurden die in Tabelle 5 aufgeführten Antikörper. Durch Absorptionsmessung bei 280 nm wurde der Anteil an Immunglobulinen in den Seren bestimmt und lag jeweils zwischen 2.5 und 3 mg/ml IgG, sodass für Neutralisationsexperimente mit denselben Verdünnungen und Vor der Verwendung des

Antikörpers in der Immunfluoreszenz oder Westernblot-Analysen wurde das erhaltene Serum 1:1 mit sterilem PBS verdünnt und 2 x für 24 h bei 37°C mit nicht-infizierten HEp-2 Zellen inkubiert oder 2 x für 12 h mit geblotteten HEp-2 Zellextrakten einer konfluenten 80 cm² Zellkulturflaschen bei 4 °C voradsorbiert. Die beste Signalqualität wurde durch Antigenreinigung der polyklonalen Seren mittels NHS-Sepharose erzielt.

3.6.14 Aufreinigung polyklonaler Antikörper mittels NHS-Sepharose

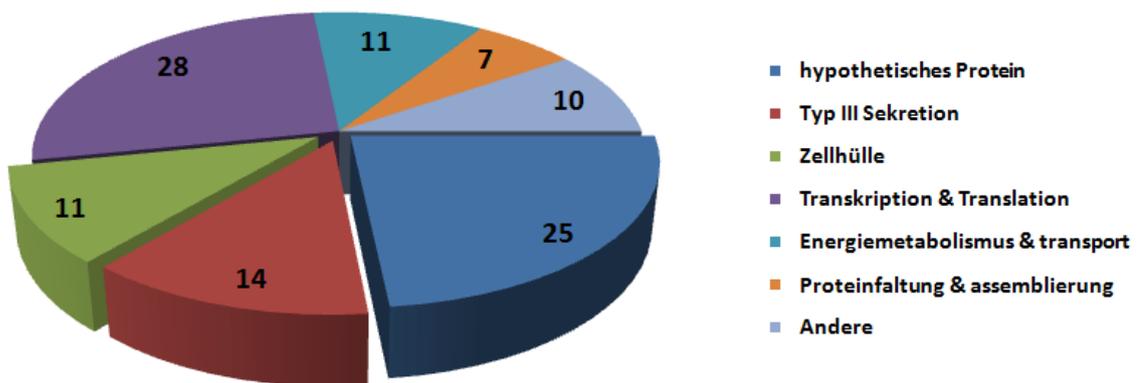
Um die Spezifität und Reinheit der polyklonalen Antikörper zu erhöhen wurde durch Verwendung von NHS-aktivierter Sepharose (GE Healthcare) eine Antigenreinigung der Cpn0678 – Cpn0676 Antiseren durchgeführt. Dabei bildet NHS (N-Hydroxysuccinimid) eine chemische stabile Amidbindung mit primären Aminogruppen von Proteinliganden aus. Durch Inkubation mit den Antiseren binden nur die für das Protein spezifischen Antikörper und der Antikörper kann durch Elution vom Protein gewonnen werden. Die Methode erfolgte nach „Using Antibodies: A Laboratory Manual“, E. Harlow, D. Lane 1999 und nach Herstellerangaben). Für die Aufreinigung von 2 ml Serum wird 1.5 ml NHS-Sepharose und 1 mg rekombinantes Protein eingesetzt.

- 1.5 ml NHS-Sepharose in eine leere Säule mit Fritte geben und durch Zugabe von 20 ml kaltem 1 mM HCl das Isopropanol herauswaschen.
- NHS-Sepharose mit 10 ml Kopplungspuffer (0.2 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8.3) waschen.
- 1 mg Proteinlösung in PBS mit demselben Volumen an Kopplungspuffer mischen und die verschlossene Säule ü/N bei 4°C auf dem Rad inkubieren.
- Um nicht-reagierte Gruppen zu blockieren, wird 4 ml Blockierungslösung (0.5 M Ethanolamin, 0.1 M Tris, pH 8.5) zugefügt und 4 h bei 4°C auf dem Rad inkubiert.
- Es wird 3 x alternierend mit 1.5 ml Puffer 1 (0.1 M Tris, pH 8.0) und 1.5 ml Puffer 2 (0.1 M Natriumacetat, 0.5 M NaCl, pH 4.0) gewaschen.
- 2 ml polyklonales Antikörperserum in 8 ml 0.1 M Tris, pH 8.0 auf die Säule geben und 2 h bei 4°C auf dem Rad inkubieren.
- Es wird mit 10 ml 10 mM Tris pH 7.5 und 10 ml 500 mM NaCl gewaschen.
- 1. Elution des Antikörpers mit 5 ml 100 mM Glycin, pH 2.5 für 5 min (saure Elution) und das Eluat in 0.5 ml 1 M Tris, pH 8.0 auffangen um den pH-Wert zu neutralisieren.
- 2. Elution des Antikörper mit 5 ml 0.1 M Triethanolamin, pH 11.5 für 5 min (basische Elution) und das Eluat in 0.5 ml 1 M Tris, pH 8.0 auffangen um den pH-Wert zu neutralisieren.
- Eine Absorptionsmessung bei 280 nm zeigte, dass sich die eluierten Antikörper überwiegend in der sauren Elution befinden. Der gereinigte Antikörper wird portioniert und bei -20°C weggefroren.

4 Ergebnisse

4.1 Identifikation Stadien-spezifisch regulierter Gene von *C. pneumoniae*

Genomweite Expressionsstudien von *Chlamydia pneumoniae* GiD im Zeitraum von 2 - 96 hpi (hours post infection) ermöglichten die Analyse von 1052 der insgesamt 1073 bakteriellen Gene (Murra 2005). Dies führte zur Identifikation von 88 Genen (8 %), die eine um den Faktor größer 3 erhöhte Expression im Zeitraum zwischen 24 und 48 hpi aufwiesen. Eine Einteilung in funktionelle Klassen erfolgte dabei anhand der NCBI-Annotation (Abb. 10). Darunter befanden sich 14 Gene mit Homologie zu dem in *C. trachomatis* L2 in 10 Operons organisierten Typ III Sekretionssystem, die sowohl Strukturkomponenten als auch potentiell sekretierte Effektoren darstellen und als späte Gene beschrieben sind (Hefty and Stephens 2007). Weiterhin sind 11 Gene spät hochreguliert, die für Proteine der chlamydiale Membran kodieren (Zellhülle), wie z.B. die am Adhäsionsprozess beteiligten Proteine OmcB, GroEL1 und Pmp21. Von den 25 spät hochregulierten Genen, die für hypothetische Proteine kodieren, konnte unter Berücksichtigung der Genomlokalisierung ein koreguliertes Cluster aus den drei Genen *Cpn0676*, *Cpn0677* und *Cpn0678* identifiziert werden (Abb. 11).



Regulierte Gene: > 3 fach erhöhte Expressionsänderung zwischen 24 und 48 h pi

Abbildung 10: Einteilung der zwischen 24 und 48 hpi differentiell regulierten Gene in funktionelle Klassen

Normalisierte und gemittelte Signalintensitäten aus 12 replikativen Datenpunkten von 3 biologischen Replikaten, die 4-fach pro Microarray gespottet waren, dienten als Datensatz (Murra 2005). Unter Verwendung der Software GeneSpring 6.0 wurde zwischen den Zeitpunkten 24 und 48 hpi nach Genen mit einer größer 3-fach erhöhten Expression gefiltert. Diese Gene wurden anhand der NCBI-Annotation in die funktionelle Klassen (cluster of orthologous groups = COGs) eingeteilt.

4.1.1 Verifikation des spät exprimierten Genclusters *Cpn0676* - *Cpn0678* mittels Real Time rt-PCR

Die Microarraydaten für die 3 Gene *Cpn0676*, *Cpn0677* und *Cpn0678* sowie benachbarte Gene sind als normalisierte Signalintensitäten anhand einer Farbkodierung dargestellt (Abb. 11 A). Alle 3 Gene zeigten einen starken Anstieg der Expression zwischen 36 und 72 hpi, mit einem Anstieg für *Cpn0676* um den Faktor 5, für *Cpn0677* um den Faktor 11 und für *Cpn0678* um den Faktor 15.

Zu den 10 Genen des gesamten Genoms mit dem stärksten Anstieg der Expression zwischen 36 und 72 hpi, gehörten somit neben dem Adhäsin *OmcB* auch *Cpn0677* und *Cpn0678*. Die 3 Gene *Cpn0676*, *Cpn0677* und *Cpn0678* zeigten dabei ein ähnlich ansteigendes und daher potentiell koreguliertes Expressionsmuster mit zunehmender Infektionsdauer (Abb. 11 A).

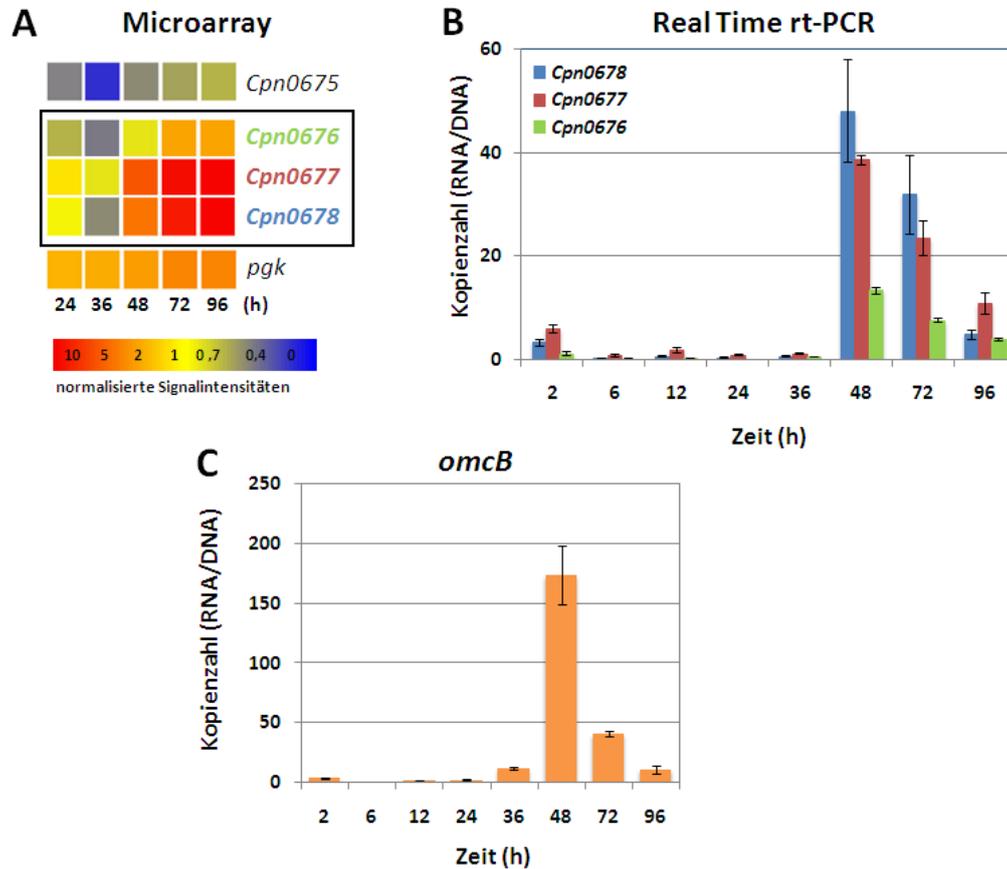


Abbildung 11: Microarray und Real Time rt-PCR des Genclusters *Cpn0676* - *Cpn0678* sowie *OmcB*

A) Gezeigt ist eine GeneTree Clusteranalyse der Microarray-Daten von den 3 koregulierten Genen *Cpn0676*, *Cpn0677* und *Cpn0678* inklusive benachbarter Gene, erstellt mit der Software GeneSpring 6.0. Normalisierte Signalintensitäten dienten dabei als Grundlage der farbkodierten Darstellung, wobei „rot“ einer hohen Transkriptmenge und „blau“ einer niedrigen Transkriptmenge entspricht. Die normalisierte Signalintensität ergibt sich dabei aus dem Quotienten der Signalintensität des jeweiligen Gens und der durchschnittlichen Signalintensität aller Gene eines Infektionszeitpunktes. Eine Infektion mit einer „multiplicity of infection“ MOI von 5 wurde durchgeführt und für jedes Gen 12 Datenpunkte aus 3 biologischen Replikaten generiert (Murra 2005).

B + C) Dargestellt ist die Zahl RNA Moleküle pro Genom [Kopienzahl (RNA/DNA)] für die Gene *Cpn0676* - *Cpn0678* bzw. *omcB* über den gesamten Infektionszyklus. cDNA und chlamydiale genomische DNA (gDNA) der Zeitpunkte 2 - 96 hpi, sowie ein Standardplasmid zur Bestimmung der Molekülzahl, wurden parallel als Matrize für eine Real Time PCR mit SYBR-Green eingesetzt. Über den Plasmidstandard generierte CT-Werte erlaubten die Bestimmung der Molekülanzahl (siehe Methoden Kapitel 3.5.8). Nun wurde anhand der gemessenen CT-Werte für die cDNA- und gDNA-Probe eines jeweiligen Zeitpunktes die Molekülanzahl bestimmt und durch Bildung des Quotienten cDNA/gDNA die Kopienzahl (RNA/DNA) ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten.

Zur Verifikation der generierten Arraydaten wurden Real Time rt-PCR Experimente durchgeführt. Die RNA-Kopienzahl pro DNA (RNA/DNA) wurde dabei unter Einbeziehung genomischer DNA ermittelt, indem mit Hilfe eines Plasmidstandards die genaue Genomzahl pro Infektionszeitpunkt bestimmt wurde. Dabei ergaben sich für alle 3 Gene *Cpn0676*, *Cpn0677* und *Cpn0678* keine nennenswerten Kopienzahlen (RNA/DNA) zwischen 6 und 36 hpi, jedoch war nach 48 hpi eine

sehr starke Expression für alle 3 Gene zu beobachten (Abb. 11 B). Hierbei war der Anstieg der Kopienzahl (RNA/DNA) zwischen 36 und 48 hpi für *Cpn0678* von 0.7 auf 48 am Stärksten und für *Cpn0676* von 0.7 auf 14 am Schwächsten. Im weiteren Verlauf der Infektion (72 und 96 hpi) kam es zu einem sukzessiven Abfall der Kopienzahl (RNA/DNA) für alle 3 Gene. Interessanterweise zeigte das Expressionsprofil des Adhäsins *omcB* einen vergleichbaren Verlauf und Anstieg der Kopienzahl (RNA/DNA) zwischen 36 und 48 hpi von 12 auf 174 (Abb. 11 C).

Somit konnten die Microarray-Daten mittels Real Time rt-PCR bestätigt werden, sodass *Cpn0676* - *Cpn0678* ein koreguliertes Gencluster darstellt, dessen Expression erstmals 48 hpi detektierbar war. Nach 48 hpi beginnt der Infektionszyklus von *C. pneumoniae* langsam asynchron zu werden und es kommt neben der Vermehrung von RBs auch bereits zur Redifferenzierung in EBs (Wolf, Fischer et al. 2000). Die beobachtete Expression des Genclusters legt die Vermutung nahe, dass es sich bei *Cpn0676* - *Cpn0678* um spät im Infektionszyklus exprimierte Gene handelt, die möglicherweise für EB-spezifische Proteine kodieren.

Interessanterweise ist sehr früh in der Infektion (2 hpi) eine 5 - 10 fach höhere Kopienanzahl (RNA/DNA) als im weiteren Verlauf bis 36 hpi feststellbar und dies könnte sogenannte „carryover mRNA“ repräsentieren (Abb. 11 B). Diese „carryover mRNA“ wurde auch schon bei Transkriptanalysen mit *C. trachomatis* D beobachtet und wird vermutlich aus der vorhergehenden Infektion in die neue Infektionsrunde von den EBs mitgeführt und im weiteren Verlauf der Infektion dann nicht translatiert (Belland, Zhong et al. 2003). Der Mechanismus, mit dem Chlamydien zwischen „carryover mRNA“ und neu transkribierter mRNA unterscheiden können, ist allerdings noch nicht bekannt (Abdelrahman and Belland 2005).

4.1.2 Transkriptionskopplungsanalysen führen zur Identifikation von *Cpn0678* – *Cpn0676* als Operon

Gene, die eine transkriptionelle Koregulation zeigen, kodieren vermutlich für Proteine mit ähnlicher zellulärer Funktion. Zur Überprüfung, ob die koregulierten Gene *Cpn0676* - *Cpn0678* als Operon exprimiert werden, wurde eine Transkriptionskopplungsanalyse durchgeführt. Dazu wurde zum Zeitpunkt 72 hpi aus der mRNA mittels „random hexamer primer“ cDNA synthetisiert. In einer PCR mit cDNA als Matrize, wurden Primer verwendet, die nur ein PCR-Produkt generieren, falls benachbarte Gene eine gemeinsame mRNA (cDNA) gebildet haben. Um auszuschließen, dass die isolierte RNA Spuren von genomischer DNA (gDNA) enthielt, diente als Negativkontrolle isolierte RNA allein (Abb. 12 A: jeweils Spur a). Wurde die generierte cDNA als PCR-Matrize eingesetzt, so zeigte sich für die Übergänge von *Cpn0676* zu *Cpn0677* und von *Cpn0677* zu *Cpn0678* jeweils ein PCR-Produkt der korrekten Größe (Abb. 12 A: Spur 2c, 3c). Für jeden Übergang wurden jeweils 2 verschiedene Primerpaare verwendet und es konnte in beiden Fällen ein positives PCR-Produkt für die grün markierten Übergänge 2, 3, 6 und 7 erhalten werden (Abb. 12 B). Für die Übergänge von *Cpn0678* zu *Cpn0679* (Phosphoglyceratkinase) sowie von *Cpn0676* zu *Cpn0675* konnte mit der eingesetzten cDNA kein PCR-Produkt generiert werden, während mit gDNA als Matrize ein PCR-Produkt der korrekten Größen erhalten wurde. Diese Resultate wurden auch

mit cDNA und gDNA des Zeitpunktes 48 hpi erhalten (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse belegen, dass die Gene *Cpn0676* - *Cpn0678* spät in der chlamydialen Infektion als transkriptionelle Einheit exprimiert werden. Sie stellen daher ein weiteres, bislang nicht identifiziertes Operon von *C. pneumoniae* dar.

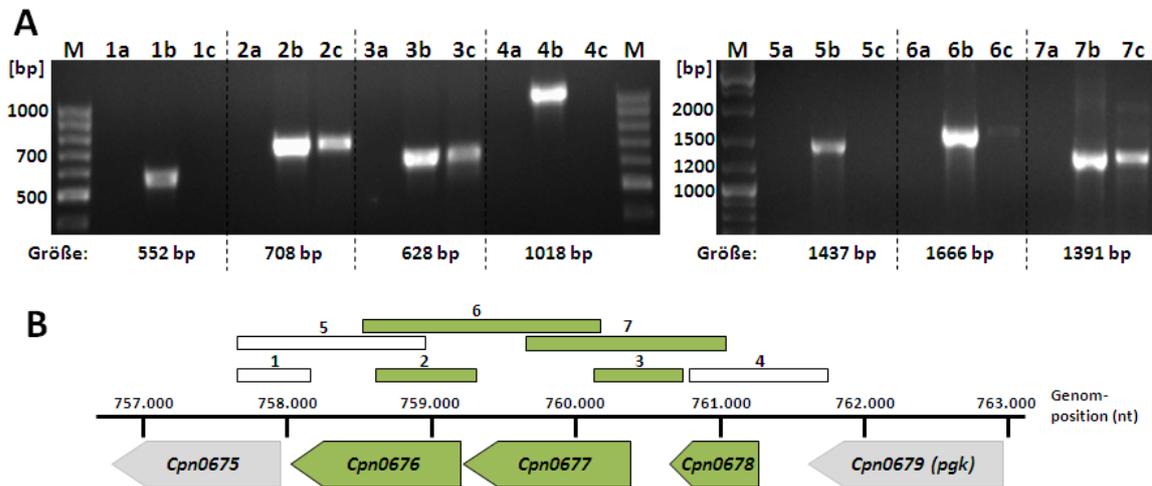


Abbildung 12: Transkriptkopplungsanalyse des Operons *Cpn0676* - *Cpn0678*

A) Gezeigt ist ein 1%-iges Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit folgendem Ladeschema:

Negativkontrolle jeweils Spur a: PCR mit RNA als Matrize

Positivkontrolle jeweils Spur b: PCR mit gDNA als Matrize (Verifikation der korrekten Produktgröße)

Jeweils Spur c: PCR mit cDNA als Matrize

RNA und genomische DNA zum Zeitpunkt 72 hpi wurden isoliert und cDNA mittels „random hexamer primer“ generiert. In einer sich anschließenden PCR wurden Primer verwendet die nur dann ein PCR-Produkt generieren, wenn zwei benachbarte Gene eine gemeinsame mRNA und damit auch cDNA gebildet haben. Aufgeführt sind im Folgenden die erwarteten Fragmentgrößen der in B) graphisch dargestellten einzelnen Übergänge: 1 (552 bp), 2 (708 bp), 3 (628 bp), 4 (1018 bp), 5 (1437 bp), 6 (1666 bp) 7 (1391 bp).

B) Schematische Übersichtsdarstellung der Lokalisation von *Cpn0675* bis *Cpn0679* unter Angabe der entsprechenden Position im *C. pneumoniae* Genom (Nukleotidposition 757.000 bis 763.000). Die grünen Balken 2, 3, 6 und 7 repräsentieren die Übergänge zwischen den Genen *Cpn0676* - *Cpn0678*, für die ein PCR-Produkt mit cDNA als Matrize erzielt wurde.

4.1.3 Bioinformatische Analyse des *Cpn0678* – *Cpn0676* Genlokus

Im Folgenden wurden die Gene des neu identifizierten *Cpn0678* – *Cpn0676* Operons und die angrenzenden Gene einer näheren bioinformatischen Analyse unterzogen. Sequenzvergleiche auf Proteinebene lieferten für die drei Proteine *Cpn0678* - *Cpn0676* keine Anwesenheit bekannter Proteindomänen oder signifikante Homologien zu Proteinen anderen bakteriellen Organismen und Eukaryoten. Sie stellen daher sehr spezifische Gene der chlamydialen Spezies dar. Weiterhin existieren für die Proteine *Cpn0676* und *Cpn0675* orthologe Proteinen in anderen chlamydialen Spezies, jedoch sind auch diese Proteine bislang noch nicht charakterisiert worden und als hypothetische Proteine annotiert. Die mittels BLAST ermittelten Ähnlichkeiten auf Proteinebene sind in Abb. 13 A aufgeführt. Das Gen *Cpn0679* liegt 5' des *Cpn0678* – *Cpn0676* Operons, kodiert für eine Phosphoglyceratkinase und das Protein weist mit 86 – 91 % Ähnlichkeit bzw. 72 – 81 % Identität zu orthologen chlamydialen Proteinen eine hohe Konservierung auf. Im Vergleich zum

Gen *CT694* aus dem humanpathogenen Serovar *C. trachomatis* D und dem Gen *CCA00062* der tierpathogenen Spezies *C. caviae* stellen die Gene *Cpn0678* und *Cpn0677* eine Expansion des *C. pneumoniae* Genoms an dieser Genomposition dar. Zum Protein CT694 aus *C. trachomatis* D wurde für *Cpn0678* und *Cpn0677* keine Ähnlichkeit ermittelt. Ein Vergleich zum Gen aus *C. caviae* zeigte, dass jeweils eine Ähnlichkeit von 43 % für *Cpn0678* und 30 % für *Cpn0677* zu dem orthologen Protein CCA00062 existiert (Abb. 13 A).

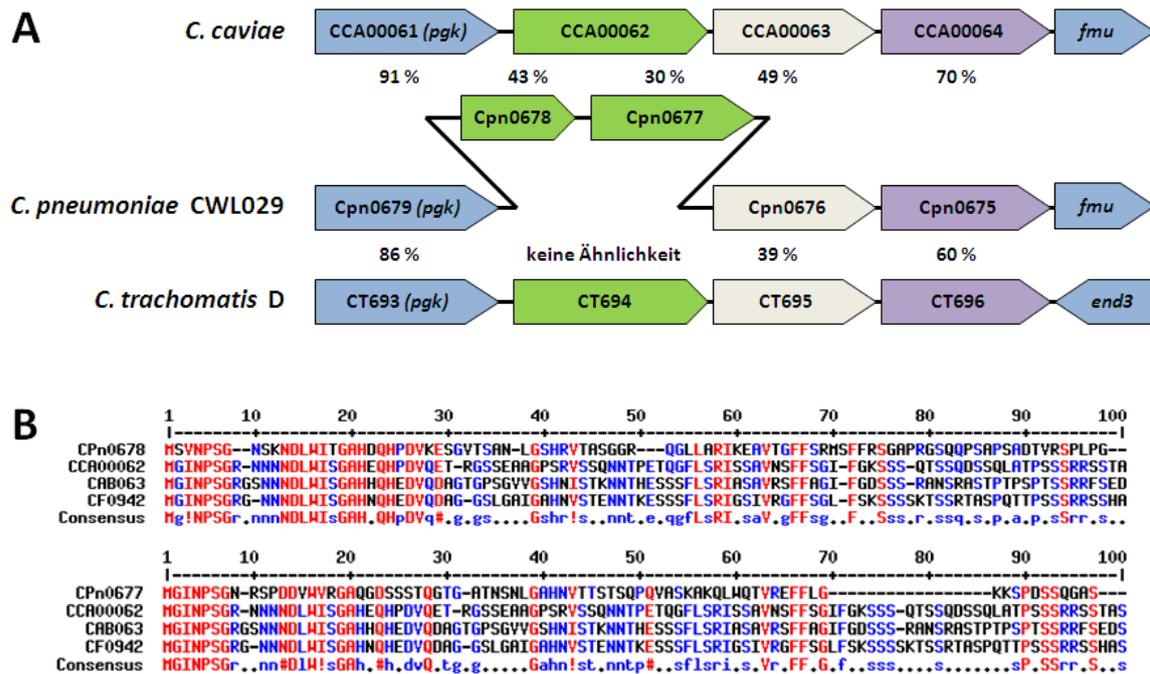


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Cpn0679 – Cpn0674 Lokus in *C. pneumoniae* CWL029 im Vergleich zu *C. caviae* und *C. trachomatis* D

A) Die *C. pneumoniae* Gene *Cpn0678* – *Cpn0675* kodieren für hypothetische Proteine und die angegebenen Prozentwerte sind BLAST-Ähnlichkeiten auf Proteinebene zwischen *C. pneumoniae* und den Proteinen der anderen chlamydialen Spezies. Das 5' liegende Gen kodiert in allen 3 Spezies für eine Phosphoglyceratkinase (*pgk*) die sehr konserviert ist, dagegen kodiert das 3' liegende Gen im Falle von *C. pneumoniae* sowie *C. caviae* für eine Methyltransferase (*fmu*) und bei *C. trachomatis* für die Endonuklease III (*end3*). Ebenso zeigen *Cpn0676* und *Cpn0675* auf Proteinebene einen relativ hohen Grad an Konservierung zu den anderen Spezies. Dagegen existiert an der Position der zwei Gene *Cpn0678* und *Cpn0677* in *C. caviae* und *C. trachomatis* nur jeweils 1 Gen (CCA00062 und CT694). Dabei zeigte sich auf Proteinebene für *Cpn0678* und *Cpn0677* keine signifikante Homologie zu CT694, dagegen wiesen beide Proteine besonders im N-terminalen Bereich Homologie zu CCA00062 auf. Die gezeigten Pfeillängen korrelieren nicht mit der tatsächlichen Größe der Proteine.

B) Multiples Sequenzalignment der ersten 100 Aminosäuren der *C. pneumoniae* Proteine *Cpn0678* und *Cpn0677* mit den orthologen Proteinen der tierpathogenen chlamydialen Spezies *C. caviae* (CCA00062), *C. abortus* (CAB063) und *C. felis* (CF0942), erstellt mit Software MultAlin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>). Im Vergleich der ersten 100 Aminosäuren von *Cpn0678* mit den drei tierpathogenen Spezies weisen alle Sequenzen zueinander 27 % Identität und 68 % Ähnlichkeit auf. Im Vergleich der ersten 100 Aminosäuren von *Cpn0677* mit den drei tierpathogenen Spezies weisen alle Sequenzen zueinander 21 % Identität und 63 % Ähnlichkeit auf.

Rot: > 90% Ähnlichkeit und Blau: > 50% Ähnlichkeit

Ein multiples Alignment wurde generiert, bestehend aus den Proteinsequenzen von Cpn0678 oder Cpn0677 mit den orthologen Proteinen aus *C. caviae*, *C. abortus* und *C. felis*, die auch alle für hypothetische Proteine kodieren (Abb. 13 B). Eine Analyse der ersten 100 Aminosäuren zeigte, dass im N-terminalen Bereich aller Sequenzen eine Konservierung existiert. Dabei betrug im Vergleich der Sequenzen mit Cpn0678 die Identität 27 % und im Vergleich mit Cpn0677 die Identität 21 %.

Somit existieren für Cpn0676 orthologe Proteine in *C. trachomatis* D und der tierpathogenen Spezies *C. caviae*. Die Gene *Cpn0678* und *Cpn0677* stellen jedoch eine Expansion des Genoms dar, wobei die Proteine Cpn0678 und Cpn0677 Ähnlichkeiten zu tierpathogenen Spezies, aber nicht zu humanpathogenen *C. trachomatis* Serovaren aufweisen.

4.2 Aga2p-Cpn0676 – Cpn0678 exprimierende Hefezellen binden an Humanzellen

Die erhaltenen Expressionsdaten lassen vermuten, dass die Proteine Cpn0676 – Cpn0678 spät im Infektionszyklus generiert werden, um möglicherweise in der neuen Infektionsrunde eine Funktion bei der Adhäsion bzw. Etablierung der Infektion auszuüben. Denkbar wäre jedoch auch eine Funktion in der intrazellulären Re-Differenzierung von RBs in EBs oder bei der Lyse der Wirtszelle. Zunächst wurden die möglichen adhäsiven Eigenschaften der Proteine untersucht und dazu das Hefe-Oberflächen-Präsentationssystem verwendet (Moelleken and Hegemann 2008). Die Gene *Cpn0676* – *Cpn0678* wurden einzeln mittels homologer *in vivo* Rekombination in den Expressionsvektor pEG6 integriert und in den GFP-exprimierenden Hefestamm YKM2 transformiert. Der Vektor pEG6 kodiert für die AGA2-Untereinheit des α -Agglutininrezeptors der Hefe und führt bei Expression unter Kontrolle des *tetO₇-CYC1*-Promotors zu einer Hefezell-Oberflächenpräsentation des Aga2p bzw. Aga2p-Fusionsproteins. Als Positivkontrolle wurde Aga2p-Pmp21-D verwendet, eine Domäne des neu identifizierten Adhäsins Pmp21, welches starke Adhäsion an Humanzellen zeigt (Schmidt 2009).

Mittels Westernblot-Analyse wurde zunächst die Expression von Aga2p und Aga2-Cpn-Fusionsproteinen in den Hefezellen überprüft (Abb. 14 A + B). Da das Aga2 Protein stark O-glykosyliert vorliegt, wurden Proteinextrakte mittels α -Mannosidase Behandlung deglykosyliert (siehe Methoden 3.3.2). Für das Aga2 Protein (theoretisches Molekulargewicht: 17 kDa) wurde eine intensive Bande bei ca. 20 kDa detektiert. Auch alle Aga2p-Fusionsproteine laufen trotz Deglykosylierung höher als theoretisch erwartet. Dabei waren die Expressionsstärken der Fusionsproteine Aga2p-Cpn0676 (ca. 80 kDa, theoretisch: 64 kDa) und Aga2p-Cpn0677 (ca. 75 kDa, theoretisch: 61 kDa) vergleichbar, jedoch deutlich schwächer als für Aga2p-Cpn0678 (ca. 55 kDa, theoretisch: 42 kDa) und die Positivkontrolle Aga2-Pmp21-D (ca. 50 kDa, theoretisch: 43 kDa).

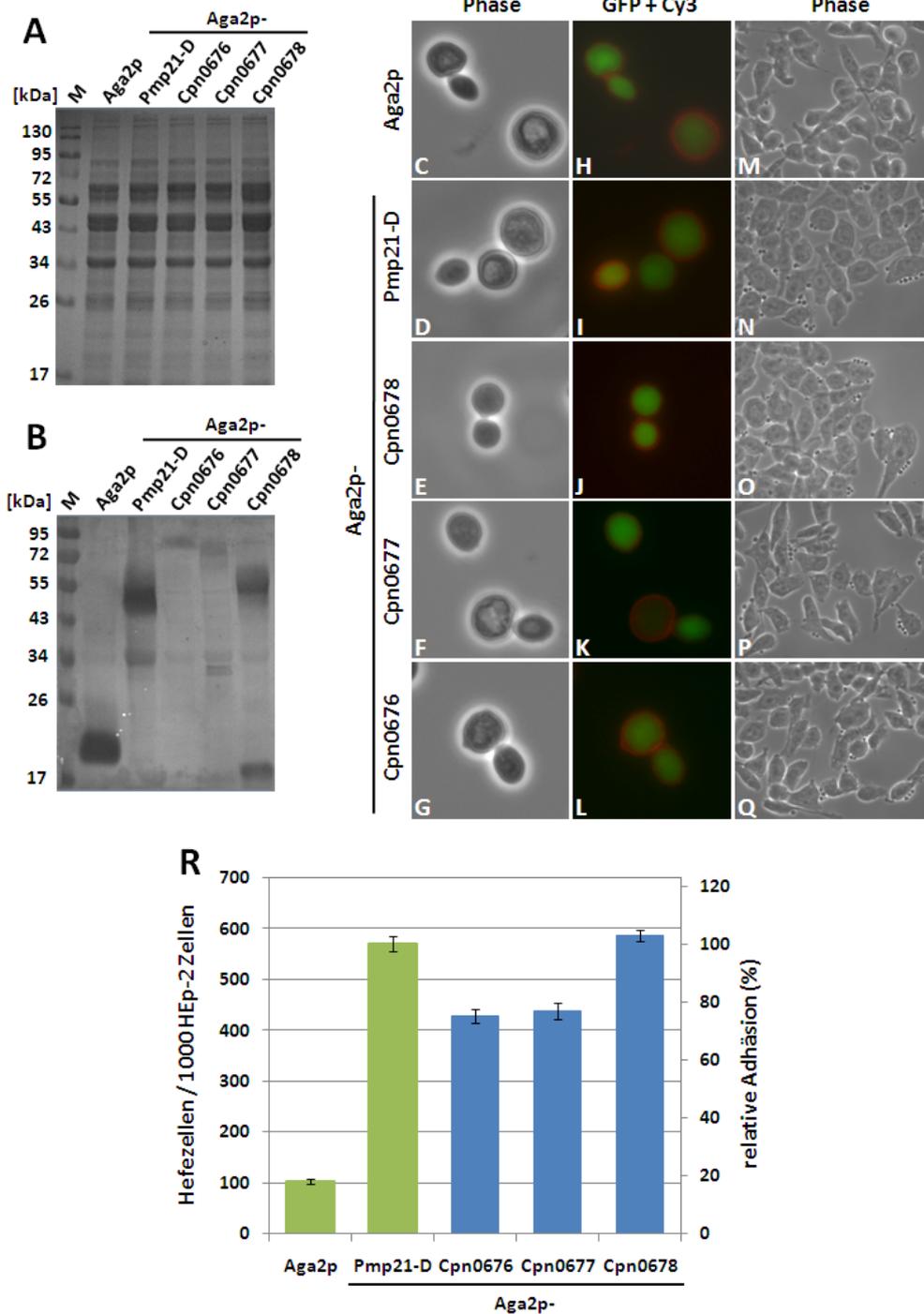


Abbildung 14: Aga2p-Cpn0676 – Cpn0678 exprimierende Hefezellen binden an Humanzellen

A) Coomassie-gefärbtes SDS-Gel als Ladekontrolle α -Mannosidase behandelte Hefezellproteinextrakte.

B) Westernblot zur Überprüfung der Expression von Aga2p und Aga2p-Cpn Fusionsprotein. Proteinextrakte von Hefezellen nach α -Mannosidase Behandlung wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion der His₆-markierten Aga2p-Cpn Fusionsproteine erfolgte mit prim. α -His Antikörper (1:2500) und sek. AP-konjugiertem α -Maus Antikörper (1:7500). M = Größenstandard [kDa]

C-G) Phasenkontrast- und **H-L)** Immunfluoreszenzmikroskopie (63 x Vergrößerung) lebender Protein-exprimierender Hefezellen, aufgenommen mit gleicher Belichtungszeit.

M-Q) Phasenkontrastaufnahmen (20 x Vergrößerung) des Hefeadhäsionstest, indem 10^5 HEp-2 Zellen mit einem 10-fachen Überschuss an Hefen für 1 h bei 4 °C inkubiert wurden (siehe Methoden 3.3.4).

R) Quantifizierung des in M-Q exemplarisch gezeigten Hefeadhäsionsassays. 10^6 Hefezellen wurden mit 10^5 adhärenenten HEp-2 Zellen inkubiert, unter mikroskopischer Beobachtung ungebundene Hefen mit PBS gewaschen und jeweils 1000 HEp-2 Zellen und die daran gebundenen Hefen bestimmt. Die Adhäsion Aga2p-Pmp21-D exprimierender Hefezellen wurde auf 100 % normiert (n = 3).

Durch indirekte Immunfluoreszenz mittels Xpress-Antikörper wurde die Oberflächenexpression von Aga2p und den Aga2p-Fusionsproteinen auf fixierten, aber nicht permeabilisierten Hefezellen nachgewiesen (Abb. 14 H - L). Die Signalintensität war für alle Fusionsproteine ähnlich, so dass davon auszugehen ist, dass die Proteine in vergleichbarer Menge auf der Hefeoberfläche präsentiert worden sind.

Im Hefe-Adhäsionsassay wurden die 570 ± 15 an 1000 HEp-2 Zellen bindenden Aga2p-Pmp21-D exprimierenden Hefezellen der Positivkontrolle auf 100 % Adhäsion normiert. Der Aga2p exprimierende Hefestamm zeigte daher mit 103 ± 5 gebundenen Hefen eine unspezifische relative Adhäsion von 18 % (Abb. 14 R). Der Aga2-Cpn0676 exprimierende Hefestamm zeigte mit 429 ± 12 gebundenen Hefen eine relative Adhäsion von 75 % und der Aga2-Cpn0677 exprimierende Hefestamm mit 439 ± 16 gebundenen Hefezellen eine relative Adhäsion von 77 %. Aga2-Cpn0678 exprimierenden Hefezellen zeigten mit 588 ± 14 gebundenen Hefen eine relative Adhäsion von 103 % und binden damit so stark wie die Positivkontrolle Aga2p-Pmp21-D. Somit zeigen die Proteine Cpn0676 und Cpn0677 eine moderate Bindung und Cpn0678 eine starke adhäsive Eigenschaft im Hefe-Adhäsionsassay.

4.2.1 Mit rCpn0677_{6His} oder rCpn0678_{6His} beschichtete Latexkügelchen zeigen moderate bzw. starke Adhäsion an Humanzellen

Die Ergebnisse des Hefe-Adhäsionsassays wurden mit rekombinantem Protein verifiziert. Dazu wurden die Proteine als His₆-markiertes Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und mittels Ni-NTA Agarose affinitätschromatographisch aufgereinigt. Als Positivkontrolle diente eine Domäne des Invasin (Inv497) aus *Y. pseudotuberculosis*, die Adhäsion vermittelt und gekoppelt an Latexkügelchen zu deren Internalisierung führt (Dersch and Isberg 1999). Für den Adhäsionsassay wurden grün-fluoreszierende 1 µm Latexkügelchen (im folgenden Beads genannt) mit jeweils 200 µg/ml Protein beschichtet und die Beschichtungseffizienz mittels His-Blot überprüft. Dabei war eine ähnliche Beschichtung für alle Proteine zu beobachten, wenngleich Cpn0676 ein etwas stärkeres Signal und Inv497 zusätzliche Degradationsbanden zeigten (Abb. 15 A).

Für die FACS-basierte Analyse wurden HEp-2 Zellen mittels Accutase abgelöst, einer Mischung aus proteolytischen und collagenolytischen Enzymen, die laut Herstellerangaben die strukturelle und funktionelle Qualität von Oberflächenproteinen nicht verändern. Im Adhäsionsassay war für BSA-beschichtete Beads als Negativkontrolle mit 0,4 Beads/HEp-2 Zelle kaum Adhäsion, dagegen für die Positivkontrolle Inv497 mit 9,4 Beads/Zelle eine starke Adhäsion zu beobachten (Abb. 15 B). Mit rCpn0676_{6His}-beschichtete Beads wiesen mit 0,6 Beads/Zelle keine Adhäsion auf. Dagegen zeigten rCpn0677_{6His}-beschichtete Beads mit 2,3 Beads/Zelle eine schwache aber signifikante Adhäsion und rCpn0678_{6His}-beschichtete Beads mit 9,7 Beads/Zelle, wie Invasin eine sehr starke Bindung. Dies ist in den repräsentativen Phasenkontrastaufnahmen nach der FACS-Messung belegt (Abb. 15 D). Diese Ergebnisse bestätigten sich in der mikroskopischen Auswertung des Adhäsionsassays der mit adhärenter HEp-2 Zellen durchgeführt wurde (Abb. 15 C). Allerdings ergab sich bei der quantitativen mikroskopischen Auswertung des Adhäsionsassays im Falle von

rCpn0677_{6His} (4,7 Beads/HEp-2) und rCpn0678_{6His} (12,9 Beads/HEp-2) eine höhere Beadzahl als bei der FACS-basierten Analyse, was für beide Proteine auf eine gewisse Sensitivität gegenüber der Accutase-Behandlung hindeuten könnte. Zusammenfassend wurde für rCpn0678_{6His} und rCpn0677_{6His} die starke bzw. moderate Bindung aus dem Hefe-Adhäsionsassay mittels beschichteter Latexkügelchen bestätigt, während mit rCpn0676_{6His}-beschichtete Beads im Gegensatz zum Aga2p-Cpn0676 Fusionsprotein im Hefe-Adhäsionsassay keine Bindung zeigten.

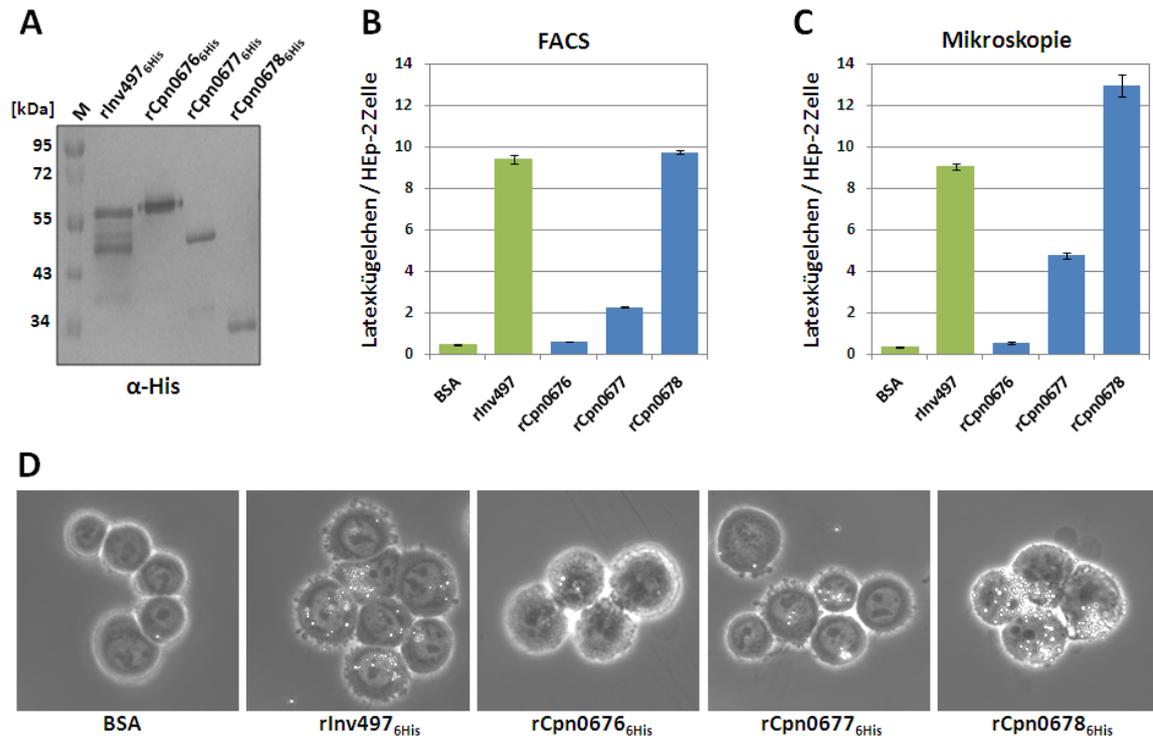


Abbildung 15: Adhäsion beschichteter Latexkügelchen an HEp-2 Zellen mittels FACS und Mikroskopie

A) 2×10^7 Protein-beschichtete Latexkügelchen wurden zur Überprüfung der Beschichtungsqualität in einem SDS-Gel aufgetrennt und der Westernblot mit einem α-His Antikörper durchgeführt.

B) FACS-Auswertung der Adhäsionsexperimente, durchgeführt mit 5×10^5 adhärenenten HEp-2 Zellen und einem 20 fachen Überschuss an Protein-beschichteten Latexkügelchen für 1 h bei 37 °C. Nach Ablösen adhärenenten HEp-2 Zellen mittels Accutase wurde im FACSaria von jeweils 10.000 HEp-2 Zellen die mittlere FITC-Fluoreszenz bestimmt. Diese wurde durch die mittlere Fluoreszenz eines Latexkügelchens dividiert und so die Anzahl Latexkügelchen/HEp-2 Zelle bestimmt (n = 3).

C) Mikroskopische Auswertung der Adhäsionsexperimente, durchgeführt mit 5×10^5 adhärenenten HEp-2 Zellen und einem 20 fachen Überschuss an Protein-beschichteten Latexkügelchen für 1 h bei 37 °C. Adhärenente HEp-2 Zellen und gebundene Beads wurden mit 3 % para-Formaldehyd fixiert und die Anzahl Latexkügelchen/HEp-2 Zelle jeweils in 10 Gesichtsfelder mikroskopisch bestimmt (n = 3).

D) Repräsentative Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen (40 x Vergrößerung) von HEp-2 Zellen mit gebundenen Latexkügelchen nach der FACS-Analyse.

4.2.2 Mit rCpn0677_{6His} oder rCpn0678_{6His} beschichtete Latexkügelchen zeigen eine konzentrationsabhängige Adhäsion an Humanzellen

Zur präziseren Untersuchung des Bindeverhaltens von rCpn0677_{6His} und rCpn0678_{6His} wurden grün-fluoreszierende Latexkügelchen mit steigenden Konzentrationen an Protein beschichtet und die Beschichtungseffizienz im Westernblot überprüft (Abb. 16 A). Als Maß für die Zahl der gebundenen Beads/HEp-2 Zelle wurde diesmal die gemessene relative Grünfluoreszenz (FITC) der

Bead tragenden Humanzellen verwendet. Als Negativkontrolle zeigten dabei mit 200 $\mu\text{g/ml}$ beschichtete BSA-Beads eine Fluoreszenz von 6.000 Einheiten (Abb. 16 B). Im Falle von rCpn0677_{6His}-Beads war mit steigender Proteinbeladung eine Zunahme der Fluoreszenz auf ca. 12.000 Einheiten zu beobachten, die bei 50 $\mu\text{g/ml}$ Protein eine Sättigung erreichte. Dagegen zeigten HEp-2 Zellen mit gebundenen rCpn0678_{6His}-Beads diese Fluoreszenzintensität schon mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Protein und erreichten mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Protein ein Maximum von 37.000 Einheiten. Somit zeigten beide Proteine eine konzentrationsabhängige Adhäsion an HEp-2 Zellen, die bei einer Proteinkonzentration von 50 – 100 $\mu\text{g/ml}$ ein Maximum erreichte.

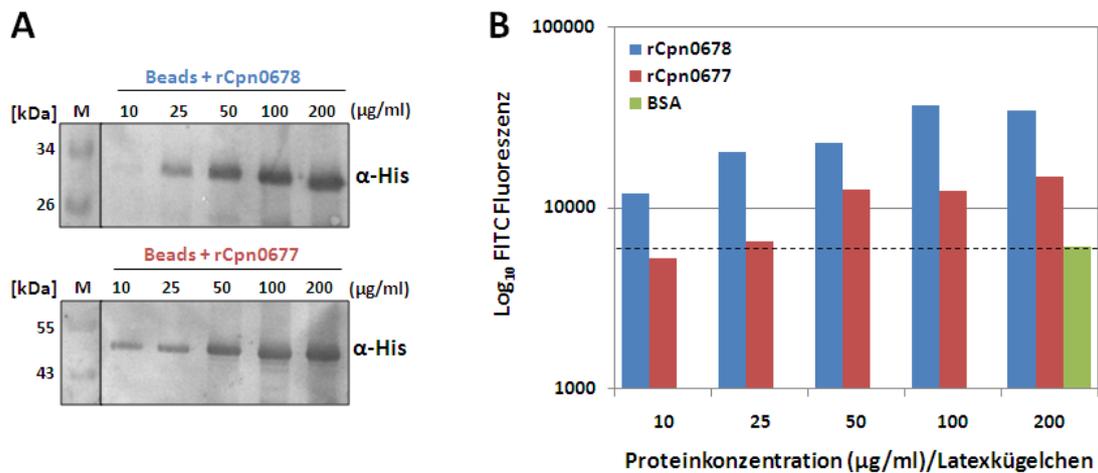


Abbildung 16: Adhäsion von Latexkugeln mit unterschiedlicher Konzentration an rCpn0677_{6His} oder rCpn0678_{6His}

A) 2×10^7 Protein-beschichtete Latexkugeln wurden zur Überprüfung der Beschichtungsqualität in einem SDS-Gel aufgetrennt und der Westernblot mit einem α -His Antikörper durchgeführt.

B) Quantitative Auswertung der Adhäsionsexperimente, durchgeführt mit 5×10^5 HEp-2 Zellen und einem 10 fachen Überschuss an Protein-beschichteten Latexkugeln. Nach Ablösen adhärenter HEp-2 Zellen mittels Accutase wurde im FACSaria von jeweils 10.000 HEp-2 Zellen die mittlere FITC-Fluoreszenz bestimmt ($n = 2$).

4.2.3 FITC-markiertes rCpn0678_{6His} bindet konzentrationsabhängig an Zellen

Da in weiteren Experimenten der Effekt von löslichem rCpn0677_{6His} und rCpn0678_{6His} auf die Bindung und Infektion mit Chlamydien untersucht werden sollte, wurde zunächst das Bindeverhalten von löslichem Protein an HEp-2 Zellen untersucht. Dazu wurden rCpn0677_{6His} und rCpn0678_{6His} sowie BSA mit FLUOS (einem FITC Derivat) markiert, in unterschiedlichen Konzentrationen in Adhäsionsstudien bei 4 °C eingesetzt und die relative FITC-Fluoreszenz der Humanzellen durch FACS-Messung quantifiziert. Die Negativkontrolle BSA^{FITC} zeigte bei 200 $\mu\text{g/ml}$ nur eine FITC-Fluoreszenz von 200 und damit keine Adhäsion, da diese Fluoreszenz auch für HEp-2 Zellen allein gemessen wurde. Überraschenderweise zeigte sich bei 200 $\mu\text{g/ml}$ rCpn0677^{FITC} nur eine Fluoreszenz von 222 und somit auch keine Adhäsion (Abb. 17 A). Dagegen war für rCpn0678^{FITC} ein konzentrationsabhängiger Anstieg der FITC-Fluoreszenz von 1630 bei 20 $\mu\text{g/ml}$ Protein auf 8670 bei 100 $\mu\text{g/ml}$ Protein und 13.300 bei 200 $\mu\text{g/ml}$ Protein zu beobachten. Die Adhäsion von rCpn0678^{FITC} erreichte bei 100 $\mu\text{g/ml}$ Protein allmählich ein Plateau, denn die

weitere Erhöhung der Proteinkonzentration hatte nur noch in eine leichte Fluoreszenzzunahme zur Folge. Zudem zeigte die mikroskopische Auswertung, dass rCpn0678^{FITC} nicht gleichmäßig verteilt an die Zelloberfläche gebunden war, sondern häufig in distinkten lokalen Anhäufungen auftrat, deren Anzahl mit zunehmender Proteinkonzentration zunahm (Abb. 17 B). Somit bestätigt dieses Experiment die starke Adhäsionsfähigkeit von rCpn0678, während rCpn0677^{FITC} im Gegensatz zu den erhaltenen Daten mit rCpn0677-beschichteten Latexkügelchen keine Bindung zeigten. Allerdings kann für rCpn0677^{FITC} nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Fluoreszenzmarkierung das Protein in seiner Funktionalität beeinträchtigt war.

Die konzentrationsabhängige Adhäsion von rCpn0678^{FITC} wurde auch mit wildtypischen CHO-K1 Zellen bestätigt (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus zeigten auch die Glykosaminoglykan-defizienten Zelllinien CHO pgsA-745 (produziert keine GAGs) und CHO pgsD-677 (produziert kein Heparansulfat) einen konzentrationsabhängigen Anstieg der rCpn0678^{FITC} Bindung (Daten nicht gezeigt). Somit spielen Glykosaminoglykane für die Bindung von rCpn0678 keine Rolle, sodass rCpn0678 stattdessen möglicherweise an einen humanen Rezeptor bindet.

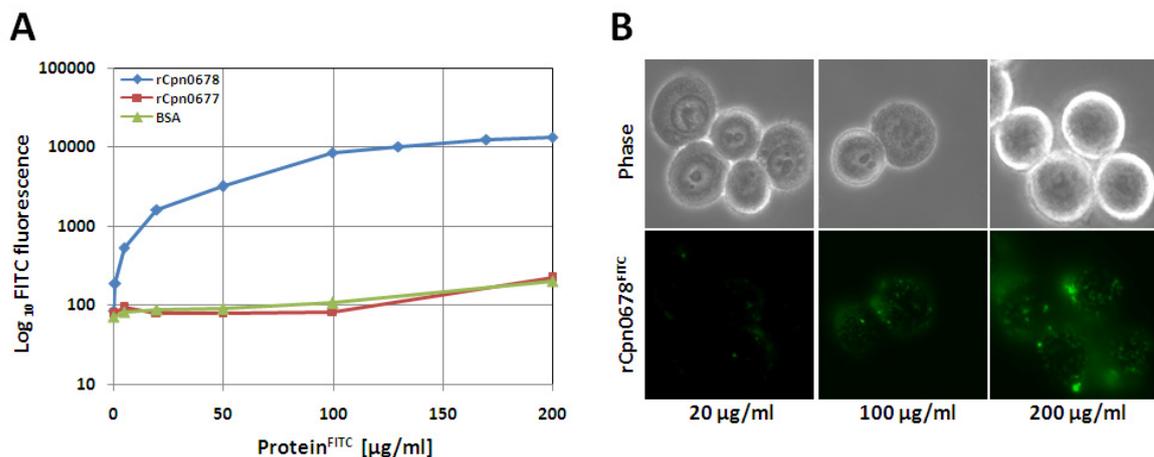


Abbildung 17: Adhäsion von FITC-markiertem löslichem rCpn0678_{6His} an HEp-2 Zellen

A) Darstellung der relativen Log₁₀ FITC Fluoreszenz von HEp-2 Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration an zugegebenem FITC-markiertem Protein. HEp-2 Zellen wurden für 30 min. bei 4°C mit unterschiedlichen Konzentrationen an FITC-markiertem BSA, rCpn0677 und rCpn0678 inkubiert und ungebundenes Protein durch Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden durch Accutase-Behandlung abgelöst, mit 3 % para-Formaldehyd fixiert und ihre Fluoreszenz mittels FACS quantifiziert.

B) Repräsentative Phasenkontrast- und Immunfluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von HEp-2 Zellen mit gebundenem rCpn0678^{FITC} nach der FACS-Messung (40 x Vergrößerung).

4.3 rCpn0677_{6His} und rCpn0678_{6His} verstärken die *C. pneumoniae* Infektion, rCpn0676_{6His} dagegen reduziert die Infektion

Die Adhäsivität der Proteine Cpn0678 und Cpn0677 deutet darauf hin, dass sie eine wichtige Rolle in der Infektionssituation spielen könnten. Um zu untersuchen, ob an HEp-2 Zellen gebundenes Protein durch Absättigung von Bindestellen die Adhäsion der Chlamydien stört, wurden Neutralisationsexperimente durchgeführt. Nach Vorinkubation von HEp-2 Zellen mit rekombinantem Protein, wurden gradientengereinigten *C. pneumoniae* EBs zugegeben und die

HEp-2 Zellen für 60 h infiziert. Die Inkubation mit 100 µg/ml BSA führte zu keiner Infektionsreduktion. Dagegen war für EBs, die mit Heparin vorinkubiert waren, nur noch eine Restinfektion von 5 % zu beobachten (Abb. 18 A). Überraschenderweise war schon mit 20 µg/ml rCpn0678_{6His} ein Anstieg der relativen Infektion auf 430 % festzustellen und bei Verwendung von 100 µg/ml Protein lag die Infektion sogar bei 680 % (Abb. 18 A). Durch die Vorbehandlung mit rCpn0678_{6His} war nach 60 h Infektion nicht die Morphologie und Größe gebildeter Inklusionen verändert, sondern nur die Anzahl der Inklusionen erhöht (Abb. 18 B). Erstaunlicherweise nahm mit steigender Konzentration an rCpn0677_{6His} die relative Infektion auch stark zu und erreichte bei 100 µg/ml Protein mit 417 % ein Maximum (Abb. 18 C).

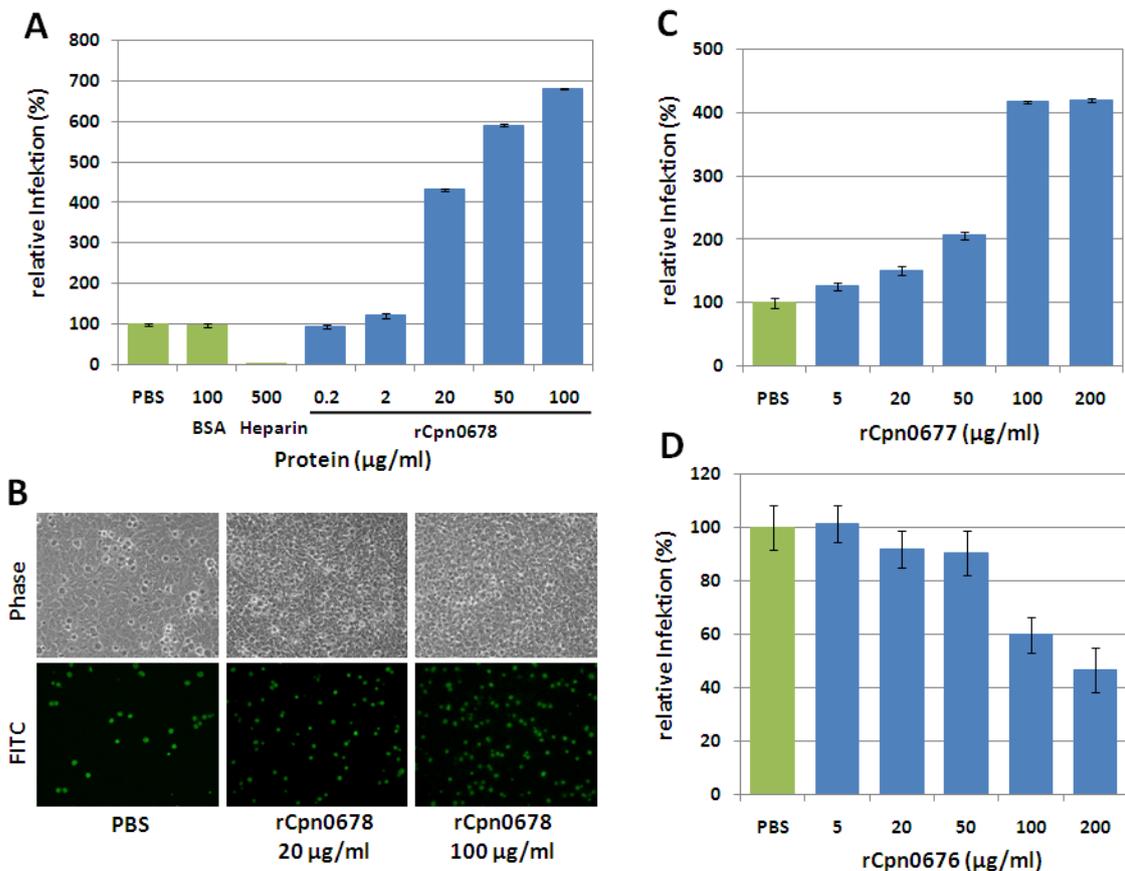


Abbildung 18: Änderung der *C. pneumoniae* Infektion durch rCpn0676_{6His} bis rCpn0678_{6His}

A) Quantifizierung des Protein-Neutralisationsassays. HEp-2 Zellen wurden 2 h bei 37 °C mit PBS, BSA oder rCpn0678_{6His} in Medium inkubiert bzw. EBs für 1 h mit 500 µg/ml Heparin in PBS vorinkubiert, bevor sie mit gradientengereinigten *C. pneumoniae* EBs (MOI = 20) stationär für 2 h bei 37 °C infiziert wurden. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und ein Medienwechsel durchgeführt. Nach 60 h wurden infizierte Zellen mit Methanol fixiert und die Detektion der gebildeten Einschlüsse erfolgte durch einen FITC-konjugierten Antikörper gegen das chlamydiale LPS (Pathfinder, 1:4 verdünnt). Die Zahl der Einschlüsse wurde jeweils in 20 Gesichtsfeldern mikroskopisch bestimmt (n = 3) und die Einschlüsse pro Gesichtsfeld in den PBS behandelten Proben auf 100 % Infektion gesetzt.

B) Repräsentative Phasenkontrast- und Immunfluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen zeigen die durch rCpn0678_{6His} erhöhte Zahl chlamydialer Einschlüsse (20 x Vergrößerung).

C+D) Quantifizierung des Protein-Neutralisationsassays durchgeführt wie unter A) beschrieben, mit gradientengereinigten *C. pneumoniae* EBs (MOI = 10) und rCpn0677_{6His} und rCpn0676_{6His} (n = 3).

Genau gegenläufig zeigte sich das Ergebnis durch Vorinkubation mit rCpn0676_{6His}, da mit steigender Proteinmenge bis 200 µg/ml die relative Infektion kontinuierlich bis auf maximal 47 % abnahm (Abb. 18 D). Auch im Falle von rCpn0677_{6His} und rCpn0676_{6His} waren Morphologie und Größe der Inklusionen unverändert (Daten nicht gezeigt). Wurde rCpn0678_{6His} mit Proteinase K verdaut, war die relative Infektion unverändert zur Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Dies zeigte, dass allein rCpn0678_{6His} für die Infektionserhöhung verantwortlich war.

Somit zeigt sich, dass rCpn0678_{6His} und rCpn0677_{6His} eine infektionsstimulierende Wirkung auf Humanzellen ausüben, während rCpn0676_{6His} die Infektion reduziert. Dabei ist die intrazelluläre Entwicklung der Chlamydien nicht beeinflusst, sondern vermutlich nur die Adhäsion infektiöser EBs. Die Proteine OmcB und Pmp21 wurden bereits als Adhäsine identifiziert. Es zeigte sich unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen, dass eine Vorbehandlung von HEp-2 Zellen mit 200 µg/ml rOmcB_{6His} oder rPmp21_{6His} zu einer Reduktion der Infektion um 80 % bzw. 90 % führt (Moelleken and Hegemann 2008) (Schmidt 2009). Denkbar wäre daher, dass ungebundenes rCpn0678_{6His} und rCpn0677_{6His} auch mit *C. pneumoniae* EBs interagieren kann und es so zu einer erhöhten Adhäsion der Chlamydien kommt.

4.3.1 Charakterisierung der Infektionsstimulation durch rCpn0678_{6His}

Im Folgenden wurde untersucht, ob die durch rCpn0678_{6His} verursachte Infektionserhöhung abhängig von der Inkubationszeit des Proteins mit gradientengereinigten EBs ist. Dazu wurden EBs und rCpn0678_{6His} parallel oder zeitversetzt mit HEp-2 Zellen inkubiert, wie im Schema verdeutlicht (Abb. 19 A). Bereits eine 3 minütige Inkubation von 50 µg/ml rCpn0678_{6His} mit EBs resultierte in einer Erhöhung der Infektion auf 407 % und diese stieg mit zunehmender Inkubationsdauer stetig an, wobei nach 90 Minuten mit einer relativen Infektion von 1960 % allmählich das Maximum erreicht war (Abb. 19 B). Eine längere Inkubationsdauer hatte nur noch einen geringen weiteren Anstieg der relativen Infektion zur Folge.

Die Stimulation der Infektion könnte dabei durch Bindung von rCpn0678_{6His} an Humanzellen oder Bindung von rCpn0678_{6His} an EBs erfolgen. Durch Vorinkubation von EBs mit löslichem Heparin konnte die Infektion durch *C. pneumoniae* auf 8 % und durch *C. trachomatis* L2 auf 2 % reduziert werden, da keine Interaktion mehr mit den Glykosaminoglykanen der Wirtszelle stattfinden kann (Wuppermann, 2001). Daher wurde nun untersucht, ob rCpn0678_{6His} und rCpn0677_{6His} den inhibierenden Effekt von Heparin kompensieren können. Die Vorinkubation von *C. pneumoniae* EBs mit 500 µg/ml Heparin führte zu einer Restinfektion von 2 % (Abb. 19 C). Durch Inkubation von unbehandelten EBs und rCpn0678_{6His} stieg die Infektion auf 272 % an. Wurden mit Heparin vorinkubierte EBs zusammen mit rCpn0678_{6His} zu HEp-2 Zellen gegeben, stieg interessanterweise die relative Infektion auf 41 % an. Dagegen führte die Inkubation von Heparin vorinkubierten EBs mit rCpn0677_{6His} zu keiner Veränderung der Infektion, während die Inkubation von unbehandelten EBs und rCpn0677_{6His} jedoch die Infektion auf 344 % erhöhte.

Denkbar wäre eine Interaktion von rCpn0678_{6His} mit EBs trotz Vorbehandlung mit Heparin, was dazu führt das einige EBs wieder Adhäsion zeigen und eine Infektion auslösen. Durch die

Vorbehandlung der EBs mit Heparin, würde vermutlich weniger rCpn0678_{6His} an diese EBs binden als an unbehandelte EBs, und dies könnte erklären warum es nur zu einem partiellen Anstieg der Infektion kommt.

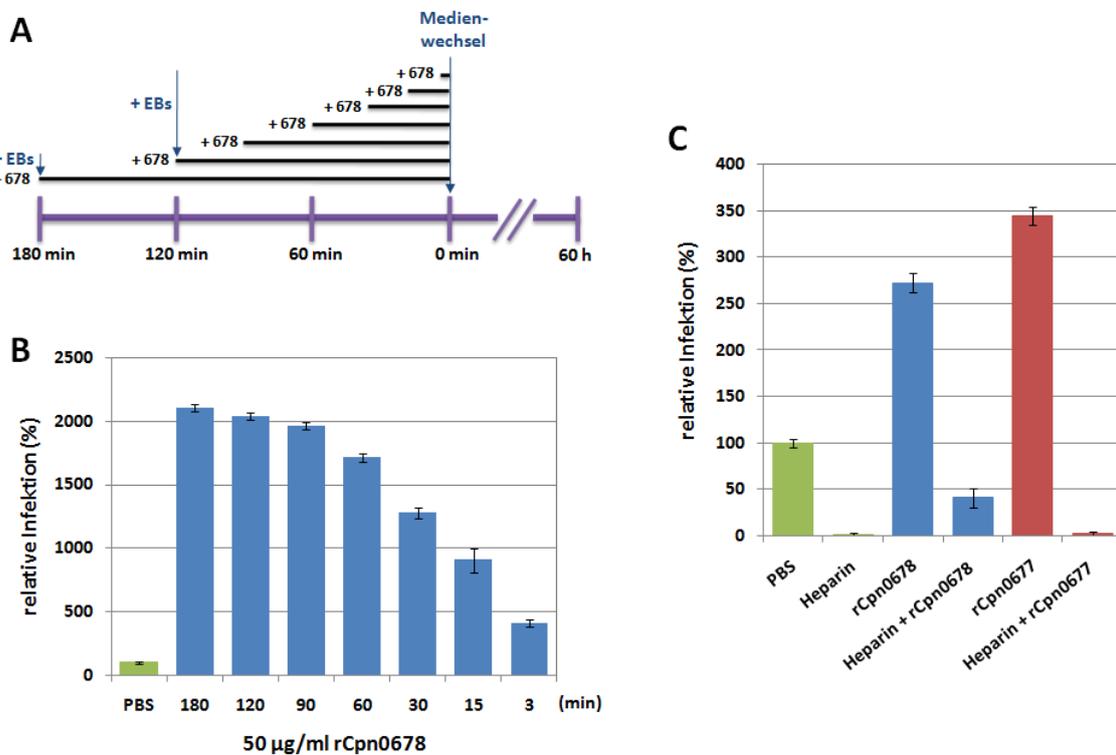


Abbildung 19: Charakterisierung der Infektionsstimulation durch rCpn0678_{6His}

A) rCpn0678_{6His} und *C. pneumoniae* EBs wurden für 3 h oder 2 h bei 37°C parallel mit HEp-2 Zellen inkubiert, die Zellen 3 x mit Medium gewaschen und ein Medienwechsel vorgenommen. Zudem wurden zuerst EBs allein zu HEp-2 Zellen gegeben, in einer Kinetik nun rCpn0678_{6His} zugefügt, die Zellen gewaschen und ein Medienwechsel durchgeführt. Dabei wurde die Inkubationszeit von rCpn0678_{6His} mit den HEp-2 Zellen und EBs von 90 min auf 3 min immer weiter verkürzt.

B) Quantifizierung des Protein-Neutralisationsassays. HEp-2 Zellen wurden wie im Schema A aufgeführt, parallel bzw. zeitversetzt mit gradientengereinigten EBs (MOI = 50) und rCpn0678_{6His} bei 37°C inkubiert. Nach 60 h wurden infizierte Zellen mit Methanol fixiert und gebildete Einschlüsse durch einen FITC-konjugierten Antikörper gegen das chlamydiale LPS detektiert. Die Zahl der Einschlüsse wurde jeweils in 20 Gesichtsfeldern mikroskopisch bestimmt (n = 1).

C) *C. pneumoniae* EBs wurden für 1 h bei 4°C in 500 µg/ml Heparin vorinkubiert. Eine MOI von 10 an EBs wurden dann für 2 h bei 37°C parallel mit 50 µg/ml rCpn0678_{6His} oder 100 µg/ml rCpn0677_{6His} in Medium inkubiert und verwendet, um konfluente HEp-2 Zellen zu infizieren. Parallel wurden 50 µg/ml rCpn0678_{6His} oder 100 µg/ml rCpn0677_{6His} mit unbehandelten *C. pneumoniae* EBs für 2 h bei 37°C mit HEp-2 Zellen inkubiert. Nach 60 h wurden infizierte Zellen mit Methanol fixiert, gebildete Einschlüsse durch einen FITC-konjugierten LPS-Antikörper detektiert und jeweils 20 Gesichtsfelder ausgezählt (n = 3).

4.3.2 rCpn0677_{6His} und rCpn0678_{6His} haben eine gegenläufige Wirkung auf die EB-Adhäsion bei 4°C

Es wurde nun untersucht, ob die durch rCpn0676_{6His}, rCpn0677_{6His} und rCpn0678_{6His} verursachte Änderung der Infektion tatsächlich mit einer veränderten Adhäsion infektiöser EBs einhergeht. HEp-2 Zellen wurden dazu bei 37°C mit rekombinantem Protein vorbehandelt, lebende CFSE-markierte EBs dazugegeben und die Adhäsion der Chlamydien bei 4°C mittels FACS analysiert.

Die relative Fluoreszenz adhärerter CFSE-markierter EBs an PBS-behandelten HEp-2 Zellen wurde auf 100 % relative Adhäsion gesetzt (Abb. 20 A). Die Behandlung mit 200 µg/ml BSA resultierte

mit 103 % in einer fast unveränderten Adhäsion, während 500 µg/ml Heparin mit 1 % die Adhäsion komplett blockierten. Überraschenderweise zeigte rCpn0678_{6His} unter diesen experimentellen Bedingungen das Verhalten eines klassischen Adhäsins, da mit steigender Konzentration an rCpn0678_{6His} die Adhäsion der Chlamydien reduziert wurde. Dies resultierte bei Einsatz von 200 µg/ml Protein in einer relativen Adhäsion von nur noch 12 % (Abb. 20 A).

Im Falle der Zugabe von rCpn0677_{6His} zeigte sich das genau umgekehrte Bild. Verglichen zur Kontrolle war eine stark erhöhte relative Adhäsion der EBs festzustellen, die mit steigender Proteinkonzentration zunahm und bis auf 309 % bei 200 µg/ml Protein anstieg (Abb. 20 B). Dagegen zeigte rCpn0676_{6His} bei allen Konzentrationen keinen nennenswerten Effekt auf die Adhäsion der EBs bei 4 °C (Abb. 20 C). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch die Vorbehandlung von HEp-2 Zellen mit rCpn0678_{6His} die Bindungsstellen für die EBs abgesättigt sind und es einer reduzierten Adhäsion kommt. Die Vorbehandlung der HEp-2 Zellen mit rCpn0677_{6His} dagegen erhöht die Adhäsion der EBs. Im Falle von rCpn0676_{6His} bindet das Protein vermutlich nicht an HEp-2 Zellen und zeigt daher keinen Effekt auf die EB-Adhäsion.

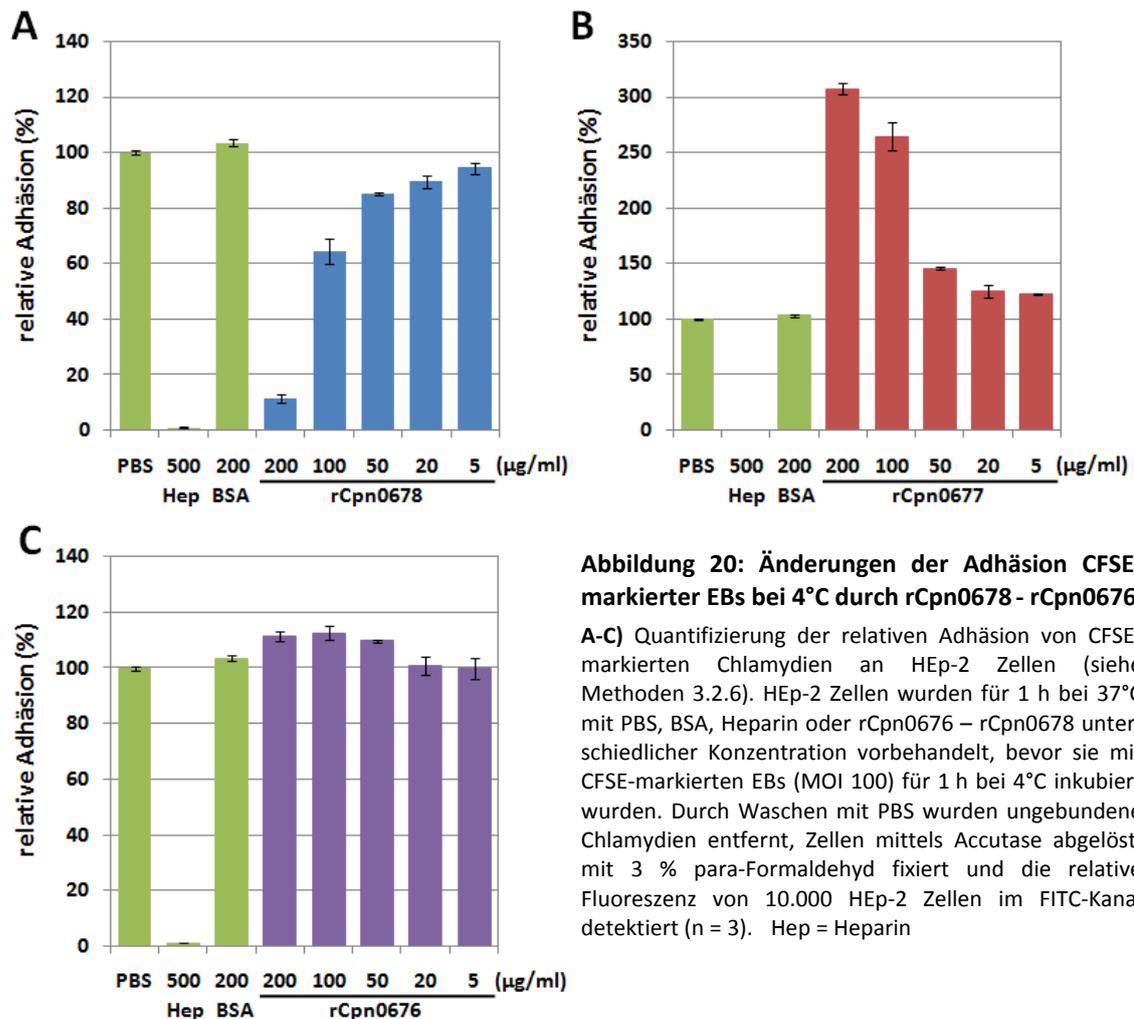


Abbildung 20: Änderungen der Adhäsion CFSE-markierter EBs bei 4°C durch rCpn0678 - rCpn0676

A-C) Quantifizierung der relativen Adhäsion von CFSE-markierten Chlamydien an HEp-2 Zellen (siehe Methoden 3.2.6). HEp-2 Zellen wurden für 1 h bei 37°C mit PBS, BSA, Heparin oder rCpn0676 – rCpn0678 unterschiedlicher Konzentration vorbehandelt, bevor sie mit CFSE-markierten EBs (MOI 100) für 1 h bei 4°C inkubiert wurden. Durch Waschen mit PBS wurden ungebundene Chlamydien entfernt, Zellen mittels Accutase abgelöst, mit 3 % para-Formaldehyd fixiert und die relative Fluoreszenz von 10.000 HEp-2 Zellen im FITC-Kanal detektiert (n = 3). Hep = Heparin

4.3.3 rCpn0677_{6His} und rCpn0678_{6His} erhöhen die EB-Adhäsion bei 37°C

Da im Neutralisationsexperiment die Inkubation von rCpn0678_{6His} mit EBs bei 37°C stattfand (siehe Abb. 18), wurden diese Bedingungen auch in Adhäsionsexperimenten mit den CFSE-markierten EBs überprüft. Einer Vorbehandlung der HEp-2 Zellen mit Protein bei 37°C folgte die Zugabe der EBs für 1 h bei 37°C und Quantifizierung der EB-Adhäsion mittels FACS-Messung. Unter diesen Bedingungen kann allerdings nicht mehr zwischen adhären und bereits internalisierten EBs unterschieden werden.

Zunächst wurde anhand eines Coomassie gefärbten SDS-Gels die Qualität der rekombinanten Proteine überprüft, wobei für OmcB und Cpn0676 eine zusätzliche Degradationsbande bei etwa 30 kDa auftrat (Abb. 21 A). Das OmcB-Protein diente als Positivkontrolle eines klassischen Adhäsins und zeigte nach EB-Zugabe bei 37°C mit nur 4 % eine stark reduzierte relative EB-Assoziation an HEp-2 Zellen (Abb. 21 B). Nach Vorinkubation mit rCpn0678_{6His} erhöhte sich die relative EB-Assoziation mit steigender Proteinkonzentration auf 272 % bei 100 µg/ml Protein (4 nM). Auch durch rCpn0677_{6His} wurde ein stetiger Anstieg der EB-Assoziation mit HEp-2 Zellen auf 347 % bei 200 µg/ml Protein (4 nM) erreicht. Dagegen zeigt sich bei 200 µg/ml rCpn0676_{6His} (4 nM) mit 112 % relativer EB-Assoziation keine signifikante Veränderung zur PBS-Kontrolle. Somit führen die Proteine Cpn0677 und Cpn0678 zu einer erhöhten Anzahl gebundener und aufgenommener EBs, während Cpn0676 keinen signifikanten Effekt zeigt.

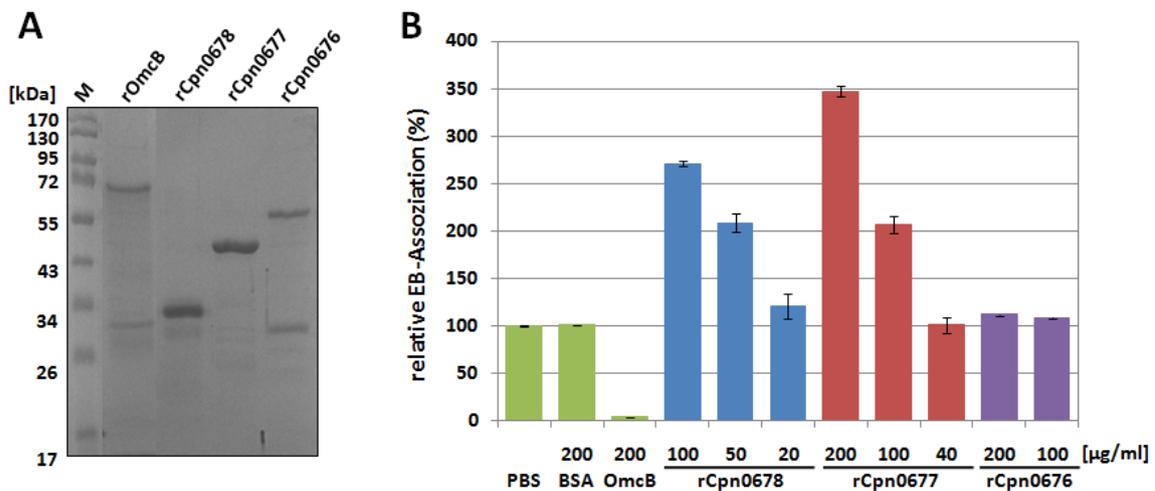


Abbildung 21: Erhöhte Adhäsion CFSE-markierter EBs bei 37 °C durch Vorbehandlung der Humanzellen mit rCpn0678 - rCpn0676

A) Coomassie gefärbtes SDS-Gel (10 %) zur Kontrolle der Qualität eingesetzter His-markierter Proteine.

B) Quantifizierung der relativen Adhäsion von HEp-2 Zellen mit gebundenen CFSE-markierten Chlamydien. HEp-2 Zellen wurden für 1 h bei 37°C mit PBS, BSA, rOmcB_{6His}, rCpn0678_{6His} bis rCpn0676_{6His} in unterschiedlichen Konzentrationen vorbehandelt. Nun wurden CFSE-markierte EBs (MOI 100) dazugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Durch Waschen mit PBS wurden ungebundene Chlamydien entfernt, die Zellen mittels Accutase abgelöst, mit 3 % para-Formaldehyd fixiert und die relative Fluoreszenz von 10.000 HEp-2 Zellen im FITC-Kanal mittels FACS detektiert (n = 3).

4.3.4 Die parallele Inkubation von rCpn0677_{6His} oder rCpn0678_{6His} mit EBs induziert die starke Infektionserhöhung

Im vorhergehenden Experiment wurde gezeigt, dass durch parallele Inkubation von EBs und rCpn0677_{6His} oder rCpn0678_{6His} die Adhäsion der Chlamydien erhöht war. Man könnte vermuten, dass unter diesen experimentellen Bedingungen ungebundenes Protein vorliegen könnte und für die Infektionsstimulation verantwortlich war. Daher wurde untersucht, ob durch Vorinkubation der Zellen mit Protein und Entfernen des ungebundenen Proteins vor der EB-Zugabe, ähnliche Veränderungen bei der Infektion auftraten. Einerseits wurden HEp-2 Zellen für 1 h bei 37°C mit rekombinantem Protein vorinkubiert und Zellen vor Zugabe von *C. pneumoniae* EBs zweifach mit Medium gewaschen (wasch). Andererseits wurden EBs und Proteinlösung parallel für 2 h mit HEp-2 Zellen inkubiert und nur der Überstand abgenommen. In beiden Ansätze wurde jeweils nach 60 h die Infektion quantifiziert.

Verglichen zur PBS-Kontrolle war nach Entfernen von ungebundenem rCpn0678_{6His} und Waschen der Zellen die Infektion auf 69 % reduziert, während bei Anwesenheit des Proteins die Infektion auf 231 % erhöht war (Abb. 22 A). Entfernte man ungebundenes rCpn0677_{6His}, so führte dies bereits zu einer leichten Infektionserhöhung auf 117 % und ohne Waschen erhöhte sich die Infektion auf 279 %. Im Gegensatz dazu war nach Entfernen von rCpn0676_{6His} die Infektion unverändert, während ohne Entfernen des ungebundenen Proteins eine Infektionsreduktion auf 42 % eintrat. Eine mikroskopische Analyse der Infektion nach paralleler Inkubation von EBs und Protein (ohne waschen), zeigte in allen Fällen keine Veränderung in Größe und Morphologie chlamydialer Inklusionen (Abb. 22 C). Bei paralleler Inkubation von Protein und EBs muss daher ungebundenes Protein vorliegen, welches die EB-Adhäsion stimuliert bzw. reduziert.

Um dies zu untersuchen, wurden in einem parallelen Experiment Zellen nach Proteininkubation und Waschen (Z), Waschfraktionen (W1 + 2) und Überstände (ÜS) im Westernblot auf die Anwesenheit der Proteine analysiert und die Bandenintensitäten quantifiziert (Abb. 22 B). Dabei waren für rCpn0678_{6His} und rCpn0677_{6His} nur 7 % des Proteins in der Zellfraktion detektierbar, während der überwiegende Anteil des Proteins im Überstand und in den Waschfraktionen vorlag. Somit war unter diesen experimentellen Bedingungen 75 % ungebundenes rCpn0678_{6His} und 55 % ungebundenes rCpn0677_{6His} im Überstand detektierbar, welches stimulierend auf die Adhäsion oder Internalisierung der EBs wirken könnte. Zugleich war der Anteil an gebundenem Protein erhöht auf 25 % für rCpn0678_{6His} und 45 % für rCpn0677_{6His}, im Vergleich zu nur 7 % bei gewaschenen Zellen. Daher ist nicht auszuschließen, dass die erhöhte Menge an gebundenem rCpn0678_{6His} und rCpn0677_{6His} der Grund für die Infektionserhöhung ist. Das rCpn0676_{6His} Protein konnte in beiden experimentellen Ansätzen nicht in der Zellfraktion detektiert werden. Damit bindet rCpn0676_{6His} nicht an HEp-2 Zellen oder in so geringen Mengen, dass es im Blot nicht nachweisbar war. Somit ist eine Interaktion von ungebundenem rCpn0676_{6His} mit EBs sehr wahrscheinlich, wodurch die EB-Adhäsion und somit die Infektion negativ beeinflusst wäre.

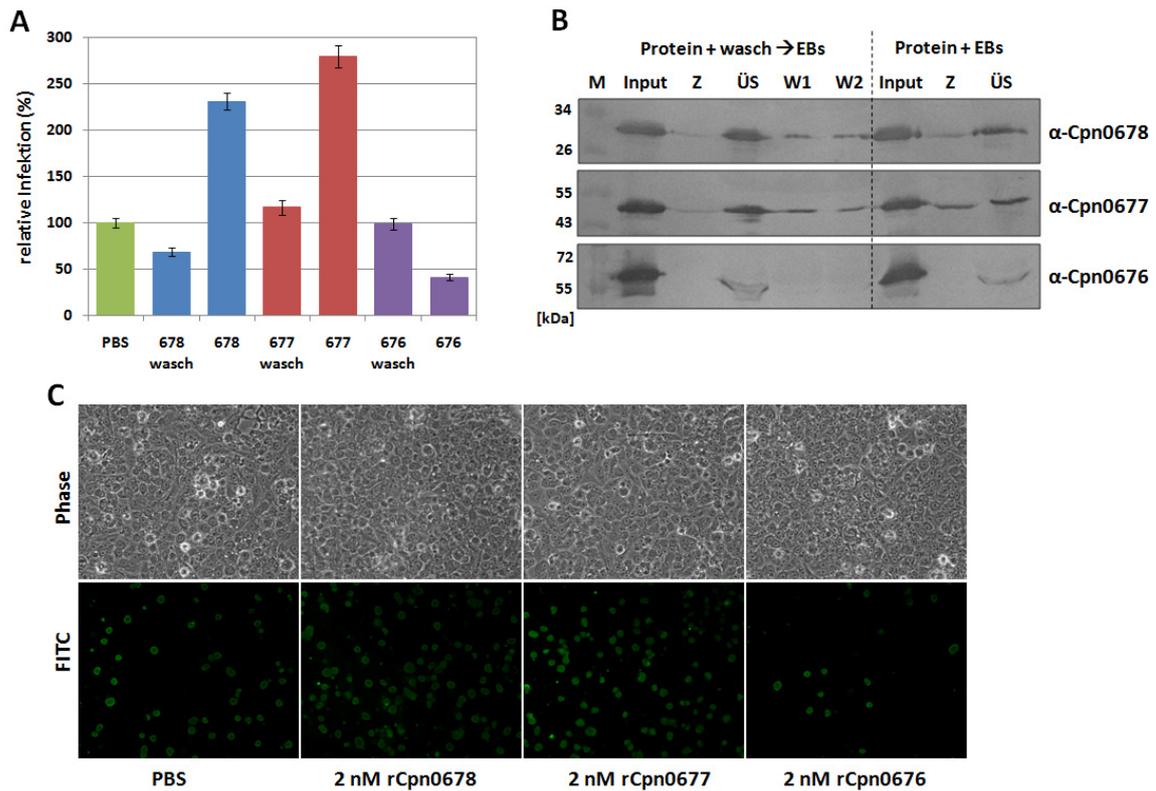


Abbildung 22: Einfluss von ungebundenem Protein auf die *C. pneumoniae* Infektion

Quantifizierung des Protein-Neutralisationsassays und Blots von gebundenem sowie ungebundenem Protein.

A) Einerseits wurden HEP-2 Zellen mit 50 µg/ml rCpn0678_{6His} bzw. 100 µg/ml rCpn0677_{6His} und rCpn0676_{6His} (jeweils 2 nM) für 1 h bei 37°C vorinkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen zweifach mit Medium gewaschen. Die Zellen wurden nun mit einer MOI 10 an *C. pneumoniae* EBs für 2 h bei 37°C inkubiert, das Medium abgenommen und durch neues Medium ersetzt. Andererseits wurden *C. pneumoniae* EBs parallel mit den Proteinen für 2 h bei 37°C mit HEP-2 Zellen inkubiert, der Überstand abgenommen und durch neues Medium ersetzt. Nach 60 h wurden jeweils infizierte Zellen mit Methanol fixiert, gebildete Einschlüsse durch einen FITC-konjugierten LPS-Antikörper detektiert und die Zahl der Einschlüsse jeweils in 20 Gesichtsfeldern mikroskopisch bestimmt (n = 3).

B) Parallele Durchführung wie unter A) beschrieben. Jedoch wurden die HEP-2 Zellen nach der Inkubation mit Protein und EBs durch Accutase abgelöst (Z) und mit gleichen Mengen der Proben Überstand (ÜS) und Waschfraktionen (W1+W2) in Westernblots mit Cpn0678, Cpn0677 und Cpn0676-Antikörpern analysiert. Gleiche Mengen des eingesetzten Proteins wurden geladen (Input). Bandenintensitäten wurden mit der Software Scion Image bestimmt (n = 1).

C) Repräsentative Phasenkontrast- und Immunfluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen zeigen die durch parallele Inkubation von EBs und rekombinanten Proteinen veränderte Zahl chlamydialer Einschlüsse (20 x Vergrößerung)

Zusammenfassend zeigt sich aus den vorangegangenen Experimenten (Abb. 18 – 22), dass in Anwesenheit von rCpn0678 die Adhäsion von EBs bei 4°C reduziert, bei 37°C dagegen erhöht war. Die Stärke der induzierten Infektionserhöhung war abhängig von der parallelen Inkubationszeit der EBs mit rCpn0678 bei 37°C. Somit könnte rCpn0678 bei 37°C entweder die Humanzelle stimulieren oder es erfolgte eine Interaktion mit EBs, die bei 4°C nicht stattfand. Zudem war rCpn0678 in der Lage, trotz Vorinkubation von EBs mit Heparin, eine Stimulation der Infektion zu verursachen.

In Anwesenheit von rCpn0677 war eine Erhöhung der Infektion bei 37°C zu beobachten, jedoch zeigte rCpn0677 keine Stimulation der Infektion bei Einsatz von Heparin vorbehandelten EBs. Die Adhäsion der EBs war bei 4°C und 37°C durch rCpn0677 gleichermaßen erhöht und lässt einen anderen Mechanismus der Infektionserhöhung, als bei rCpn0678 vermuten. Die Adhäsion von EBs

bei 4°C und 37°C ist durch rCpn0676 nicht signifikant verändert, dennoch führte die parallele Inkubation von EBs und rCpn0676 bei 37°C zu einer Infektionsreduktion. Die durch rCpn0678 und rCpn0677 verursachte Infektionserhöhung bzw. durch rCpn0676 verursachte Infektionsreduktion war dabei maßgeblich vom Vorhandensein ungebundenen Proteins abhängig. Dieses ungebundene Protein könnte im Falle von rCpn0677 und rCpn0678 zu einer Stimulation der Humanzelle führen, wodurch EBs vermehrt Adhäsion bzw. Internalisierung zeigen oder eine Interaktion der Proteine mit EBs zur Infektionserhöhung führen.

4.4 Cpn0676 – Cpn0678 werden spät im Infektionszyklus exprimiert und kodieren für EB-spezifische Proteine

Für die Analyse der Proteinexpression von Cpn0676 - Cpn0678 während des Infektionszyklus wurden polyklonale Antikörper gegen rCpn0676_{6His} - rCpn0678_{6His} generiert und die Seren mittels NHS-Sepharose gegen das rekombinante Antigen aufgereinigt. Infizierte HEp-2 Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und im Westernblot die Expression von Cpn0676 – Cpn0678 analysiert. Das Hitzeschock-Protein DnaK (theoretisch: 71,3 kDa) diente als Positivkontrolle und zeigte eine Expression über den gesamten chlamydialen Infektionszyklus (Abb. 22 A). Für Cpn0678 (theoretisch: 21,8 kDa) konnte eine einzige Proteinbande bei ca. 28 kDa erstmals nach 48 hpi und mit zunehmender Intensität im weiteren Infektionsverlauf detektiert werden (Abb. 23 A).

Für Cpn0677 (theoretisch: 40,6 kDa) war eine Proteinbande bei ca. 44 kDa detektierbar, die zwischen 6 - 48 hpi noch sehr schwach war und ab 60 hpi stark an Intensität zunahm. Für Cpn0676 (theoretisch: 43,4 kDa) war zu den Zeitpunkten 72 und 84 hpi bei ca. 46 kDa eine intensive Bande detektierbar, die bei 48 hpi noch nicht auftrat (Abb. 23 B). Da es sich bei der Bande um Cpn0676 handelt, kann durch die Beobachtung unterstützt werden, dass im Blot mit gradientengereinigten EBs keine Zusatzbanden auftraten und Cpn0676 auf derselben Höhe detektierbar war (Abb. 23 C). Cpn0677 und Cpn0676 zeigten im Westernblot ein leicht höheres apparentes Laufverhalten als theoretisch erwartet, während DnaK bei der theoretisch erwarteten Größe detektiert wurde. Dabei war im Falle von Cpn0678 das apparente Molekulargewicht mit 28 – 30 kDa deutlich erhöht, da entweder das Protein nicht komplett denaturiert vorlag oder eine Modifikation des Proteins stattgefunden hat. Dabei ist es wichtig anzumerken, dass in den gezeigten Westernblots die späte Detektion der Proteine nur aufgrund der nun ausreichend vorhandenen Menge an Chlamydien zurückzuführen sein könnte, die sich während der Infektion vermehren. Denn für *C. pneumoniae* GiD wurde ermittelt, dass die Zahl der Chlamydien durch die Replikation bis 96 hpi etwa um den Faktor 1000 zunimmt (Willger 2004). Außerdem wurde für *C. pneumoniae* gezeigt, dass nach 36 hpi ausschließlich RBs und noch keine EBs vorhanden sind, während nach 60 und 72 hpi der Anteil an EBs stark zunimmt (Wolf, Fischer et al. 2000).

Im Folgenden wurde durch Westernblots von gradientengereinigten RBs und EBs analysiert, ob Cpn0676 – Cpn0678 in infektiösen EB vorhanden sind. Da das DnaK-Protein über den gesamten Infektionszyklus exprimiert wurde, diente es hier als Kontrolle. Gleiche Mengen an RBs und EBs,

die im Westernblot mit dem DnaK-Antikörper eine vergleichbare Bandenintensität zeigten, wurden auch für Westernblots mit Cpn0676 - Cpn0678-Antikörpern eingesetzt (Abb. 23 C). Unter diesen Bedingungen war im Falle von Cpn0676, Cpn0677 und Cpn0678 nur jeweils eine Bande für EBs detektierbar, während die Proteine nicht in RBs nachgewiesen werden konnten. Dabei war von Cpn0678 bis zu Cpn0676 eine abnehmende Bandenintensität zu beobachten und dies korreliert mit den Transkriptdaten (siehe Abb. 11), in denen für Cpn0678 die stärkste Expression und für Cpn0676 die niedrigste Expression beobachtet wurde. Zusammenfassend zeigt sich für Cpn0676, Cpn0677 und Cpn0678 das früheste Auftreten detektierbarer Proteinmengen erst nach 48 hpi und die späte Expression im Infektionszyklus deutet darauf hin, dass es sich bei Cpn0676, Cpn0677 und Cpn0678 um EB-spezifische Proteine handelt. Eine EB-spezifische Expression der Proteine wurde durch Westernblots mit gradientengereinigten EBs gezeigt.

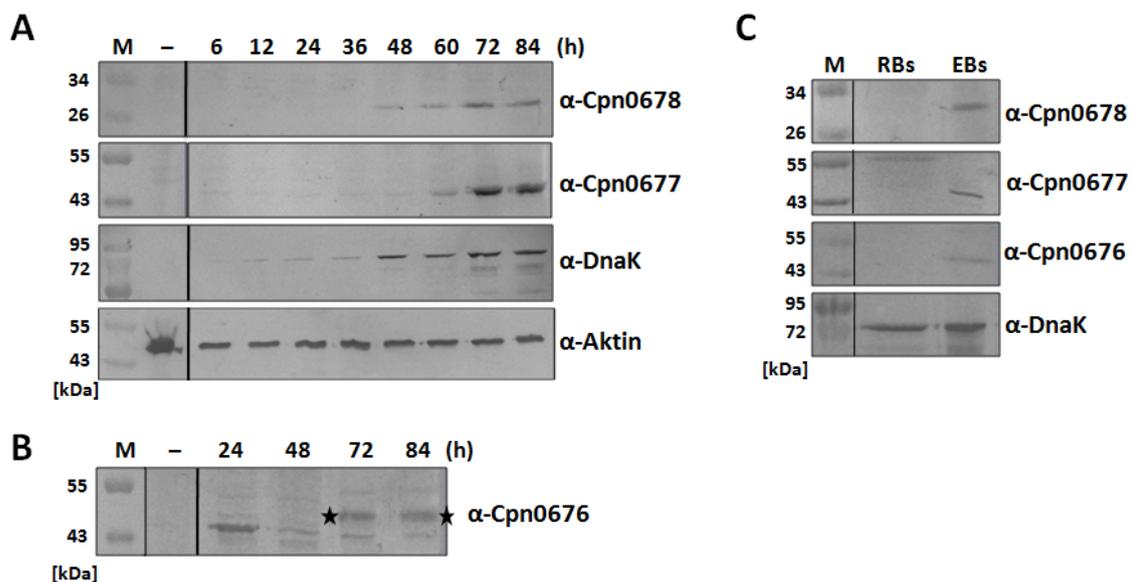


Abbildung 23: Nachweis von Cpn0678 – Cpn0676 während des Infektionszyklus

A) Kinetik der Cpn0677 und Cpn0678 Proteinexpression während des Infektionszyklus 6 – 84 hpi. 2×10^7 Hep-2 Zellen, infiziert mit einer MOI von 5 wurden, zur Ernte der Chlamydien zu den angegebenen Zeitpunkten durch Ultraschall lysiert, pelletiert und jeweils gleiche Zellmengen für das SDS-Gel geladen. Die Detektion erfolgte mit antigengereinigtem anti-Cpn0677 und Cpn0678 Antikörper und ein α -DnaK Blot diente als interne chlamydiale Kontrolle. Ein Blot mit β -Aktin Antikörper diente als Ladekontrolle gleicher Mengen an Humanzellen.

B) Kinetik der Cpn0676 Proteinexpression während des Infektionszyklus. Sterne markieren die spezifischen Proteinbanden für Cpn0676.

C) Westernblot-Analyse von gradientengereinigten Chlamydien, wobei RBs nach 36 hpi und EBs nach 80 hpi geerntet wurden. Ein Blot mit DnaK-Antikörper diente als Ladekontrolle, um gleiche Mengen an geladenen RBs und EBs pro Spur sicherzustellen. Die Detektion erfolgte mit antigengereinigten Cpn0676 - 678 Antikörpern.

4.4.1 Cpn0676 – Cpn0678 sind in chlamydialen Inklusionen frühestens nach 60 hpi detektierbar

Mittels Immunfluoreszenz wurde ermittelt, wann die Proteine Cpn0676 – 678 in der chlamydialen Infektion detektierbar sind, und ob sich somit die im Westernblot ermittelten Expressionsmuster bestätigen lassen. Zur Spezifitätskontrolle der generierten Seren wurden infizierte Zellen mit allen Präimmunsereen von Cpn0676 - 678 gefärbt und es wurde keine spezifische Färbung der Inklusion

beobachtet (Daten nicht gezeigt). Durch die verwendete Formaldehyd-Fixierung und Permeabilisierung werden nur Oberflächenproteine der Chlamydien gefärbt (Moelleken and Hegemann 2008). Bei der Immunfluoreszenz mit antigengereinigten Cpn0676, Cpn0677 und Cpn0678 Seren wurde parallel ein *C. pneumoniae* spezifischer MOMP-Antikörper eingesetzt, der ein oberflächenlokalisiertes Epitop erkennt. Es zeigte sich, dass die Proteine Cpn0676, Cpn0677 und Cpn0678 zeitgleich erstmals ab 60 hpi in den chlamydialen Inklusionen detektierbar waren, während der anti-MOMP Antikörper auch schon bei 32 h und 48 hpi die Inklusionen anfärbte (Abb. 24 A - C). Im Falle von Cpn0677 war zu den Zeitpunkten 60 – 90 hpi zusätzlich auch eine Färbung außerhalb der Inklusionen zu beobachten. Die Färbung trat jedoch sowohl in infizierten als auch nicht infizierten Zellen auf und stellt damit ein Hintergrundsignal der Antikörperfärbung dar, wie die exemplarische Immunfluoreszenz zum Zeitpunkt 84 hpi zeigte (Abb. 24 D). Auch bei der Färbung mit dem Cpn0676-Antikörper (72 hpi) und dem Cpn0678-Antikörper (60 hpi) war zusätzlich eine Färbung im Zytoplasma der Humanzelle zu beobachten, die aber auch in nicht infizierten Zellen zu sehen war (Daten nicht gezeigt). Somit konnte gezeigt werden, dass die als hypothetisch annotierten Proteine Cpn0676, Cpn0677 und Cpn0678 erstmals nach 60 hpi in chlamydialen Inklusionen detektierbar sind und unterstützt die Annahme, dass es sich um EB-spezifische Proteine handelt. Dies lässt vermuten, dass Cpn0676, Cpn0677 und Cpn0678 auf der Oberfläche von Chlamydien lokalisieren und daher detektierbar sind.

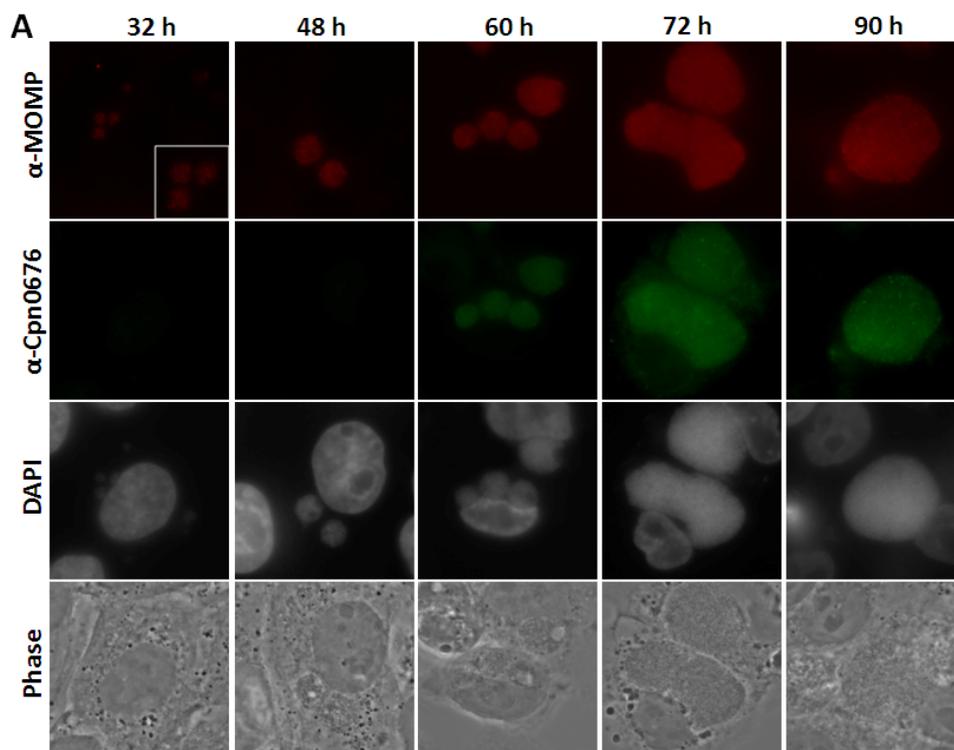
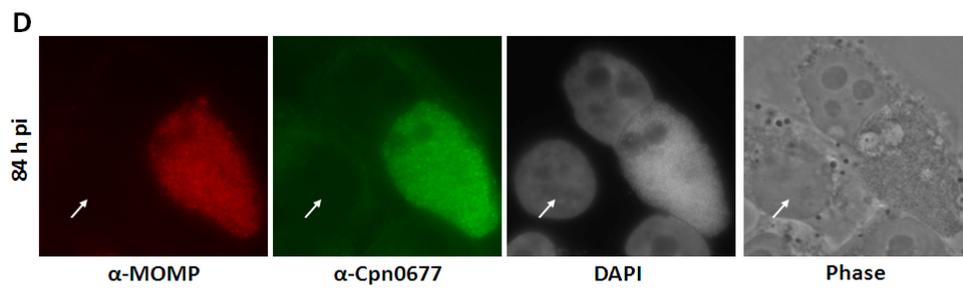
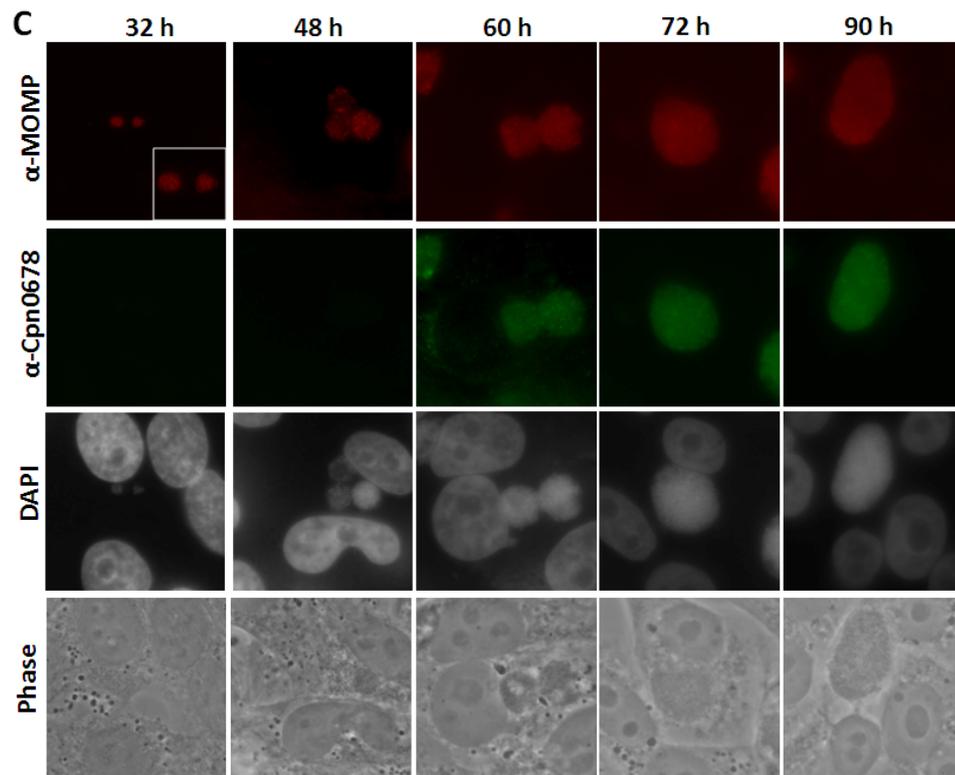
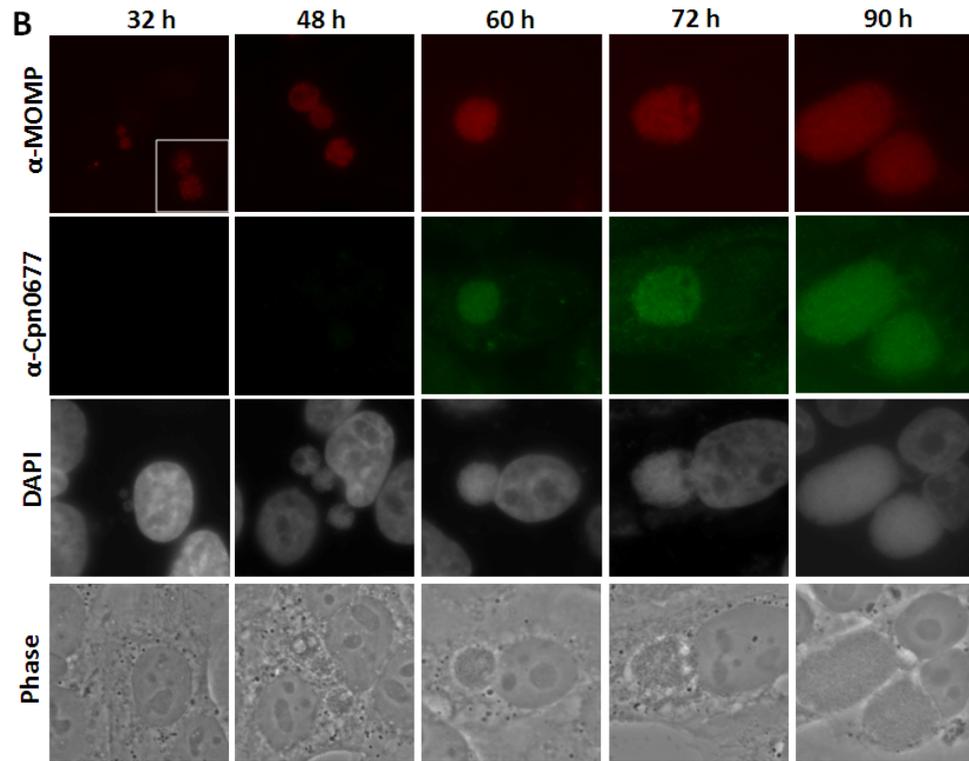


Abbildung 24: Detektion von Cpn0676 - Cpn0678 während der chlamydialen Infektion

A - C) Phasenkontrast- und Immunfluoreszenzaufnahmen von HEp-2 Zellen, die mit einer MOI 1 an *C. pneumoniae* EBs infiziert wurden. Zellen wurden mit para-Formaldehyd fixiert und für 5 min mit 0.2 % Triton X-100 permeabilisiert. 2 µg/ml antigengereinigter Antikörper gegen Cpn0676 (A), Cpn0677 (B) und Cpn0678 (C) wurden eingesetzt und eine Kofärbung mit dem *C. pneumoniae* spezifischen MOMP-Antikörper (Wolf, Fischer et al. 2001) durchgeführt.

D) Phasenkontrast- und Immunfluoreszenzaufnahmen einer infizierten und nicht-infizierten (Pfeil) HEp-2 Zelle 84 hpi.



4.4.2 Cpn0677 und Cpn0678 sind auf der Oberfläche von EBs detektierbar

Aufgrund der vermuteten Oberflächenlokalisierung von Cpn0676 – Cpn0678 aus der Immunfluoreszenz und der EB-spezifischen Detektion der Proteine im Westernblot wurde untersucht, ob die Proteine Cpn0676 – Cpn0678 auf der Oberfläche von EBs lokalisieren. Dazu wurde eine sog. „Dot-Blot“-Analyse durchgeführt, bei der gradientengereinigte EBs auf eine PVDF-Membran getropft und mit spezifischen Antikörpern inkubiert wurden. Sollten die Proteine auf der Oberfläche nachweisbar sein, müsste durch Vorbehandlung der EBs mit steigender Konzentration an Proteinase K das Signal verschwinden. Die Intaktheit der EBs nach Behandlung mit Proteinase K wurde mit einem Antikörper gegen das intrachlamydiale ribosomale S1-Protein überprüft. Dabei wurde für unbehandelte und Proteinase K behandelte EBs dasselbe schwache Signal detektiert. Dies zeigte, dass durch die Proteinase K Behandlung keine erhöhte Lyse der EBs auftrat (Abb. 25 A). Da die EBs auf der Membran getrocknet wurden, könnten dabei einige EBs zerstört worden sein und würden das schwache Signal für S1 erklären. Als Ladekontrolle wurden gleiche Mengen an unbehandelten EBs sowie EBs nach Proteinase K Behandlung mit 1 % SDS lysiert und dies führte zur Detektion des S1-Proteins in allen Proben (Abb. 25 A, unten). Zusätzlich dienen MOMP als Außenmembranprotein und DnaK als partiell oberflächenlokalisiertes Protein als Positivkontrollen.

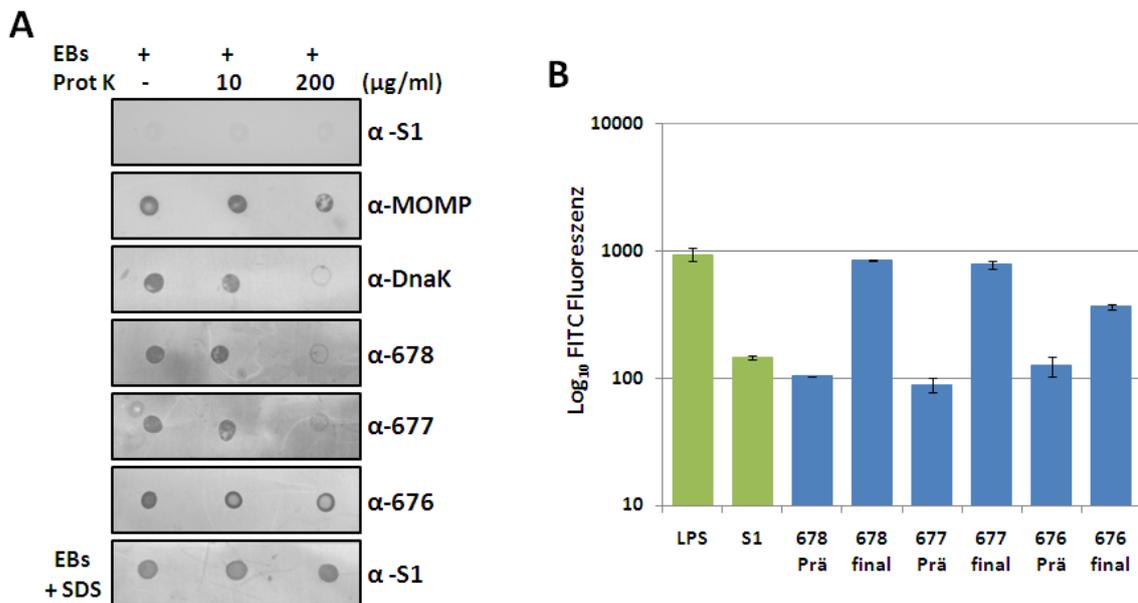


Abbildung 25: Dot-Blot und FACS-Analysen zeigen die Oberflächenlokalisierung von Cpn0677 und Cpn0678

A) Jeweils 2×10^8 gradientengereinigte *C. pneumoniae* EBs wurden mit 10 bzw. 200 µg/ml Proteinase K (Prot K) für 30 min bei 37°C verdaut und das Enzym durch Zugabe von 2 nM PMSF inaktiviert, die EBs 1:10 verdünnt, auf eine PVDF-Membran getropft und getrocknet. Als Ladekontrolle wurden EBs vor dem Tropfen auf die Membran in 1 % SDS lysiert. Die Chlamydien auf der Membran wurden nun mit verschiedenen Antikörpern analysiert: α-MOMP (Wuppermann, 1:500), α-DnaK und α-S1 (Birkelund, 1:500) und α-Cpn0678, α-Cpn0677 und α-Cpn0676 Antikörper (1:20), die über gebloottete HEp-2 Zelllysate abgereichert wurden.

B) Gradientengereinigte *C. pneumoniae* EBs wurden mit dem DNA-Farbstoff Syto 17 gefärbt, um in Kombination mit den Parametern Größe und Granularität die EBs zuverlässig im FACS zu detektieren. Anschließend wurden jeweils 10^7 EBs mit verschiedenen primären Antikörpern und einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper inkubiert. Die EBs wurden mit 3 % Formaldehyd fixiert und die mittlere FITC-Fluoreszenz von 10.000 Chlamydien bestimmt (n = 2). Es wurden die Präimmunsere und finale Seren von Cpn0678 – Cpn0676 jeweils 1:200 verdünnt und Antikörper gegen chlamydiales LPS (1:10) sowie gegen ribosomales S1-Protein (1:50) verwendet.

Mit 200 µg/ml Proteinase K wurde das Signal für MOMP deutlich schwächer, verschwand jedoch nicht ganz (Abb. 25 A). Da es sich bei MOMP um ein integrales Protein des cOMC handelt wäre denkbar, dass nicht alle durch den Antikörper detektierten Epitope von der Oberfläche verdaut wurden. Im Falle von DnaK verschwanden nach Behandlung mit 200 µg/ml Proteinase K die Signale fast vollständig. Für Cpn0678 und Cpn0677 war auch bereits bei 10 µg/ml Proteinase K Behandlung ein leicht reduziertes Signal zu beobachten und bei 200 µg/ml Proteinase K verschwanden die Signale nahezu vollständig. Für Cpn0676 dagegen war der Verlust des Signals deutlich schwächer und zwischen 10 und 200 µg/ml Proteinase K kein Unterschied zu beobachten. Dies zeigt, dass es sich bei Cpn0677 und Cpn0678 vermutlich um oberflächenlokalisierte Proteine handelt, da die Behandlung von EBs mit Proteinase K zu einem fast kompletten Verlust der Detektion dieser Proteine führte. Cpn0676 ist vermutlich nur partiell oberflächenlokalisiert oder ähnlich wie MOMP, stärker in der chlamydialen Außenmembran verankert.

Der Nachweis der Oberflächenlokalisierung von EB-spezifischen Proteinen mittels FACS-Analyse wurden bereits erfolgreich eingesetzt (Montigiani, Falugi et al. 2002). Um die obigen Daten zu verifizieren, wurden in einem zweiten experimentellen Ansatz gradientengereinigte EBs mit dem DNA-Farbstoff Syto 17 gefärbt. Dann wurden die EBs mit Antikörpern gegen das oberflächenlokalisierte Lipopolysaccharid LPS (Positivkontrolle), das intrachlamydiale ribosomale S1-Protein (Negativkontrolle) sowie mit Antikörpern gegen Cpn0676 – Cpn0678 gefärbt. Die relative FITC-Fluoreszenz wurde mittels FACS quantifiziert und zeigte für LPS eine Fluoreszenz von 938 und für S1 dagegen nur eine Fluoreszenz von 145 (Abb. 25 B). Die Präimmunseren von Cpn0676 – Cpn0678 zeigten eine relative Fluoreszenz die im Größenbereich der Negativkontrolle lag. Die antigengereinigten Antikörper gegen Cpn0677 und Cpn0678 lieferten mit 778 und 841 dagegen eine starke Fluoreszenz in der Größenordnung der LPS-Kontrolle. Im Gegensatz dazu war für Cpn0676 die Fluoreszenz mit 367 deutlich niedriger. Die erhaltenen FACS-Daten bestätigen die Ergebnisse aus dem „Dot-Blot“ und unterstützen die Vermutung, dass Cpn0677 und Cpn0678 auf der Oberfläche der EBs lokalisieren und daher für den Antikörper zugänglich sind. Für Cpn0676 sind die beobachteten Effekte aus den zwei Experimenten schwächer und deuten möglicherweise auf eine partielle Oberflächenlokalisierung hin.

4.4.3 Lokalisierungsanalysen von Cpn0678 – Cpn0676 in EBs durch Behandlung mit Detergenzien

Für die präzisere Charakterisierung der Lokalisation auf der EB-Oberfläche und der biochemischen Verankerung innerhalb der EB-Außenmembran, wurde die Löslichkeit der Proteine Cpn0678 – Cpn0676 in verschiedenen Detergenzien untersucht. Als Kontrollen wurden die Proteine MOMP, GroEL-1 und DnaK analysiert. Für das oberflächenexponierte und integrale Außenmembranprotein MOMP aus *C. trachomatis* wurde gezeigt, dass es nicht mit 2 % Triton X-100 oder 2 % Sarkosyl solubilisiert werden konnte (Caldwell, Kromhout et al. 1981). Für das *C. pneumoniae* MOMP wurde dasselbe Solubilisierungsverhalten beobachtet, zudem war ein Abwaschen des Proteins mit PBS nicht möglich, was zugleich die Intaktheit der EBs nach dieser Prozedur belegte

(Abb. 26) (Wuppermann, Molleken et al. 2008). Das oberflächenlokalisierte *C. pneumoniae* Chaperon GroEL-1 konnte dagegen durch mehrfaches Waschen gradientengereinigter EBs mit PBS zu etwa 50 % von der EB-Oberfläche gelöst und daher im Überstand detektiert werden (Wuppermann, Molleken et al. 2008). Dieses Ergebnis wurde hier bestätigt und zusätzlich konnte etwa die Hälfte des GroEL-1 Proteins in Triton X-100 und Sarkosyl solubilisiert werden (Abb. 26). Für das Hitzschockprotein DnaK aus *C. trachomatis* wurde eine Assoziation mit der Außenmembran von EBs sowie die Oberflächenzugänglichkeit nach Reduktion der Disulfidbrücken zwischen Außenmembranproteinen nachgewiesen (Raulston, Davis et al. 2002). Das orthologe *C. pneumoniae* DnaK weist 86 % Identität auf, jedoch wurde nicht die Löslichkeit dieses Proteins in Detergenzien untersucht. Ein geringer Teil des DnaK-Proteins wurde nach PBS-Behandlung im Überstand detektiert und konnte damit von EBs abgewaschen werden (Abb. 26). 20 – 25 % des Proteins konnte in Triton X-100 und etwa die Hälfte des Proteins in Sarkosyl solubilisiert werden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für Cpn0677 beobachtet. Ein geringer Teil von Cpn0677 wurde nach PBS-Behandlung im Überstand detektiert, weiterhin waren etwa 50 % in Triton und fast das gesamte Protein in Sarkosyl solubilisierbar. Die Proteine Cpn0678 und Cpn0676 dagegen ließen sich nicht mit PBS von EBs waschen, blieben nach Behandlung mit Triton X-100 komplett im Pellet und konnten mit Sarkosyl komplett solubilisiert im Überstand nachgewiesen werden (Abb. 26).

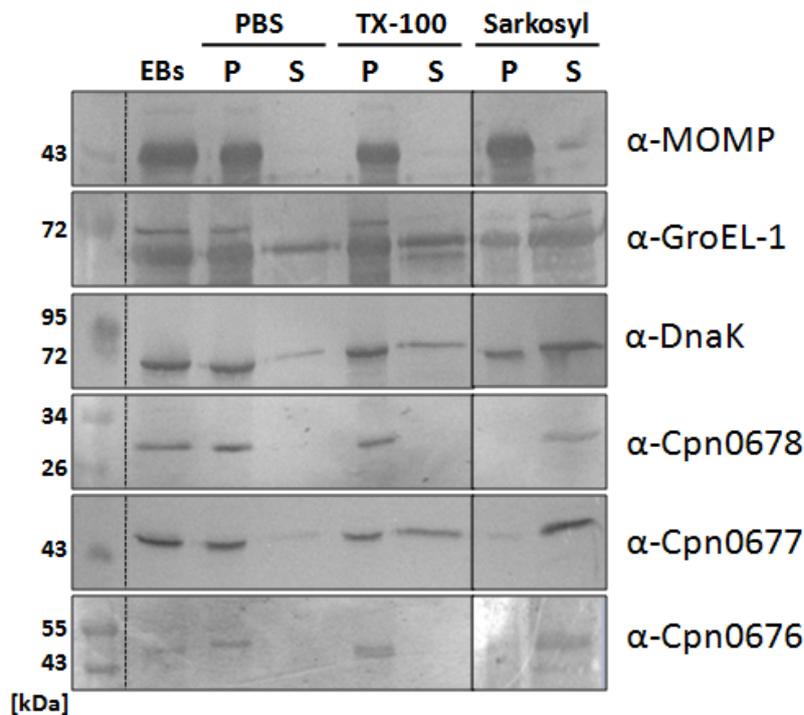


Abbildung 26: Behandlung von *C. pneumoniae* EBs mit Detergenzien

1×10^8 gradientengereinigte *C. pneumoniae* EBs (75 μ l) wurden für 1 h bei 37°C mit PBS, 1 % Triton X-100 (nicht-ionisches Detergens) oder 2 % Sarkosyl (anionisches Detergens) in PBS behandelt und die Proben nun durch Ultrazentrifugation für 1 h bei 100.000 g in die Fraktionen Pellet (P) und Überstand (S) getrennt. Gezeigt sind Westernblots die mit den in Abbildung 25 beschriebenen Antikörpern detektiert wurden. Im Falle von DnaK und Cpn0677 wurde die Bandenintensitäten mit der Software Scion Image bestimmt.

Zusammenfassend konnte Cpn0677, ähnlich wie die oberflächenlokalisierte Proteinen GroEL-1 und DnaK, in geringen Mengen von EBs gewaschen werden und war partiell in Triton X-100 solubilisierbar. In Kombination mit den vorherigen Ergebnissen unterstützt dies eine Oberflächenlokalisation für Cpn0677. Cpn0678 und Cpn0676 verbleiben dagegen nach Triton-Behandlung komplett im Pellet und sind daher vermutlich anders in der chlamydialen Membran verankert als Cpn0677. Eine Assoziation von Cpn0678 und Cpn0676 mit dem chlamydialen Außenmembrankomplex (cOMC) ist unwahrscheinlich, da die Proteine vollständig mit Sarkosyl solubilisiert werden konnten, während MOMP als Vertreter des cOMC dagegen unlöslich in Sarkosyl ist. Im Falle von Cpn0677 war ein geringer Teil des Proteins unlöslich in Sarkosyl und könnte auf eine Interaktion mit Komponenten des cOMC hindeuten.

4.5 Cpn0678 und Cpn0677 - Antikörper neutralisieren signifikant die *C. pneumoniae* Infektion

Sollte die EB-Oberflächenlokalisation der Proteine Cpn0676 – Cpn0678 wichtig für die Infektion sein, so müsste durch eine Vorbehandlung der EBs mit spezifischen Cpn0676 - Cpn0678 Antikörpern die Bindung der Chlamydien an die Humanzellen beeinträchtigt werden und in einer reduzierten Infektion resultieren. Dazu wurden gradientengereinigte EBs mit Präimmenserum oder finalen Serum derselben Verdünnung vorinkubiert und dann zur Infektion von HEp-2 Zellen eingesetzt. Die Vorinkubation mit Cpn0678-Präimmenserum zeigte mit einer relativen Infektion von 97 % keinen signifikanten Einfluß. Jedoch kam es bei Einsatz des Cpn0678-Serums zu einer stark reduzierten Infektion auf 53 % (Abb. 27). Auch das Cpn0677-Präimmenserum zeigte nur eine leichte Reduktion auf 93 %, während mit dem Cpn0677-Serum die Infektion deutlich auf 64 % reduziert war. Das Cpn0676-Präimmenserum zeigte mit einer relativen Infektion von 96 % keinen Einfluß, allerdings war auch mit dem Cpn0676-Serum die Infektion nur leicht auf 84 % reduziert. Wurden die Cpn0677 und Cpn0678-Seren in höherer Konzentration eingesetzt, so reduzierte sich die relative Infektion noch stärker auf Werte zwischen 30 – 40 %, allerdings zeigten auch die Präimmenserum zunehmend reduzierende Effekte auf die Infektion (Abb. 27 B + C). Bei allen verwendeten Seren war die Morphologie und Größe der gebildeten Inklusionen unverändert, sodass die intrazelluläre Entwicklung der Chlamydien nicht beeinträchtigt war.

Durch die Antikörperbehandlung stehen die Proteine Cpn0677 und Cpn0678 nicht mehr an der EB-Oberfläche zur Verfügung und dadurch sind die EBs daran gehindert an die Humanzellen zu binden. Durch die reduzierte Adhäsion kommt es zur beobachteten Inhibierung der Infektion. Aufgrund der vorher gezeigten partiellen Oberflächenlokalisation von Cpn0676, ist das Protein bei der Antikörperbehandlung vermutlich nur schlecht zugänglich und dies resultierte in einer nur geringen Infektionsreduktion. Daher kann für Cpn0677 und Cpn0678 eine wichtige Rolle im Adhäsionsprozess postuliert werden, während dies für Cpn0676 fraglich ist.

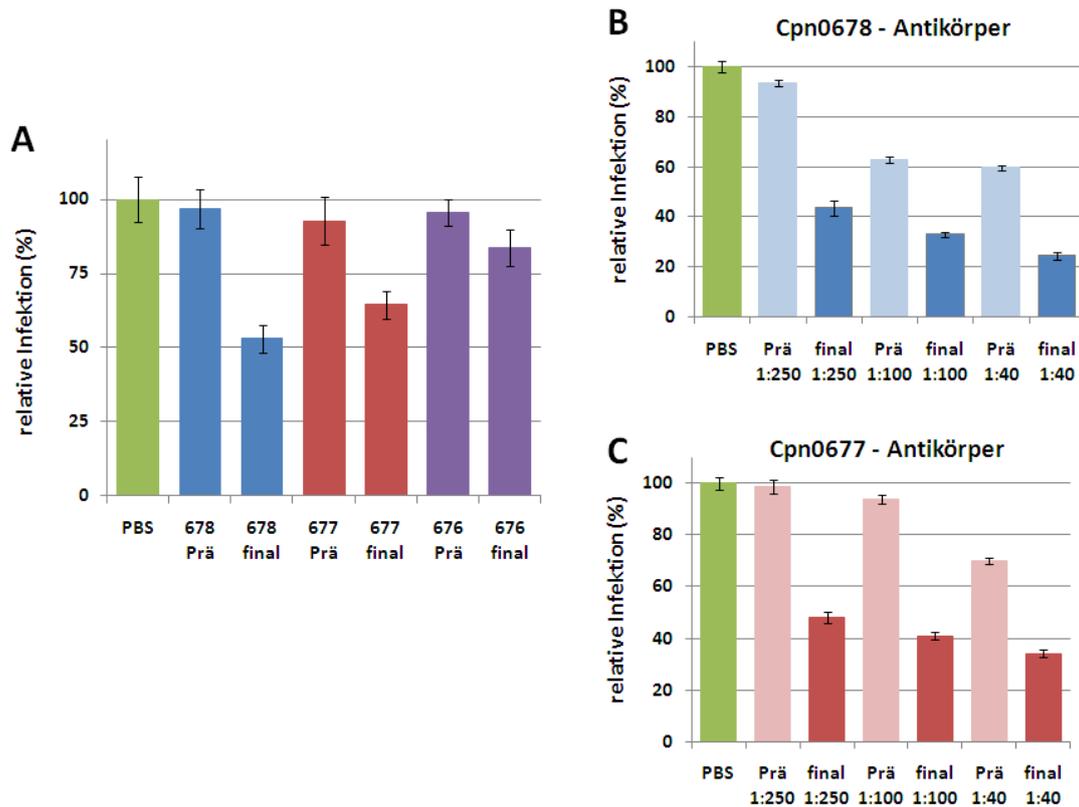


Abbildung 27: Neutralisation der Infektion durch Cpn0676 – Cpn0678 Antikörper

A) Gradientengereinigte *C. pneumoniae* EBs wurden mit PBS, Präimmunsereen oder finalen Seren (1:250 = 10 µg/ml IgG) für 1 h bei 4°C vorbehandelt, bevor sie mit einer MOI 10 zur Infektion von HEp-2 Zellen eingesetzt wurden. Nach 60 h wurden infizierte Zellen mit Methanol fixiert und die Detektion der gebildeten Einschlüsse erfolgte durch einen FITC-konjugierten Antikörper gegen das chlamydiale LPS (Pathfinder, 1:4 verdünnt). Die Zahl der Einschlüsse wurde jeweils in 20 Gesichtsfeldern mikroskopisch bestimmt (n = 3).

B) Gradientengereinigte *C. pneumoniae* EBs wurden mit Präimmunsereen oder finalen Seren gegen Cpn0677 und Cpn0678 in den angegebenen Verdünnungen für 1 h bei 4°C bei 4°C vorinkubiert. Die Zahl chlamydialer Einschlüsse nach 60 hpi wurden jeweils in 20 Gesichtsfeldern mikroskopisch bestimmt (n = 1).

4.5.1 Lokalisation von Cpn0676 - Cpn0678 in späten Inklusionen

Aufgrund der gezeigten EB-Oberflächenlokalisation und der Detektion von Cpn0676 – Cpn0678 in infizierten Zellen nicht vor 60 hpi, wurde die exakte Lokalisation der Proteine in der späten Infektion (72 – 90 hpi) untersucht. Zu diesen späten Infektionszeitpunkten zeigten einige Inklusionen eine aufgelockerte Struktur, sodass einzelne EBs sichtbar waren und eine präzisere Immunfluoreszenz-Analyse erlaubte. Parallel wurde eine Färbung mit einem *C. pneumoniae* spezifischen MOMP-Antikörper durchgeführt, der ein oberflächenlokalisiertes Epitop erkennt und eine charakteristische punktierte oder durchgehend kreisförmige Färbung der EBs zeigte (Abb. 28 A, E, I). Für Cpn0676 war eine kreisförmige Färbung zu beobachten (Abb. 28 B, grün), welche die DAPI gefärbten EBs umrundete (Abb. 28 D, rot). Allerdings zeigte sich im Überlagerungsbild mit MOMP nur teilweise eine Kolo-kalisation mit dem MOMP-Signal (Abb. 28 C, rot). Stattdessen umrundet das MOMP-Signal häufig die kreisförmige Färbung von Cpn0676 (Abb. 28 C, grün).

Für Cpn0678 war die Antikörperfärbung intensiv und erlaubte eine Analyse mittels Konfokalmikroskopie. Dabei lokalisierte Cpn0678 nach 90 hpi in kreisförmigen Strukturen, die DAPI

gefärbte Chlamydien umrunden (siehe Abb. 53, Anhang). Auch in der Fluoreszenzmikroskopie wurde für Cpn0677 und Cpn0678 jeweils eine kreisförmige Färbung beobachtet, die DAPI gefärbte EBs umrundete (Abb. 28 H + L). Im Überlagerungsbild mit MOMP zeigten Cpn0677 und Cpn0678 nur eine partielle Kolo­kalisierung (Abb. 28 G + K). Jedoch war der Eindruck, dass die Kombination aus dem MOMP und Cpn0677 bzw. Cpn0678-Signal eine komplette kreisförmige Färbung beschreibt. Da in der Kofärbung beide Antikörper parallel eingesetzt wurden, könnte eine Konkurrenz der Antikörper das Färbemuster erklären. Zusammenfassend zeigen Cpn0677 und Cpn0678 eine vergleichbare Oberflächenlokalisation, während für Cpn0676 eine Lokalisation im Periplasma oder der inneren Membran der EBs denkbar wäre.

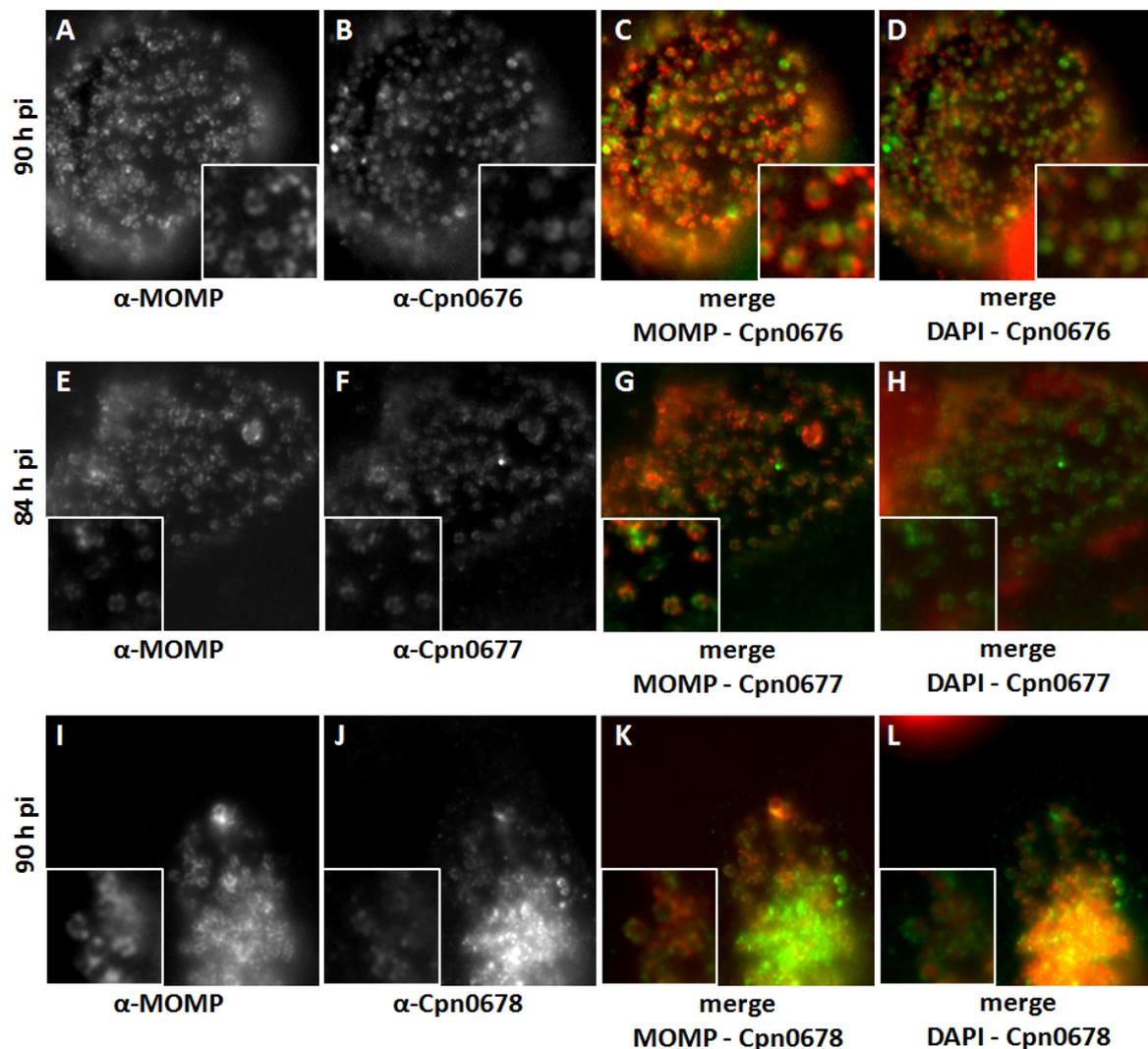


Abbildung 28: Lokalisation von Cpn0676 - Cpn0678 spät in der Infektion

Immunfluoreszenzaufnahmen von HEp-2 Zellen die mit einer MOI 1 an *C. pneumoniae* EBs infiziert wurden. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit para-Formaldehyd fixiert und für 5 min mit 0.2 % Triton X-100 permeabilisiert. Es wurde jeweils 2 µg/ml antigengereinigter Cpn-Antikörper in Kombination mit anti-Kaninchen FITC Antikörper (Dako, 1:40) eingesetzt und eine Kofärbung mit einem *C. pneumoniae* spezifischen MOMP-Antikörper (1:5) in Kombination mit einem anti-Kaninchen Cy3 Antikörper (Sigma, 1:200) durchgeführt. Bilder wurden mit dem Zeiss Axioskop 50 generiert.

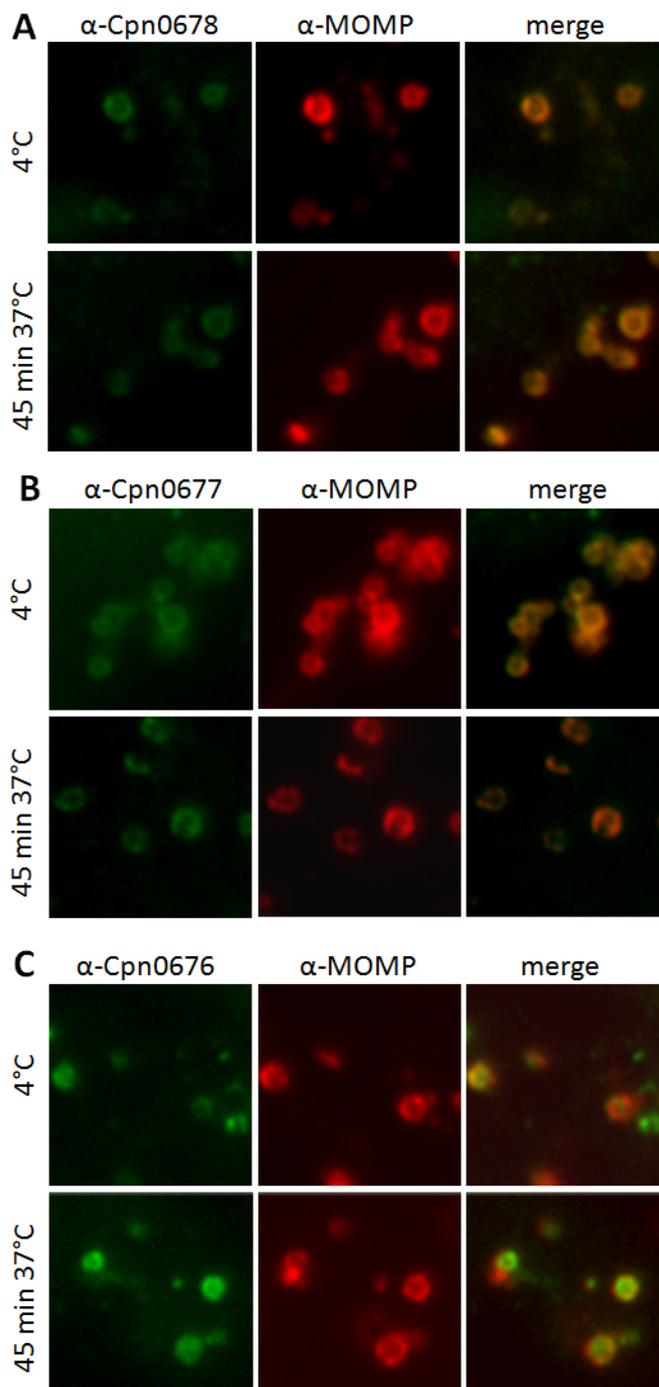
A-D) Infizierte HEp-2 Zellen (90 hpi) parallel gefärbt mit MOMP-Antikörper (rot) und Cpn0676-Antikörper (grün).

E-H) Infizierte HEp-2 Zellen (84 hpi) parallel gefärbt mit MOMP-Antikörper (rot) und Cpn0677-Antikörper (grün).

I-L) Infizierte HEp-2 Zellen (90 hpi) parallel gefärbt mit MOMP-Antikörper (rot) und Cpn0678-Antikörper (grün).

4.6 Cpn0677 und Cpn0678 kolokalisieren mit MOMP früh in der Infektion

Die bisherigen biochemischen, mikroskopischen und FACS-Daten zeigten eine eindeutige Oberflächenlokalisierung von Cpn0677 und Cpn0678 auf EBs, für Cpn0676 dagegen nicht. Im Folgenden wurde untersucht, ob sich die Lokalisation von Cpn0676 - Cpn0678 während der Adhäsion und Internalisierung von EBs verändert und das Protein womöglich sekretiert wird.



Dazu wurden HEp-2 Zellen bei 4°C infiziert, Bedingungen unter denen nur Adhäsion stattfindet. Ein Teil der Proben wurde danach für 45 min bei 37°C inkubiert, um die Lokalisation der Proteine nach Internalisierung der EBs zu untersuchen. Parallel wurde mit einem MOMP-Antikörper gefärbt, der ein oberflächenlokalisiertes Epitop erkennt.

Cpn0678 und Cpn0677 zeigten bei 4°C und 37°C jeweils eine kreisförmige Färbung die komplett mit MOMP kolokalisierte (Abb. 29 A + B). Dies zeigte, dass beide Proteine während der Adhäsion und Internalisierung auf der EB-Oberfläche verbleiben und nicht sekretiert werden.

Für Cpn0676 zeigte sich bei 4°C und 37°C eine EB-assoziierte kreisförmige Färbung, die partiell mit MOMP kolokalisierte, sodass auch Cpn0676 während der Internalisierung mit den EBs assoziiert bleibt (Abb. 29 C).

Abbildung 29: Lokalisation von Cpn0676 – Cpn0678 während der Adhäsion und Internalisierung von EBs

A + C) HEp-2 Zellen wurden mit einer MOI 5 an *C. pneumoniae* EBs für 20 min bei 4°C infiziert (Adhäsion). Anschließend erfolgte eine Inkubation für 45 min bei 37°C (Internalisierung). Zellen wurden mit para-Formaldehyd fixiert und für 5 min mit 0.2 % Triton X-100 permeabilisiert. Kofärbungen mit jeweils α-Cpn0678, α-Cpn0677 oder α-Cpn0676 Antikörpern (grün) und einem *C. pneumoniae* spezifischen α-MOMP Antikörper (rot) wurden durchgeführt. Bilder wurden mit dem Zeiss Axioskop 50 generiert.

Dabei konnte für Cpn0676 erneut keine eindeutige Kollokalisierung mit MOMP beobachtet werden, wie auch schon nach 90 hpi gezeigt wurde, sodass Cpn0676 vermutlich nur partiell auf der Oberfläche von EBs lokalisiert. Für alle drei Proteine wurden die nach 45 min bei 37°C erhaltenen Lokalisationen auch nach 5, 15 und 90 min bei 37°C beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Immunfluoreszenz ist daher konsistent mit den Dot-Blot sowie FACS-Ergebnissen (Abb. 25) und zeigt die eindeutige Oberflächenlokalisation von Cpn0678 und Cpn0677 auf EBs während der Adhäsion und Internalisierung. Im Gegensatz dazu ist Cpn0676 vermutlich nicht oder nur partiell auf der Oberfläche von EBs lokalisiert, was die schwache neutralisierende Wirkung des Cpn0676-Antikörpers erklären könnte.

4.7 Nur rCpn0677_{6His} zeigt einen Effekt auf die *C. trachomatis* L2 Infektion

Im Folgenden wurde untersucht, ob die durch rCpn0678_{6His} - rCpn0676_{6His} induzierten Änderungen der Infektion Spezies-spezifische Effekte sind. Dazu wurden gradientengereinigte EBs von *C. trachomatis* L2 sowie auch *C. pneumoniae* GiD parallel mit jeweils 2 nM Protein für 2 h mit HEp-2 Zellen inkubiert und die Zahl gebildeter Inklusionen nach 28 h bzw. 60 h quantifiziert.

Dabei zeigte die *C. trachomatis* L2 Infektion bei Zugabe von rCpn0678_{6His} und rCpn0676_{6His} keine Änderung verglichen zur PBS-Kontrolle (Abb. 30 A). Dagegen wurde durch rCpn0677_{6His} die relative Infektion mit *C. trachomatis* L2 auf 178 % erhöht. Für *C. pneumoniae* GiD dagegen war die relative Infektion durch rCpn0678_{6His} auf 233 % sowie mit rCpn0677_{6His} auf 268 % stark erhöht, während sich mit rCpn0676_{6His} eine leichte Reduktion auf 72 % zeigte (Abb. 30 B).

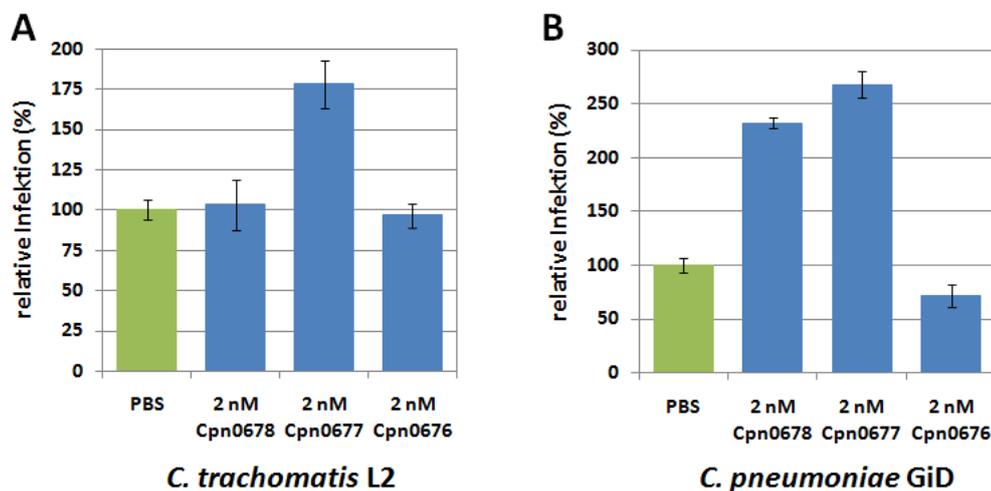


Abbildung 30: Effekt von rCpn0676 – rCpn0678 auf die Infektion mit *C. trachomatis* L2 im Vergleich zu *C. pneumoniae* GiD

HEp-2 Zellen wurden für 2 h parallel mit gradientengereinigten EBs (MOI = 10) und PBS oder jeweils 2 nM rCpn0676_{6His} - rCpn0678_{6His} inkubiert, die Zellen gewaschen und ein Medienwechsel durchgeführt. Infizierte Zellen wurden mit Methanol fixiert und die Zahl gebildeter Einschüsse jeweils in 20 Gesichtsfeldern mikroskopisch bestimmt (n = 3).

A) Protein-Neutralisationsassays mit *C. trachomatis* L2. Da der Entwicklungszyklus von *C. trachomatis* L2 viel schneller abläuft, wurden infizierte Zellen bereits nach 28 h mit Methanol fixiert und die Detektion der gebildeten Einschüsse erfolgte mit dem α -DnaK (1:50) und α -Maus Cy3 Antikörper (1:200).

B) Protein-Neutralisationsassay mit *C. pneumoniae* GiD. Nach 60 h wurden infizierte Zellen mit Methanol fixiert und die Detektion der gebildeten Einschüsse erfolgte durch einen FITC-konjugierten Antikörper gegen das chlamydiale LPS (Pathfinder, 1:4).

Bioinformatische Analysen mit Sequenzen der Vollängenproteine ergaben, dass für Cpn0677 und Cpn0678 keine homologen Proteine in *C. trachomatis* L2 existieren (Abb. 13). Somit ist rCpn0677_{6His} in der Lage, unabhängig von der chlamydialen Spezies eine erhöhte Infektion zu induzieren. Denkbar wäre daher eine Stimulation oder Modulation der Humanzellen durch rCpn0677_{6His}, die zu einer generellen erhöhten Adhäsion oder Internalisierung infektiöser Chlamydien führen könnte. Dagegen verursachen Cpn0676 und Cpn0678 nur eine *C. pneumoniae* spezifische Veränderung der Infektion. Da lösliches rCpn0676_{6His} sowie auch rCpn0676_{6His}-beschichtete Latexbeads keine Adhäsion an Humanzellen zeigten, lässt sich die reduzierte *C. pneumoniae* Infektion durch eine Interaktion von rCpn0676_{6His} mit EBs erklären.

4.7.1 rCpn0678_{6His} interagiert mit rCpn0676_{6His} *in vitro*

Aufgrund des ähnlichen Solubilisierungsverhalten von Cpn0678 und Cpn0676 in Detergenzien könnte eine Interaktion der Proteine möglich sein. Um diese Vermutung zu bekräftigen, wurde die Fähigkeit von rCpn0678_{6His} mit rCpn0676_{6His} untersucht, *in vitro* miteinander zu interagieren und dazu wurden zwei verschiedene experimentelle Ansätze gewählt. Zuerst wurde untersucht ob lösliches rCpn0678_{6His} in der Lage ist, eine Adhäsion von rCpn0676_{6His}-beschichteten Beads an HEp-2 Zellen zu induzieren. Dazu wurden Latexkügelchen beschichtet mit BSA, rCpn0676_{6His} oder rCpn0678_{6His} zu HEp-2 Zellen gegeben, die mit löslichem rCpn0678_{6His} vorinkubiert waren und die Zahl gebundener Beads pro Zelle mittels FACS quantifiziert. Parallel wurde dies auch für lösliches rCpn0677_{6His} untersucht.

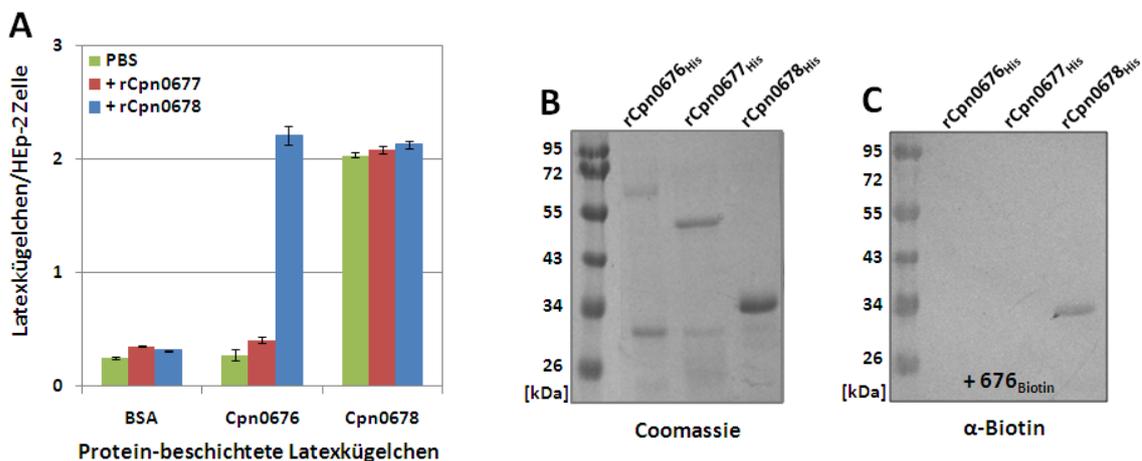


Abbildung 31: Interaktion von rCpn0678_{6His} und rCpn0676_{6His}

A) Quantitative Auswertung der Adhäsionsexperimente. 5×10^5 HEp-2 Zellen wurden für 30 min bei 37°C mit 50 µg/ml rCpn0678_{6His} bzw. 100 µg/ml rCpn0677_{6His} vorinkubiert, gefolgt von der Zugabe eines 2 fachen Überschusses an Latexkügelchen die jeweils mit 200 µg/ml Protein beschichtet waren. Nach der FACS-Messung von jeweils 10.000 HEp-2 Zellen und Quantifizierung der mittleren FITC-Fluoreszenz, wurde diese durch die mittlere Fluoreszenz von einem Latexkügelchen dividiert (n = 2).

B) Coomassie gefärbtes SDS-Gel zur Inputkontrolle der für den Far-Western Blot verwendeten Proteine.

C) Gezeigt ist ein Far-Western Blot. Geblottete His₆-Fusionsproteine wurden auf der Membran renaturiert, durch Waschen mit Puffern die Guanidin in absteigenden Konzentrationen von 6 M, 3 M, 1 M, 0.1 M und 0 M beinhaltenen. Der Blot wurden mit 4 µg/ml an biotinyliertem rCpn0676_{6His} inkubiert und die Interaktion mit der Membran mittels α-Biotin Blot detektiert. Dabei zeigte sich eine Interaktion von 676_{Biotin} mit nativem rCpn0678_{6His} auf der Membran.

Als Kontrolle dienten BSA-Beads, die eine geringe Adhäsion von 0,25 Beads/HEp-2 Zelle zeigten und deren Adhäsion durch die Anwesenheit von rCpn0677_{6His} und rCpn0678_{6His} nicht beeinflusst wurde (Abb. 31 A). Mit rCpn0676_{6His}-beschichtete Beads zeigten mit 0,28 Beads/HEp-2 Zelle kaum Adhäsion und dies wurde durch lösliches rCpn0677_{6His} kaum verändert. Interessanterweise war ein starker Anstieg der Adhäsion von rCpn0676_{6His}-Beads um den Faktor 7 auf 2,21 Beads/HEp-2 Zelle zu beobachten, wenn lösliches rCpn0678_{6His} anwesend war. Die rCpn0678_{6His}-beschichteten Beads zeigten alleine bereits eine starke Adhäsion von 2,05 Beads/HEp-2 Zelle. Da ein zweifacher Überschuss an Beads pro HEp-2 Zellen eingesetzt wurde, stellt dies bereits die maximal mögliche Adhäsion dar. Daher konnte auch durch lösliches rCpn0677_{6His} oder rCpn0678_{6His} die Adhäsion nicht weiter gesteigert werden.

In einem zweiten Ansatz wurde die Interaktion von Cpn0676 mit Cpn0678 – Cpn0676 anhand eines Far-Western Blots untersucht. Dabei wurde untersucht, ob biotinyliertes rCpn0676_{6His} in der Lage ist, mit nativem rCpn0676_{6His}, rCpn0677_{6His} oder rCpn0678_{6His} auf der Membran zu interagieren. Ein Coomassie-Gel diente als Inputkontrolle und zeigte neben den drei Volllängensproteinen für rCpn0676_{6His} und rCpn0677_{6His} noch eine zusätzlich Bande bei ca. 30 kDa (Abb. 31 B). Nach Inkubation von rCpn0676_{Biotin} mit den nativen Proteinen auf der Membran war eine Interaktion mit rCpn0678_{6His} nachweisbar (Abb. 31 C). Dies zeigte, dass rCpn0676 und rCpn0678 in der Lage sind miteinander zu interagieren und wird durch die vorherigen Daten unterstützt. Vermutlich interagieren Cpn0676_{6His}-Beads mit dem an Humanzellen gebundenem rCpn0678_{6His}. Denkbar wäre aber auch, dass lösliches rCpn0678_{6His} mit rCpn0676_{6His}-Beads interagiert sowie zusätzlich noch mit dem an Humanzellen gebundenem rCpn0678_{6His} interagiert und es so zu einer erhöhten Bindung von rCpn0676_{6His}-Beads kommt. Die Voraussetzung dafür ist, dass rCpn0678_{6His} mit sich selbst interagieren kann. Dies kann unterstützt werden durch die Beobachtung aus einer Far-Western Blot Analyse, in der rCpn0678_{Biotin} eine Interaktion mit rCpn0678_{6His} auf der Membran zeigte (Daten nicht gezeigt).

4.8 Domänenanalyse von Cpn0678

In Folgenden wurde anhand einer Domänenanalyse eine detaillierte Untersuchung der adhäsiven und infektionsstimulierenden Eigenschaften von Cpn0678 vorgenommen. Eine bioinformatische Untersuchung von Cpn0678 führte zur Identifikation von 3 aufeinanderfolgenden Prolin-reichen Wiederholungen (PRR) mit einer Länge von jeweils 22 Aminosäuren (Abb. 32). Auch das EspF Protein des *enteropathogenen Escherichia coli* (EPEC) besitzt 3 Prolin-reiche Wiederholungen mit einer Länge von jeweils 47 Aminosäuren für PRR1 und PRR2. Bei EspF handelt es sich um ein Typ-III-sekretiertes Effektorprotein, dass in der infizierten Humanzelle über die PRRs mit dem eukaryotischen Protein Sorting Nexin 9 (SNX9) interagiert und dadurch eine Remodulierung der Membran verursacht (Alto, Weflen et al. 2007). Es wurden die Domänen rCpn0678N_{6His} (enthält keine PRRs) und rCpn0678C_{6His} (enthält 3 PRRs) generiert, um den Einfluss der Prolin-reichen Wiederholungen auf die Adhäsion und Infektion zu untersuchen (Abb. 32).

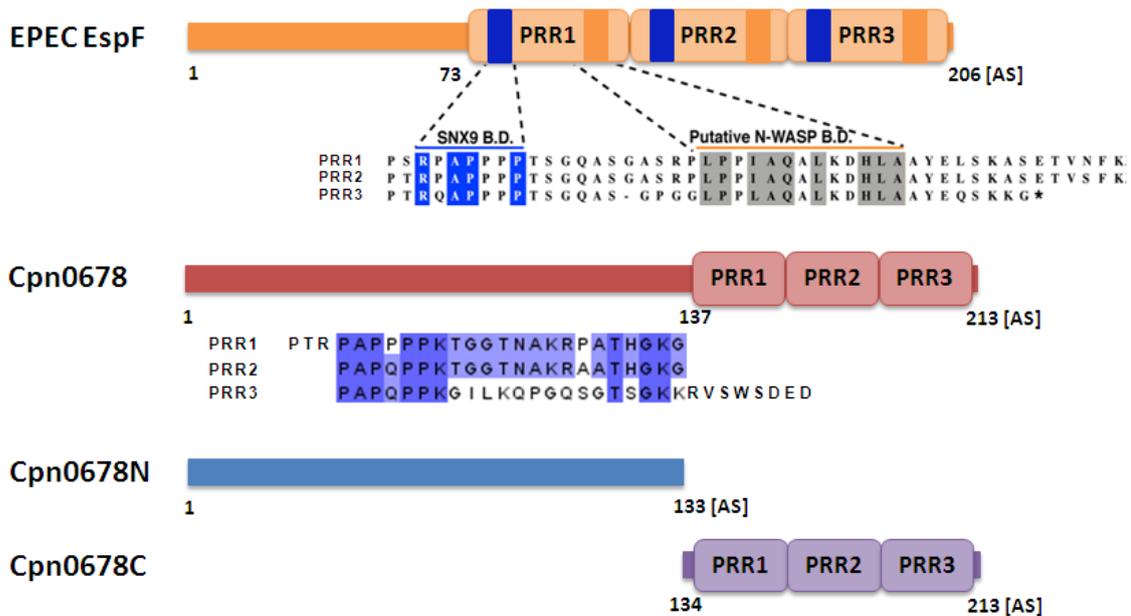


Abbildung 32: Vergleich der PRRs von Cpn0678 mit EspF und Generierung von Cpn0678N und Cpn0678C

Schematische Darstellung des EPEC-Effektorproteins EspF mit 3 Prolin-reichen Wiederholungen (PRR1 – PRR3), wobei PRR1 und PRR2 aus maximal 47 Aminosäuren bestehen. Durch den Screen einer Maus cDNA-Bibliothek mittels Hefe 2-Hybrid System wurde eine SNX9-Bindestelle (blau) und putative N-WASP Bindestelle (grau) identifiziert (Abbildung modifiziert aus Alto et al., 2007).

Auch Cpn0678 verfügt über 3 Prolin-reiche Wiederholungen (PRR1 – PRR3), die jeweils aus 22 Aminosäuren bestehen. Gezeigt sind die generierte Cpn678N-Domäne (ohne PRR) und die Cpn0678C-Domäne (mit 3 PRRs). AS = Aminosäure

4.8.1 Der N-Terminus von Cpn0678 zeigt Adhäsion und erhöht die Infektion

Cpn0678, Cpn0678N und Cpn0678C wurden als His₆-markiertes Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und mittels Ni-NTA Agarose affinitätschromatographisch aufgereinigt. Die Reinheit der Proteine wurden in einem Coomassie-gefärbten SDS-Gel überprüft und alle Proteine zeigten ein gleichmäßig höheres apparentes Laufverhalten als theoretisch erwartet (Abb. 33 A). Für rCpn0678_{6His} (theoretisch: 23,8 kDa) waren eine Hauptbande bei ca. 32 kDa und schwache Zusatzbanden sichtbar, während rCpn0678N_{6His} (theoretisch: 15,8 kDa) und rCpn0678C_{6His} (theoretisch: 10,2 kDa) eine Bande zeigten. Grün-fluoreszierende Latexkugeln wurden mit jeweils 8 nM Protein beschichtet (entspricht 200 µg/ml für rCpn0678_{6His}) und die Anzahl an HEp-2 Zellen gebundener Latexkugeln im FACS quantifiziert. Mit rCpn0678_{6His}-beschichtete Beads zeigten mit 11,1 Beads/HEp-2 Zelle eine starke Adhäsion und rCpn0678N_{6His}-beschichtete Beads mit 2,3 Beads/HEp-2 Zelle eine schwächere, aber signifikante Adhäsion (Abb. 33 B). Dagegen zeigten rCpn0678C_{6His}-beschichtete Beads mit 0,25 Beads/HEp-2 Zelle keine Adhäsion, ebenso wie die Negativkontrolle BSA-beschichtete Beads mit 0,25 Beads/HEp-2 Zelle. Somit ist rCpn0678N_{6His} noch in der Lage an Zellen zu binden, wenngleich um den Faktor 5 schwächer als das Vollängenprotein, dagegen verfügt rCpn0678C_{6His} nicht mehr über adhäsive Fähigkeiten.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die beiden Cpn0678-Domänen einen Einfluss auf die chlamydiale Infektion haben. Dazu wurden gradientengereinigten *C. pneumoniae* EBs parallel mit den rekombinanten Proteinen inkubiert und nach 60 h die relative Infektion quantifiziert.

Bei Proteinkonzentrationen größer 50 µg/ml für rCpn0678_{6His} wurde eine stark erhöhte Infektion beobachtet, die zu einem Ablösen der HEp-2 Zellen führte (Daten nicht gezeigt). Daher wurde hier maximal 2 nM rCpn0678_{6His} (50 µg/ml) eingesetzt und dies führte zu einer Infektionserhöhung auf 220 %, verglichen zu PBS-behandelten HEp-2 Zellen (Abb. 33 C). Für rCpn0678N_{6His} wurde eine konzentrationsabhängige Zunahme der Infektion beobachtet, die aber erst bei einer 3.5 fach höheren Proteinkonzentration (7 nM) eine Infektionserhöhung auf 220 % zeigte.

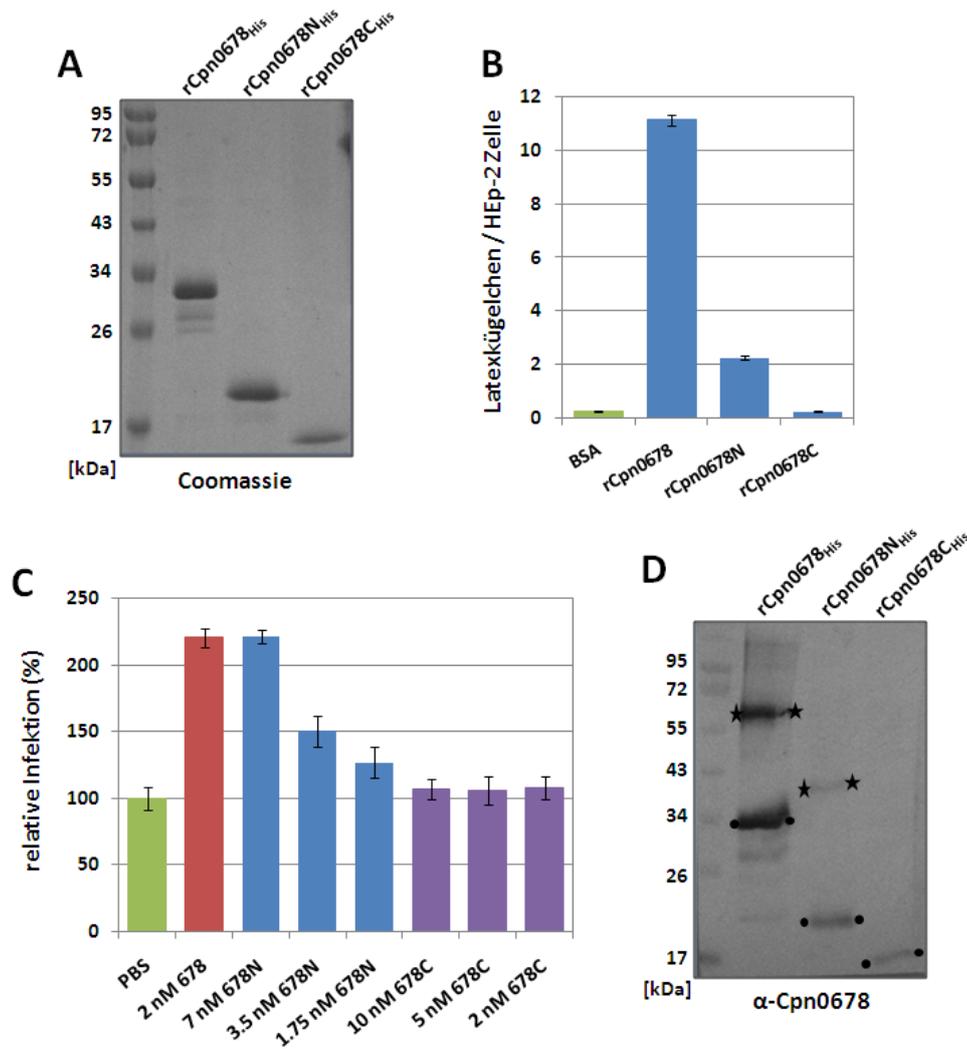


Abbildung 33: Die Cpn0678N-Domäne zeigt Adhäsion an Zellen und erhöht die Infektion

A) Coomassie gefärbtes SDS-Gel zur Inputkontrolle der verwendeten Proteine.

B) Quantitative Auswertung der Adhäsionsexperimente, durchgeführt mit 5×10^5 HEp-2 Zellen und einem 10 fachen Überschuss an Latexkugeln, die jeweils mit 8 nM Protein beschichtet waren. Mittels FACS wurde von jeweils 10.000 HEp-2 Zellen die mittlere FITC-Fluoreszenz bestimmt, dividiert durch die mittlere Fluoreszenz eines Latexkugelhens und so die Anzahl Latexkugeln/HEp-2 Zelle bestimmt ($n = 3$).

C) Quantifizierung des Protein-Neutralisationsassays. HEp-2 Zellen wurden für 2 h parallel mit gradientengereinigten *C. pneumoniae* EBs (MOI = 10) und den angegebenen Proteinmengen rCpn0678_{6His}, rCpn0678N_{6His} oder rCpn0678C_{6His} inkubiert. Nach 60 h wurden infizierte Zellen mit Methanol fixiert und die Detektion der gebildeten Einschlüsse erfolgte durch einen FITC-konjugierten Antikörper gegen das chlamydiale LPS (Pathfinder, 1:4 verdünnt). Die Zahl der Einschlüsse wurde jeweils in 20 Gesichtsfeldern mikroskopisch bestimmt ($n = 3$).

D) Verschiedene native rCpn0678_{6His} Varianten wurden nicht mit DTT aufgekocht und anschließend unter nicht-reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde ein Blot mit antigengereinigtem α-Cpn0678 Antikörper analysiert. Monomere Proteinbanden sind mit Punkten und dimere Proteinbanden mit Sternen markiert.

Für rCpn0678_{C_{6His}} wurde bis 10 nM Protein keine signifikante Erhöhung der Infektion beobachtet. Somit scheint der N-Terminus von Cpn0678 eine Rolle in der Adhäsion zu spielen, jedoch sind die Effekte deutlich schwächer als für das Volllängenprotein. Der Prolin-reiche C-Terminus dagegen zeigt weder Adhäsion noch einen Einfluss auf die *C. pneumoniae* Infektion.

Zur Untersuchung, ob die nativen rCpn0678_{6His} Proteinvarianten in der Lage sind Dimere auszubilden, wurde eine nicht-reduzierende SDS-PAGE durchgeführt. Der Blot mit einem Cpn0678-Antikörper zeigte für rCpn0678_{6His} und rCpn0678N_{6His} jeweils eine zusätzlichen Bande bei ungefähr der doppelten Größe verglichen zu den monomeren Proteinen (Abb. 33 D). Somit könnte eine Dimersierung von rCpn0678_{6His} und rCpn0678N_{6His} begünstigend für die Infektionserhöhung sein, während rCpn0678_{C_{6His}} weder mit Humanzellen noch mit selbst interagiert.

4.9 Lokalisation von Cpn0677 und Cpn0678 in Hefe und Humanzellen

Die bisherigen Lokalisationsdaten der Proteine Cpn0677 und Cpn0678, während der Adhäsion und Internalisierung von EBs und auch spät in der Infektion, deuten auf eine Oberflächenlokalisierung und nicht auf eine Sekretion der Proteine hin. *C. trachomatis* assoziiert nach der Bindung an HeLa-Zellen mit Lipidmikrodomänen der Wirtszellmembran (Jutras, 2003). Die Lipidomänen enthalten Sphingolipide und Cholesterol sowie G Protein-gekoppelte Rezeptoren und Tyrosinkinasen für die intrazelluläre Signalweiterleitung. Durch die EB-Oberflächenlokalisierung von Cpn0677 und Cpn0678 während der Internalisierung, wäre somit eine Interaktion mit Komponenten der Wirtszellmembran denkbar, die nicht nur ausschließlich auf der Wirtszelloberfläche lokalisiert sein müssen. Experimente mit der Hefe *S. cerevisiae* haben intensiv zum Verständnis grundlegender zellulärer und molekularer Prozesse in eukaryotischen Zellen beigetragen.

Um etwas über mögliche humane Interaktionspartner von Cpn0677 und Cpn0678 in der Infektion zu lernen, wurden zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation, Cpn0677 und verschiedene Cpn0678-Domänen in N-terminaler Fusion mit GFP in *S. cerevisiae* exprimiert (Abb. 34 A). Dabei war in GFP-exprimierenden Kontrollzellen das GFP komplett in der ganzen Zelle verteilt. Dagegen zeigte GFP-Cpn0678 eine charakteristische Lokalisation prädominant an der Plasmamembran. Auch GFP-Cpn0678N lokalisierte an der Plasmamembran, jedoch war zusätzlich noch eine intensive Färbung in der Nähe des Kerns zu beobachten. Dagegen zeigte GFP-Cpn0678C wie das GFP der Kontrollzellen eine Verteilung in der gesamten Zelle. Für GFP-Cpn0677 wurde ebenfalls eine partielle Lokalisation an der Plasmamembran und zusätzlich eine Färbung im Zytoplasma beobachtet. Somit zeigten Cpn0678 und Cpn0677 eine Lokalisation an der Plasmamembran, wo sie höchstwahrscheinlich mit bislang unbekanntem Interaktionspartnern wechselwirken.

Im Folgenden wurde untersucht, ob durch Expression der chlamydialen Proteine in Humanzellen die in *S. cerevisiae* beobachteten Lokalisationen bestätigt werden können. Daher wurde eine Transfektion von GFP-Fusionsproteinen in humanen HEK293T-Zellen durchgeführt. In GFP-exprimierenden Kontrollzellen war das GFP komplett in der Zelle verteilt (Abb. 34 B). Die Expression von GFP-Cpn0678 zeigte eine ausschließliche Lokalisation an der Plasmamembran,

während GFP-Cpn0678N auch überwiegend an der Plasmamembran lokalisierte, sowie zusätzlich noch eine schwache und leicht strukturierte zytoplasmatische Färbung festzustellen war. GFP-CPn0678C zeigte eine überwiegende Lokalisation im Kern und war zudem auch schwach im Zytoplasma zu sehen.

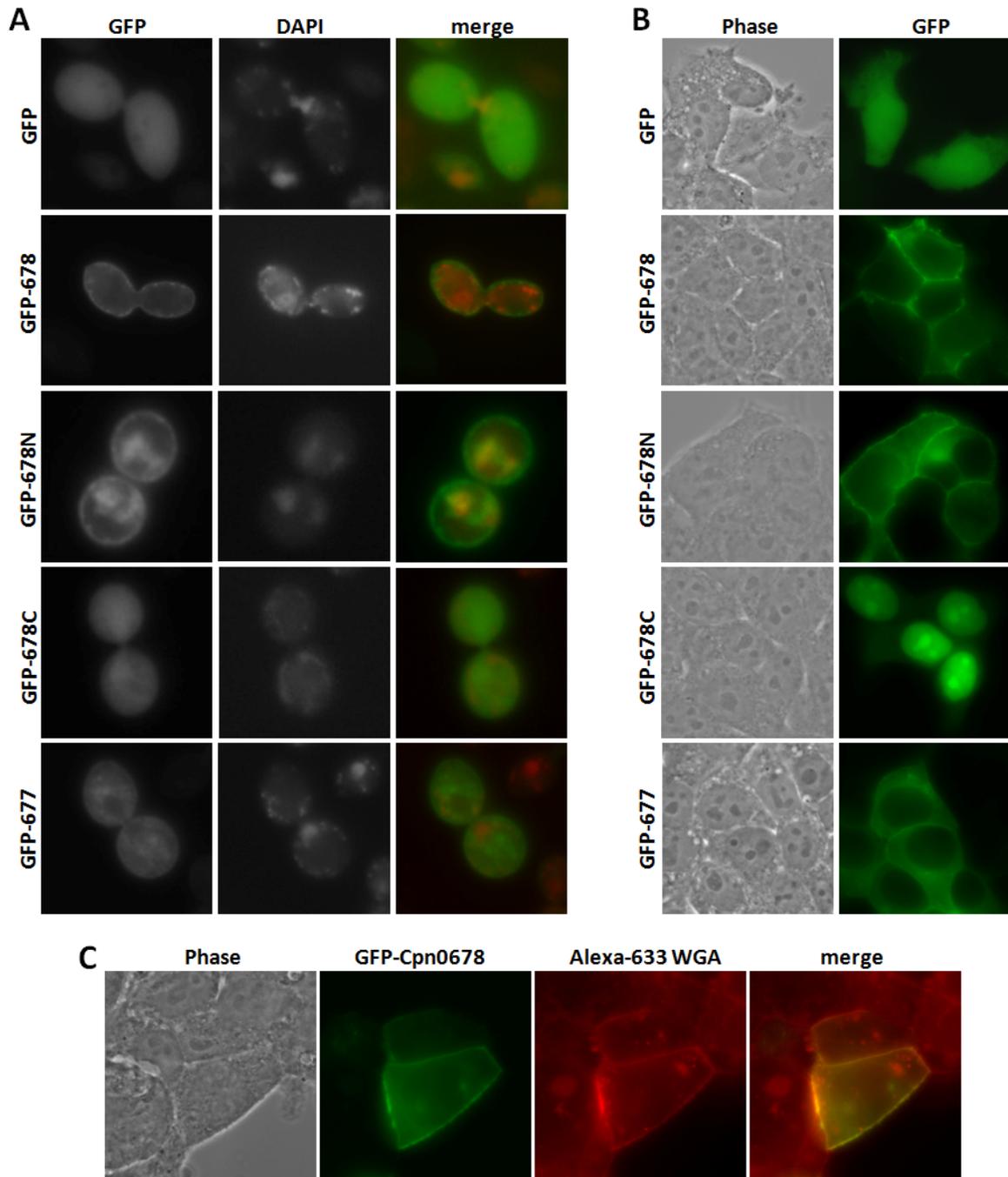


Abbildung 34: Lokalisationsstudien von Cpn0677 und Cpn0678 in Hefe und Humanzellen

A) Expression von GFP-Cpn Fusionsproteinen von einem CEN-Plasmid unter Kontrolle des *MET25*-Promotors in *S. cerevisiae*. Hefezellen wurden für 16 h in Selektivmedium angezogen, mit 3 % para-Formaldehyd fixiert und mit DAPI gefärbt, wobei neben dem Kern auch Mitochondrien angefärbt werden.

B) Expression von GFP-Cpn Fusionsproteinen in humanen HEK293T-Zellen. Plasmid-DNA wurde mittels CaCl_2 -Methode in die Humanzellen transfiziert und die Zellen nach 24 h mit 3 % para-Formaldehyd fixiert.

C) Expression von GFP-Cpn0678 Fusionsproteinen in HEK293T-Zellen und Färbung mit 5 $\mu\text{g/ml}$ des Plasmamembranmarkers Alexa-633 WGA (wheat germ agglutinin).

GFP-Cpn0677 zeigte wiederum eine partielle Lokalisation an der Plasmamembran sowie eine diffuse Verteilung im Zytoplasma der Zellen. Um die zelluläre Struktur an die GFP-Cpn0678 bindet, eindeutig als Plasmamembran zu identifizieren, wurden GFP-Cpn0678 exprimierende Zellen parallel mit einem Plasmamembranmarker gefärbt. Dazu diente fluoreszenzmarkiertes WGA (wheat germ agglutinin), das an N-Acetylglucosaminyl-Zuckerreste der Plasmamembran bindet. Dabei zeigte sich in GFP-Cpn0678 exprimierenden Zellen eine Kollokalisierung mit WGA (Abb. 34 C). Zusammenfassend zeigte die intrazelluläre Expression von GFP-Cpn0678 und GFP-Cpn0677 in Hefen und Humanzellen eine vergleichbare Lokalisation, die durch eine komplette oder partielle Lokalisation an der Plasmamembran charakterisiert ist. Für die Proteine Cpn0677 und Cpn0678 sowie die Domäne Cpn0678N lässt sich daher ein humaner Interaktionspartner vermuten, der an der Plasmamembran lokalisiert sein könnte, aber auch extrazellulär zu finden ist.

4.10 Cpn0677 und Cpn0678 interagieren mit SNX9 *in vitro*

Weiterführende bioinformatische Analysen für Cpn0678 und Cpn0677 führten zur Identifikation von Prolin-reichen Wiederholungen (PRR) (Abb. 35 A). Durch Verwendung einer Phagenbibliothek von zufälligen Dodecapeptiden, konnte für das Typ III sekretierte Effektorprotein EspF aus enteropathogenen *E. coli* (EPEC) ein sehr spezifisches Bindemotiv mit der Konsensussequenz RxAPxxP (Abb. 35 A, rot) identifiziert werden. Dies befindet sich im Falle von EspF in jedem der 3 PRRs und kann mit der SH3-Domäne des humanen SNX9-Proteins interagieren (Alto, Weflen et al. 2007). Interessanterweise ist auch bei Cpn0678 und Cpn0677 die Konsensussequenz RxAPxxP jeweils einmal enthalten. Zusätzlich führte ein Sequenzvergleich zwischen Cpn0678 und Cpn0677 zur Identifikation eines Bereiches von 31 Aminosäuren (AS), bestehend aus dem kompletten PRR1 und 6 AS des PRR2, die bis auf 3 Positionen (blau) identisch sind (Abb. 35 B).



Abbildung 35: Sequenzvergleich der PRRs von EspF, Cpn0678 und Cpn0677

A) Darstellung von Sequenzen der ersten 25 AS des PRR1 von EspF, sowie die 3 PRRs von Cpn0678 und die 2 PRRs von Cpn0677. Die konservierten Aminosäuren der Konsensussequenz RxAPxxP, über die EspF mit SNX9 interagiert, sind in rot dargestellt. Der blau unterlegte Bereich kennzeichnet die Prolin-reichen Bereiche in allen 3 Proteinen.

B) Darstellung eines Sequenzbereiches von 31 AS, beginnend mit dem PRR1 in Cpn0677 und Cpn0678, die bis auf 3 AS-Austausche (blau) identisch sind. PRR = Prolin-reiche Wiederholungen

Zur Überprüfung einer möglichen Interaktion von Cpn0677 und Cpn0678 mit SNX9 wurden GST-Pulldown Experimente durchgeführt. Rekombinante GST und GST-SNX9 Fusionsproteine wurden dazu mittels FPLC affinitätschromatographisch aufgereinigt (Abb. 36 A). Äquimolare Mengen an GST und GST-Fusionsprotein wurden an GST-Agarose gekoppelt und mit *E. coli* Lysaten inkubiert, die gleiche Mengen an rCpn0677_{6His} und rCpn0678_{6His} exprimieren. Als Kontrolle diente GST-Protein allein, dass keine Interaktion mit Cpn0677 und Cpn0678 zeigte (Abb. 36 B). Das SNX9-Volllängenprotein und die SNX9-SH3 Domäne zeigten eine Interaktion mit Cpn0677 und Cpn0678. Die Deletion der SH3-Domäne von SNX9 führte zum kompletten Verlust der Interaktion mit Cpn0677, dagegen war für Cpn0678 noch eine sehr schwache Interaktion zu sichtbar. Die Ergebnisse zeigen eine *in vitro* Interaktion der SH3-Domäne von SNX9 mit Cpn0677 und Cpn0678.

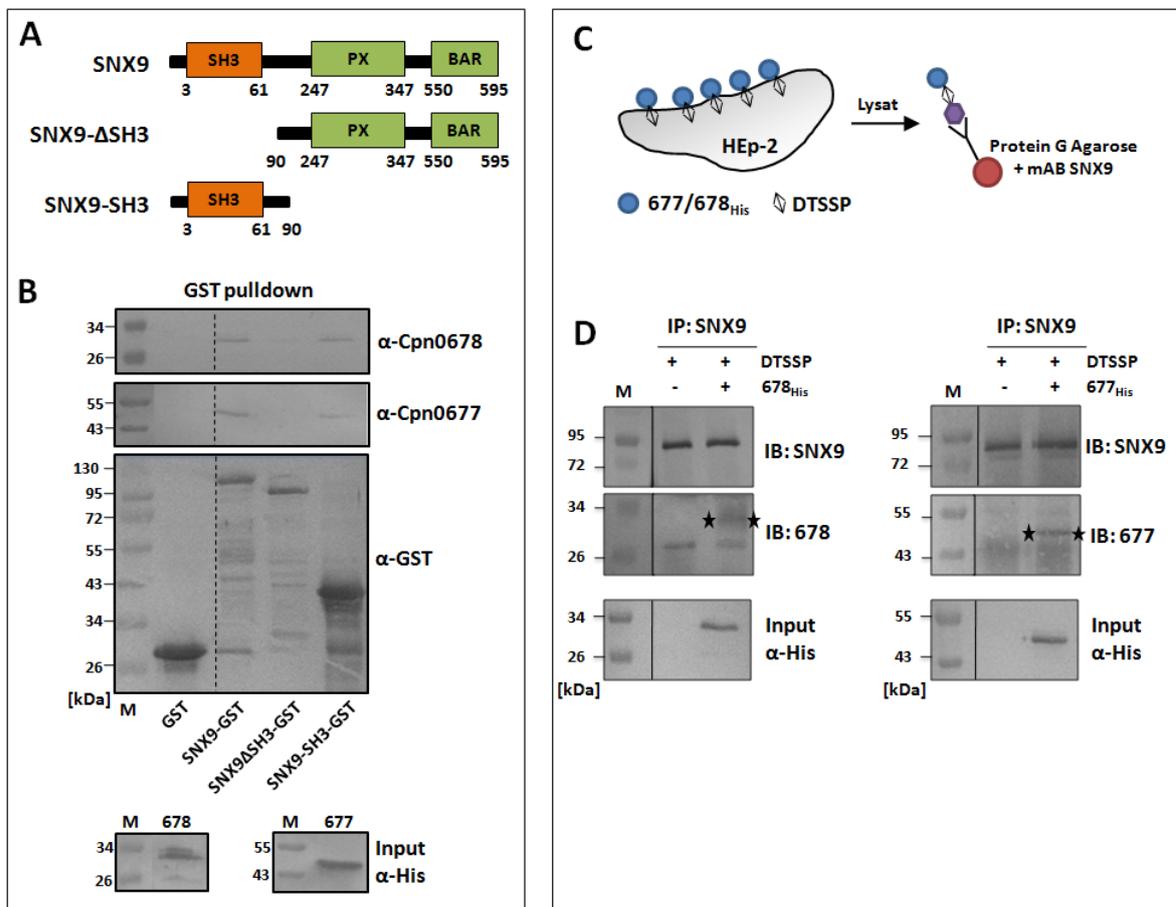


Abbildung 36: Nachweis einer Interaktion zwischen Cpn0678 und Cpn0677 mit SNX9 durch GST-Pulldown Experimente und Immunpräzipitation

A) SNX9-Proteine, die als rekombinante GST-Fusionsproteine für das GST-Pulldown Experiment eingesetzt wurden.

B) GST-Pulldown Experiment. 1.5 nM gereinigte GST/GST-SNX9-Fusionsproteine wurden an GST-Agarose gekoppelt und mit 2.5 mg *E. coli* Zellysaten inkubiert, die jeweils rCpn0678_{6His} und rCpn0677_{6His} exprimieren (siehe Methoden 3.6.5). *Oben:* In den α-Cpn0678 und α-Cpn0677 Blots ist eine Interaktion mit GST-SNX9 und GST-SNX9-SH3 zu sehen.

Mitte: Der α-GST Blot diente der Kontrolle, dass gleiche Mengen GST/GST-SNX9 Fusionsproteinen an die GST-Agarose gekoppelt war. *Unten:* His-Blot als Inputkontrolle von *E. coli* Lysaten die rCpn0677_{6His} und rCpn0678_{6His} exprimieren.

C) Schematische Darstellung der Immunpräzipitation mit monoklonalem Ratte-SNX9 Antikörper. 2 nM rCpn0678_{6His} sowie rCpn0677_{6His} wurde für 1 h bei 37°C mit konfluenten HEp-2 Zellen inkubiert (siehe Methoden 3.6.7). Nach dem „crosslink“ der extrazellulär gebundenen Proteine mit DTSSP, wurden HEp-2 Zellen mit gebundenem Protein mittels NOPS-Puffer (erlaubt auch die Solubilisierung von Membranen) lysiert und für die IP eingesetzt.

D) Immunpräzipitation durch SNX9 Antikörper. Im Blot zeigte sich jeweils die erfolgreiche IP des SNX9-Proteins mit rCpn0678_{6His} oder mit rCpn0677_{6His} markiert mit Sternen. Durch Kochen wurde der „crosslink“ aufgehoben. M = Marker

Zur Untersuchung ob diese Interaktion auch mit endogenem SNX9 in Humanzellen stattfindet, wurde rCpn0678_{6His} und rCpn0677_{6His} bei 37°C mit HEp-2 Zellen inkubiert und ein extrazelluläres Crosslinking (Quervernetzung) mit membranimpermeablem DTSSP durchgeführt (Abb. 36 C). HEp2-Zellen wurden lysiert, die Anwesenheit von gebundenem rCpn0678_{6His} und rCpn0677_{6His} im Lysat überprüft und beide Proteine waren dabei im His-Blot detektierbar (Abb. 36 D, Input). Nun wurde die Immunpräzipitation mit einem monoklonalem SNX9-Antikörper durchgeführt. Im anschließenden Immunoblot mit SNX9-Antikörper wurde jeweils das endogene SNX9 in gleichen Mengen detektiert (Abb.36 D, oben). Wurde nun ein Immunoblot mit einem Cpn0678-Antikörper durchgeführt, so konnte in den Proben mit rCpn0678_{6His} und DTSSP eine Bande für Cpn0678 bei ca. 30 kDa und damit auf derselben Höhe wie bei der Inputkontrolle detektiert werden (Abb. 36 D, Mitte links). Auch in den Proben mit rCpn0677_{6His} und DTSSP war eine Bande bei ca. 48 kDa und damit auf derselben Höhe wie bei der Inputkontrolle detektierbar (Abb. 36 D, Mitte rechts). Somit konnte die Interaktion von rGST-SNX9 mit rCpn0678_{6His} und rCpn0677_{6His} aus dem GST-Pulldown bestätigt werden. Zudem zeigte die Immunpräzipitation eine Interaktion von endogenem SNX9 aus HEp-2 Zellen mit rCpn0678_{6His} und rCpn0677_{6His}. Unter der Annahme, dass rCpn0678_{6His} und rCpn0677_{6His} nicht internalisiert werden, findet diese Interaktion somit an der Oberfläche der Humanzellen statt, denn aufgrund des Crosslinking wurde nur die extrazelluläre Interaktion untersucht. Dies lässt vermuten, dass Cpn0677 und Cpn0678 mit SNX9 auf oder an der Plasmamembran interagieren.

4.10.1 Interaktionen von Cpn0677/Cpn0678 mit SNX9 durch Far-Western Blots

Zur Bestätigung der beobachteten Protein-Protein Interaktionen von Cpn0677 und Cpn0678 mit verschiedenen SNX9-Domänen wurden Far-Western Blots durchgeführt. Rekombinantes GST bzw. GST-SNX9-Fusionsprotein (0.1 nM) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und die Proteine auf der Membran renaturiert. Die Membran wurde mit biotinylierten chlamydialen Proteinen inkubiert und die mit der Membran interagierenden Proteine mittels Streptavidin-Antikörper detektiert. Zur Überprüfung äquimolar eingesetzter Proteinmengen wurde ein GST-Blot durchgeführt, der für alle GST-SNX9-Fusionsproteine Degradationsbanden zeigte (Abb. 37 A). Jedoch war die Bandenintensität der GST-SNX9-Vollängenproteine vergleichbar, wobei alle Proteine im Gel höher liefen als theoretisch erwartet (GST = 25.8 kDa , GST-SNX9 = 94.0 kDa , GST-SNX9 Δ SH3 = 83.8 kDa , GST-SNX9-SH3 = 35.8 kDa).

Die Inkubation mit Cpn0677_{Biotin} und der Domäne Cpn0677N_{Biotin} zeigte eine Interaktion mit GST-SNX9 und GST-SNX9-SH3, jedoch nicht mit GST-SNX9 Δ SH3. Cpn0678_{Biotin} interagiert stark mit GST-SNX9 und GST-SNX9-SH3 und sehr schwach mit GST-SNX9 Δ SH3. Die Domäne Cpn0678N_{Biotin} interagiert mit GST-SNX9 und verglichen zu Cpn0678_{Biotin} nur noch schwach mit GST-SNX9-SH3. Auch war für Cpn0678N_{Biotin} eine Bande auf der Höhe von GST-SNX9 Δ SH3 detektierbar, die etwas stärker war als die generierte Bande mit Cpn0678_{Biotin}. Die Domäne Cpn0678C_{Biotin} interagiert nur mit GST-SNX9 und GST-SNX9-SH3 und alle Interaktionen sind in Abb. 37 B zusammengefasst.

Zusammenfassend zeigt sich das die Prolin-reichen Regionen, enthalten in den Domänen Cpn0677N und Cpn0678C ausreichend für eine Interaktion mit SNX9-SH3 sind (Abb. 37 C). Cpn0678N zeigt kaum noch Interaktion mit SNX9-SH3, dagegen eine stärkere Interaktion mit SNX9- Δ SH3 als das Volllängenprotein Cpn0678.

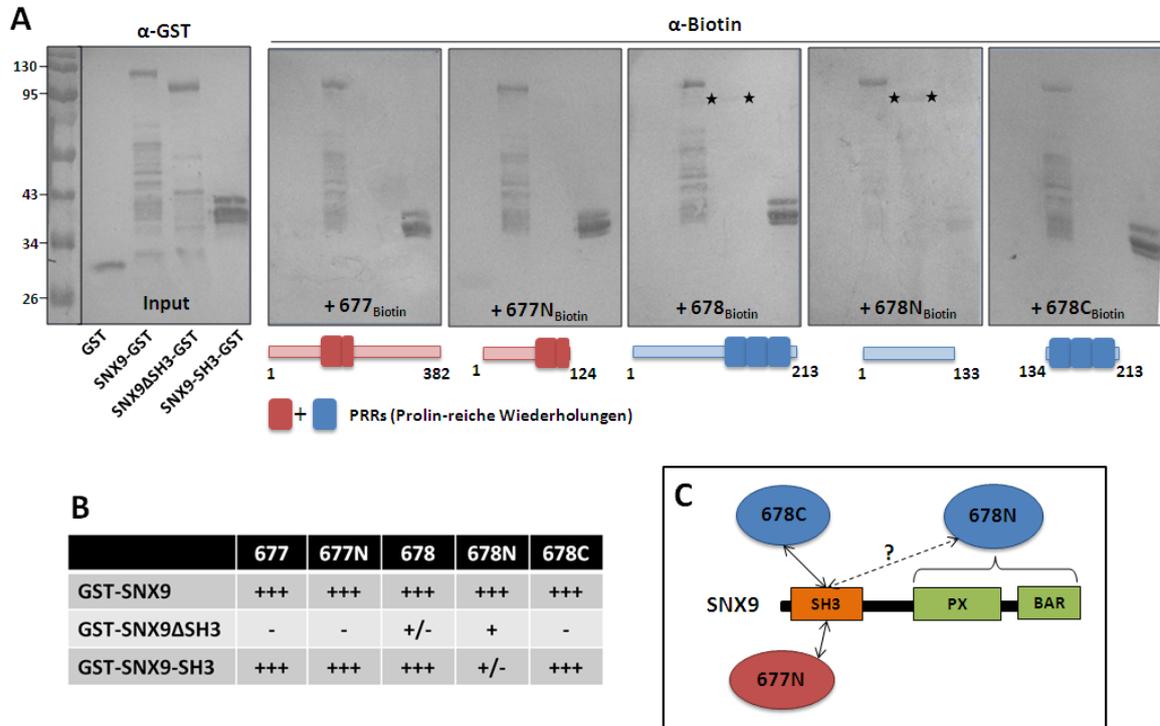


Abbildung 37: Interaktionsstudien zwischen Cpn0677 und Cpn0678 mit SNX9 mittels Far-Western Blot

A) Ein α -GST Blot als Inputkontrolle äquimolar geblotteter GST bzw. GST-Fusionsproteine. Die Proteine wurden auf der Membran renaturiert durch Waschen mit Puffer die Guanidin in absteigenden Konzentrationen von 6 M, 3 M, 1 M, 0.1 M und 0 M beinhalteteten. Die Blots wurden jeweils mit 4 μ g/ml an biotinylierten chlamydialen Proteinen inkubiert und deren Interaktion mit der Membran mittels α -Biotin Blot detektiert. Interaktionen mit GST-SNX9 Δ SH3 sind mit Sternen markiert.

B) Zusammenfassung der beobachteten Interaktionen, mit sehr stark (+++) und keine nennenswerte Interaktion (+/-)

C) Schematische Übersicht der aus dem Far-Westernblot ermittelten Interaktionen zwischen SNX9 und Cpn0677 und Cpn0678

4.10.2 Endogenes SNX9 lokalisiert an der Zelloberfläche von Humanzellen

Die Ergebnisse der Immunpräzipitation deuten auf eine Interaktion von rCpn0678_{6His} und rCpn0677_{6His} mit endogenem SNX9 hin, die vermutlich an der Zelloberfläche stattfindet. Endogenes SNX9 lokalisiert in sogenannten „clathrin-coated pits“ (CCPs) zusammen mit Clathrin an der Zelloberfläche von HeLa Zellen (Soulet, Yarar et al. 2005) (Alto, Weflen et al. 2007). Die Oberflächenlokalisierung von SNX9 wurde dabei aufgrund der Kolo-kalisation mit Clathrin angenommen, jedoch wurde die Oberflächenlokalisierung experimentell nicht direkt analysiert. Freundlicherweise wurde der in den obigen Arbeit (Alto, 2007) verwendete SNX9-Antikörper zur Verfügung gestellt. Damit wurde nun endogenes SNX9 in fixierten, jedoch nicht permeabilisierten HEP-2 Zellen analysiert. Dabei zeigte sich für SNX9 eine punktuierete Färbung der Oberfläche, verteilt über die ganze Zelle (Abb. 38 A - C). Um die Integrität der Zellen zu überprüfen, wurde

eine Antikörper-Färbung gegen α -Tubulin vorgenommen. Eine Detektion von intrazellulärem α -Tubulin in fixierten, nicht permeabilisierten Zellen war jedoch nicht möglich, während das Protein nach Permeabilisierung mit Triton angefärbt werden konnte. Dies zeigte, dass durch Fixierung mit para-Formaldehyd keine intrazelluläre Färbung möglich war (Abb. 38 D + E).

Die punktuierete Lokalisation von endogenem SNX9 in HEK293T-Zellen war auch bei allen Transfektionen der chlamydialen GFP-Fusionsproteine unverändert und exemplarisch ist endogenes SNX9 bei Expression von GFP-Cpn0678 gezeigt (Abb. 38 F - H). Eine partielle perinukleare Akkumulation von endogenem SNX9 war in transfizierten sowie in nicht transfizierten Zellen zu beobachten (Abb. 38 F) und wurde auch bereits beschrieben (Alto, Weflen et al. 2007). Somit ist endogenes SNX9 an der Zelloberfläche für eine Antikörperdetektion zugänglich und könnte daher mit exogenem rCpn0678_{GHis} und rCpn0677_{GHis} interagieren. Eine intrazelluläre Expression von GFP-Cpn0677 und GFP-Cpn0678 dagegen führt zwar zur Lokalisation an der Plasmamembran, resultiert jedoch nicht in einer veränderten Lokalisation von endogenem SNX9.

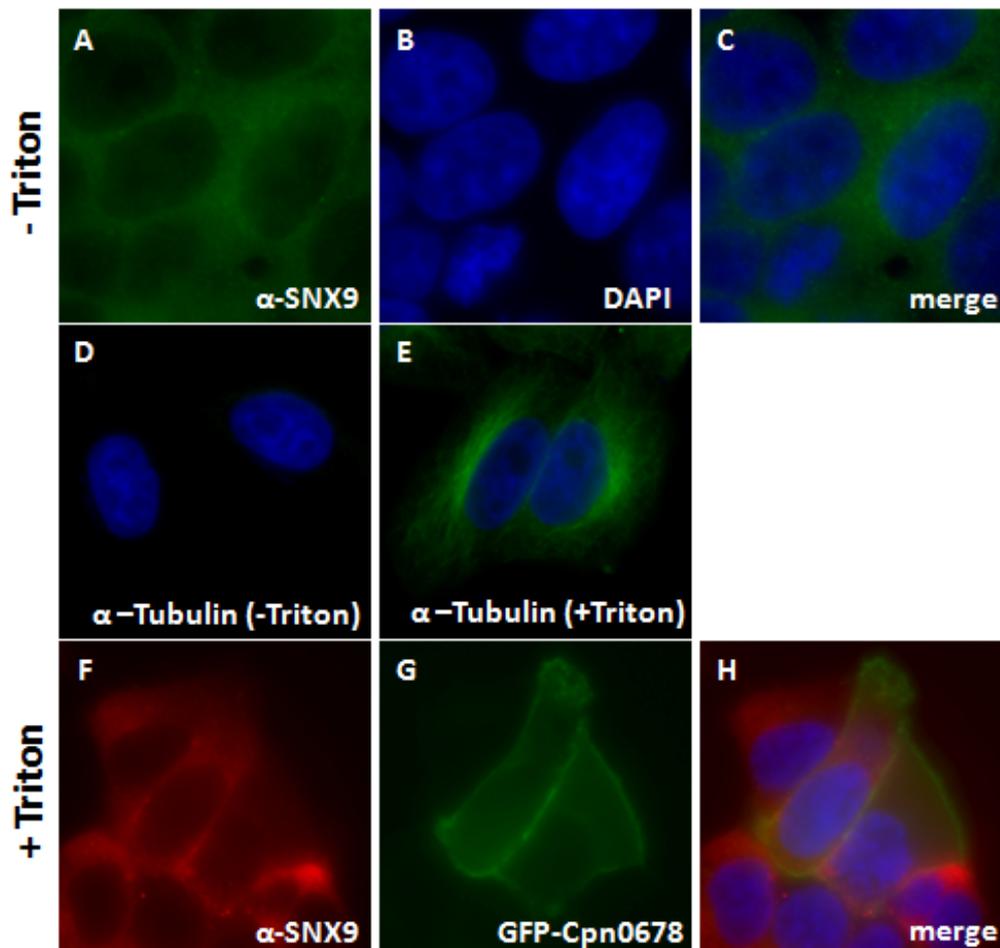


Abbildung 38: Lokalisation von endogenem SNX9 in HEp-2 Zellen und in transfizierten HEK293T-Zellen

A-C) HEp-2 Zellen wurden mit 3 % para-Formaldehyd fixiert, jedoch nicht permeabilisiert und endogenes SNX9 unter Verwendung eines SNX9-Antikörpers (1:50, Alto *et al.*, 2007) und Kaninchen-FITC Antikörpers (1:40) gefärbt.

D+E) HEp-2 Zellen wurden mit 3 % para-Formaldehyd fixiert und nicht permeabilisiert (D) oder mit 0.2 % Triton permeabilisiert (E). Die Detektion von intrazellulärem α -Tubulin war dabei nur in permeabilisierten Zellen möglich.

F-H) HEK293T-Zellen wurden für 24 h mit GFP-Cpn0678 transfiziert, mit 3 % para-Formaldehyd fixiert und Zellen mit 0.2 % Triton permeabilisiert. Anschließend wurde extra- und intrazelluläres endogenes SNX9 mittels SNX9-Antikörper (1:50, Alto *et al.*, 2007) und Kaninchen-Cy3 Antikörper (1:200) gefärbt.

4.10.3 Kotransfektion von Cpn0678 und SNX9 induziert tubuläre Strukturen

Aufgrund der gezeigten *in vitro* Interaktion von Cpn0678 und Cpn0677 mit SNX9 sowie der Ähnlichkeit zu EspF wurde untersucht, ob eine *in vivo* Koexpression der chlamydialen Proteine mit SNX9 auch zu einer Interaktion führt. Für das Effektorprotein EspF wurde gezeigt, dass es SNX9 ausschließlich über die SH3-Domäne bindet und der gebildete Komplex mit der Membran assoziiert ist (Marches, Batchelor et al. 2006). Weiterhin wurde bei Kotransfektion von EspF und SNX9 in HeLa-Zellen die Bildung einer großen Anzahl von tubulären Strukturen beobachtet, an denen beide Proteine kolokalisieren (Alto, Weflen et al. 2007).

Um die Interaktion von Cpn0678 und Cpn0677 mit SNX9 näher zu untersuchen, wurden nun Kotransfektionen der chlamydialen GFP-Fusionsproteine mit mcherry-SNX9 durchgeführt. Als Kontrolle wurden GFP und mcherry-SNX9 koexprimiert und dabei zeigte sich für GFP eine Verteilung in der gesamten Zelle, während SNX9 komplett im Zytoplasma verteilt lokalisierte (Abb. 39). Dabei zeigte mcherry-SNX9 eine andere Lokalisation als endogenes SNX9 und wurde bereits beschrieben (Alto, Weflen et al. 2007). Eine Kotransfektion von GFP-Cpn0678 und mcherry-SNX9 zeigte eine komplette und massive Relokalisation beider Proteine. Lange tubuläre Strukturen waren über die ganze Zelle verteilt sichtbar, an denen beide Proteine kolokalisieren. Eine Kotransfektion mit GFP-Cpn0678N zeigte keine tubulären Strukturen, jedoch war ein großer Teil von SNX9 nicht mehr im Zytoplasma, sondern an der Plasmamembran sichtbar. In Plasmamembranregionen mit einer großen Menge an GFP-Cpn0678N kam es zu einer Kolokalisation mit SNX9. Bei Kotransfektion von GFP-Cpn0678C mit mcherry-SNX9 waren beide Proteine komplett im Zytoplasma zu finden und zeigten eine vollständige Kolokalisation. Transfizierte man GFP-Cpn0678C allein in HEK293T-Zellen zeigte sich eine fast ausschließliche Kernlokalisation sowie eine leichte zytoplasmatische Färbung (siehe Abb. 34). Durch die Interaktion mit SNX9 verbleibt GFP-Cpn0678C nun vermutlich im Zytoplasma. Auch GFP-Cpn0677 war nach Kotransfektion komplett im Zytoplasma zu finden und kolokalisierte vollständig mit SNX9 (Abb. 39). Dagegen zeigte die Expression von GFP-Cpn0677 allein, neben der Lokalisation im Zytoplasma auch eine Akkumulation an der Plasmamembran zeigte (siehe Abb. 34). Folglich ist Cpn0677 in der Lage mit SNX9 *in vivo* zu interagieren, dies führt aber nicht zu einer veränderten Lokalisation von SNX9.

Somit löst Cpn0678 durch Koexpression mit SNX9 in HEK293T-Zellen die Bildung von langen tubulären Strukturen aus, an denen beide Proteine kolokalisieren. Diese tubulären Strukturen unterscheiden sich jedoch morphologisch von den bei Koexpression von GFP-EspF und mcherry-SNX9 beobachteten Strukturen in HeLa-Zellen (siehe Diskussion) (Alto, 2007). Die Domäne Cpn0678N ist in der Lage eine Membranlokalisation von SNX9 zu induzieren. Bei Anwesenheit von SNX9 verbleibt Cpn0678C im Zytoplasma und kolokalisiert dort mit SNX9. Folglich unterstützen diese Daten die gezeigten Interaktionen aus dem Far-Western-Blot, sodass Cpn0678N vermutlich mit der PX-BAR Struktureinheit von SNX9 an der Plasmamembran interagiert, während Cpn0678C nur mit der SH3-Domäne von SNX9 interagiert und keine Lokalisation von SNX9 an der Plasmamembran induzieren kann. Zusammenfassend zeigt sich, dass Cpn0678 in der Lage ist SNX9 an der Membran zu lokalisieren und ermöglicht so SNX9 tubuläre Strukturen zu induzieren.

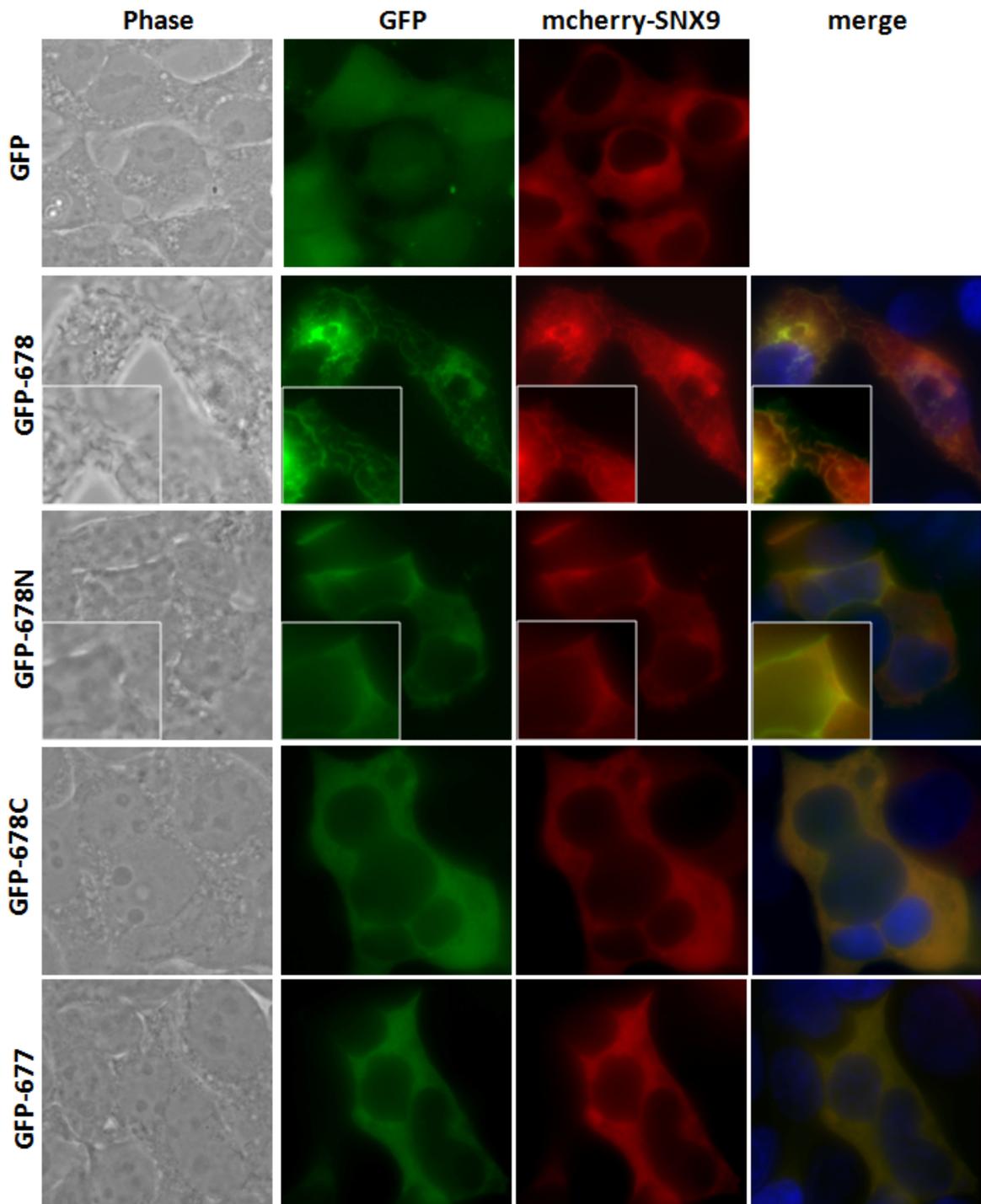


Abbildung 39: Kotransfektion von chlamydialen GFP-Fusionsproteinen mit mcherry-SNX9

HEK293T-Zellen wurden mittels CaCl_2 -Methode mit den einzelnen GFP-Cpn Fusionsproteinen und mcherry-SNX9 kotransfiziert, die Zellen nach 24 h mit 3 % para-Formaldehyd fixiert und die Kollokalisierungen durch Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Die merge-Bilder zeigen zusätzlich noch eine DAPI-Färbung des Zellkerns (blau).

4.11 SNX9 ist an der Aufnahme von *C. pneumoniae* beteiligt

Die bisherigen Daten deuten auf eine extra- und intrazelluläre Interaktion von Cpn0678 und Cpn0677 mit SNX9 hin. Im Folgenden wurde die direkte Rolle von SNX9 bei der Internalisierung und Infektion von *C. pneumoniae* EBs anhand von lentiviral transduzierten HEK293T-Zelllinien untersucht (unpubliziert, Lichtenthaler 2009). In dieser Zelllinie wurden zwei verschiedene sog. *short-hairpin* RNAs (shRNA1 + 2) die gegen SNX9 gerichtet sind exprimiert. Im Westernblot zeigte die SNX9-Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle für shRNA1-Zellen eine Reduktion auf 9 % und für shRNA2-Zellen auf 67 % (Abb. 40 A).

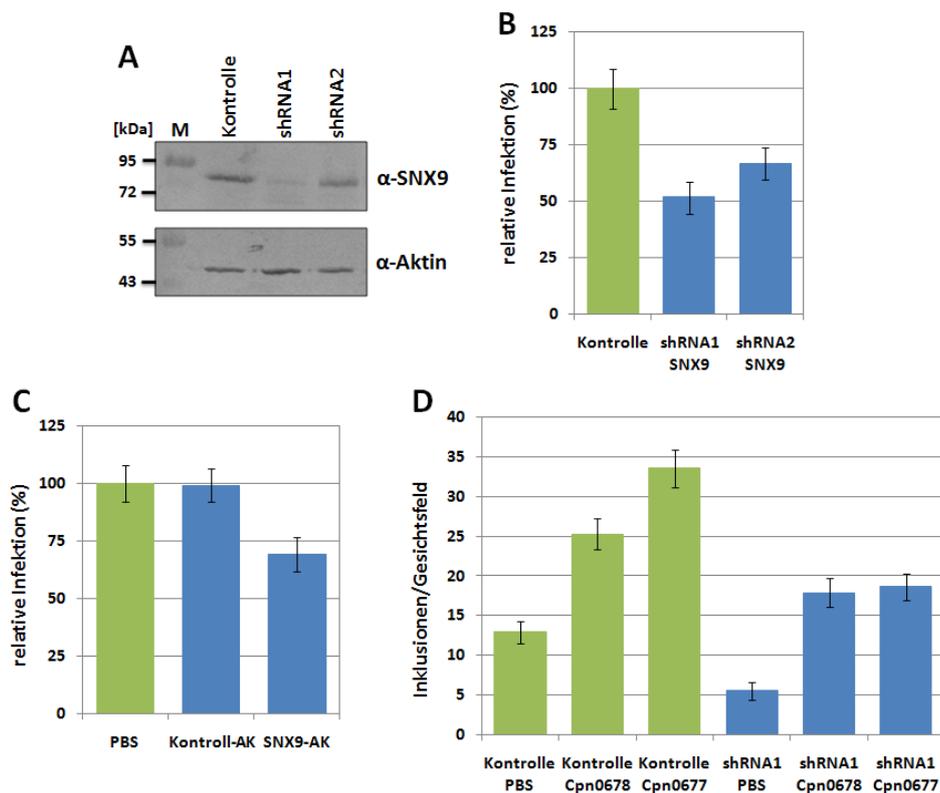


Abbildung 40: Das Ausschalten des SNX9-Gens reduziert die Infektion mit *C. pneumoniae*

A) Immunoblot zur Überprüfung der SNX9-Proteinmenge in HEK293T-Kontrollzellen und HEK293T-Zellen, die shRNA1 und shRNA2 exprimieren, sowie ein Blot gegen β -Aktin als Ladekontrolle. Die Bandenintensitäten des α -SNX9 Blots wurden mit der Software Scion Image bestimmt. Antikörper und shRNA-SNX9 Zelllinien wurden freundlicherweise von Dr. Lichtenthaler zur Verfügung gestellt (siehe Schöbel *et al.*, 2008)

B) HEK293T-Zellen wurden mit *C. pneumoniae* EBs (MOI = 10) für 60 h infiziert, mit Methanol fixiert. Die Detektion der Einschlüsse erfolgte mittels α -DnaK und Maus-Cy3 Antikörper. Die Zahl gebildeter Einschlüsse wurde in 20 Gesichtsfeldern mikroskopisch bestimmt (n = 3) und die Einschlüsse in Kontrollzellen auf 100 % relative Infektion gesetzt.

C) HEp-2 Zellen wurden mit PBS, Kontrollantikörper (rat antibody 7H8, 1:5) und SNX9-Antikörper (rat antibody 6C6, 1:5) für 1 h bei 4°C vorbehandelt, bevor sie mit *C. pneumoniae* EBs (MOI 10) infiziert wurden. Nach 60 h wurden infizierte Zellen mit Methanol fixiert und die Detektion der gebildeten Einschlüsse erfolgte durch einen FITC-konjugierten Antikörper gegen das chlamydiale LPS (Pathfinder, 1:4 verdünnt). Die Zahl der Einschlüsse wurde jeweils in 20 Gesichtsfeldern mikroskopisch bestimmt (n = 3).

D) Protein-Neutralisationsassay. HEK293T-Kontrollzellen (Kontrolle) und HEK293T-Zellen, welche die shRNA1 exprimieren (shRNA1) wurden für 2 h mit PBS, 50 μ g/ml rCpn0678_{6His} oder 100 μ g/ml rCpn0677_{6His} parallel mit gradientengereinigten *C. pneumoniae* EBs (MOI 10) inkubiert. Nach 60 h wurden infizierte Zellen mit Methanol fixiert und die Detektion der gebildeten Einschlüsse erfolgte durch einen FITC-konjugierten Antikörper gegen das chlamydiale LPS (Pathfinder, 1:4). Die Zahl der Inklusionen wurde bei 40 x Vergrößerung jeweils in 15 Gesichtsfeldern mikroskopisch bestimmt. Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl von Inklusionen/Gesichtsfeld (n = 2).

Im Vergleich zur Kontrollzelllinie zeigte die shRNA1-Zelllinie eine stark reduzierte relative Infektion von 51 % und die shRNA2-Zelllinie eine Infektion von 67 % (Abb. 40 B). Diese Ergebnisse zeigen, dass SNX9 eine wichtige Rolle für die *C. pneumoniae* Infektion einnimmt.

Aufgrund der Lokalisation von SNX9 auf der Zelloberfläche (siehe Abb. 38 A) wurde nun untersucht, ob durch Vorinkubation von HEp-2 Zellen mit einem SNX9-Antikörper die nachfolgende Infektion mit *C. pneumoniae* gestört ist. Ein Kontroll-Antikörper zeigte keinen Effekt auf die Infektion verglichen zur PBS-Kontrolle. Interessanterweise führte die Vorinkubation von HEp-2 Zellen mit dem SNX9-Antikörper zu einer Reduktion der Infektion auf 69 % (Abb. 40 C). Diese Daten lassen vermuten, dass durch die Blockierung von oberflächenlokalisiertem endogenem SNX9 mit einem spezifischen Antikörper die Infektion reduziert ist. Zusammenfassend zeigen die Daten erstmalig eine Beteiligung von SNX9 bei der Etablierung der *C. pneumoniae* Infektion.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Erhöhung der *C. pneumoniae* Infektion durch parallele Inkubation von rCpn0678_{6His} oder rCpn0677_{6His} mit EBs direkt von der Anwesenheit des SNX9-Proteins abhängt. In Kontrollzellen war durch rCpn0678_{6His} mit 25 Inklusionen/Gesichtsfeld die Infektion fast doppelt so hoch wie in PBS-behandelten Zellen mit 13 Inklusionen/Gesichtsfeld (Abb. 40 D). Auch durch rCpn0677_{6His} war ein starker Anstieg auf 33,5 Inklusionen/Gesichtsfeld feststellbar. Für die shRNA1-Zellen, die noch über eine Restmenge von 9 % SNX9 verfügen, war bereits in PBS-behandelten Zellen die Infektion im Vergleich zu den Kontrollzellen um den Faktor 2,3 auf nur noch 5,6 Inklusionen/Gesichtsfeld reduziert. Die Anwesenheit von rCpn0678_{6His} oder rCpn0677_{6His} führt zu einem Anstieg auf 17,8 bzw. 18,7 Inklusionen/Gesichtsfeld und somit zu einer Erhöhung der Infektion um den Faktor 3,2 bis 3,3. Dies zeigt, dass die Anwesenheit von wildtypischen Mengen an SNX9 nicht für die durch rCpn0678_{6His} oder rCpn0677_{6His} induzierte Infektionserhöhung verantwortlich ist. Somit interagieren rCpn0678_{6His} oder rCpn0677_{6His} vermutlich mit weiteren Proteinen der Wirtszelle.

4.12 Identifikation humaner Interaktionspartner von rCpn0678_{6His} aus HEp-2 Zelllysaten

Um neben SNX9 weitere potentielle humane Interaktionspartner für Cpn0678 zu identifizieren, wurden NHS-Pulldown Experimente mit HEp-2 Zelllysaten durchgeführt. Dazu wurde rCpn0678_{6His} kovalent an NHS-Sepharose gekoppelt, mit HEp-2 Zelllysaten inkubiert und durch sauren Glycinpuffer (Gly 1 + 2) Interaktionspartner eluiert. Bei Inkubation des Zelllysats mit ungekoppelter NHS-Sepharose interagierte kein Protein unspezifisch mit der Sepharose (Abb. 41, Spur 6 + 7). Dagegen zeigten sich in den Elutionsfraktionen von rCpn0678_{6His} gekoppelter Sepharose (Abb. 41, Spur 4 + 5) neben dem Protein noch 6 weitere distinkte Banden, die mittels „peptide mass fingerprinting“ analysiert und als GAPDH, β -Aktin, α/β -Tubulin, Hsp70, Hsp90 β/α und Myosin-9 identifiziert wurden (Abb. 41, rechts). Interessanterweise war in einem Blot mit SNX9-Antikörper in den Elutionsfraktionen von rCpn0678_{6His} gekoppelter Sepharose (Abb. 41 unten, Spur 4 + 5), das SNX9 Protein als Doppelbande detektierbar. Dies bestätigt eine Interaktion zwischen Cpn0678 und

SNX9, jedoch ist die Menge an SNX9 zu gering, um im Coomassie-Gel detektierbar zu sein. Die Relevanz der weiteren identifizierten Interaktionspartner muss in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

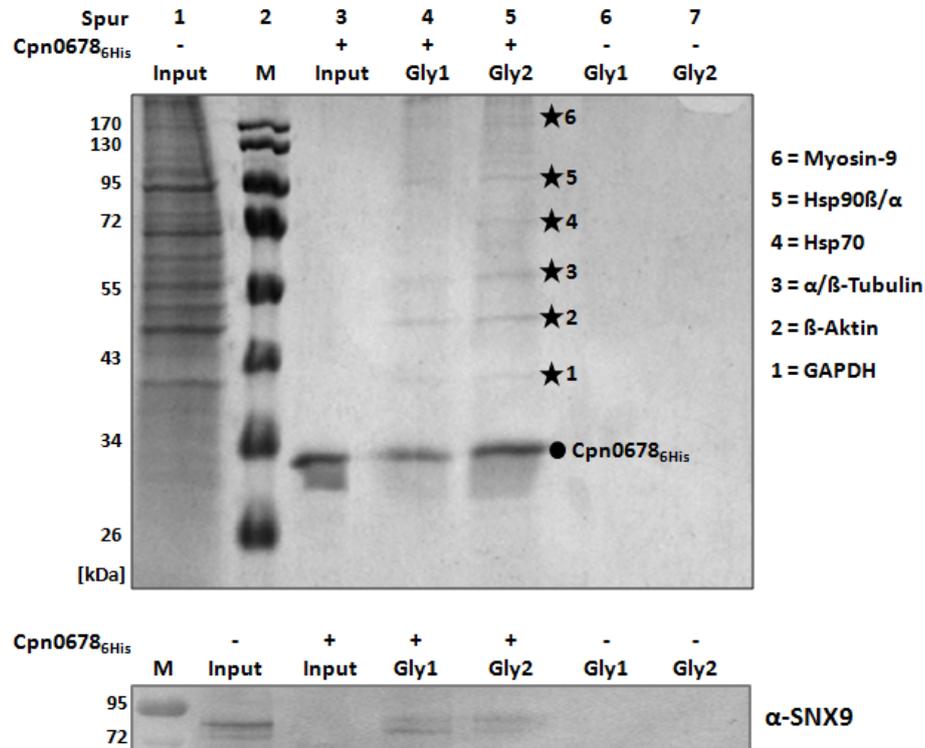


Abbildung 41: NHS-Pulldown von rCpn0678_{GHis} mit HEp-2 Lysaten identifiziert neben SNX9 noch 6 weitere potentielle Interaktionspartner

Coomassie gefärbtes SDS-Gel zeigt als Inputproben HEp-2 Gesamtzell-Lysat (Spur 1) und 0.5 µg rCpn0678_{GHis} (Spur 3), sowie die Elutionsfraktionen von NHS-Sepharose, die mit rCpn0678_{GHis} (Spur 4 + 5) bzw. ohne rCpn0678_{GHis} (Spur 6 + 7) gekoppelt war. Die NHS-Sepharose wurde mit 200 µg rCpn0678_{GHis} gekoppelt, mit HEp-2 Gesamtzell-Lysaten inkubiert und durch 0.1 M Glycin pH 2.5 eluiert. Die 6 markierten Proteinbanden wurden mittels „peptide mass fingerprinting“ analysiert. Im Bild unten ist ein Westernblot der Input- und Elutionsfraktionen mit einem SNX9 Antikörper gezeigt.

4.13 Transfektion von Cpn0678 inhibiert die Aufnahme von Transferrin

Für *C. trachomatis* wurde gezeigt, dass die Aufnahme der EBs durch Clathrin vermittelt wird. Das Ausschalten von endogenem Clathrin mittels siRNA führte dabei zur fast kompletten Inhibition der Aufnahme von Transferrin, einem klassischen Marker für Clathrin-abhängige Endozytose (Hybiske and Stephens 2007). Auch SNX9 könnte notwendig sein für die Aufnahme von Transferrin (Tf), denn eine Überexpression von exogenem SNX9 sowie das Ausschalten von endogenem SNX9 hatte eine inhibierte Aufnahme von Transferrin zur Folge (Shin, Ahn et al. 2008). Da Cpn0678 und Cpn0677 *in vivo* mit SNX9 interagieren wurde nun untersucht, ob die intrazelluläre Überexpression von GFP-Cpn0678 oder GFP-Cpn0677 in HEK293-Zellen Effekte auf die Transferrinaufnahme zeigt. Dazu wurde biotinyliertes Transferrin (Tf_{Biotin}) für 1 h bei 4°C mit adhären HEK293-Zellen inkubiert. Gebundenes Transferrin zeigte sich durch eine charakteristische Färbung der Plasmamembran (Abb. 42 A). Wurde nun durch Inkubation für 30 min bei 37°C

die Endozytose induziert, zeigte sich für Transferrin (Tf_{Biotin}) in GFP-transfizierten Zellen eine komplett in den Zellen verteilte punktuierete Lokalisation (Abb 42 B). Die Relokalisation des Transferrins von der Plasmamembran in intrazelluläre vesikuläre Strukturen, diente dabei als Marker für eine erfolgte Endozytose. Für GFP-transfizierte als auch für nicht transfizierte Zellen war die gleiche Transferrin-Lokalisation zu beobachten (Abb. 42 B, oben). Bei GFP-Cpn0678 transfizierten Zellen dagegen war die Endozytose von Tf_{Biotin} stark gestört. Es zeigte sich immer noch, neben einigen punktuiereten Signalen, eine deutliche Plasmamembranfärbung für Transferrin wie bei 4°C. In nicht mit GFP-Cpn0678 transfizierten Zellen war die Lokalisation von Transferrin dagegen nicht gestört (siehe Pfeile) und zeigte eine Färbung wie in den GFP-transfizierten Zellen. Im Falle von GFP-Cpn0677 ist in transfizierten und nicht transfizierten Zellen dieselbe Transferrin-Lokalisation zu beobachten und die Endozytose von Transferrin war nicht gestört. Somit verursacht die intrazelluläre Expression von GFP-Cpn0678 eine Inhibition der Transferrin-Endozytose. Aufgrund der Lokalisation von GFP-Cpn0678 an der Plasmamembran wäre denkbar, dass es durch die Überexpression zu einer Interaktion und Blockierung humaner Proteine (z.B. SNX9) kommt, die eine wichtige Rolle bei der Endozytose spielen.

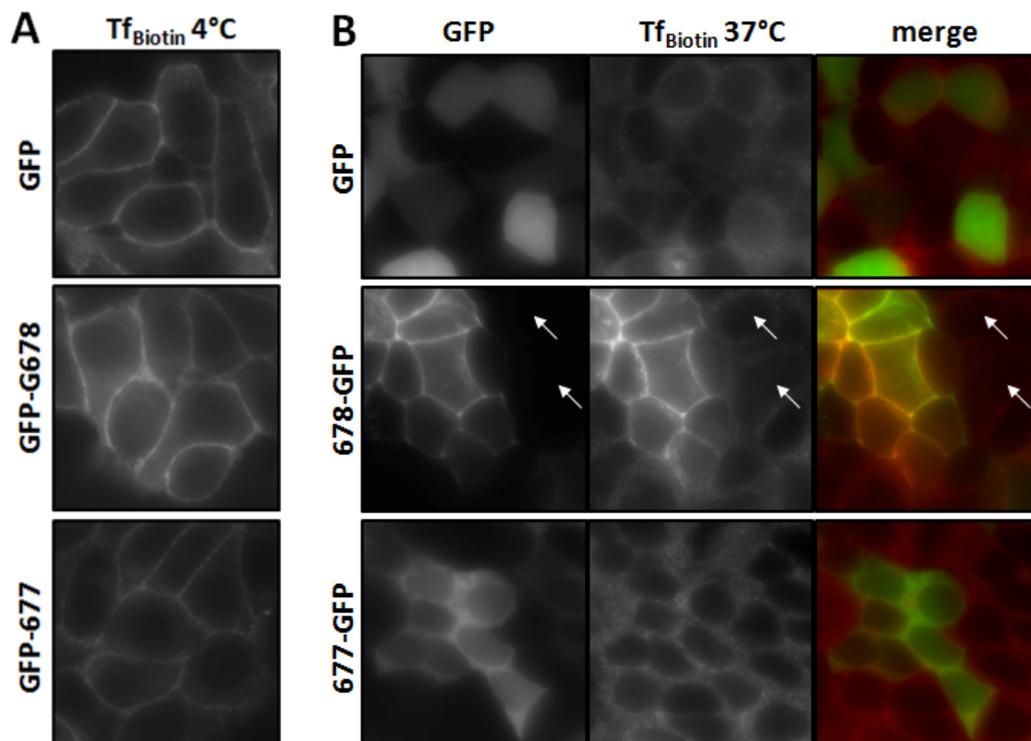


Abbildung 42: Effekt von intrazellulär exprimiertem Cpn0677 oder Cpn0678 auf die Transferrin-aufnahme

A) HEK293-Zellen wurden mittels $CaCl_2$ -Methode mit GFP, GFP-Cpn0678 und GFP-Cpn0677 transfiziert. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ biotinyliertes Transferrin wurde für 1 h bei 4°C mit den Zellen inkubiert und überschüssiges Transferrin weggewaschen. Zellen wurden mit 3 % para-Formaldehyd fixiert, durch 0.2 % Triton permeabilisiert und mit Streptavidin-APC (1:40) gefärbt.

B) HEK293-Zellen wurden mittels $CaCl_2$ -Methode mit GFP, GFP-Cpn0678 und GFP-Cpn0677 transfiziert. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ biotinyliertes Transferrin wurde für 1 h bei 4°C mit den Zellen inkubiert und überschüssiges Transferrin weggewaschen. Nun wurden die Zellen für 30 min. bei 37°C inkubiert, Zellen mit 3 % para-Formaldehyd fixiert, durch 0.2 % Triton permeabilisiert und mit Streptavidin-APC (1:40) gefärbt.

In allen Aufnahmen wurde auf den Zellkern fokussiert, sodass hier kein Transferrin-Signal zu beobachten war.

4.14 rCpn0677_{6His} und rCpn0678_{6His} erhöhen nicht die Endozytose von Transferrin, jedoch wird rCpn0677_{6His} internalisiert

Da durch extrazelluläre Zugabe von rCpn0677_{6His} und rCpn0678_{6His} die Infektion erhöht war, wurde der Einfluß dieser Proteine auf die Endozytoseverhalten von Humanzellen mit Transferrin als Endozytosemarker untersucht. Biotinyliertes Transferrin (Tf_{Biotin}) wurde mit adhärenenten HEp-2 Zellen für 1 h bei 4°C inkubiert und nach Zugabe von rCpn0677_{6His} bzw. rCpn0678_{6His} bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde gebundenes Transferrin mit einem „Stripping-Puffer“ entfernt und die Menge an intrazellulärem Transferrin durch Immunoblotting bestimmt. Das Entfernen von Transferrin erfolgte nahezu vollständig, da zum Zeitpunkt 0 min jeweils nur ein schwache Transferrinbande zu sehen war (Abb. 43 A - C).

Im Kontrolllexperiment nahm die Menge an intrazellulärem Transferrin bei 37 °C über die Zeit stetig zu und erreichte nach 30 min das Maximum (Abb. 43 A). Die Zugabe von rCpn0677_{6His} zeigt keine signifikante Veränderung der aufgenommenen Menge an Transferrin. Interessanterweise konnte jedoch erstmalig nach 15 min und stark zunehmend nach 30 und 60 min intrazelluläres rCpn0677_{6His} detektiert werden (Abb. 43 B). Im Gegensatz dazu veränderte die Zugabe von rCpn0678_{6His} weder die Menge an endozytiertem Transferrin, noch war rCpn0678_{6His} intrazellulär nachweisbar (Abb. 43 C).

Somit verursacht die extrazelluläre Gabe von rCpn0677_{6His} und rCpn0678_{6His} keine Störung in der Transferrinaufnahme. Jedoch konnte überraschenderweise die Endozytose von rCpn0677_{6His} gezeigt werden.

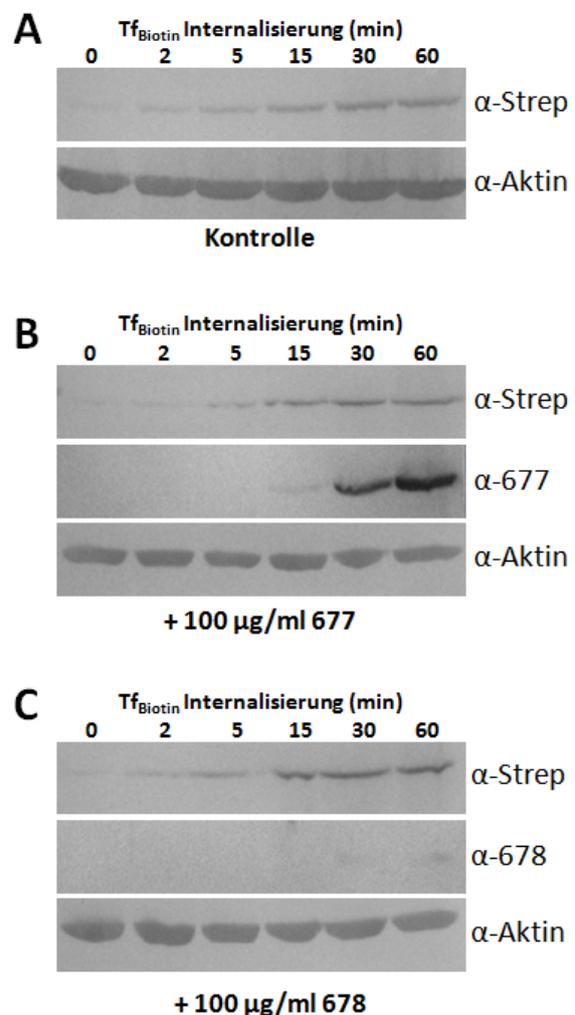


Abbildung 43: Transferrinaufnahme ist nicht gestört durch extrazelluläres rCpn0677 und rCpn0678

A - C) Westernblot-Analyse der Transferrinaufnahme bei 37°C über die Zeit (0 - 60 min). 10 µg/ml biotinyliertes Transferrin wurde für 1 h bei 4°C mit HEp-2 Zellen inkubiert und überschüssiges Transferrin nicht wegwaschen. Dann wurden 100 µg/ml rCpn0677 oder rCpn0678 zugegeben und zu den angegebenen Zeitpunkten die Zellen mit einem „Stripping Puffer“ 0.2 M Na-Acetat + 0.5 M NaCl pH 4.5 zum Ablösen gebundenen Transferrins und anderer Proteine von der Zelloberfläche behandelt. Dann wurde intrazelluläres Transferrin mittels α-Biotin Blot und die chlamydialen Proteine mit den entsprechenden antigengereinigten Antikörpern im Blot detektiert. Ein Blot gegen humanes β-Aktin diente als Ladekontrolle.

4.15 Mit rCpn0677_{6His}-beschichtete Latexkugeln werden internalisiert

Aufgrund der Oberflächenlokalisierung von Cpn0677 und Cpn0678, sowie der Interaktion mit dem an der Endozytose beteiligten SNX9, wurde eine mögliche Funktion der Proteine in der Internalisierung untersucht. Zusätzlich sollte die bereits beobachtete Endozytose von rCpn0677_{6His} unabhängig von der Anwesenheit Transferrins durch Internalisierungsexperimente mit Protein-beschichteten Latexkugeln untersucht werden. Für *Y. pseudotuberculosis* konnte gezeigt werden, dass das bakterielle Protein Invasin die Adhäsion und Internalisierung des Bakteriums vermittelt, wobei Latexkugeln gekoppelt mit der Domäne Inv497 sehr effizient in die Wirtszelle internalisiert werden (Dersch and Isberg 1999).

Blau-fluoreszierende Latexkugeln wurden mit 200 µg/ml Protein beschichtet und deren Aufnahme durch HEP-2 Zellen analysiert. Für rInv497_{6His}-beschichtete Beads wurde eine Internalisierungsrate von 96 % ermittelt (Abb. 44 A + B). Auch rCpn0677_{6His}-beschichtete Beads zeigten mit 76 % Internalisierung eine hohe Aufnahmeeffizienz. Dagegen wurden rCpn0678_{6His}-beschichtete Beads nicht internalisiert. Diese Ergebnisse bestätigen die mit löslichem rCpn0677_{6His} beobachtete Internalisierung des Proteins (Abb. 43 B), sodass Cpn0677 neben der Vermittlung der Adhäsion auch an der Internalisierung der Chlamydien beteiligt sein könnte.

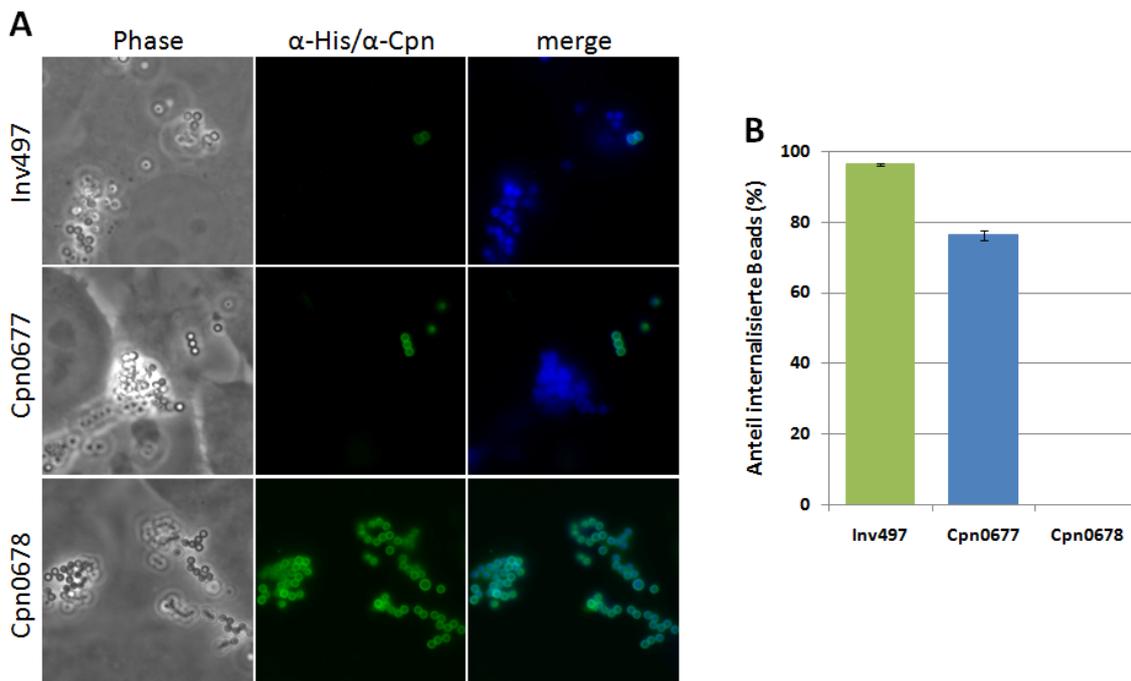


Abbildung 44: Internalisierung von rCpn0677_{6His}-beschichteten Latexkugeln

A + B) Repräsentative Mikroskopie und Quantifizierung des Internalisierungsexperiments. Blau-fluoreszierende 1 µm Latexkugeln wurden mit 200 µg/ml rInv497_{6His}, rCpn0677_{6His} oder rCpn0678_{6His} beschichtet, in 20 fachem Überschuss mit HEP-2 Zellen für 3 h bei 37°C inkubiert, die Zellen mit Formaldehyd fixiert und nicht permeabilisiert. Die Detektion extrazellulärer Latexkugeln erfolgte im Falle von Inv497_{6His} durch His-Antikörper bzw. durch einen Cpn0677- oder Cpn0678-Antikörper. Der Quotient aus extrazellulärer und totaler Anzahl an Latexkugeln wurden in jeweils 10 Gesichtsfeldern quantifiziert und liefert so den Anteil an internalisierten Beads (n = 3).

4.15.1 Die Internalisierung von rCpn0677_{6His}-beschichtete Latexkügelchen ist abhängig von einem intakten Zytoskelett

Für *C. psittaci* wurde gezeigt, dass eine Zerstörung von Aktin-Mikrofilamenten der Humanzelle durch Cytochalasin D die Infektion um bis zu 90 % reduziert (Boleti, Benmerah et al. 1999). Im Folgenden wurde daher untersucht, ob die Internalisierung rCpn0677_{6His}-beschichteter Latexkügelchen abhängig vom Aktinzytoskelett ist. Zunächst wurden die Auswirkungen einer Cytochalasin D Behandlung auf HEp-2 Zellen morphologisch untersucht. Im Vergleich zu unbehandelte Zellen mit langen intakten Aktinfasern zeigten Cytochalasin-behandelte Zellen ein zerstörtes und abnormales Zytoskelett, was in einer Abrundung der Zellen resultierte (Abb. 45 A).

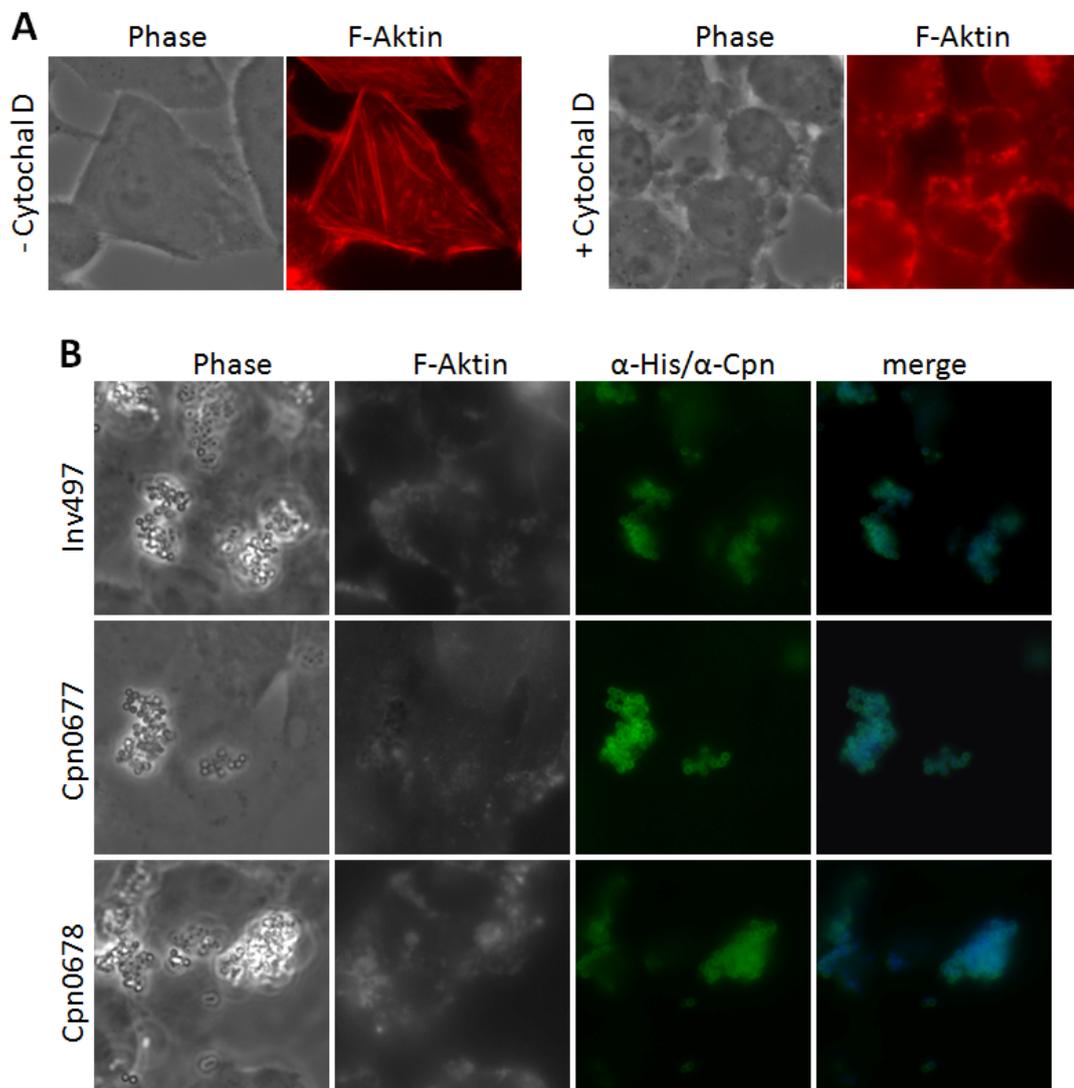


Abbildung 45: Die Internalisierung von rCpn0677-Beads ist abhängig von einem intakten Zytoskelett

A) Repräsentative Mikroskopie von HEp-2 Zellen die ohne bzw. mit 1 μ g/ml Cytochalasin D für 30 min bei 37 °C behandelt wurden. Die Anfärbung von F-Aktin erfolgte durch Rhodamin-Phalloidin.

B) HEp-2 Zellen wurden für 30 min bei 37 °C mit 1 μ g/ml Cytochalasin D vorbehandelt. Blau-fluoreszierende 1 μ m Latexkügelchen beschichtet mit 200 μ g/ml rInv497_{6His}, rCpn0677_{6His} oder rCpn0678_{6His} wurden in 20 fachem Überschuss mit HEp-2 Zellen in Anwesenheit von Cytochalasin D für 3 h bei 37 °C inkubiert und die Zellen mit para-Formaldehyd fixiert und nicht permeabilisiert. Die Detektion extrazellulärer Latexkügelchen erfolgte im Falle von Inv497_{6His} durch His-Antikörper bzw. durch einen Cpn0677- oder Cpn0678-Antikörper.

Nun wurde die Internalisierung von Protein-beschichteten Latexkugeln für 3 h in Anwesenheit von Cytochalasin D durchgeführt. Es zeigten die mit rInv497_{6His}, rCpn0677_{6His} oder rCpn0678_{6His} beschichteten Beads eine starke Adhäsion (Abb. 45 B). Dabei wurden keine Unterschiede in der Adhäsion im Vergleich zu unbehandelten HEP-2 Zellen (siehe Abb. 44) festgestellt, allerdings wurde die Zahl gebundener Beads nicht quantifiziert. Die mit rInv497_{6His} und rCpn0677_{6His}-beschichtete Beads zeigten keine Internalisierung mehr, da alle Beads durch Färbung nicht permeabilisierter HEP-2 Zellen angefärbt wurden (Abb. 45 B).

Zusammenfassend zeigt dies für Cpn0677 eine wichtige Rolle in der Adhäsion und Internalisierung von *C. pneumoniae*, wobei die Internalisierung abhängig von einem intakten Zytoskeletts der humanen Wirtszelle ist. Dagegen vermittelt Cpn0678 nur Adhäsion die, wie auch im Falle von Cpn0677, nicht abhängig von einem intakten Aktinzytoskelett der Wirtszelle ist.

5 Diskussion

Zur Etablierung der Infektion durch *C. pneumoniae* ist die Adhäsion und die darauf folgende Internalisierung der EBs, der essentielle primäre Schritt. Für das *C. pneumoniae* Adhäsin OmcB wurde gezeigt, dass es an Glykosaminoglykane der Wirtszelle bindet (Moelleken and Hegemann 2008). Auch das *C. pneumoniae* Chaperon GroEL1 und der Autotransporter Pmp21 zeigen Adhäsion an Humanzellen (Wuppermann, Molleken et al. 2008) (Schmidt 2009). Viele Pathogene nutzen jedoch multiple Eintrittspforten für die Infektion, was die Existenz entsprechender bakterieller Adhäsine voraussetzt. Daher gibt es für *C. pneumoniae* vermutlich weitere Adhäsion-Rezeptor Kombinationen, die für eine spezifische Adhäsion chlamydialer EBs an verschiedene Zelltypen verantwortlich sind. Weiterhin können durch die EB-Bindung ausgelöste Signalwege die Internalisierung der Chlamydien stimulieren. Eine Beladung von Proteinen auf der Oberfläche von EBs, die eine wichtige Rolle in der Adhäsion und Internalisierung während der initialen Infektion einnehmen, ist somit sehr wahrscheinlich. Die Analyse differentiell exprimierter Gene in der späten Phase des chlamydialen Entwicklungszyklus, während der Re-Differenzierung von RBs in infektiöse EBs, könnte zur Identifikation neuer EB-spezifischer Proteine mit adhäsiver Funktion führen.

Daher wurde in dieser Arbeit basierend auf eigenen Expressionsdaten, das spät in der Infektion exprimierte Gencluster *Cpn0678 – Cpn0676* identifiziert, welches ein koreguliertes Expressionsmuster zeigte und ein neues *C. pneumoniae* Operon darstellt. Hefezellen, die auf der Oberfläche die Proteine Cpn0678, Cpn0677 und Cpn0676 exprimieren, zeigten Adhäsion an HEp-2 Zellen. Latexbeads beschichtet mit rekombinantem Cpn0678 und Cpn0677-Protein zeigten ebenfalls Adhäsion. Cpn0678, Cpn0677 und Cpn0676 sind EB-spezifische Proteine, deren Lokalisation erstmalig nach 60 hpi spät in der Infektion mikroskopisch detektierbar war und sich nur auf die Chlamydien innerhalb der Inklusion beschränkte.

In GST-Pulldown und Crosslinking Experimenten konnte für Cpn0677 und Cpn0678 ein Interaktion mit humanem SNX9 gezeigt werden, welches ein zentrales Protein an der Schnittstelle von Clathrin-vermittelter Endozytose und Reorganisation des Aktinzytoskeletts darstellt. Mit Hilfe von SNX9 „knock-down“-Zelllinien sowie Neutralisationsexperimenten mit einem spezifischen SNX9-Antikörper wurde erstmals eine funktionelle Rolle von SNX9 für die *C. pneumoniae* Infektion gezeigt. Die Kotransfektion von Cpn0678 und SNX9 in Humanzellen zeigte eine Kolo-kalisation und führte zur Ausbildung von Membrantubulationen. Dies zeigt eine Interaktion zwischen SNX9 und Cpn0678, die möglicherweise zu einer Blockierung der SNX9-Funktion führt und SNX9 somit daran gehindert ist, ein erfolgreiches Abschnüren endozytotischer Vesikel zu steuern. Mit rCpn0677 und rCpn0678-beschichtete Latexkugeln induzieren die Bildung von F-Aktin Taschen und mit rCpn0677-beschichtete Latexkugeln werden internalisiert. Wahrscheinlich nehmen Cpn0677 und Cpn0678 daher neben der Adhäsion auch eine prominente Rolle in der SNX9-vermittelten Endozytose ein.

5.1 *Cpn0678 – Cpn0676* stellen ein neues *C. pneumoniae* Operon dar

Die starke phylogenetische Abtrennung der Chlamydien von anderen Bakterien reflektiert sich phänotypisch durch die obligat intrazelluläre Lebensweise und den einzigartigen biphasischen Entwicklungszyklus. In vorhergehenden Arbeiten mit *Chlamydia trachomatis* konnten temporär regulierte Gene identifiziert werden. Dies impliziert ein geordnetes System bei der Regulation der chlamydialen Entwicklung auf Transkriptionsebene (Koo, Walthers et al. 2006). Diese Beobachtungen führen zu der Hypothese, dass ein erheblicher Anteil des chlamydialen Genoms differentiell reguliert sowie koordiniert transkribiert wird und somit zumindest teilweise die beobachteten phänotypischen Veränderungen vermittelt (Nicholson, Olinger et al. 2003), (Belland, Zhong et al. 2003).

Die im Rahmen meiner Diplomarbeit durchgeführte genomweite Genexpressionsanalyse über den chlamydialen Infektionszyklus, führte zur Identifikation des spät in der Infektion Stadien-spezifisch koregulierten Genclusters *Cpn0678 – Cpn0676* (Murra 2005). Die Verifikation der erhaltenen Genexpressionsmuster aus den Mikroarrayanalysen mittels Real Time rt-PCR bestätigte das koregulierte Expressionsmuster, wobei die Kopienzahl (RNA/DNA) für alle 3 Gene nach 48 hpi stark anstieg und dann zu späten Zeitpunkten sukzessive abnahm (Abb. 11 B, Ergebnisse). Die mRNA-Mengen nahmen dabei von *Cpn0678* über *Cpn0677* zu *Cpn0676* kontinuierlich ab. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die 3 Gene ein gemeinsames Transkript bilden, dessen Stabilität jedoch mit zunehmender mRNA-Länge abnimmt oder die Transkription des Clusters mit zunehmender Länge immer häufiger abbricht. Für das Gencluster *Cpn0678 – Cpn0676* wurde durch Transkriptkopplungsanalysen nach 48 und 72 hpi identifiziert, dass es als transkriptionelle Einheit exprimiert wird und somit ein Operon darstellt (Abb. 12, Ergebnisse). Zudem wurde für das Gencluster *Cpn0678 – Cpn0676* ein sehr ähnlicher Expressionsverlauf, wie für das spät in der Infektion exprimierte Adhäsins *omcB* beobachtet. Die Daten dieser Arbeit zeigen somit, dass *Cpn0678*, *Cpn0677* und *Cpn0676* EB-spezifische, spät exprimierte Gene des Infektionszyklus darstellen, die als Operon organisiert sind. Die Befunde für das Gencluster *Cpn0678 - Cpn0676* wurden in parallelen Transkriptanalysen mit *C. pneumoniae* CWL029 bestätigt (Maurer, Mehlitz et al. 2007). Dabei zeigte sich für *Cpn0678 - Cpn0676* erst nach 60 hpi eine Expression und sie wurden daher als sehr spät exprimierte Gene („tardy“) klassifiziert. Zudem beinhaltete die Identifikation von 91 EB-spezifischen Transkripten auch *Cpn0677* und *Cpn0678*. Dies ist in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit generierten Transkriptdaten.

Nur wenige chlamydiale Operons (*hrcA-grpE-dnaK*, *groES-groEL*, *incD-G* und *omcAB*) wurden bislang experimentell identifiziert und diese kodieren stets für funktional verlinkte Proteine (Tan, Wong et al. 1996) (Scidmore-Carlson, Shaw et al. 1999) (Watson, Clarke et al. 1995). Für *C. trachomatis* wurde für die in 10 Operons organisierten Typ III Sekretionssystem(TTSS)-Gene eine Promotoranalyse durchgeführt und resultierte in den in Abb. 46 B als Weblogo dargestellten Nukleotidhäufigkeiten der -35 und -10 Promotorregion, die eine hohe Korrelation zu σ^{70} -ähnlichen Promotorelementen von *E. coli* zeigen (Hefty and Stephens 2007). Auch in der nicht-kodierenden 5'-Region vor *Cpn0678* sind potentielle -35 (TTTTTT) und -10 (TATATT) Promotorelemente zu

finden (Abb. 46 A). Diese zeigen Ähnlichkeit zu den Promotorelementen aus *C. trachomatis* (Abb. 46 B) und vor allem zu den Promotorelementen -35 (TTGTTT) und -10 (TAAAT) aus *C. pneumoniae* (Abb. 46 C), die für die Regulation von Genen des TTSS verantwortlich sind (Hefty and Stephens 2007) (Ouellette, Abdelrahman et al. 2005). Diese Daten unterstützen die aus den Transkriptionskopplungsanalysen erhaltenen Ergebnisse eines *Cpn0678 – Cpn0676* Operons, welches somit potentiell über den σ^{66} -Faktor reguliert wird.

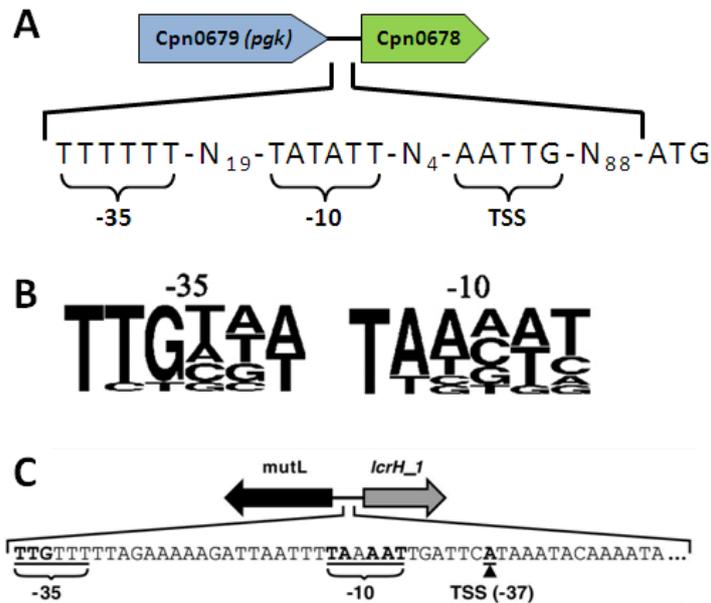


Abbildung 46: Analyse der Transkriptions-Startstelle des *Cpn0678 – Cpn0676* Operons

A) DNA-Sequenz „upstream“ der Transkriptions-Startstelle (TSS) der nicht-kodierenden 5' Region vor dem *Cpn0678 – Cpn0676* Operon. Markiert ist die -35 Region (TTTTTT) und die -10 Region (TATATT). Der Abstand zwischen Transkriptions- und Translations-Startstelle (ATG) beträgt 88 Nukleotide.

B) Darstellung der Nukleotidhäufigkeiten der Promotorelemente von 9 *C. trachomatis* TTSS-Operons dargestellt als Weblogo-Grafik (entnommen aus Hefty *et al.*, 2007)

C) Darstellung der über 5' RACE identifizierten Promotorsequenz des *C. pneumoniae lcrH_1* (*Cpn1021*) Operons, welches aus 4 TTSS-assoziierten Genen besteht, die spät in der Infektion > 48 hpi exprimiert werden (entnommen aus Ouellette *et al.*, 2005).

In der Real Time rt-PCR Analyse zeigten alle 3 Gene des *Cpn0678 – Cpn0676* Operons sehr früh in der Infektion (2 hpi) eine 5 - 10 fach höhere Kopienanzahl (RNA/DNA) als im weiteren Verlauf bis 36 hpi und dies könnte sogenannte „carryover mRNA“ repräsentieren (Abb. 11 B). Chlamydiale EBs enthalten signifikante Mengen an mRNA (sog. carryover mRNA), die jedoch nicht translatiert werden. In genomweiten Genexpressionsstudien von *C. trachomatis* D wurden 26 späte Gene identifiziert, wobei die Verifikation von 8 dieser Gene mittels Real Time rt-PCR jeweils nach 1 hpi eine geringere Transkriptmenge verglichen zu gereinigten EBs (0 hpi) zeigte. Dies unterstützt die Theorie der carryover mRNA für diese Gene (Belland, Zhong et al. 2003). Auch beim *omcB*-Gen nimmt trotz des Vorhandenseins spezifischer mRNA in EBs die Transkriptmenge im weiteren Verlauf stetig ab, da die mRNA vermutlich degradiert wird und keine Synthese des OmcB-Proteins früh in der Infektion stattfindet (Belland, Zhong et al. 2003) (Hatch, Miceli et al. 1986) (Abdelrahman and Belland 2005). Vermutlich haben Chlamydien einen Mechanismus entwickelt, um carryover mRNA von neu transkribierter und translational kompetenter mRNA zu

unterscheiden, möglicherweise durch Prozessierung der carryover mRNA oder durch RNA-bindende Proteine, die carryover mRNA von den Ribosomen entfernen (Abdelrahman and Belland 2005).

5.2 Cpn0677 und Cpn0678 zeigen Adhäsion an Humanzellen

Es besteht die Vermutung, dass spät im Entwicklungszyklus exprimierte Gene für EB-assoziierte Proteine kodieren, die eine wichtige Funktion für neu gebildete EBs während des Adhäsions- und Invasionsprozesses einer neuer Infektionsrunde haben und es spät in der Infektion zu einer Beladung der EBs mit diesen Proteinen kommt (Valdivia 2008). Spät exprimierte Gene kodieren daher vermutlich für oberflächenlokalisierte Proteine der EBs mit einer Funktion in der Adhäsion, Proteine die bei Kontakt der EBs mit der humanen Wirtszelle auf die EB-Oberfläche sekretiert werden oder Proteine die direkt in die Wirtszelle sekretiert werden. Denkbar wäre auch eine Funktion in der intrazellulären Re-Differenzierung von RBs in EBs, bei der Lyse der Wirtszelle oder der Freisetzung einer neuen Generation von EBs über Extrusion.

Das koregulierte Expressionsmuster des spät in der Infektion exprimierten *Cpn0678* – *Cpn0676* Operons und die Ähnlichkeit des Verlaufes zum Adhäsins *OmcB* lassen vermuten, dass eine Beladung der EBs mit diesen Proteinen stattfinden könnte, die in der neuen Infektionsrunde beispielweise bei der Adhäsion benötigt werden. Daher wurde für alle 3 Proteine die Adhäsion an humane HEp-2 Zellen untersucht, durch Expression der chlamydialen Proteine auf der Hefezelloberfläche. Diese Methode wurde bereits erfolgreich zur Identifikation der *C. pneumoniae* Adhäsine *OmcB* und *Pmp21* eingesetzt (Moelleken and Hegemann 2008) (Schmidt 2009). Aga2-*Cpn0678* exprimierende Hefen zeigten eine vergleichbar starke Adhäsion wie Aga2-*Pmp21*-Hefen, während Aga2-*Cpn0677* und Aga2-*Cpn0676* Hefen eine moderate Adhäsion zeigten.

Zur Bestätigung der Adhäsion wurden nun Latexbeads mit rekombinanten *Cpn0678* – *Cpn0676* Proteinen beschichtet. Als Positivkontrolle wurden Latexbeads mit einer Domäne des Invasin-Proteins (*Inv497*) von *Y. pseudotuberculosis* beschichtet, die starke Adhäsion zeigt (Dersch and Isberg 1999). *Inv497*- und *Cpn0678*-Beads zeigten eine gleiche und sehr starke Adhäsion, dagegen *Cpn0677*-Beads eine schwächere Adhäsion und *Cpn0676*-Beads zeigten keine Adhäsion (Abb. 15, Ergebnisse). Somit konnte für *Cpn0678* und *Cpn0677* eindeutig eine adhäsive Eigenschaft mit Hilfe unabhängiger Methoden gezeigt werden, während die Ergebnisse für *Cpn0676* gegenläufig waren. Aufgrund der *in vivo* Synthese von *Cpn0676* in Hefe nimmt das Protein hier vermutlich eine funktionelle Konformation ein, während es bei der Dialyse von rekombinantem *Cpn0676* nach der denaturierenden Aufreinigung zu einer Fehlfaltung und damit zu nicht funktionellem Protein kommen könnte.

Die Proteine *Cpn0678* und *Cpn0677* stellen somit neue *C. pneumoniae* Proteine mit adhäsiven Eigenschaften dar, für die keine orthologen Proteine in *C. trachomatis* existieren. Da *Cpn0678* und *Cpn0677* eine Expansion des *C. pneumoniae* Genoms darstellen, lässt sich eine Spezies-spezifische Funktion der Proteine vermuten, um möglicherweise für eine effiziente Adhäsion zu sorgen. In Bindungsstudien von FITC-markiertem r*Cpn0678* mit Glykosaminoglykan(GAG)-defizienten

Zelllinien, zeigte das Protein eine unverändert starke Adhäsion, sodass GAG-Strukturen als Interaktionspartner nicht in Frage kommen. Denkbar wäre daher eine Interaktion mit anderen proteinösen Strukturen der Humanzelloberfläche wie z.B. einem spezifischen Rezeptor.

Für rCpn0677^{FITC} konnte keine Adhäsion an HEp-2 und GAG-defizienten Zelllinien beobachtet werden, da vermutlich die für die Adhäsion kritischen Aminosäuren durch die FITC-Markierung modifiziert worden sind. Die Markierung mit FITC erfolgt an Aminogruppen von Proteinen und damit bevorzugt an die basischen Aminosäuren Lysin (K), Arginin (R) und Histidin (H). Für *C. pneumoniae* OmcB-Protein wurde ein Heparinbindemotiv aus basischen Aminosäuren identifiziert (XKKXRX und XRRXKX) und auch hier führte die FITC-Markierung zum Verlust der Adhäsion (Daten nicht gezeigt). Daher sind Adhäsionsstudien mit löslichem FITC-markiertem Protein nur bedingt möglich und die Beschichtung von Beads ist vorzuziehen. Bei der nicht-kovalenten Beschichtung von Beads ist zwar auch eine sterische Behinderung gekoppelter Proteine möglich, aber es wird keine biochemische Modifikation des Proteins generiert.

Für die Quantifizierung gebundener Latexbeads an HEp-2 Zellen wurde in dieser Arbeit eine FACS-basierte Analyse etabliert. Dazu war ein Ablösen adhärenter HEp-2 Zellen nötig, ohne die Bindung der Latexbeads aufzuheben. Die Ablösung mit Accutase erhielt die Bindung der Latexbeads, wie durch parallele mikroskopische Auswertung adhärenter HEp-2 Zellen gezeigt werden konnte. Somit konnte die Validität einer FACS-basierten Analyse zur quantitativen Bestimmung des Adhäsionsverhaltens von Protein-gekoppelten Latexbeads an Humanzellen gezeigt werden und erlaubt zukünftig die schnelle und quantitative Untersuchung weiterer chlamydialer Proteine mit adhäsiven Eigenschaften.

5.2.1 Der Einfluss der rekombinanten Protein Cpn0676, Cpn0677 und Cpn0678 auf die *C. pneumoniae* Infektion

Bei der Charakterisierung der *C. pneumoniae* Adhäsine OmcB und Pmp21 führte die Vorbehandlung von HEp-2 Zellen mit jeweils 200 µg/ml rekombinantem Protein zu einer Infektionsreduktion um 80 % bzw. 90 % (Moelleken and Hegemann 2008) (Schmidt 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels rekombinanter Cpn0676, Cpn0677 und Cpn0678 Proteine untersucht, welchen Effekt diese Proteine auf die Adhäsion infektiöser EBs und die Etablierung der Infektion ausüben. Während die Anwesenheit von rCpn0676 zu einer Reduktion der *C. pneumoniae* Infektion führt, zeigten rCpn0677 und rCpn0678 einen stimulatorischen Effekt auf die Infektion. Dabei waren die Infektionsänderungen maßgeblich vom Vorhandensein ungebundenen löslichen Proteins abhängig. In allen Fällen waren Größe und Morphologie der gebildeten Inklusionen unverändert, sodass die intrazelluläre Entwicklung der Chlamydien nicht betroffen war. Ein Anstieg der chlamydialen Infektion durch Vorbehandlung mit rekombinantem Protein wurde bisher noch nie beschrieben. Abhängig von der eingesetzten Menge an EBs, des Proteins und der parallelen Inkubationsdauer von Protein und EBs konnte dabei ein erstaunlicher Anstieg um bis zu Faktor 20 beobachtet werden. Von den gradientengereinigten EBs wurde zwar jeweils die Zahl Einschlussbildender Einheiten/ml (infection forming units = IFU/ml) bestimmt. Alle Experimente wurden

unter stationären Bedingungen (ohne Zentrifugation) durchgeführt und es zeigt sich, dass viele der EBs nicht die Fähigkeit haben an Humanzellen zu adhären um eine produktive Infektion zu generieren. Die Effekte der rekombinanten Proteine rCpn0676, rCpn0677 und rCpn0678 auf die chlamydiale Adhäsion und Infektion sind in Abb. 47 schematisch zusammengefasst und berücksichtigen zudem, die in dieser Arbeit beobachteten *in vitro* Interaktionen zwischen den einzelnen Proteinen.

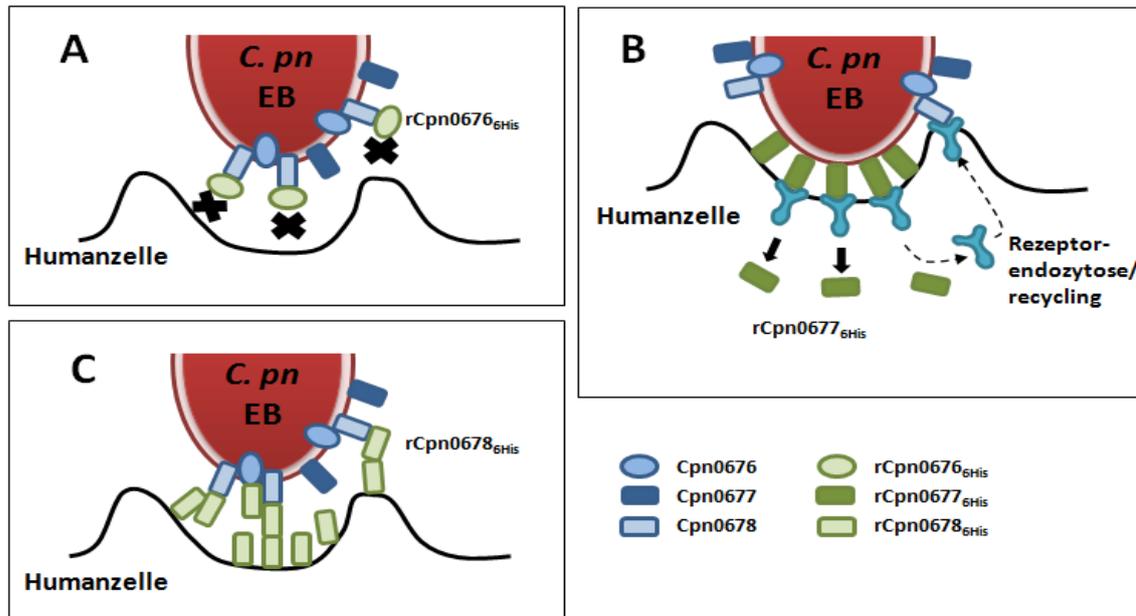


Abbildung 47: Einfluss von rCpn0676_{6His} – rCpn0678_{6His} auf die *C. pneumoniae* Adhäsion und Infektion

A) Das rCpn0676_{6His}-Protein zeigte keine Bindung an Humanzellen, jedoch führte die parallele Inkubation von Protein und EBs mit HEp-2 Zellen zu einer reduzierten Infektion. Da *in vitro* eine Interaktion zwischen rCpn0676_{6His} mit rCpn0678_{6His} gezeigt wurde, könnte also auch rCpn0676_{6His} mit dem nativen Cpn0678-Protein auf der EB-Oberfläche interagieren. Dadurch würde das Cpn0678-Protein abgesättigt werden und in einer reduzierten Infektion resultieren.

B) Das rCpn0677_{6His}-Protein bindet an Humanzellen, erhöht die Adhäsion von EBs sowie die Infektion und wird zudem internalisiert. Das rCpn0677_{6His}-Protein zeigte keine Interaktion mit rCpn0676_{6His} oder rCpn0678_{6His} und auch nicht mit sich selbst. Daher wäre eine Interaktion von rCpn0677_{6His} mit anderen Komponenten der chlamydialen Außenmembran denkbar. Durch die Adhäsion an Humanzellen könnte somit eine Quervernetzung zwischen EBs und der Humanzelle stattfinden. Zudem könnte internalisiertes rCpn0677_{6His} zu einem erhöhten „turnover“ von Rezeptoren führen, die somit in größerer Zahl zur Verfügung stehen und einer zunehmenden Zahl an EBs die Adhäsion an Humanzellen ermöglichen könnten.

C) Das rCpn0678_{6His}-Protein bindet an Humanzellen, interagiert sowohl mit rCpn0676_{6His} als auch mit sich selbst und liegt als rekombinantes Protein vermutlich als Dimer vor. Somit wäre denkbar, dass rCpn0678_{6His} auch mit nativen Cpn0676 und Cpn0678-Proteinen auf der Oberfläche von EBs interagiert. Durch die Fähigkeit zur Dimerisierung könnte somit gebundenes rCpn0678_{6His} auf EBs mit gebundenem rCpn0678_{6His} auf Humanzellen interagieren. Dies würde zur erhöhten Adhäsion und Infektion führen.

Die Ergebnisse zum Adhäsions- und Internalisierungsverhalten von EBs zeigten für rCpn0677 und rCpn0678 bei 37°C eine erhöhte Assoziation von EBs mit Humanzellen. Wurde jedoch nur die Adhäsion von EBs (4°C) untersucht, Bedingungen unter denen endozytotische Prozesse und Rezeptorrecycling stark verlangsamt sind, so führte rCpn0677 erneut zu einer erhöhten Adhäsion, während rCpn0678 die Adhäsion stark blockierte. Somit könnte rCpn0678 bei 37°C entweder die Humanzelle stimulieren oder eine Interaktion mit EBs eingehen, die bei 4°C nicht stattfand.

Vermutlich verfügt rCpn0678 erst bei 37°C über die volle Funktionalität, die zu einer Aktivierung der Humanzelle oder EBs führt. Zudem könnte ungebundenes lösliches rCpn0678 mit Ober-

flächenproteinen der EBs interagieren und es auch nicht kompetenten EBs ermöglichen in besseren Kontakt mit der Wirtszelle zu gelangen. Dies kann unterstützt werden durch die Beobachtung, dass rCpn0678 in der Lage war eine durch Heparinzugabe blockierte Infektion wieder zu verstärken. Dagegen konnte rCpn0677 die durch Heparinzugabe blockierte Infektion nicht verstärken, sodass rCpn0677 vermutlich nicht mit EBs interagiert. Nach Vorinkubation der Humanzellen mit rCpn0677 bei 37°C, war die Adhäsion von EBs bei 4°C als auch die Internalisierung von EBs bei 37°C erhöht. Das Protein scheint daher auf einem anderen Weg die Adhäsion von EBs positiv zu beeinflussen. Durch die Vorbehandlung der Zellen mit rCpn0677 wäre daher eine vermehrte Aktivierung von Signalwegen der Wirtszelle denkbar, was einen erhöhten Umsatz von Rezeptoren zur Folge haben könnte. Somit würden mehr EBs an Zellen binden und auch internalisiert werden (Abb. 47 B). Dabei erfolgt die Stimulation durch rCpn0677 vermutlich auch intrazellulär, da eine Internalisierung von rCpn0677 beobachtet wurde.

Homologe Proteine zu Cpn0677 und Cpn0678 existieren nicht in *C. trachomatis*, während es für Cpn0676 das zu 39 % homologe Protein CT695 gibt. Daher wurde untersucht, ob die durch rCpn0677 und rCpn0678 beobachtete Infektionserhöhung ein Spezies-spezifischer Effekt ist. Jedoch ist rCpn0677 auch in der Lage die *C. trachomatis* Infektion zu erhöhen, während äquimolare Mengen an rCpn0678 und rCpn0676 keinen Einfluß auf die Infektion zeigten (Abb. 30, Ergebnisse). Dies bekräftigt die Vermutung, dass rCpn0677 eine generelle Erhöhung der Endozytoserate auslöst, durch Aktivierung von Signalwegen in der Wirtszelle und somit auch die Aufnahme anderer chlamydialer Spezies fördert. Eine Interaktion von rCpn0678 mit oberflächenlokalisiertem nativem Cpn0678 auf EBs oder einem anderen *C. pneumoniae* spezifischen Protein, würde die beobachteten Spezies-spezifischen Unterschiede in der Infektion erklären.

Auch die Vermutung der Interaktion von Cpn0676 mit *C. pneumoniae* EBs wird unterstützt durch die Ergebnisse, dass Cpn0676 die *C. trachomatis* Infektion nicht beeinflusst, jedoch die *C. pneumoniae* Infektion reduziert. In Experimenten mit Latexkügelchen konnte gezeigt werden, dass die Vorinkubation von HEp-2 Zellen mit rCpn0678 zu einer 7-fachen Erhöhung gebundener Cpn0676-Latexbeads führt und lässt vermuten, dass beide Proteine miteinander interagieren. Dies wurde durch Far-Western Blot Daten unterstützt, bei dem biotinyliertes rCpn0676 mit nativem rCpn0678_{6His} auf der Membran interagierte. Weiterhin zeigten Cpn0676 und Cpn0678 ein identisches Löslichkeitsverhalten in Detergenzien, da sie nicht mit Triton solubilisiert wurden, was auf eine ähnliche Lokalisierungssituation beider Proteine in EBs schließen lässt (Abb. 26, Ergebnisse). Während Cpn0678 in der äußeren Membran von EBs verankert und stark oberflächenexponiert sein könnte, wäre für Cpn0676 eine Lokalisation in dem Periplasma zugewandten Teil der äußeren Membran von EBs denkbar. Weiterhin wurde in einem nicht-denaturierenden SDS-Gel für natives rCpn0678 eine zusätzliche Bande bei doppelter Laufhöhe detektiert, was eine Dimerisierung des Proteins vermuten lässt (Abb. 33 D, Ergebnisse). Auch bekräftigt die Interaktion von biotinyliertem rCpn0678 mit nativem rCpn0678 im Far-Western Blot diese Hypothese, während für Cpn0677 im Far-Western Blot keine Interaktion mit sich selbst beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt).

5.3 Cpn0676 – 678 werden spät im Infektionszyklus exprimiert und kodieren für EB-spezifische Proteine

Bei der Untersuchung der Proteinexpression in Westernblots ist Cpn0678 erstmalig nach 48 hpi, Cpn0676 erst später als 48 hpi detektierbar und Cpn0677 erst nach 60 hpi signifikant detektierbar (Abb. 23, Ergebnisse). Auch in Westernblots aufgereinigter RBs (36 hpi) und EBs (80 hpi) konnten alle 3 Proteine als EB-spezifische Proteine detektiert werden. Diese Befunde werden unterstützt durch 2D-PAGE Proteomanalysen von *C. pneumoniae* EBs, in denen Cpn0677 zu den 16 abundan- testen Proteinspots gehörte (Vandahl, Birkelund et al. 2001). Mittels indirekter Immunfluoreszenz konnten Cpn0678 – Cpn0676 erstmals 60 hpi und im weiteren Verlauf der Infektion ausschließlich assoziiert mit Chlamydien innerhalb der Inklusion detektiert werden (Abb. 24, Ergebnisse).

5.3.1 Cpn0677 und Cpn0678 lokalisieren auf der EB-Oberfläche

Da es sich bei Cpn0678, Cpn0677 und Cpn0676 um EB-spezifische Proteine handelt, wurde die Lokalisation der Proteine während der Adhäsion (4°C) und Internalisierung (37°C) fluoreszenz- mikroskopisch untersucht. Für Cpn0678 und Cpn0677 war bei 4°C und 37°C jeweils eine kreisförmige Färbung und komplette Kolo-kalisation mit dem Oberflächenprotein MOMP zu beobachten, sodass beide Proteine während der Adhäsion und Internalisierung auf der EB-Oberfläche vorliegen (Abb. 29, Ergebnisse). Dagegen zeigte Cpn0676 auch eine ringförmige Färbung, die aber nicht mit MOMP kolo-kalisierte, sondern sich innerhalb des MOMP-Ringes befand. Somit könnte Cpn0676 möglicherweise in der inneren Membran oder im Periplasma der EBs lokalisieren.

Aufgrund der adhäsiven und infektionssteigernden Eigenschaften von Cpn0677 und Cpn0678 und der Kolo-kalisation mit MOMP in der Immunfluoreszenz von EBs, wurde die Oberflächenlokalisation in weiteren Experimenten genauer charakterisiert. Dot Blot Experimente wurden bereits in der Vergangenheit zur Analyse der Zugänglichkeit von MOMP-Antikörpern sowie der Detektion von Antigenen auf der chlamydialen Oberfläche mittels einer humanen Antikörperbibliothek verwendet (Zhang, Watkins et al. 1987) (Lindquist, Marks et al. 2002). Eine Proteinase K Behandlung der EBs diente der Untersuchung der Antigensensitivität und es zeigte sich für Cpn0677 und Cpn0678 bei EB-Behandlung mit 200 µg/ml Proteinase K eine nahezu vollständiger Verlust einer Antikörperreaktivität. Dies belegt erneut die EB-Oberflächenlokalisation beider Proteine (Abb. 25, Ergebnisse). Cpn0676 zeigte dagegen nach Proteinase K Behandlung nur eine leicht reduzierte Antikörperreaktivität, was auf eine partielle Oberflächenlokalisation hindeutet.

Die Charakterisierung der Oberflächenlokalisation EB-spezifischer Proteinen mittels Antikörperfärbung und anschließender FACS-Analyse wurde bereits erfolgreich eingesetzt (Montigiani, Falugi et al. 2002). Unter Anwendung dieses experimentellen Ansatzes wurde mit den finalen Cpn0677- und Cpn0678-Seren eine vergleichbare Fluoreszenz wie mit einem LPS-Antikörper als Positivkontrolle für eine oberflächenlokalisierte Struktur erzielt. Da sowohl mit den korrespondierenden Präimmunseren wie auch mit einer intrachlamydialen S1-Kontrolle keine Färbung erzielt wurde,

müssen Cpn0677 und Cpn0678 auf der EB-Oberfläche für die Antikörper zugänglich sein. Mit dem Cpn0676-Serum dagegen war die Fluoreszenz deutlich geringer und dies korreliert daher mit dem Dot Blot Ergebnis, sodass Cpn0676 vermutlich nur partiell oberflächenzugänglich ist. Dagegen zeigt sich für Cpn0677 und Cpn0678 in beiden experimentellen Ansätzen eine eindeutige Oberflächenlokalisation auf EBs.

5.3.2 Cpn0677 und Cpn0678 vermitteln die chlamydiale Infektion

Es wurde bereits für die chlamydialen Außenmembrankomponenten MOMP, Pmp21, OmcB und LPS eine Funktion in der Adhäsion gezeigt bzw. disuziert, da durch Zugabe spezifischer Antikörper die Infektion reduziert (neutralisiert) werden konnte (Su, Morrison et al. 1990) (Schmidt 2009) (Moelleken and Hegemann 2008) (Peterson, de la Maza et al. 1998). Die Infektionsreduktion resultiert dabei aus einer Interaktion des Antikörpers mit dem chlamydialen Adhäsin, wodurch die Bindung von EBs an die Wirtszelle unterbunden wird. Vermutlich kann es dabei auch zur sterischen Behinderung benachbarter Liganden mit adhäsiven Eigenschaften kommen.

Die Vorbehandlung der EBs mit dem Cpn0677- und Cpn0678-Antikörper zeigte ein stark reduzierte Infektion die abhängig von der Antikörperkonzentration in einer Restinfektion von 34 % bzw. 25 % resultierte, sodass beide Proteine wesentlich an der Etablierung der Infektion beteiligt sind (Abb. 27 Ergebnisse). Dagegen zeigte der Cpn0676-Antikörper nur eine sehr geringe neutralisierende Wirkung verglichen zu den Cpn0677- und Cpn0678-Antikörpern. Daher ist Cpn0676 vermutlich nicht direkt an den EB-Humanzell-Wechselwirkungen beteiligt und spielt nur eine untergeordnete Rolle. Jedoch muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden, ob durch steigende Konzentrationen des Cpn0676-Antikörpers die Infektion noch weiter blockiert werden kann.

5.4 Cpn0677 und Cpn0678 interagieren mit SNX9 *in vitro* und mit endogenem SNX9 an der Plasmamembran

Die bioinformatische Analyse von Cpn0678 führte zur Identifikation von 3 aufeinanderfolgenden Prolin-reichen Wiederholungen (PRR) mit einer Länge von jeweils 22 Aminosäuren (AS). Zusätzlich wurde in den Proteinen Cpn0678 und Cpn0677 jeweils ein Bereich von 31 Aminosäuren identifiziert, bestehend aus dem kompletten PRR1 und 6 AS des PRR2, der bis auf 3 Positionen identisch ist. Auch das EspF Protein von *enteropathogenen Escherichia coli* (EPEC) besitzt 3 Prolin-reiche Wiederholungen (PRRs) mit einer Länge von jeweils 47 Aminosäuren. PRRs sind verbreitet in Proteinen die schnelle und schwache aber spezifische Bindestellen zur Verfügung stellen, wie sie bei der Aktivierung von Signalkaskaden oder beim Umbau des Zytoskeletts benötigt werden (Kay, Williamson et al. 2000). Das TTSS-Effektorprotein EspF wird in die Humanzelle sekretiert, wo es über die PRRs sehr spezifisch mit der SH3-Domäne von SNX9 wechselwirkt, um so eine Remodulierung der Wirtszellmembran zu verursachen (Alto, Weflen et al. 2007). Durch Screening einer Peptidbibliothek wurde RxAPxxP als Konsensusmotiv für die Interaktion mit SNX9-SH3

identifiziert und vermutlich wird durch jedes PRR die Proteinavidität erhöht bzw. eine Oligomerisierung von SNX9 induziert und so N-WASP für die sukzessive Einleitung der Aktinpolymerisation aktiviert (Alto, Weflen et al. 2007) (Yarar, Waterman-Storer et al. 2007). Die Interaktion von EspF mit SNX9-SH3 vermittelt über die C-terminale BAR-Domäne von SNX9 ein membranmodulierendes Signal, da durch EspF induzierte Membrantubulationen nicht in BAR-Domäne Deletionsmutanten auftreten. Auch können Membrantubulationen nicht durch eine EspF-Mutante induziert werden, in der das basische Arginin des Konsensusmotives aller 3 PRRs durch die saure Asparaginsäure ersetzt wurde (Alto, Weflen et al. 2007).

Cpn0678 verfügt über 3 deutlich kürzere PRRs als EspF, während Cpn0677 nur ein komplettes PRR mit hoher Identität zum PRR1 von Cpn0678 aufweist und noch ein partielles PRR2 besitzt (Abb. 35, Ergebnisse). Das Konsensusmotiv RxAPxxP tritt bei Cpn0678 und Cpn0677 jeweils nur im PRR1 auf und beide Proteine besitzen im Gegensatz zu EspF vermutlich keine N-WASP Binde-domäne. Das N-terminale Fragment Cpn0678N enthält keine PRRs und zeigte Adhäsion sowie eine Erhöhung der Infektion, wenn auch schwächer als das Volllängenprotein Cpn0678. Dagegen zeigt das C-terminale Fragment Cpn0678C mit den 3 PRRs weder Adhäsion noch wirkt es auf die Infektion. In Crosslinking-Experimenten von rCpn0677_{6His} oder rCpn0678_{6His} mit Oberflächenproteinen von HEp-2 Zellen, konnte durch Immunopräzipitation mittels SNX9-Antikörper die Interaktion beider Proteine mit endogenem SNX9 gezeigt und durch GST-Pulldown Experimente mit GST-SNX9 Fusionsproteinen bestätigt werden (Abb. 36, Ergebnisse). Detaillierte Studien mittels Far-Western Blots zeigten die Interaktion von Cpn0677N (2 PRRs) und Cpn0678C (3 PRRs), ausschließlich mit der SH3-Domäne von SNX9, während Cpn0678N auch eine leichte Interaktion mit der PX-BAR Struktureinheit von SNX9 zeigte (Abb. 36, Ergebnisse). Zudem konnte mittels Immunfluoreszenz in nicht-permeabilisierten Zellen eine Oberflächenlokalisation von endogenem SNX9 gezeigt werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass rCpn0677_{6His} und rCpn0678_{6His} in der Lage sind, auf der Oberfläche von Humanzelle mit SNX9 zu interagieren.

5.4.1 Intrazellulär exprimiertes Cpn0678 oder Cpn0677 interagiert mit SNX9, jedoch nur Cpn0678 induziert Membrantubulationen

Da Cpn0677 und Cpn0678 auf der EB-Oberfläche während der Adhäsion und Internalisierung lokalisieren, könnte eine Interaktion mit SNX9 an der Plasmamembran stattfinden. Daher wurden zunächst zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation GFP-Cpn0677 und GFP-Cpn0678 in Hefe sowie in humanen HEK-293T Zellen exprimiert. Dabei zeigte Cpn0678 jeweils eine Lokalisation ausschließlich an der Plasmamembran, wie durch Kolo-kalisation mit dem humanen Plasmamembranmarker WGA bestätigt wurde. Cpn0677 zeigte in Hefe und Humanzellen eine partielle Plasmamembran- und Zytosollokalisation. Da kein orthologes Protein zu SNX9 in Hefe existiert und endogenes SNX9 nicht mit GFP-Cpn0677 und GFP-Cpn0678 in transfizierten Zellen kolo-kalisiert, müssen Cpn0677 und Cpn0678 auch noch mit anderen Proteinen evtl. auch Rezeptoren interagieren, was zur Lokalisation an der Plasmamembran führen könnte.

EspF zeigt eine hohe Dynamik an der Plasmamembran und akkumuliert in „patches“ an der Zelloberfläche. Dabei zeigt sich eine partielle Kolokalisation mit Clathrin, allerdings verweilt EspF länger an der Plasmamembran als internalisierte „clathrin-coated vesicles“, sodass EspF vermutlich mit der Plasmamembran und nicht mit „clathrin-coated pits“ (CCP) assoziiert ist (Alto, Weflen et al. 2007). Die Transfektion von EspF in wildtypische Humanzellen führte zu einer leichten Redistribution von endogenem SNX9 in „Wurm-ähnliche“ tubuläre Strukturen nahe der Zellperipherie (Abb. 48 A - C) (Alto, Weflen et al. 2007). Die Kotransfektion von EGFP-EspF und mcherry-SNX9 dagegen führte zur Induktion eines Netzwerkes an tubulären Strukturen an denen beide Proteine kolokalisieren, da vermutlich EspF an die SNX9-SH3 Domäne bindet und so die C-terminale BAR Domäne von SNX9 exponiert, was zur Induktion von Membranremodulierungen führt (Abb. 48 D - F) (Alto, Weflen et al. 2007).

Für das *C. trachomatis* Protein CT694 konnte eine heterologe Expression in *Y. pseudotuberculosis* über einen TTSS-abhängigen Mechanismus gezeigt werden. CT694 interagiert mit dem humanen AHNAK-Protein, welches als Gerüstprotein in membranassoziierten Signalwegen dienen könnte (Hower, Wolf et al. 2009). Die Transfektion von GFP-CT694 in HeLa-Zellen zeigte eine Lokalisation in der Zellperipherie, möglicherweise in Assoziation mit der Plasmamembran und CT694 kolokalisierte dort mit AHNAK (Abb. 48 G - I) (Hower, Wolf et al. 2009).

Bei Transfektion von Cpn0678 in Humanzellen wurde eine Lokalisation an der Plasmamembran, jedoch keine Kolokalisation mit endogenem SNX9 beobachtet (Abb. 48 J - L). Interessanterweise resultierte aber auch die Kotransfektion von Cpn0678 und SNX9 in der Ausbildung ausgeprägter Membrantubulationen, an denen beide Proteine kolokalisieren (Abb. 48, M - O).

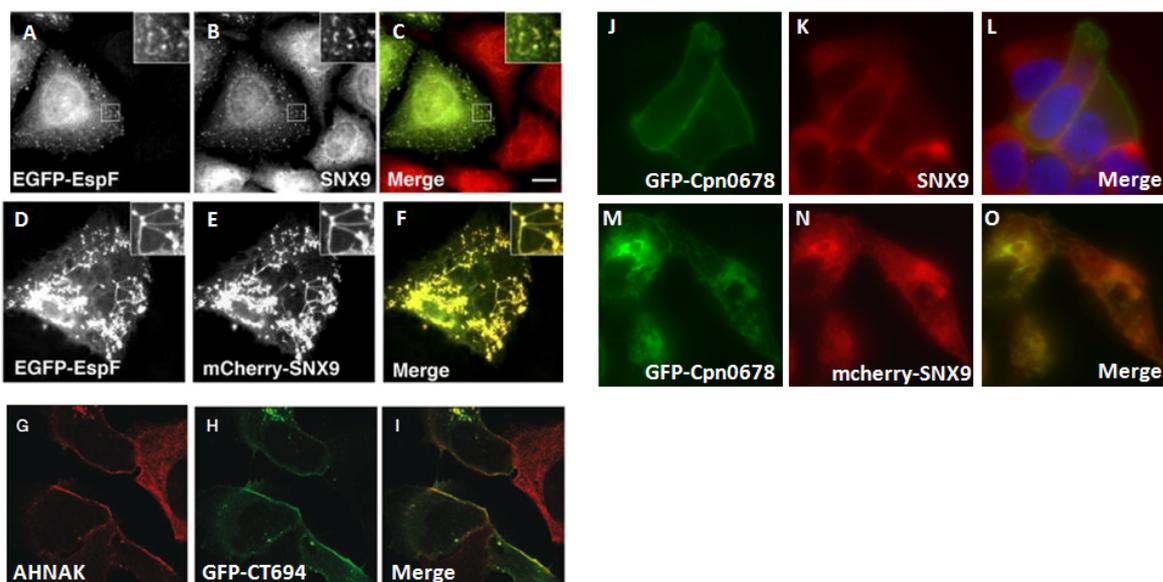


Abbildung 48: Intrazelluläre Lokalisation von EspF, CT694 und Cpn0678

A-C) Mikroskopie von HeLa-Zellen transfiziert mit EGFP-EspF und Färbung von endogenem SNX9 (Alto *et al.*, 2007).

D-F) Mikroskopie von HeLa-Zellen kotransfiziert mit EGFP-EspF und mCherry-SNX9 (Alto *et al.*, 2007).

G-I) Mikroskopie von HeLa-Zellen transfiziert mit GFP-CT694 und Färbung von endogenem AHNAK (Hower *et al.*, 2009).

J-L) Mikroskopie von HEK293-Zellen transfiziert mit GFP-Cpn0678 und Färbung von endogenem SNX9.

M-O) Mikroskopie von HEK293-Zellen kotransfiziert mit GFP-Cpn0678 und mCherry-SNX9.

Auch die Kotransfektion von Cpn0678N und SNX9 führte zur Kollokalisierung prädominant an der Plasmamembran, induzierte aber keine Membrantubulationen. Die Kotransfektion von Cpn0678C und SNX9 führte zu einer Kollokalisierung, jedoch ausschließlich im Zytoplasma der Zelle. Daher scheint der N-terminale Bereich von Cpn0678 für die Lokalisation an der Plasmamembran ausreichend zu sein und interagiert vermutlich mit der PX-BAR Struktureinheit von SNX9, während die PRRs in Cpn0678C mit der SH3-Domäne von SNX9 interagieren. Somit ist Cpn0678 vergleichbar zu EspF vermutlich in der Lage, über die PRRs eine Aktivierung bzw. Oligomerisierung von SNX9 und sukzessive Ausbildung von Membrantubulationen zu induzieren. Die Kotransfektion von Cpn0677 und SNX9 führte zu einer kompletten Kollokalisierung, die jedoch ausschließlich auf das Zytoplasma beschränkt war. Da Cpn0678 nicht wie Cpn0677 ausschließlich mit der SH3-Domäne von SNX9 interagiert, wäre eine Interaktion des EB-oberflächenlokalisierten Cpn0678 mit der PX-BAR-Struktureinheit von SNX9 in der chlamydialen Infektion denkbar. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass geringe Mengen der Proteine Cpn0677 und Cpn0678 in die Humanzellen sekretiert werden, die in der Immunfluoreszenz während der Adhäsion und Internalisierung von EBs nicht detektierbar waren. Zudem könnten weitere, bislang nicht identifizierte chlamydiale Proteine sekretiert werden, die mit der intrazellulären SNX9-SH3-Domäne interagieren und so die Oligomerisierung von SNX9 für die Einleitung der Endozytose stimulieren.

5.4.2 SNX9 ist an der Aufnahme von *C. pneumoniae* beteiligt

Die Depletion der schweren Ketten von Clathrin mittels RNA Interferenz zeigte eine ausgeprägte, jedoch nicht essentielle Beteiligung von Clathrin an der Aufnahme der *C. trachomatis* Serovare L2 und D (Hybiske and Stephens 2007). Weiterhin konnte eine direkte Interaktion von Clathrin mit einer Region von SNX9 gezeigt werden, die zwischen der SH3 und PX-Domäne („low complexity region“) liegt (Lundmark and Carlsson 2003). In lentiviral transduzierten HEK293T-Zelllinien wurden sog. *short-hairpin* RNAs exprimiert, die gegen SNX9 gerichtet sind. Dies erlaubte die Untersuchung der Rolle von SNX9 in der chlamydialen Infektion. Zellen mit nur noch 9 % der normalen endogenen SNX9-Proteinmenge zeigten verglichen zur Kontrollzelllinie eine um 50 % reduzierte Infektion mit *C. pneumoniae* (Abb. 40, Ergebnisse). Auch die Vorinkubation von HEP-2 Zellen mit einem SNX9-Antikörper resultierte in einer Reduktion der *C. pneumoniae* Infektion auf 69 %. Beide Experimente zeigen damit erstmalig eine relevante und funktionelle Rolle von SNX9 in der Etablierung der *C. pneumoniae* Infektion.

Allerdings zeigt sich in SNX9-depletierten Zellen nach Inkubation von EBs mit exogenem rCpn0677_{6His} und rCpn0678_{6His} immer noch eine Infektionserhöhung, sodass Cpn0677 und Cpn0678 möglicherweise nicht auf die alleinige und direkte Interaktion mit SNX9 angewiesen sind. Da der knockdown von SNX9 nicht vollständig war, könnte auch die in den Zellen vorhandene Restmenge an SNX9 ausreichend für eine Infektionsstimulation sein. Denkbar wäre auch, dass ein anderes Mitglied der SNX-Familie die Funktion des SNX9-Proteins übernimmt.

5.4.3 Der N-Terminus von Cpn0678 und CT694 weist ein gemeinsames GxxxG-Motiv auf

Für EspF und CT694 wurden keine Untersuchungen zur Adhäsion der Proteine durchgeführt, da es sich um sekretierte TTSS-Effektoren handelt. Jedoch hatte eine Deletion von EspF keinen Einfluss auf die Adhäsion von EPEC. Die Lokalisation von GFP-Cpn0678 an der Plasmamembran ähnelt stark der Lokalisation von CT694 (Abb. 48). Ein Alignment von Cpn0678 und CT694 zeigte bei AS 38 - 63 einen Bereich hoher Homologie zwischen den Proteinen, sowie interessanterweise ein GxxxG Motiv an Position 44 – 48 (Abb. 49). GxxxG-Motive sind wichtig für α -Helix Interaktionen vieler Transmembrandomänen von Proteinen und für die Ausbildung von Dimeren, was im Falle des VacA-Toxins von *Helicobacter pylori* zur Ausbildung von Membrankanälen führt (Russ, 2000) (McClain, 2003). Ob das GxxxG-Motiv wichtig für die Adhäsion sowie die Protein-Protein-Interaktion von intrazellulär exprimiertem GFP-Cpn0678 mit anderen Proteinen an der Plasmamembran ist, kann zur Zeit nur spekuliert werden, ist aber Bestandteil weiterer Untersuchungen.

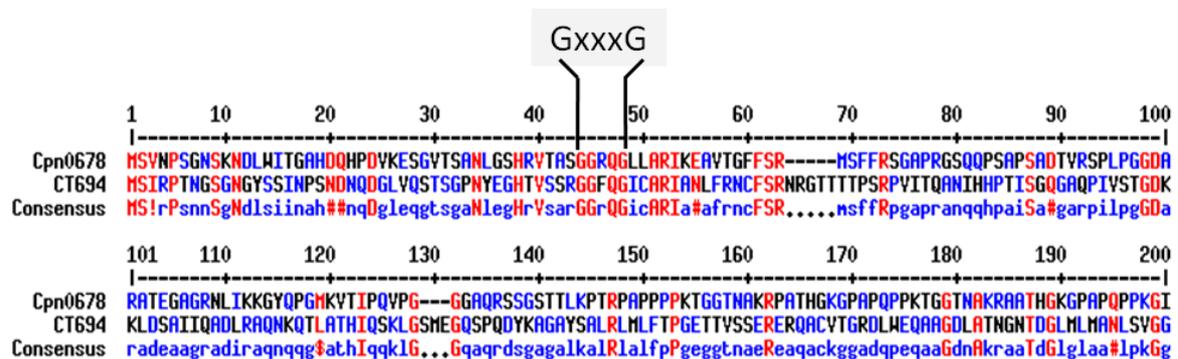


Abbildung 49: Alignment des *C. pneumoniae* Cpn0678 und *C. trachomatis* CT694 Proteins

Das Alignment wurde mittels MultAlin generiert und zeigt das konservierte GxxxG-Motiv. Innerhalb der ersten 100 Aminosäuren sind beide Sequenzen zu 23 % identisch und innerhalb der Aminosäuren 100 – 200 nur zu 11 % identisch. Rot: > 90% Ähnlichkeit, Blau: > 50% Ähnlichkeit

5.5 Die intrazelluläre Expression von Cpn0678 inhibiert die Endozytose von Transferrin

Ein Ausschalten von endogenem SNX9 mittels siRNA resultiert in einer 45%igen Inhibition der Transferrinaufnahme (Soulet, Yarar et al. 2005). Die in dieser Arbeit verwendete SNX9-knockdown Zelllinie wurde bislang noch nicht auf das Endozytoseverhalten von Transferrin untersucht. Tatsächlich konnten jedoch keine Unterschiede in der Aufnahme von Transferrin für die Zelllinie mit 90%igem SNX9-knockdown verglichen zur Kontrollzelllinie beobachtet werden (Abb. 52, Anhang). Jedoch zeigte sich bei intrazellulärer Expression von GFP-Cpn0678 in humanen HEK293T-Zellen eine Akkumulation von Transferrin an der Plasmamembran und eine starke Inhibition der Endozytose (Abb. 42, Ergebnisse). Dagegen wiesen Zellen die nur GFP exprimieren eine normale Endozytose von Transferrin auf. Nach intrazellulärer Expression lokalisiert GFP-Cpn0678 an der Plasmamembran und interferiert vermutlich mit der Rezeptor-vermittelten Endozytose von

Transferrin. Denkbar wäre eine Depletion des für die Endozytose benötigten freien SNX9-Pools in Zellen durch Interaktion des stark überexprimierten GFP-Cpn0678 mit endogenem SNX9 oder auch eine Interaktion mit anderen bei der Endozytose benötigten Komponenten.

Interessanterweise zeigte GFP-Cpn0678N auch eine Lokalisation an der Plasmamembran, aber die Endozytose von Transferrin war nicht beeinflusst (Abb. 54, Anhang). Dies unterstützt die Theorie einer Depletion von SNX9 durch Interaktion mit Cpn0678, da auch nur das Volllängenprotein in der Lage ist SNX9 zu aktivieren und Membrantubulationen auszulösen.

5.6 rCpn0677 induziert Internalisierung in HEp-2 Zellen

Nachdem durch intrazelluläre Expression von Cpn0678 die Endozytose von Transferrin blockiert war, stellte sich die Frage ob extrazelluläres rCpn0677_{6His} oder rCpn0678_{6His}, neben der erhöhten EB-Adhäsion auch die Endozytose modulieren kann. Dabei wurde Transferrin als Marker für die Clathrin-vermittelte Endozytose verwendet. In einer Kinetik war mit zunehmender Zeit eine steigende Menge an intrazellulärem endozytiertem Transferrin nachweisbar (Abb. 43, Ergebnisse). Durch rCpn0677_{6His} und rCpn0678_{6His} war sowohl die Zeitkinetik als auch die Totalmenge an endozytiertem Transferrin unverändert. Somit führt exogenes rCpn0677_{6His} und rCpn0678_{6His} zu keiner Veränderung der Clathrin-vermittelten Endozytoserate von Humanzellen. Interessanterweise wurde jedoch rCpn0677_{6His} endozytiert, da im Cpn0677-Blot zwischen 15 - 60 min ein stark zunehmendes Signal für Cpn0677 in Zellextrakten detektierbar war (Abb. 43 B, Ergebnisse).

Aufgrund der Internalisierung von löslichem rCpn0677_{6His} wurde untersucht ob auch mit rCpn0677_{6His}-beschichtete Latexkügelchen internalisiert werden. Die Invasin-Domäne Inv497 von *Y. pseudotuberculosis* führte bei Beschichtung von Latexbeads zu deren Internalisierung in HEp-2 Zellen (Dersch and Isberg 1999). Weder parallel mit Transferrin inkubiertes rCpn0678_{6His}, noch mit rCpn0678-beschichtete Latexkügelchen wurden internalisiert. Interessanterweise wurden aber mit rCpn0677-beschichtete Latexbeads zu 76 % von HEp-2 Zellen internalisiert. Dies zeigt das eine Endozytose von rCpn0677_{6His} auch unabhängig von Transferrin erfolgt. Damit ist Cpn0677 das erste chlamydiale Protein, welches in Zellen internalisiert wird. Weiterhin zeigen vorläufige Daten, dass mit rCpn0677N_{6His}-beschichtete Latexbeads, bestehend aus den Aminosäuren 1 - 124 (PRR1 und PRR2), nicht in HEp-2 Zellen internalisiert werden. Daher muss im C-terminalen Teil von Cpn0677, die für eine Internalisierung verantwortliche Domäne und im N-terminalen Bereich von Cpn0677 und Cpn0678, die für die Adhäsion wichtige Domäne liegen. Dies ist Bestandteil gegenwärtiger Untersuchungen.

Für die erfolgreiche Internalisierung von Chlamydien ist ein intaktes Aktinzytoskeletts notwendig, denn eine Zerstörung des Aktinzytoskeletts mit Cytochalasin D reduzierte die *C. psittaci* Infektion um 90 % und inhibierte die Internalisierung von *C. trachomatis* EBs (Boleti, Benmerah et al. 1999) (Carabeo, Grieshaber et al. 2002). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Internalisierung von rInv497_{6His}- und rCpn0677_{6His}-Beads abhängig von einem intakten Aktinzytoskelett ist, da die Zerstörung von Aktin-Mikrofilamenten der Humanzelle durch Cytochalasin D nicht die

Adhäsion der Beads beeinflusste, aber die Internalisierung der Beads komplett verhinderte (Abb. 45, Ergebnisse).

Für die Stärke der Invasin-abhängigen Aufnahme von *Yersinia* ist die Dichte an Integrinrezeptoren sowie die relative Affinität der Ligand-Rezeptor Interaktion bestimmend (Dersch and Isberg 1999). Eine effiziente Internalisierung setzt eine hoch-affine Bindung des Integrin-Rezeptors voraus, während niedrig-affine Liganden zwar die bakterielle Adhäsion, jedoch nicht die Aufnahme unterstützen, da für eine Internalisierung wesentlich mehr Ligand-Rezeptor Interaktionen notwendig sind als für eine simple Oberflächenadhäsion (Tran Van Nhieu and Isberg 1993). Unklar ist bislang, ob Cpn0677 und Cpn0678 aufgrund der Homologie im N-terminalen Bereich mit denselben humanen Interaktionspartnern unabhängig von SNX9 interagieren. Da Cpn0677 im Gegensatz zu Cpn0678 auch die *C. trachomatis* Infektion erhöht sowie eine Internalisierung induziert, könnte die Interaktion von Cpn0677 mit Humanzellen eine hohe Affinität besitzen, während Cpn0678 mit nur niedriger Affinität bindet. An der Oberfläche von HEp-2 Zellen gebundenes Cpn0678^{FITC} akkumulierte in „patches“, sodass entweder eine Aggregation des Proteins bereits vor der Bindung geschieht oder der gebundene Rezeptor eine lokalisierte Verteilung aufweist (Abb. 17, Ergebnisse).

5.7 Cpn0677 und Cpn0678-Beads induzieren die Bildung von Aktinringen

Vorläufige Daten zeigen für rInv497, rCpn0677- und rCpn0678-Beads, die Ausbildung von mit Beads assoziierten F-Aktin Taschen (Abb. 55, Anhang). Bislang ist das *C. pneumoniae* Protein Cpn0572 das einzig bekannte Protein mit einer Wirkung auf das Aktinzytoskelett der Wirtszelle, jedoch handelt es sich dabei um ein Typ III sekretiertes Effektorprotein (Zrieq 2009). Weiterhin zeigt Cpn0677 dasselbe Verhalten wie die Proteine Internalin B und Invasin, da es gekoppelt an Beads internalisiert wird und phagozytotische F-Aktin Taschen induziert. Die Ausbildung phagozytotischer F-Aktin Taschen steht in direktem Zusammenhang mit einer effizienten Abschnürung endozytotischer Vesikel und ist in Abb. 48 schematisch dargestellt. Da auch die Bindung von Cpn0678-Beads an Humanzellen zu einer F-Aktin Polymerisation führt, könnte die Interaktion mit SNX9 von großer Bedeutung sein, da SNX9 oligomerisiert und durch Interaktion mit N-WASP sowie dem Arp2/3-Komplex eine Aktinpolymerisation induzieren kann.

Die Bildung einer aus F-Aktin bestehenden phagozytotischen Tasche wurde für das Internalin B (InIB) von *Listeria monocytogenes* beschrieben, ebenso wie das Auslösen von Membrankräuselungen (membrane ruffling) durch Adhäsion von löslichem InIB und geht einher mit einer Phosphorylierung verschiedener Proteine (Bierne, Gouin et al. 2001) (Ireton, Payrastra et al. 1999). Bei der InIB-induzierten Phagozytose sind der Arp2/3-Komplex, GTPase Rac, Cofilin sowie die dazu korrespondierende LIM Kinase involviert (Bierne, Gouin et al. 2001). Auch Beads gekoppelt mit Invasin (Inv397) von *Y. pseudotuberculosis* führen zur Ausbildung phagozytotischer F-Aktin Taschen um internalisierte Beads sowie zur Rekrutierung des $\alpha 5\beta 1$ Integrin Rezeptors, WASP und dem Arp2/3 Komplex in humanen Makrophagen (Wiedemann, Linder et al. 2001).

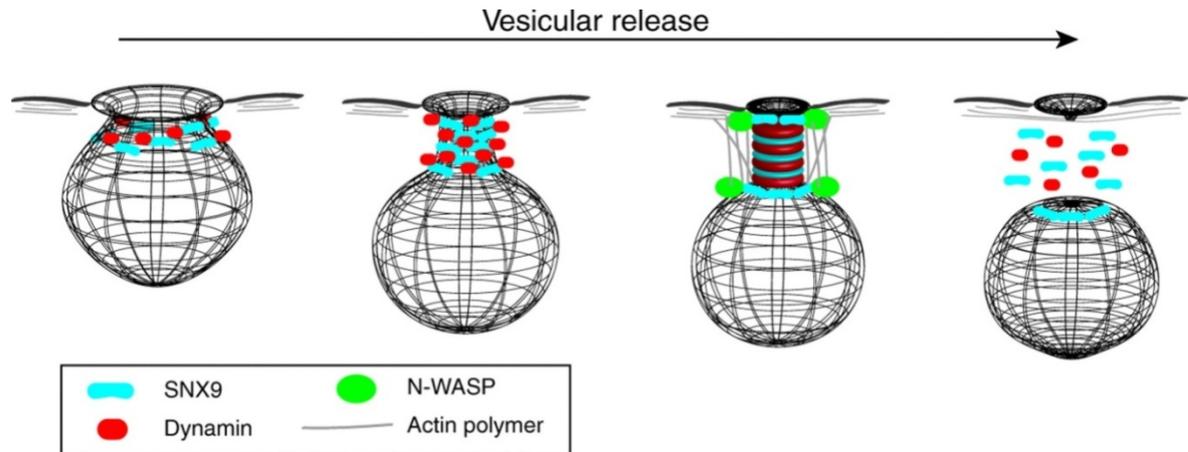


Abbildung 50: Rolle von SNX9, Dynamin und Aktinpolymerisation während der Vesikelabschnürung bei der Endozytose

SNX9 rekrutiert Dynamin zum Hals stark invaginiertes „clathrin-coated pits“. Die geordnete Assemblierung der Proteine an der Membranoberfläche führt zur Bildung einer verengten tubulären Struktur, die durch SNX9-vermittelte GTP Hydrolyse von Dynamin destabilisiert wird. Rekrutierung und Aktivierung von N-WASP durch SNX9 initiiert die Aktinpolymerisation, die so eine finale Abschnürung des endozytotischen Vesikels unterstützt. Entnommen aus Lundmark and Carlsson, 2009.

5.8 Ist eine Sekretion von Cpn0678 und Cpn0677 möglich ?

Da Chlamydien genetisch nicht manipuliert werden können, ist der direkte Nachweis einer Sekretion von Proteinen schwierig. Daher wurde bislang die TTSS-abhängige Sekretion chlamydialer Proteine, aufgrund des Vorhandenseins eines Sekretionssignals in den ersten 15 Aminosäuren des Proteins, durch heterologe Expression analysiert (Subtil, Delevoye et al. 2005). Chimera wurden generiert durch Fusion der N-terminalen Abschnitte von *Cpn0676* – *Cpn0678* mit dem *cya* Gen von *Bordetella pertussis*, welches für die Calmodulin-abhängige Adenylatcyclase (Cya) kodiert und als Reporterprotein für Typ III Sekretion in *Yersinia* und *Salmonella* verwendet wurde (Subtil, Parsot et al. 2001). Bei Expression der Fusionsproteine in einem *Shigella flexneri* Stamm mit dereguliertem TTSS (*ipaD*) wurde für Cpn0677 und Cpn0678 eine TTS-abhängige Sekretion und für Cpn0676 dagegen keine Sekretion beobachtet (Abb. 56, Anhang) (Subtil, unpubliziert 2009). Dies deutet auf das Vorhandensein eines Sekretionssignals im N-terminalen Bereich von Cpn0677 und Cpn0678 hin, zeigt jedoch nicht ob die Proteine tatsächlich während der Infektion sekretiert werden.

Anhand der Aminosäurezusammensetzung und Sekundärstrukturen der N-Termini 100 bekannter Effektoren von *Chlamydiae*, *Escherichia*, *Yersinia* und *Pseudomonas* wurde ein Computermodell zur *in silico* Vorhersage Typ III sekretierter Proteine erstellt und erlaubt die Vorhersage für alle chlamydialen Proteine (Arnold, Brandmaier et al. 2009). Die Proteine Cpn0678, Cpn0677 und Cpn0676 sind danach als Typ III sekretierte Proteine vorhergesagt, jedoch handelt es sich nur um eine bioinformatische Vorhersage (<http://www.chlamydiaedb.org>).

Da in den Immunfluoreszenzanalysen für Cpn0677 und Cpn0678 früh in der Infektion jeweils eine Kolo-kalisation mit MOMP beobachtet wurde, erfolgt eine potentielle Sekretion der Proteine nicht während der Adhäsion und Internalisierung von EBs (Abb. 28, Ergebnisse). Kürzlich wurde für

C. trachomatis EBs die Induktion der Typ III Sekretion in einem zellfreiem System mittels 0.5 % BSA und 10 mM EGTA anhand des bekannten TTSS-Effektorproteins TARP gezeigt (Jamison and Hackstadt 2008) (Spaeth, Chen et al. 2009). Allerdings wurde dieses zellfreie Sekretionssystem bislang noch nicht für weitere Effektoren von *C. trachomatis* und auch nicht für *C. pneumoniae* EBs untersucht. Nach Induktion der zellfreien Sekretion mit BSA und EGTA waren Cpn0677 und Cpn0678 nicht im extrazellulären Überstand detektierbar und damit unter diesen Bedingungen nicht sekretiert (Daten nicht gezeigt). Allerdings ermöglicht der Puffer möglicherweise keine universale Induktion aller TTSS-Effektoren, sodass zukünftige Experimente notwendig sind mit bekannten *C. pneumoniae* Effektoren, wie dem zu TARP homologen Protein Cpn0572.

Da Cpn0677 und Cpn0678 in der Immunfluoreszenz erst nach 60 hpi detektiert wurden, die Inklusionen zu diesen späten Infektionszeitpunkten aber nahezu komplett mit Chlamydien gefüllt sind, ist eine präzise Lokalisation der Proteine schwierig. Jedoch zeigte sich erstmalig nach 84 hpi für viele Inklusionen eine aufgelockerte Struktur mit weniger dicht gepackten Bakterien, vermutlich ausgelöst durch Lyse der Inklusionen. In dieser Situation zeigte sich für Cpn0677 und Cpn0678 eine kreisförmige Färbung um chlamydiale Partikel, die durch mehrere punktuerte Strukturen charakterisiert ist und nicht mit dem MOMP-Signal kolokalisiert (Abb. 28, Ergebnisse). Unter der Annahme das eine Sekretion von Cpn0677 und Cpn0678 über das TTSS möglich wäre, könnten beide Proteine spät in der Infektion auf die Oberfläche der EBs sekretiert werden, wodurch die punktuerte Lokalisation entsteht. Möglicherweise ist im Falle von Cpn0678 freies Antigen im Lumen der Inklusionen detektierbar, da zusätzlich sehr viele schwache punktuerte Spots gefärbt sind. Es könnte daher freies Cpn0678 nach Lyse der Inklusion an neue Wirtszellen binden, dadurch eine Brücke zwischen Humanzelle und EBs bilden und so für eine effektive Adhäsion der EBs sorgen. Jedoch muss diese Hypothese in weiteren Untersuchungen verifiziert werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch bioinformatische Vorhersage und durch die heterologe Expression in *Shigella* eine Sekretion von Cpn0677 und Cpn0678 möglich ist. Jedoch zeigen die mikroskopischen Analysen keine Sekretion von Cpn0677 und Cpn0678 während der Adhäsion und Internalisierung. Denkbar wäre, dass die EB-Oberflächenlokalisation der Proteine erst durch eine Sekretion der Proteine auf die Oberfläche zustande kommt.

5.9 Identifikation potentieller humaner Interaktionspartner von Cpn0678

Durch NHS-Pulldown Experimente von rCpn0678_{6His} mit HEp-2 Zelllysaten konnten Hsp90 β / α , Hsp70, Myosin-9, GAPDH, β -Aktin und α / β -Tubulin als weitere potentielle humane Interaktionspartner von Cpn0678 identifiziert werden (Abb. 41, Ergebnisse). Für die Hitzeschockproteine Hsp90 und Hsp70 sowie GAPDH wurde gezeigt, dass alle direkt mit der zytoplasmatischen Domäne des Makrophagen-Rezeptors MSR interagieren und vermutlich die Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion regulieren (Nakamura, Hinagata et al. 2002). Weiterhin wurde gezeigt, dass GAPDH mit Aktin, Tubulin und Mikrotubuli interagiert (Kumagai and Sakai 1983), (Mejean, Pons et al. 1989). Hsp70 wird benötigt für den reversiblen Austausch und die irreversible Dissoziation von Clathrin während der Endozytose (Eisenberg and Greene 2007). Die Oberflächenlokalisation von

Hsp90 auf Humanzellen wurde beschrieben und ermöglicht so eine Interaktion mit bakteriellen oder viralen Proteinen, wie z.B. dem Adhäsin JlpA aus *Campylobacter jejuni* und dem Glycoprotein E des Dengue-Virus (Jin, Song et al. 2003), (Reyes-Del Valle, Chavez-Salinas et al. 2005). Hsp90 und Hsp70 sind als ein Rezeptorkomplex beim Eintritt des Dengue-Virus beteiligt (Reyes-Del Valle, Chavez-Salinas et al. 2005). Eine Interaktion von Myosin-Motorproteinen mit Clathrin umhüllten Vesikeln (coated vesicle) wurde gezeigt und dies könnte eine zusätzliche Kraft für das Abschnüren der Vesikel zur Verfügung stellen (Ungewickell and Hinrichsen 2007). Zusammenfassend lässt sich für alle 6 Interaktionspartner von Cpn0678 eine Funktion in der Rezeptorinternalisierung mittels Clathrin-abhängiger Endozytose feststellen und daher ist die Untersuchung dieser Interaktionen Bestandteil weiterführender Arbeiten.

5.10 Cpn0677 und Cpn0678 stellen eine *C. pneumoniae* spezifische Expansion des Genoms dar

Verglichen mit den Genomen von *C. trachomatis* und *C. caviae* stellen Cpn0677 und Cpn0678 eine Expansion an dieser Genomposition von *C. pneumoniae* dar. Viele der 214 zusätzlichen Gene die in *C. pneumoniae* jedoch nicht in *C. trachomatis* auftauchen, sind Expansionen der Pmp-Proteinfamilie oder kodieren für hypothetische Proteine und lokalisieren in einer sogenannten Plastizitätszone (Kalman, Mitchell et al. 1999). Diese Genomunterschiede deuten auf eine unterschiedliche Biologie der drei Spezies hin und werden durch den Befund unterstützt, dass *C. pneumoniae* eine größere Bandbreite an Wirtszelltypen infizieren kann (Kalman, Mitchell et al. 1999). Die starke Homologie von Cpn0677 und Cpn0678 im N-terminalen Bereich und die Fähigkeiten beider Proteine zu adhären, lässt eine Duplikation der beiden Gene vermuten. Jedoch besitzt Cpn0677 vermutlich im C-terminalen Bereich eine Internalisierungsdomäne, sodass für Cpn0677 neben der Interaktion mit SNX9 über die PRRs noch eine zusätzliche Funktion postulierbar ist. Aufgrund der Oberflächenlokalisierung von Cpn0677 und Cpn0678 könnte durch eine parallele Aktion beider Proteine die Adhäsion und Internalisierung beeinflusst werden. Denkbar wäre auch, dass abhängig vom Wirtszelltyp nur eines der Proteine benötigt wird und eine Erklärung für die unterschiedliche Pathogenität und den Zelltropismus von *C. pneumoniae* sein. Daher wäre es sinnvoll, Untersuchungen über infektionsstimulierende Fähigkeiten beider Proteine auch auf andere Zelltypen auszudehnen, um eine genauere Charakterisierung der involvierten Wirtszellprozesse zu erzielen.

Das zu Cpn0677 homologe Protein in *C. pneumoniae* TW-183 (CpB0704, YwbM) ist bis auf den AS-Austausch S₂₁₀L identisch und wurde als immundominantes Antigen identifiziert (Bunk, Susnea et al. 2008). In 2D-Gelen von *C. pneumoniae* EBs reagierten 27 von 38 Seren *C. pneumoniae* infizierter Patienten verschiedenen MIF Titers mit dem CpB0704-Protein. Zusätzlich wurde es aufgrund der quantifizierten Reaktivität als stärkstes Antigen eingestuft und die Reaktivität der Seren konnte auch mit rekombinantem CpB0704 in ELISA Untersuchungen bestätigt werden. Da es sich bei Cpn0677 und Cpn0678 um oberflächenlokalisierte Proteine handelt sind Studien in

Tiermodellen notwendig um die spannende Frage zu klären, ob durch Vakzinierung mit rCpn0677 und rCpn0678 eine protektive Immunität erzielt werden kann.

5.11 Modell der Cpn0677 und Cpn0678 vermittelten Adhäsion und Internalisierung von *C. pneumoniae*

Die initiale Phagozytose mikrobieller Pathogene involviert häufig eine sequentielle Abfolge von Ereignissen: Adhäsion infektiöser Partikel, Rezeptor-Clustering, Aktinpolymerisation, Bildung von Membranausstülpungen, Abschnürung des endozytisches Vesikels und Aktindepolymerisation um das Phagosom. Neben dem Adhäsins OmcB, dass durch Bindung an Glykosaminoglykanen der Humanzelle den initialen Kontakt herstellt, könnte die Gruppe der Pmp-Proteine für eine Zelltyp-spezifische feste Adhäsion sorgen. Die in dieser Arbeit identifizierten *C. pneumoniae* spezifischen Proteine Cpn0678 und Cpn0677 sind in der Lage, Adhäsion sowie Internalisierung von EBs zu vermitteln. Durch die Interaktion mit dem humanen SNX9-Protein sind Cpn0677 und Cpn0678 involviert in der Verknüpfung von Aktinpolymerisation sowie Membranremodellierung während der Endozytose (Abb. 51).

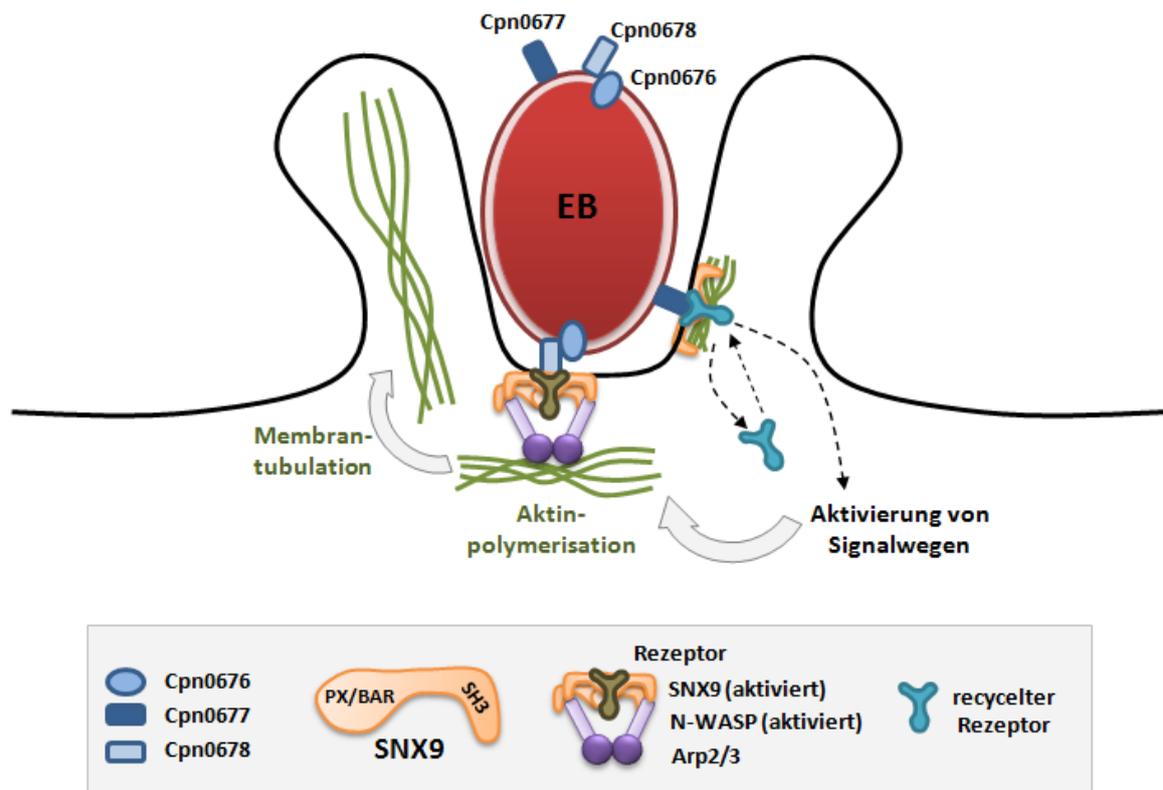


Abbildung 51: Modell der Rolle von Cpn0678 und Cpn0677 in der *C. pneumoniae* Infektion

Die oberflächenlokalisierten Proteine Cpn0677 und Cpn0678 vermitteln die Adhäsion von *C. pneumoniae* an Humanzellen. Cpn0678 könnte durch direkte Interaktion mit SNX9 oder über einen weiteren unbekanntem Interaktionspartner (Rezeptor) an Humanzellen binden. Dabei kommt es möglicherweise zu Oligomerisierung von SNX9 und so zu einer subsequenten Aktivierung von N-WASP und dem Arp2/3-Komplex, wodurch eine Aktinpolymerisation induziert wird. Parallel kommt es zu einer Interaktion von Cpn0677 mit SNX9 und einem bislang unbekanntem Interaktionspartner (Rezeptor). Dadurch könnte es zu einer Aktivierung von Signalwegen kommen, was zu einer erhöhten Recyclingrate von Rezeptoren führt. Dies könnte sich positiv auf eine effiziente Adhäsion und Internalisierung von EBs auswirken.

6 Anhang

6.1 Zusätzliche Abbildungen zum Ergebnisteil und der Diskussion

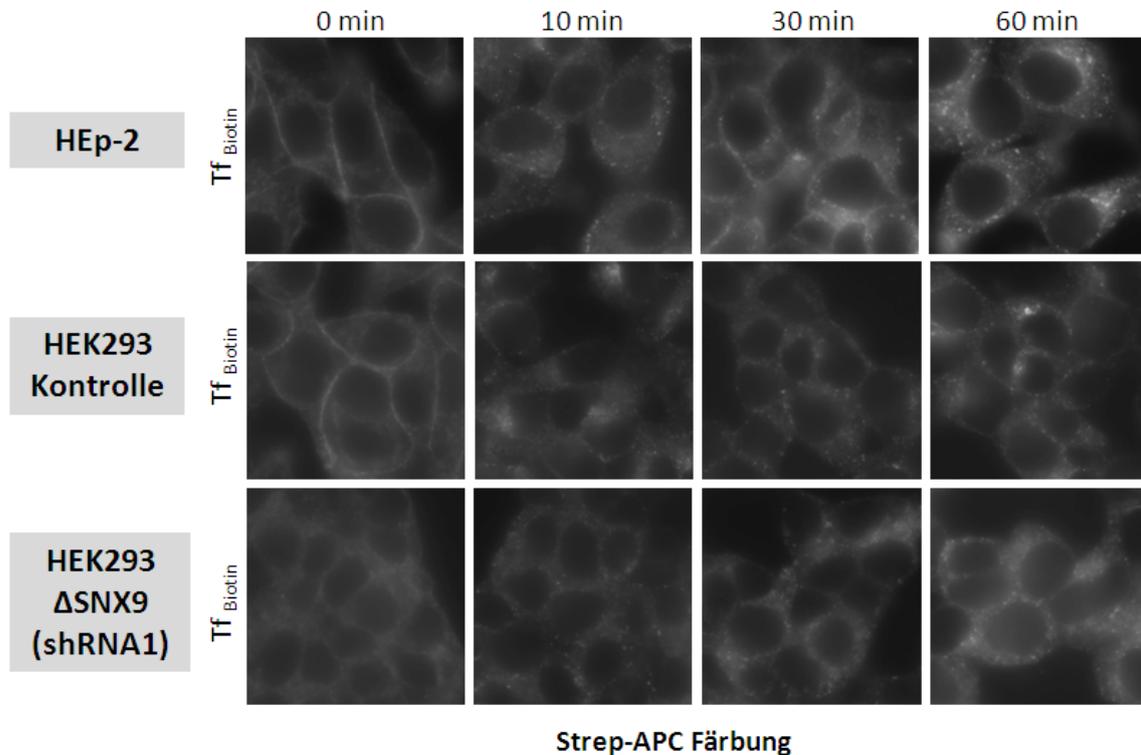


Abbildung 52: Transferrinaufnahme verschiedener Zelllinien

In den HEK293-Zelllinien mit 90%igem „knockdown“ von SNX9 sind keine Unterschiede im Internalisierungsverhalten von Transferrin verglichen zu den Kontrollzelllinien zu beobachten. Die verschiedenen Zelllinien wurden mit 10 µg/ml biotinyliertem Transferrin für 1 h bei 4°C inkubiert und nun die Zellen für 10, 30 und 60 min. bei 37°C inkubiert, Zellen mit 3 % para-Formaldehyd fixiert, durch 0.2 % Triton permeabilisiert und mit Streptavidin-APC (1:40) gefärbt.

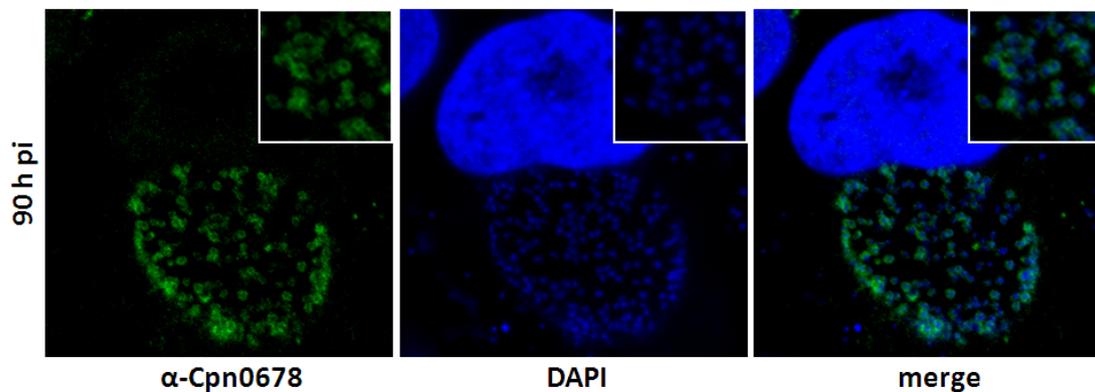


Abbildung 53: Lokalisation von Cpn678 spät in der Infektion

Immunfluoreszenzaufnahmen von HEp-2 Zellen die mit einer MOI 1 an *C. pneumoniae* EBs infiziert wurden. Die Zellen wurden nach 90 h mit Methanol fixiert und mit 2 µg/ml antigengereinigtem Cpn0678-Antikörper sowie parallel mit DAPI gefärbt. Bilder wurden mit dem Konfokalmikroskop Leica LSM 510 Meta erstellt

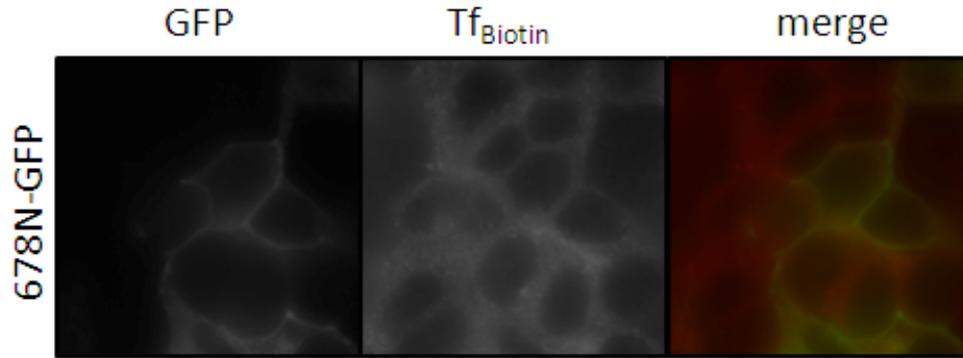


Abbildung 54: Effekt auf die Transferrinaufnahme durch intrazellulär exprimiertes Cpn0678N

In transfizierten sowie auch nicht transfizierten Zellen sind keine Unterschiede im Internalisierungsverhalten von Transferrin zu beobachten. HEK293T-Zellen wurden mittels CaCl_2 -Methode mit GFP-Cpn0678N transfiziert. $10 \mu\text{g/ml}$ biotinyliertes Transferrin wurde für 1 h bei 4°C mit den Zellen inkubiert und überschüssiges Transferrin wegwaschen. Nun wurden die Zellen für 30 min. bei 37°C inkubiert, Zellen mit 3 % para-Formaldehyd fixiert, durch 0.2 % Triton permeabilisiert und mit Streptavidin-APC (1:40) gefärbt.

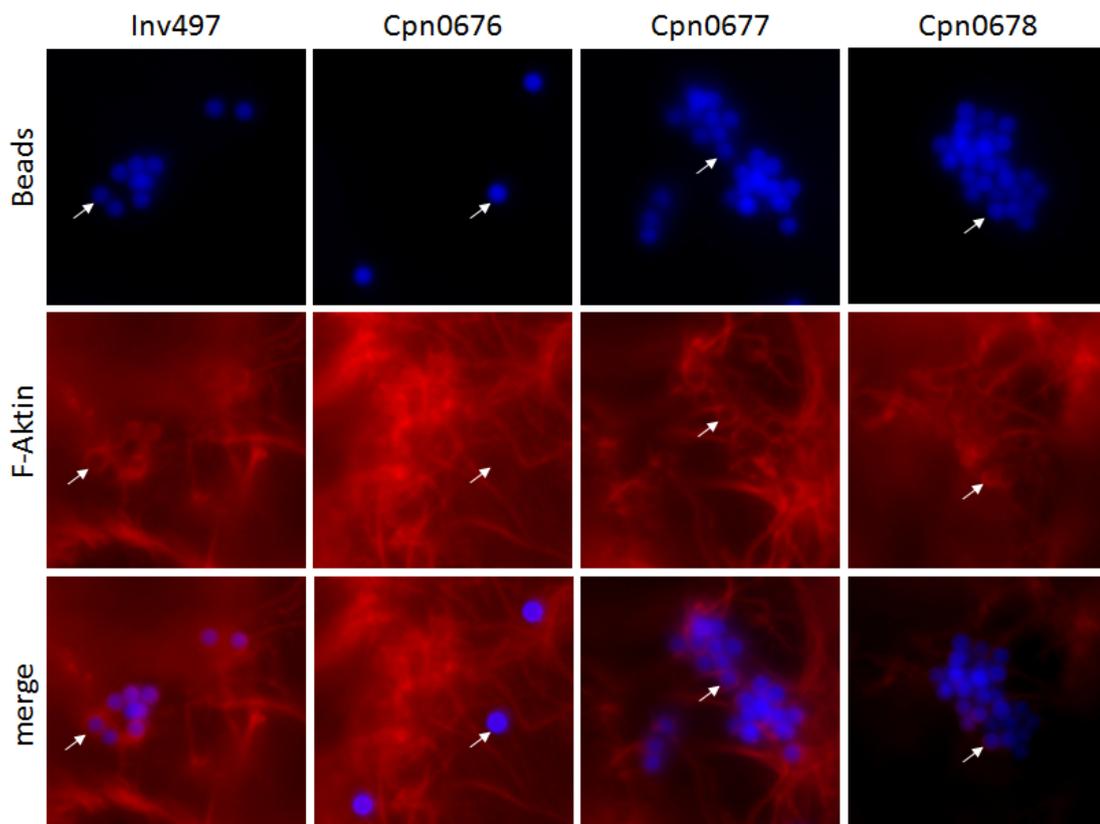


Abbildung 55: Cpn0677 und Cpn0678 beschichtete Latexbeads induzieren die Bildung von F-Aktin Taschen

Latexkugeln beschichtet mit $\text{rInv497}_{6\text{His}}$, $\text{rCpn0677}_{6\text{His}}$ und $\text{rCpn0678}_{6\text{His}}$ induzieren die Bildung von F-Aktin Taschen um adhärierte Latexkugeln, während sich um adhärierte und mit $\text{rCpn0676}_{6\text{His}}$ beschichtete Beads keine Ringen gebildet haben. Blau-fluoreszierende $1 \mu\text{m}$ Beads wurden mit $200 \mu\text{g/ml}$ $\text{rInv497}_{6\text{His}}$, $\text{rCpn0676}_{6\text{His}}$, $\text{rCpn0677}_{6\text{His}}$ und $\text{rCpn0678}_{6\text{His}}$ beschichtet, in 20fachem Überschuss für 10 min bei 4°C und mit 700 rpm auf HEp-2 Zellen zentrifugiert. Nach Inkubation für 10 min bei 37°C wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert, durch 0.2 % Triton permeabilisiert und F-Aktin mittels Rhodamin-Phalloidin angefärbt.

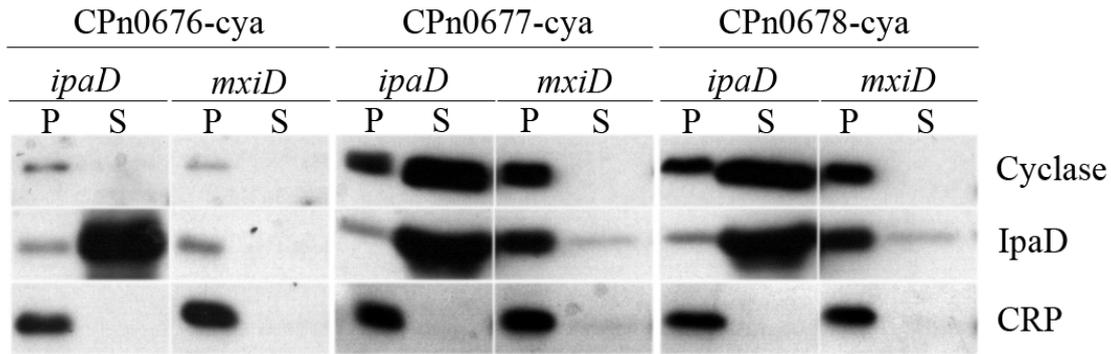


Abbildung 56: Heterologe Expression des N-Terminus von Cpn0676 - Cpn0678 in *Shigella flexneri*

Verteilung der Cpn0676-Cpn0678-cya Chimera nach subzellulärer Fraktionierung.

Exponentiell wachsende Kulturen von *ipaD* und *mxiD* Stämmen, welche die angegebenen Chimera exprimieren wurden in Pellet (P) sowie Überstand (S) fraktioniert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Im *S. flexneri ipaB* Mutantenstamm ist die Aktivität der TTS Maschinerie dereguliert und im *mxiD* Mutantenstamm ist das TTSS komplett gestört. Die Anwesenheit der Chimera anhand der Cyclase (oben), IpaD (mitte) und CRP (unten) in jeder Fraktion wurde mittels Westernblot detektiert unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen die Proteine. Ein IpaD-Blot diente zur Kontrolle, dass der *ipaD* Stamm noch in der Lage ist das Protein zu sekretieren und war jeweils positiv. Das bakterielle cAMP receptor protein (CRP) diente als zytosolischer Marker. Diese Daten wurden im Rahmen einer Kooperation freundlicherweise von Rita Furtado (Institut Pasteur) generiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Taxonomie der Ordnung <i>Chlamydiales</i> -----	12
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von <i>C. pneumoniae</i> -----	15
Abbildung 3: Hauptklassen adhäsiver Proteine auf der Oberfläche Gram-negativer Bakterien -----	20
Abbildung 4: Invasionsstrategien verschiedener pathogener Bakterien-----	22
Abbildung 5: Modell der Interaktionen chlamydialer EBs mit der epithelialen Wirtszelle -----	24
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Domänen und Interaktionspartner von SNX9-----	30
Abbildung 7: Interaktionen von EspF, SNX9 und N-WASP bei der Clathrin-vermittelten Endozytose -----	31
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Cpn0679 – Cpn0675 Lokus in <i>C. pneumoniae</i> CWL029 -----	33
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Hefe-Oberflächen-Präsentationssystems-----	34
Abbildung 10: Einteilung der zwischen 24 und 48 hpi differentiell regulierten Gene in funktionelle Klassen	68
Abbildung 11: Microarray und Real Time rt-PCR des Genclusters <i>Cpn0676 - Cpn0678</i> sowie <i>OmcB</i> -----	69
Abbildung 12: Transkriptkopplungsanalyse des Operons <i>Cpn0676 - Cpn0678</i> -----	71
Abbildung 13: Schematische Darstellung des Cpn0679 – Cpn0674 Lokus in <i>C. pneumoniae</i> CWL029 im Vergleich zu <i>C. caviae</i> und <i>C. trachomatis</i> D -----	72
Abbildung 14: Aga2p-Cpn0676 – Cpn0678 exprimierende Hefezellen binden an Humanzellen -----	74
Abbildung 15: Adhäsion beschichteter Latexkügelchen an HEp-2 Zellen mittels FACS und Mikroskopie-----	76
Abbildung 16: Adhäsion von Latexkügelchen mit unterschiedlicher Konzentration an rCpn0677 _{6His} oder rCpn0678 _{6His} -----	77
Abbildung 17: Adhäsion von FITC-markiertem löslichem rCpn0678 _{6His} an HEp-2 Zellen -----	78
Abbildung 18: Änderung der <i>C. pneumoniae</i> Infektion durch rCpn0676 _{6His} bis rCpn0678 _{6His} -----	79

Abbildung 19: Charakterisierung der Infektionsstimulation durch rCpn0678 _{6His}	81
Abbildung 20: Änderungen der Adhäsion CFSE-markierter EBs bei 4°C durch rCpn0678 - rCpn0676	82
Abbildung 21: Erhöhte Adhäsion CFSE-markierter EBs bei 37 °C durch Vorbehandlung der Humanzellen mit rCpn0678 - rCpn0676	83
Abbildung 22: Einfluss von ungebundenem Protein auf die <i>C. pneumoniae</i> Infektion	85
Abbildung 23: Nachweis von Cpn0678 – Cpn0676 während des Infektionszyklus	87
Abbildung 24: Detektion von Cpn0676 - Cpn0678 während der chlamydialen Infektion.....	88
Abbildung 25: Dot-Blot und FACS-Analysen zeigen die Oberflächenlokalisierung von Cpn0677 und Cpn0678	89
Abbildung 26: Behandlung von <i>C. pneumoniae</i> EBs mit Detergenzien	92
Abbildung 27: Neutralisation der Infektion durch Cpn0676 – Cpn0678 Antikörper	94
Abbildung 28: Lokalisation von Cpn0676 - Cpn0678 spät in der Infektion	95
Abbildung 29: Lokalisation von Cpn0676 – Cpn0678 während der Adhäsion und Internalisierung von EBs-	96
Abbildung 30: Effekt von rCpn0676 – rCpn0678 auf die Infektion mit <i>C. trachomatis</i> L2 im Vergleich zu <i>C. pneumoniae</i> GiD	97
Abbildung 31: Interaktion von rCpn0678 _{6His} und rCpn0676 _{6His} , sowie Dimerisierung von rCpn0678 _{6His}	98
Abbildung 32: Vergleich der PRRs von Cpn0678 mit EspF und Generierung von Cpn0678N und Cpn0678C	100
Abbildung 33: Die Cpn0678N-Domäne zeigt Adhäsion an Zellen und erhöht die Infektion.....	101
Abbildung 34: Lokalisationsstudien von Cpn0677 und Cpn0678 in Hefe und Humanzellen	103
Abbildung 35: Sequenzvergleich der PRRs von EspF, Cpn0678 und Cpn0677	104
Abbildung 36: Nachweis einer Interaktion zwischen Cpn0678 und Cpn0677 mit SNX9 durch GST-Pulldown Experimente und Immunpräzipitation.....	105
Abbildung 37: Interaktionsstudien zwischen Cpn0677 und Cpn0678 mit SNX9 mittels Far-Western Blot --	107
Abbildung 38: Lokalisation von endogenem SNX9 in HEp-2 Zellen und in transfizierten HEK293T-Zellen --	108
Abbildung 39: Kotransfektion von chlamydialen GFP-Fusionsproteinen mit mcherry-SNX9	110
Abbildung 40: Das Ausschalten des <i>SNX9</i> -Gens reduziert die Infektion mit <i>C. pneumoniae</i>	111
Abbildung 41: NHS-Pulldown von rCpn0678 _{6His} mit HEp-2 Lysaten identifiziert neben SNX9 noch 6 weitere potentielle Interaktionspartner	113
Abbildung 42: Effekt von intrazellulär exprimiertem Cpn0677 oder Cpn0678 auf die Transferrin-aufnahme	114
Abbildung 43: Transferrinaufnahme ist nicht gestört durch extrazelluläres rCpn0677 und rCpn0678.....	115
Abbildung 44: Internalisierung von rCpn0677 _{6His} -beschichteten Latexkügelchen	116
Abbildung 45: Die Internalisierung von rCpn0677-Beads ist abhängig von einem intakten Zytoskelett ----	117
Abbildung 46: Analyse der Transkriptions-Startstelle des <i>Cpn0678 – Cpn0676</i> Operons.....	121
Abbildung 47: Einfluss von rCpn0676 _{6His} – rCpn0678 _{6His} auf die <i>C. pneumoniae</i> Adhäsion und Infektion ---	124
Abbildung 48: Intrazelluläre Lokalisation von EspF, CT694 und Cpn0678	129
Abbildung 49: Alignment des <i>C. pneumoniae</i> Cpn0678 und <i>C. trachomatis</i> CT694 Proteins	131
Abbildung 50: Rolle von SNX9, Dynamin und Aktinpolymerisation während der Vesikelabschnürung bei der Endozytose	134
Abbildung 51: Modell der Rolle von Cpn0678 und Cpn0677 in der <i>C. pneumoniae</i> Infektion.....	137

Abbildung 52: Transferrinaufnahme verschiedener Zelllinien-----	138
Abbildung 53: Lokalisation von Cpn678 spät in der Infektion -----	138
Abbildung 54: Effekt auf die Transferrinaufnahme durch intrazellulär exprimiertes Cpn0678N -----	139
Abbildung 55: Cpn0677 und Cpn0678 beschichtete Latexbeads induzieren die Bildung von F-Aktin Taschen -----	139
Abbildung 56: Heterologe Expression des N-Terminus von Cpn0676 - Cpn0678 in <i>Shigella flexneri</i> -----	140

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Gebrauchsmaterialien -----	36
Tabelle 2: Verwendete Geräte und Maschinen -----	36
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien -----	37
Tabelle 4: Verwendete Enzyme -----	38
Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper-----	38
Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper -----	39
Tabelle 7: Verwendete Kits, Sepharosen und Beads -----	39
Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide-----	39
Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide zur Sequenzierung -----	41
Tabelle 10: Verwendete und in der Arbeit generierte Plasmide -----	41
Tabelle 11: PCR-Ansätze für Plasmid-DNA bzw. chlamydiale genomische DNA-----	56
Tabelle 12: PCR-Bedingungen -----	56
Tabelle 13: Reaktionsansatz für die reverse Transkription -----	58
Tabelle 14: Reaktionsansatz für die Real Time PCR -----	59
Tabelle 15: Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel-----	61
Tabelle 16: Puffer mit variierendem Guanidin-Anteil für die Renaturierung -----	64

7 Literaturverzeichnis

- Abdelrahman, Y. M. and R. J. Belland (2005). "The chlamydial developmental cycle." *FEMS Microbiol Rev* **29**(5): 949-59.
- Alto, N. M., A. W. Weflen, et al. (2007). "The type III effector EspF coordinates membrane trafficking by the spatiotemporal activation of two eukaryotic signaling pathways." *J Cell Biol* **178**(7): 1265-78.
- Arnold, R., S. Brandmaier, et al. (2009). "Sequence-based prediction of type III secreted proteins." *PLoS Pathog* **5**(4): e1000376.
- Azzazy, H. M. and W. E. Highsmith, Jr. (2002). "Phage display technology: clinical applications and recent innovations." *Clin Biochem* **35**(6): 425-45.
- Badour, K., M. K. McGavin, et al. (2007). "Interaction of the Wiskott-Aldrich syndrome protein with sorting nexin 9 is required for CD28 endocytosis and cosignaling in T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(5): 1593-8.
- Baehr, W., Y. X. Zhang, et al. (1988). "Mapping antigenic domains expressed by *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(11): 4000-4.
- 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.
- Beatty, W. L., T. A. Belanger, et al. (1994). "Role of tryptophan in gamma interferon-mediated chlamydial persistence." *Ann N Y Acad Sci* **730**: 304-6.
- Bebear, C. and B. de Barbeyrac (2009). "Genital *Chlamydia trachomatis* infections." *Clin Microbiol Infect* **15**(1): 4-10.
- Belland, R. J., S. P. Ouellette, et al. (2004). "*Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis." *Cell Microbiol* **6**(2): 117-27.
- 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.
- Beswick, E. J., A. Travelstead, et al. (2003). "Comparative studies of glycosaminoglycan involvement in *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis* invasion of host cells." *J Infect Dis* **187**(8): 1291-300.
- Bierne, H., E. Gouin, et al. (2001). "A role for cofilin and LIM kinase in *Listeria*-induced phagocytosis." *J Cell Biol* **155**(1): 101-12.
- 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.
- Bonazzi, M., M. Lecuit, et al. (2009). "*Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin: from structure to pathogenesis." *Cell Microbiol*.
- Bulut, Y., E. Faure, et al. (2002). "*Chlamydial* heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway." *J Immunol* **168**(3): 1435-40.
- 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.
- Caldwell, H. D., J. Kromhout, et al. (1981). "Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*." *Infect Immun* **31**(3): 1161-76.
- Campbell, L. A., C. C. Kuo, et al. (1990). "Structural and antigenic analysis of *Chlamydia pneumoniae*." *Infect Immun* **58**(1): 93-7.
- Cappellaro, C., C. Baldermann, et al. (1994). "Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of α - and α -agglutinin." *Embo J* **13**(20): 4737-44.
- 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. 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.
- Carlton, J., M. Bujny, et al. (2005). "Sorting nexins--unifying trends and new perspectives." *Traffic* **6**(2): 75-82.
- Cheng, Y., W. Boll, et al. (2007). "Cryo-electron tomography of clathrin-coated vesicles: structural implications for coat assembly." *J Mol Biol* **365**(3): 892-9.

- Christiansen, G., L. B. Pedersen, et al. (1993). "Interaction between the Chlamydia trachomatis histone H1-like protein (Hc1) and DNA." *J Bacteriol* **175**(6): 1785-95.
- 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.
- Clifton, D. R., C. A. Dooley, et al. (2005). "Tyrosine phosphorylation of the chlamydial effector protein Tarp is species specific and not required for recruitment of actin." *Infect Immun* **73**(7): 3860-8.
- Clifton, D. R., K. A. Fields, et al. (2004). "A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(27): 10166-71.
- Cocchiari, J. L. and R. H. Valdivia (2009). "New insights into Chlamydia intracellular survival mechanisms." *Cell Microbiol* **11**(11): 1571-8.
- 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., B. Chiu, et al. (2002). "Chlamydia pneumoniae infection of endothelial cells induces transcriptional activation of platelet-derived growth factor-B: a potential link to intimal thickening in a rabbit model of atherosclerosis." *J Infect Dis* **185**(11): 1621-30.
- Coombes, B. K. and J. B. Mahony (2002). "Identification of MEK- and phosphoinositide 3-kinase-dependent signalling as essential events during Chlamydia pneumoniae invasion of HEp2 cells." *Cell Microbiol* **4**(7): 447-60.
- Cornelis, G. R. (2006). "The type III secretion injectisome." *Nat Rev Microbiol* **4**(11): 811-25.
- Cossart, P. and P. J. Sansonetti (2004). "Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens." *Science* **304**(5668): 242-8.
- Costa, C. P., C. J. Kirschning, et al. (2002). "Role of chlamydial heat shock protein 60 in the stimulation of innate immune cells by Chlamydia pneumoniae." *Eur J Immunol* **32**(9): 2460-70.
- 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.
- 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.
- 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.
- Doherty, G. J. and H. T. McMahon (2008). "Mediation, modulation, and consequences of membrane-cytoskeleton interactions." *Annu Rev Biophys* **37**: 65-95.
- 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.
- Ehrlich, M., W. Boll, et al. (2004). "Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits." *Cell* **118**(5): 591-605.
- Eisenberg, E. and L. E. Greene (2007). "Multiple roles of auxilin and hsc70 in clathrin-mediated endocytosis." *Traffic* **8**(6): 640-6.
- 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.
- Elwell, C. A., A. Ceesay, et al. (2008). "RNA interference screen identifies Abl kinase and PDGFR signaling in Chlamydia trachomatis entry." *PLoS Pathog* **4**(3): e1000021.
- Engel, J. N. and D. Ganem (1990). "A polymerase chain reaction-based approach to cloning sigma factors from eubacteria and its application to the isolation of a sigma-70 homolog from Chlamydia trachomatis." *J Bacteriol* **172**(5): 2447-55.
- Erridge, C., A. Pridmore, et al. (2004). "Lipopolysaccharides of Bacteroides fragilis, Chlamydia trachomatis and Pseudomonas aeruginosa signal via toll-like receptor 2." *J Med Microbiol* **53**(Pt 8): 735-40.
- 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.
- Fields, K. A. and T. Hackstadt (2000). "Evidence for the secretion of *Chlamydia trachomatis* CopN by a type III secretion mechanism." *Mol Microbiol* **38**(5): 1048-60.
- Gabel, B. R., C. Elwell, et al. (2004). "Lipid raft-mediated entry is not required for *Chlamydia trachomatis* infection of cultured epithelial cells." *Infect Immun* **72**(12): 7367-73.
- Gai, S. A. and K. D. Wittrup (2007). "Yeast surface display for protein engineering and characterization." *Curr Opin Struct Biol* **17**(4): 467-73.
- Galan, J. E. and A. Collmer (1999). "Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells." *Science* **284**(5418): 1322-8.
- Garcia-Olivas, R., J. Hoebeke, et al. (2003). "Differential binding of platelet-derived growth factor isoforms to glycosaminoglycans." *Histochem Cell Biol* **120**(5): 371-82.
- Gerard, H. C., E. Fomicheva, et al. (2008). "Apolipoprotein E4 enhances attachment of *Chlamydia pneumoniae* elementary bodies to host cells." *Microb Pathog* **44**(4): 279-85.
- Gerlach, R. G. and M. Hensel (2007). "Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens." *Int J Med Microbiol* **297**(6): 401-15.
- Ghuysen, J. M. and C. Goffin (1999). "Lack of cell wall peptidoglycan versus penicillin sensitivity: new insights into the chlamydial anomaly." *Antimicrob Agents Chemother* **43**(10): 2339-44.
- Grayston, J. T. (2000). "Background and current knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis." *J Infect Dis* **181 Suppl 3**: S402-10.
- Grieshaber, N. A., E. R. Fischer, et al. (2004). "Chlamydial histone-DNA interactions are disrupted by a metabolite in the methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(19): 7451-6.
- Grieshaber, S. S., N. A. Grieshaber, et al. (2003). "*Chlamydia trachomatis* uses host cell dynein to traffic to the microtubule-organizing center in a p50 dynamitin-independent process." *J Cell Sci* **116**(Pt 18): 3793-802.
- Haberg, K., R. Lundmark, et al. (2008). "SNX18 is an SNX9 paralog that acts as a membrane tubulator in AP-1-positive endosomal trafficking." *J Cell Sci* **121**(Pt 9): 1495-505.
- Hackstadt, T., E. R. Fischer, et al. (1997). "Origins and functions of the chlamydial inclusion." *Trends Microbiol* **5**(7): 288-93.
- Hackstadt, T., M. A. Scidmore-Carlson, et al. (1999). "The *Chlamydia trachomatis* IncA protein is required for homotypic vesicle fusion." *Cell Microbiol* **1**(2): 119-30.
- 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.
- Hahn, D. L., A. A. Azenabor, et al. (2002). "*Chlamydia pneumoniae* as a respiratory pathogen." *Front Biosci* **7**: e66-76.
- Hahn, D. L., R. W. Dodge, et al. (1991). "Association of *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adult-onset asthma [see comments]." *Jama* **266**(2): 225-30.
- Hannu, T., M. Puolakkainen, et al. (1999). "*Chlamydia pneumoniae* as a triggering infection in reactive arthritis." *Rheumatology (Oxford)* **38**(5): 411-4.
- Harkinezhad, T., K. Verminnen, et al. (2009). "Prevalence of *Chlamydia psittaci* infections in a human population in contact with domestic and companion birds." *J Med Microbiol* **58**(Pt 9): 1207-12.
- Hatch, T. P., M. Miceli, et al. (1986). "Synthesis of disulfide-bonded outer membrane proteins during the developmental cycle of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis*." *J Bacteriol* **165**(2): 379-85.
- Hefty, P. S. and R. S. Stephens (2007). "Chlamydial type III secretion system is encoded on ten operons preceded by sigma 70-like promoter elements." *J Bacteriol* **189**(1): 198-206.
- Heine, H., S. Muller-Loennies, et al. (2003). "Endotoxic activity and chemical structure of lipopolysaccharides from *Chlamydia trachomatis* serotypes E and L2 and *Chlamydia psittaci* 6BC." *Eur J Biochem* **270**(3): 440-50.
- Helms, J. B. and C. Zurzolo (2004). "Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking." *Traffic* **5**(4): 247-54.
- 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., F. Navarro-Garcia, et al. (1998). "The great escape: structure and function of the autotransporter proteins." *Trends Microbiol* **6**(9): 370-8.

- Heuer, D., A. Rejman Lipinski, et al. (2009). "Chlamydia causes fragmentation of the Golgi compartment to ensure reproduction." *Nature* **457**(7230): 731-5.
- Hodinka, R. L., C. H. Davis, et al. (1988). "Ultrastructural study of endocytosis of Chlamydia trachomatis by McCoy cells." *Infect Immun* **56**(6): 1456-63.
- Hogan, R. J., S. A. Mathews, et al. (2004). "Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm." *Infect Immun* **72**(4): 1843-55.
- 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.
- Hower, S., K. Wolf, et al. (2009). "Evidence that CT694 is a novel Chlamydia trachomatis T3S substrate capable of functioning during invasion or early cycle development." *Mol Microbiol* **72**(6): 1423-37.
- Hybiske, K. and R. S. Stephens (2007). "Mechanisms of Chlamydia trachomatis entry into nonphagocytic cells." *Infect Immun* **75**(8): 3925-34.
- 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.
- Ireton, K., B. Payrastra, et al. (1999). "The Listeria monocytogenes protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase." *J Biol Chem* **274**(24): 17025-32.
- Isberg, R. R. and J. M. Leong (1990). "Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells." *Cell* **60**(5): 861-71.
- Jamison, W. P. and T. Hackstadt (2008). "Induction of type III secretion by cell-free Chlamydia trachomatis elementary bodies." *Microb Pathog* **45**(5-6): 435-40.
- Jantos, C. A., S. Heck, et al. (1997). "Antigenic and molecular analyses of different Chlamydia pneumoniae strains." *J Clin Microbiol* **35**(3): 620-3.
- Jantos, C. A., C. Krombach, et al. (2000). "Antibody response to the 60-kDa heat-shock protein of Chlamydia pneumoniae in patients with coronary artery disease." *J Infect Dis* **181**(5): 1700-5.
- 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.
- Jin, S., Y. C. Song, et al. (2003). "IlpA of Campylobacter jejuni interacts with surface-exposed heat shock protein 90alpha and triggers signalling pathways leading to the activation of NF-kappaB and p38 MAP kinase in epithelial cells." *Cell Microbiol* **5**(3): 165-74.
- Jose, J. (2006). "Autodisplay: efficient bacterial surface display of recombinant proteins." *Appl Microbiol Biotechnol* **69**(6): 607-14.
- 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.
- Kalman, S., W. Mitchell, et al. (1999). "Comparative genomes of Chlamydia pneumoniae and C. trachomatis." *Nat Genet* **21**(4): 385-9.
- Kay, B. K., M. P. Williamson, et al. (2000). "The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains." *Faseb J* **14**(2): 231-41.
- Kern, J. M., V. Maass, et al. (2009). "Molecular pathogenesis of chronic Chlamydia pneumoniae infection: a brief overview." *Clin Microbiol Infect* **15**(1): 36-41.
- Kiselev, A. O., M. C. Skinner, et al. (2009). "Analysis of pmpD expression and PmpD post-translational processing during the life cycle of Chlamydia trachomatis serovars A, D, and L2." *PLoS One* **4**(4): e5191.
- 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.
- Kondo, A. and M. Ueda (2004). "Yeast cell-surface display--applications of molecular display." *Appl Microbiol Biotechnol* **64**(1): 28-40.
- Koo, I. C., D. Walthers, et al. (2006). "ChxR is a transcriptional activator in Chlamydia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(3): 750-5.
- Krull, M., M. Maass, et al. (2005). "Chlamydia pneumoniae. Mechanisms of target cell infection and activation." *Thromb Haemost* **94**(2): 319-26.
- 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.
- Kumagai, H. and H. Sakai (1983). "A porcine brain protein (35 K protein) which bundles microtubules and its identification as glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase." *J Biochem* **93**(5): 1259-69.
- Kuo, C. C., L. A. Jackson, et al. (1995). "Chlamydia pneumoniae (TWAR)." *Clin Microbiol Rev* **8**(4): 451-61.
- 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., A. Shor, et al. (1993). "Demonstration of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic lesions of coronary arteries." *J Infect Dis* **167**(4): 841-9.
- Lafont, F. and F. G. van der Goot (2005). "Bacterial invasion via lipid rafts." *Cell Microbiol* **7**(5): 613-20.
- Lane, B. J., C. Mutchler, et al. (2008). "Chlamydial entry involves TARP binding of guanine nucleotide exchange factors." *PLoS Pathog* **4**(3): e1000014.
- Lin, Q., C. G. Lo, et al. (2002). "The Cdc42 target ACK2 interacts with sorting nexin 9 (SH3PX1) to regulate epidermal growth factor receptor degradation." *J Biol Chem* **277**(12): 10134-8.
- Lindquist, E. A., J. D. Marks, et al. (2002). "Phage-display antibody detection of Chlamydia trachomatis-associated antigens." *Microbiology* **148**(Pt 2): 443-51.
- Longbottom, D. (2004). "Chlamydial infections of domestic ruminants and swine: new nomenclature and new knowledge." *Vet J* **168**(1): 9-11.
- Lundmark, R. and S. R. Carlsson (2003). "Sorting nexin 9 participates in clathrin-mediated endocytosis through interactions with the core components." *J Biol Chem* **278**(47): 46772-81.
- Lundmark, R. and S. R. Carlsson (2009). "SNX9 - a prelude to vesicle release." *J Cell Sci* **122**(Pt 1): 5-11.
- Maass, M., C. Bartels, et al. (1998). "Endovascular presence of viable Chlamydia pneumoniae is a common phenomenon in coronary artery disease." *J Am Coll Cardiol* **31**(4): 827-32.
- Majeed, M. and E. Kihlstrom (1991). "Mobilization of F-actin and clathrin during redistribution of Chlamydia trachomatis to an intracellular site in eucaryotic cells." *Infect Immun* **59**(12): 4465-72.
- Marches, O., M. Batchelor, et al. (2006). "EspF of enteropathogenic Escherichia coli binds sorting nexin 9." *J Bacteriol* **188**(8): 3110-5.
- Matsumoto, A., H. Bessho, et al. (1991). "Morphological studies of the association of mitochondria with chlamydial inclusions and the fusion of chlamydial inclusions." *J Electron Microsc (Tokyo)* **40**(5): 356-63.
- Maurer, A. P., A. Mehlitz, et al. (2007). "Gene expression profiles of Chlamydia pneumoniae during the developmental cycle and iron depletion-mediated persistence." *PLoS Pathog* **3**(6): e83.
- McCoy, A. J. and A. T. Maurelli (2006). "Building the invisible wall: updating the chlamydial peptidoglycan anomaly." *Trends Microbiol* **14**(2): 70-7.
- Mejean, C., F. Pons, et al. (1989). "Antigenic probes locate binding sites for the glycolytic enzymes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, aldolase and phosphofructokinase on the actin monomer in microfilaments." *Biochem J* **264**(3): 671-7.
- Merrifield, C. J., M. E. Feldman, et al. (2002). "Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits." *Nat Cell Biol* **4**(9): 691-8.
- 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.
- Mölleken, K. (2005). "Charakterisierung des OmcB Adhäsins von *Chlamydia pneumoniae*." *Dissertation Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen* (Heinrich-Heine Universität Düsseldorf).
- Montigiani, S., F. Falugi, et al. (2002). "Genomic approach for analysis of surface proteins in Chlamydia pneumoniae." *Infect Immun* **70**(1): 368-79.
- Mota, L. J., I. Sorg, et al. (2005). "Type III secretion: the bacteria-eukaryotic cell express." *FEMS Microbiol Lett* **252**(1): 1-10.
- Murra, G. (2005). Untersuchungen zu DNA-Microarray-Studien des genomweiten Genexpressionsprofils von *Chlamydia pneumoniae*. *Diplomarbeit*. Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen (Heinrich-Heine Universität Düsseldorf).
- Nakamura, T., J. Hinagata, et al. (2002). "HSP90, HSP70, and GAPDH directly interact with the cytoplasmic domain of macrophage scavenger receptors." *Biochem Biophys Res Commun* **290**(2): 858-64.
- Netea, M. G., B. J. Kullberg, et al. (2002). "Non-LPS components of Chlamydia pneumoniae stimulate cytokine production through Toll-like receptor 2-dependent pathways." *Eur J Immunol* **32**(4): 1188-95.
- Nicholson, T. L., L. Olinger, et al. (2003). "Global stage-specific gene regulation during the developmental cycle of Chlamydia trachomatis." *J Bacteriol* **185**(10): 3179-89.
- 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.
- Nougayrede, J. P., P. J. Fernandes, et al. (2003). "Adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to host cells." *Cell Microbiol* **5**(6): 359-72.

- Nurminen, M., M. Leinonen, et al. (1983). "The genus-specific antigen of Chlamydia: resemblance to the lipopolysaccharide of enteric bacteria." *Science* **220**(4603): 1279-81.
- Ojcius, D. M., T. Darville, et al. (2006). "Die heimliche Seuche." *Spektrum der Wissenschaft Februar*: 28-35.
- Ojcius, D. M., H. Degani, et al. (1998). "Enhancement of ATP levels and glucose metabolism during an infection by Chlamydia. NMR studies of living cells." *J Biol Chem* **273**(12): 7052-8.
- Ouellette, S. P., Y. M. Abdelrahman, et al. (2005). "The Chlamydia pneumoniae type III secretion-related IcrH gene clusters are developmentally expressed operons." *J Bacteriol* **187**(22): 7853-6.
- 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.
- Pavelka, M. S., Jr. (2007). "Another brick in the wall." *Trends Microbiol* **15**(4): 147-9.
- Peeling, R. W., R. L. Bailey, et al. (1998). "Antibody response to the 60-kDa chlamydial heat-shock protein is associated with scarring trachoma." *J Infect Dis* **177**(1): 256-9.
- Peeling, R. W. and R. C. Brunham (1996). "Chlamydiae as pathogens: new species and new issues." *Emerg Infect Dis* **2**(4): 307-19.
- Peter, B. J., H. M. Kent, et al. (2004). "BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure." *Science* **303**(5657): 495-9.
- Peters, J., D. P. Wilson, et al. (2007). "Type III secretion in Chlamydia." *Trends Microbiol* **15**(6): 241-51.
- Peterson, E. M., L. M. de la Maza, et al. (1998). "Characterization of a neutralizing monoclonal antibody directed at the lipopolysaccharide of Chlamydia pneumoniae." *Infect Immun* **66**(8): 3848-55.
- Pizarro-Cerda, J. and P. Cossart (2006). "Bacterial adhesion and entry into host cells." *Cell* **124**(4): 715-27.
- 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.
- Pylypenko, O., R. Lundmark, et al. (2007). "The PX-BAR membrane-remodeling unit of sorting nexin 9." *Embo J* **26**(22): 4788-800.
- 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.
- 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., T. R. Paul, et al. (1998). "Localization of Chlamydia trachomatis heat shock proteins 60 and 70 during infection of a human endometrial epithelial cell line in vitro." *Infect Immun* **66**(5): 2323-9.
- 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.
- Read, T. D., G. S. Myers, et al. (2003). "Genome sequence of Chlamydia caviae (Chlamydia psittaci GPIC): examining the role of niche-specific genes in the evolution of the Chlamydiaceae." *Nucleic Acids Res* **31**(8): 2134-47.
- Reyes-Del Valle, J., S. Chavez-Salinas, et al. (2005). "Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells." *J Virol* **79**(8): 4557-67.
- Rodel, J., M. Lehmann, et al. (2007). "Chlamydia pneumoniae infection of aortic smooth muscle cells reduces platelet-derived growth factor receptor-beta expression." *FEMS Immunol Med Microbiol* **51**(2): 363-71.
- Rodriguez, N., N. Wantia, et al. (2006). "Differential involvement of TLR2 and TLR4 in host survival during pulmonary infection with Chlamydia pneumoniae." *Eur J Immunol* **36**(5): 1145-55.
- Sallee, N. A., G. M. Rivera, et al. (2008). "The pathogen protein EspF(U) hijacks actin polymerization using mimicry and multivalency." *Nature* **454**(7207): 1005-8.
- Sasu, S., D. LaVerda, et al. (2001). "Chlamydia pneumoniae and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation." *Circ Res* **89**(3): 244-50.
- Schlumberger, M. C. and W. D. Hardt (2006). "Salmonella type III secretion effectors: pulling the host cell's strings." *Curr Opin Microbiol* **9**(1): 46-54.
- Schmidt, E. (2009). "Charakterisierung des *C. pneumoniae* Adhäsins und Invasins Pmp21." *Dissertation Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen* (Heinrich-Heine Universität Düsseldorf).
- Schroeder, G. N. and H. Hilbi (2008). "Molecular pathogenesis of Shigella spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion." *Clin Microbiol Rev* **21**(1): 134-56.

- Scidmore-Carlson, M. A., E. I. Shaw, et al. (1999). "Identification and characterization of a Chlamydia trachomatis early operon encoding four novel inclusion membrane proteins." *Mol Microbiol* **33**(4): 753-65.
- Scidmore, M. A., D. D. Rockey, et al. (1996). "Vesicular interactions of the Chlamydia trachomatis inclusion are determined by chlamydial early protein synthesis rather than route of entry." *Infect Immun* **64**(12): 5366-72.
- 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.
- Shin, N., N. Ahn, et al. (2008). "SNX9 regulates tubular invagination of the plasma membrane through interaction with actin cytoskeleton and dynamin 2." *J Cell Sci* **121**(Pt 8): 1252-63.
- Soulet, F., D. Yarar, et al. (2005). "SNX9 regulates dynamin assembly and is required for efficient clathrin-mediated endocytosis." *Mol Biol Cell* **16**(4): 2058-67.
- Spaeth, K. E., Y. S. Chen, et al. (2009). "The Chlamydia type III secretion system C-ring engages a chaperone-effector protein complex." *PLoS Pathog* **5**(9): e1000579.
- 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.
- 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., K. Koshiyama, et al. (2001). "Heparin-binding outer membrane protein of chlamydiae." *Mol Microbiol* **40**(3): 691-9.
- Stephens, R. S., G. Myers, et al. (2009). "Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of Chlamydia resolved." *FEMS Immunol Med Microbiol* **55**(2): 115-9.
- Su, H., R. P. Morrison, et al. (1990). "Identification and characterization of T helper cell epitopes of the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis." *J Exp Med* **172**(1): 203-12.
- 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., C. Delevoye, et al. (2005). "A directed screen for chlamydial proteins secreted by a type III mechanism identifies a translocated protein and numerous other new candidates." *Mol Microbiol* **56**(6): 1636-47.
- Subtil, A., C. Parsot, et al. (2001). "Secretion of predicted Inc proteins of Chlamydia pneumoniae by a heterologous type III machinery." *Mol Microbiol* **39**(3): 792-800.
- 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.
- 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.
- Tan, M., B. Wong, et al. (1996). "Transcriptional organization and regulation of the dnaK and groE operons of Chlamydia trachomatis." *J Bacteriol* **178**(23): 6983-90.
- 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.
- Toh, H., K. Miura, et al. (2003). "In silico inference of inclusion membrane protein family in obligate intracellular parasites chlamydiae." *DNA Res* **10**(1): 9-17.
- Tran Van Nhieu, G. and R. R. Isberg (1993). "Bacterial internalization mediated by beta 1 chain integrins is determined by ligand affinity and receptor density." *Embo J* **12**(5): 1887-95.
- Uliczka, F., T. Kornprobst, et al. (2009). "Cell invasion of Yersinia pseudotuberculosis by invasin and YadA requires protein kinase C, phospholipase C-gamma1 and Akt kinase." *Cell Microbiol*.
- Ungewickell, E. J. and L. Hinrichsen (2007). "Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding." *Curr Opin Cell Biol* **19**(4): 417-25.
- Valdivia, R. H. (2008). "Chlamydia effector proteins and new insights into chlamydial cellular microbiology." *Curr Opin Microbiol* **11**(1): 53-9.
- Vandahl, B. B., S. Birkelund, et al. (2001). "Proteome analysis of the Chlamydia pneumoniae elementary body." *Electrophoresis* **22**(6): 1204-23.

- 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. and P. Cossart (2006). "The role of clathrin-dependent endocytosis in bacterial internalization." *Trends Cell Biol* **16**(10): 499-504.
- Veiga, E., J. A. Guttman, et al. (2007). "Invasive and adherent bacterial pathogens co-Opt host clathrin for infection." *Cell Host Microbe* **2**(5): 340-51.
- Watson, C. and N. J. Alp (2008). "Role of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis." *Clin Sci (Lond)* **114**(8): 509-31.
- Watson, M. W., I. N. Clarke, et al. (1995). "The CrP operon of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae*." *Microbiology* **141**(Pt 10): 2489-97.
- 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.
- Wehrli, 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.
- Whitcher, J. P., M. Srinivasan, et al. (2001). "Corneal blindness: a global perspective." *Bull World Health Organ* **79**(3): 214-21.
- Wiedemann, A., S. Linder, et al. (2001). "Yersinia enterocolitica invasin triggers phagocytosis via beta1 integrins, CDC42Hs and WASp in macrophages." *Cell Microbiol* **3**(10): 693-702.
- Willger, S. (2004). "Untersuchungen zum Entwicklungszyklus von *Chlamydia pneumoniae*." *Diplomarbeit Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen* (Heinrich-Heine Universität Düsseldorf).
- 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., E. Fischer, et al. (2001). "*Chlamydia pneumoniae* major outer membrane protein is a surface-exposed antigen that elicits antibodies primarily directed against conformation- dependent determinants." *Infect Immun* **69**(5): 3082-91.
- Wolf, K. and T. Hackstadt (2001). "Sphingomyelin trafficking in *Chlamydia pneumoniae*-infected cells." *Cell Microbiol* **3**(3): 145-52.
- Worby, C. A. and J. E. Dixon (2002). "Sorting out the cellular functions of sorting nexins." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(12): 919-31.
- 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.
- Wuppermann, F. N., K. Molleken, et al. (2008). "*Chlamydia pneumoniae* GroEL1 protein is cell surface associated and required for infection of HEp-2 cells." *J Bacteriol* **190**(10): 3757-67.
- 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. (2000). "Intracellular survival by *Chlamydia*." *Cell Microbiol* **2**(4): 275-82.
- Wyrick, P. B. and S. J. Richmond (1989). "Biology of chlamydiae." *J Am Vet Med Assoc* **195**(11): 1507-12.
- Yarar, D., C. M. Waterman-Storer, et al. (2007). "SNX9 couples actin assembly to phosphoinositide signals and is required for membrane remodeling during endocytosis." *Dev Cell* **13**(1): 43-56.
- Zhang, Y. X., N. G. Watkins, et al. (1987). "The low-molecular-mass, cysteine-rich outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* possesses both biovar- and species-specific epitopes." *Infect Immun* **55**(11): 2570-3.
- 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.
- Zhong, G. M. and R. C. Brunham (1990). "Immunoaccessible peptide sequences of the major outer membrane protein from *Chlamydia trachomatis* serovar C." *Infect Immun* **58**(10): 3438-41.
- Zrieq, R. (2009). "The dual function of the *Chlamydia pneumoniae* Cpn0572 in modulating the host actin cytoskeleton." *Dissertation Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen* (Heinrich-Heine Universität Düsseldorf).

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt zuerst Herrn Prof. Dr. J. H. Hegemann für die Überlassung des interessanten Themas. Sein stetiges Interesse war von Anfang an sehr motivierend und seine neuen Ideen und Anregungen trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei. In vielen Gesprächen über Ergebnisse, experimentelle Ansätze und Probleme hat er mich durch seine ständige Diskussionsbereitschaft zum wissenschaftlichen Denken angeregt.

Ein weiterer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Rüdiger Simon für die bereitwillige Übernahme des Koreferats.

Ein ganz besonderer Dank gilt Katja Mölleken, die mir durch ihre fachliche Kompetenz und Diskussionsbereitschaft bei Problemen jeglicher Art immer geholfen hat und mich zu neuen experimentellen Ansätzen inspiriert hat, wenn sie nicht gerade auf einer Fernreise war. Der gesamten Arbeitsgruppe des Chlamydienlabors (Mr. Zrieq, Elli, Eleni und Co) sowie des Hefelabors (Frauke, Anne, Vanessa, Boris und Co) danke ich für die immer tolle Arbeitsatmosphäre während der ganzen Zeit und den zahlreichen lustigen Unternehmungen neben und nach der Arbeit. Man kann sich bei Euch einfach nur wohl fühlen. Besonders Tim und Benny möchte ich für die zahlreichen Spieleabende danken, die mir immer sehr viel Spaß gemacht haben.

In dieser Stelle möchte ich mich auch bei allen „Spaltern“ aus dem Pombe-Labor bedanken, die sehr zum Wohlfühl-Klima beigetragen haben. Ein Dank geht auch an Steffi für das Lösen aller organisatorischen Probleme und an Klaus für die Unterstützung bei den zahlreichen Stunden am FACS-Gerät.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen externen Kooperationspartnern die mich mit Plasmiden, Antikörpern und Zellen versorgt haben.

Meine Eltern danke ich dafür, dass sie mir das Studium ermöglicht haben und mich bei meinen beruflichen Entscheidungen unterstützt haben. Ein ganz besonderer Dank gilt meiner besseren Hälfte Corinna. Ich danke Dir für die große Geduld, grenzenlose Unterstützung und Liebe während der Erstellung dieser Arbeit. Danke, dass Du mich immer unterstützt hast und an mich glaubst.

Diese Dissertation wurde zu großen Teilen durch die Düsseldorf Entrepreneur Foundation finanziert und dafür möchte ich mich sehr bedanken.

9 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.

Düsseldorf, November 2009

(Gido Murra)