

**Identifizierung und Charakterisierung  
potentieller neuer Effektorproteine aus  
*Chlamydia pneumoniae***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Frauke Herbst**  
aus Wuppertal

Düsseldorf, November 2011

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  
Korreferent: Prof. Dr. Hermann Aberle

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2011

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	Adhäsionsdomäne
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserum Albumin
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl-Phosphat
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cOMC	chlamydia outer membrane complex
deion.	deionisiert
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EB	Elementarkörper
et al.	und andere
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
hpi	hours post infection, Stunde(n) nach der Infektion
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IFU	Inclusion forming units (Einschluss bildende Einheiten)
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LGV	lymphogranuloma vereum
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lipidtröpfchen
min	Minute
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
$\mu$ M	Mikromolar
MOI	multiplicity of infektion
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
OD	optische Dichte
PBS	physiologischer Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)

PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RB	Retikularkörper
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Std	Stunde
TLR2	toll like receptor 2
TTSS	Typ III-Sekretionssystem
ün	über Nacht
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute

## Zusammenfassung

Chlamydien sind obligat intrazelluläre, gram-negative Bakterien. Zu den humanpathogenen Chlamydien gehören *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* und *Chlamydia psittaci*. *C. trachomatis* ist der Hauptauslöser sexuell übertragbarer Erkrankungen, die bei Frauen zu Infertilität führen können, verursacht andererseits aber auch eine Augeninfektion, die unbehandelt zu Erblindung führt und vor allem in Entwicklungsländern ein schwerwiegendes Problem darstellt. *C. psittaci*, Auslöser der Psittakose, ist ein zoonotischer Erreger grippeähnlicher Erkrankungen mit teils tödlichem Ausgang. *C. pneumoniae* infiziert die oberen Atemwege und führt zu Bronchitis und Pneumonien, wird aber auch mit systemischen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht.

Chlamydien zeichnen sich durch einen einzigartigen, biphasischen Lebenszyklus aus und verbleiben während der gesamten intrazellulären Entwicklung in einer parasitophoren Vakuole, der so genannten Inklusion. Um intrazellulär überleben zu können, modulieren Chlamydien in vielerlei Hinsicht die Wirtszelle. Hierfür sekretieren die Bakterien Effektorproteine über den Typ III-Sekretionsapparat in die Wirtszelle und in die Inklusionsmembran, um zum Beispiel die Internalisierung zu erleichtern, eine Fusion der Inklusion mit Lysosomen zu verhindern, oder die Apoptose der Wirtszelle zu unterdrücken. Jedoch sind bis heute nur wenige Effektorproteine und ihre Funktion bekannt. Die Tatsache, dass Chlamydien bisher nicht genetisch manipulierbar sind, erschwert die Suche nach solchen Virulenzfaktoren. Ziel dieser Arbeit war es daher, in einer genomweiten Suche neue Effektorproteine zu identifizieren und zu charakterisieren.

Hierzu wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Anne Kerres eine *C. pneumoniae*-Genom-Bibliothek in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert und gezielt nach Proteinen gesucht, die in der Hefe zum Zelltod führen. Es ist bekannt, dass Effektoren, die konservierte eukaryotische Zielstrukturen angreifen, bei Expression in der Bäckerhefe zu einem Wachstumsdefekt führen können. Mit einer 33fachen genomischen Abdeckung konnten 47 unterschiedliche chlamydiale Leserahmen identifiziert werden, deren Lokalisierung und Phänotyp in Hefe genauer analysiert wurde. Bei 29 dieser Kandidaten handelte es sich um hypothetische Proteine. 15 Kandidaten waren als potentielle Inklusionsmembran-Proteine vorhergesagt. Drei der identifizierten Proteine waren zuvor als sekretierte Effektoren beschrieben.

Aufgrund der gewonnenen Daten aus Hefe, bioinformatischer Analysen und Vergleich mit den Sekretionsvorhersagen anderer Arbeitsgruppen wurden von diesen Kandidaten sechs Proteine ausgewählt, gegen die Antiseren generiert wurden, um ihre Lokalisierung und Funktion in der Infektion genauer zu studieren. Fünf der Kandidaten zeigten eine Lokalisierung innerhalb der Inklusion. Bei vier dieser Kandidaten liegt wahrscheinlich eine Assoziation mit den Bakterien vor, wobei für zwei dieser Proteine eine Funktion in der frühen

Infektion postuliert werden kann. Der fünfte Kandidat könnte mit der Inklusionsmembran in Verbindung stehen.

Für den sechsten Kandidaten, CPn0147, konnte eine Lokalisierung in der Inklusionsmembran gefunden werden. Des Weiteren lokalisierte dieses chlamydiale Inklusionsmembran-Protein in fadenartigen Strukturen, die von der Inklusionsmembran in das Zytoplasma der Wirtszelle reichten und meistens in der Nähe des Zellkerns zu finden waren. In der späten Infektion nahm das Auftreten dieser Fäden signifikant zu, hier konnte bei fast 50 % der Inklusionen mindestens ein Faden beobachtet werden. Interessanterweise konnten auf diesen Fäden und in der direkten Umgebung der Inklusion Lipidtröpfchen (LT) gefunden werden, auf deren Oberfläche CPn0147 lokalisierte, was auch biochemisch bestätigt werden konnte. Die Stimulation der LT-Bildung durch Ölsäure führte zu einer Steigerung der Fadenanzahl der Inklusionen vor allem in der späten Infektion. Lipidtröpfchen sind essentiell für die Entwicklung der Bakterien. Mit CPn0147 konnte erstmals ein chlamydiales Protein identifiziert werden, welches während der Infektion auf der Oberfläche von Lipidtröpfchen zu finden ist und sehr wahrscheinlich eine Rolle in der Rekrutierung dieser Organellen zur Inklusion spielt.

## Summary

*Chlamydiaceae* are obligate intracellular Gram-negative bacteria. *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psittaci* are the human pathogens of this family. Serovars of *C. trachomatis* are the leading cause for sexually transmitted diseases causing infertility in women. Other serovars induce infections of the eye, which can lead to a preventable form of blindness, a severe problem in the third world. *C. psittaci*, causative of the psittacosis, is a zoonotic agent of flu-like, sometimes lethal diseases. *C. pneumoniae* infects the upper respiratory tract inducing bronchitis and pneumonia but is also thought to cause systemic infections.

Chlamydia exhibit a unique biphasic lifecycle and stay for the whole intracellular development inside a parasitophorous vacuole termed the inclusion.

Chlamydia modulate the host cell in various ways to establish their intracellular life style. Therefore they secrete effector proteins via the type three secretion apparatus into the host cell and into the inclusion membrane e.g. to enhance their uptake, prevent lysosomal fusion or inhibit host cell apoptosis. To date, only few effector proteins and their functions are known and the fact that chlamydia are genetically intractable makes it even more difficult to identify these virulence factors. The goal of this work was therefore the identification and characterization of new effector proteins in a genome-wide approach.

For this reason we expressed a genomic *C. pneumoniae* library in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and screened for yeast cell exhibiting a lethal phenotype. It is already described that effectors that target conserved eukaryotic structures lead to growth defects when expressed in yeast. With this approach we could identify 47 different chlamydial ORFs from which we analyzed the localization and phenotype in yeast in more detail. This screening was performed in close collaboration with Dr. Anne Kerres. 29 of the isolated candidates were hypothetical proteins with unknown function. For fifteen candidates a localization in the inclusion membrane was predicted. Amongst the 47 candidates were three already described secreted proteins.

With the yeast data, bioinformatic searches and the comparison with secretion predictions from other working groups six candidates were chosen against which antisera were generated to study their localization and function during infection. Five of these candidates showed an intra-inclusion localization, four of them seemed to be bacteria-associated while one could be an inclusion membrane associated protein.

The last candidate, CPn0147 could be localized in the inclusion membrane and in fibers extending from the inclusion membrane into the host cell cytosol where they often located in close proximity to the host cell nucleus. The abundance of these fibers increased significantly in the late stage of infection: 50 % of the inclusions could be associated with at least one fiber at late time points. Interestingly, CPn0147 could be also identified on lipid droplets (LDs)

close to the inclusion or on the observed fibers. The LD association could be verified biochemically. Stimulation of LD synthesis with oleic acid led to a significant increase in fiber formation at late time points of infection. Lipid droplets are essential for the chlamydial development and CPn0147 is the first chlamydial protein that could be found on LDs outside the inclusion and that is very likely playing a role in recruiting LDs to the inclusion.

# Inhalt

Abkürzungsverzeichnis .....	1
Zusammenfassung .....	3
Summary .....	5
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>14</b>
1.1 Taxonomie .....	14
1.2 Chlamydien als Krankheitserreger .....	15
1.2.1 <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	16
1.2.2 <i>Chlamydia pneumoniae</i> .....	17
1.3 Pathogene Bakterien und die Interaktionen mit der Wirtszelle.....	17
1.3.1 Bakterielle Sekretionssysteme.....	18
1.3.1.1 Die Typ III-Translokationspore .....	21
1.3.2 Der chlamydiale Lebenszyklus .....	21
1.3.3 Effektorproteine der Chlamydien .....	24
1.3.4 Die Inklusionsmembran .....	27
1.3.4.1 Die Inc-Proteine .....	28
1.4 Chlamydien benötigen Wirtszellnährstoffe zur Proliferation.....	30
1.4.1 Was sind Lipidtröpfchen? .....	30
1.4.2 Chlamydien interagieren mit Lipidtröpfchen der Wirtszelle.....	32
1.5 Identifizierung von Effektorproteinen .....	33
1.5.1 Hefe als Tool zur Identifizierung neuer Effektorproteine .....	35
1.6 Zielsetzung .....	36
<b>2 MATERIALIEN .....</b>	<b>37</b>
2.1 Gebrauchsartikel.....	37
2.2 Geräte und Maschinen.....	37
2.3 Chemikalien .....	38
2.4 Enzyme.....	41
2.4.1 Nukleasen .....	41
2.4.2 Restriktionsenzyme .....	41
2.4.3 Polymerasen .....	41
2.4.4. Andere Enzyme .....	41
2.5 Antikörper .....	41
2.6 Fluoreszenzfarbstoffe.....	43
2.7 Kits.....	43
2.8 DNA Größenstandard .....	43
2.9 Proteingrößenstandard .....	43
2.10 Oligonukleotide .....	43
2.11 Plasmide .....	43
2.12 Zellen und Zelllinien .....	44
2.12.1 Prokaryotische Zellen / Isolate.....	44

2.12.1.1 Chlamydia pneumoniae .....	44
2.12.1.3 Escherichia coli .....	44
2.12.2 Eukaryotische Zellen / Zelllinien .....	44
2.12.2.1 Saccharomyces cerevisiae.....	44
2.12.2.2 Adhärenente Zellkulturzellen.....	44
2.13 Medien und Medienzusätze .....	45
2.13.1 Zell- und Chlamydienkulturmedium.....	45
2.13.2 Medien für <i>Escherichia coli</i> .....	45
2.13.3 Medien für <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	45
<b>3. METHODEN .....</b>	<b>47</b>
3.1 Zellbiologische Methoden .....	47
3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen in der Zellkultur .....	47
3.1.1.1 Herstellung des Zellkulturmediums .....	47
3.1.1.2 Herstellung aller Stammlösungen für die Zellkultur .....	47
3.1.1.2 Auftauen von adhärenenten epithelialen Zellen .....	47
3.1.1.3 Trypsinbehandlung zum Ablösen adhärenenter epithelialer Zellen .....	48
3.1.1.4 Passagieren von adhärenenten epithelialen Zellen .....	48
3.1.1.5 Einfrieren von Humanzellen .....	49
3.1.1.6 Bestimmung von Zellzahlen .....	49
3.1.1.7 Transfektion adhärenenter epithelialer Zellen mittels Calciumphosphat .....	49
3.1.1.8 Transfektion adhärenenter epithelialer Zellen mit Primärantikörpern.....	50
3.1.2 Chlamydienkultur.....	50
3.1.2.1 Herstellung des Chlamydienkulturmediums .....	50
3.1.2.2 Lösungen für die Chlamydienkultur .....	50
3.1.2.3 Auftauen einer Chlamydien suspension zur Kultivierung.....	50
3.1.2.4 Passage von Chlamydien in 24-Well-Platten.....	50
3.1.2.5 Passage von Chlamydien in kleinen Zellkulturflaschen .....	51
3.1.2.6 Sedimentation und Einfrieren von Chlamydien.....	52
3.1.2.7 Reinigung von Chlamydien durch Zentrifugation .....	52
3.1.2.8 Titration von Chlamydien suspensionen.....	52
3.1.2.9 Test von Zellkultur- und Chlamydienkultur auf Kontaminationen durch Mycoplasma sp.....	53
3.1.2.10 Immunologischer Nachweis von Chlamydien mittels Fluoreszenzmikroskopie .....	54
3.1.2.11 Gewinnung von chlamydialer DNA für PCR-Reaktionen .....	55
3.1.2.12 Bestimmung der Inklusionsgröße .....	55
3.1.3 Kultivierung und Manipulation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	55
3.1.3.1 Durchführung des Screenings zur Identifizierung potentieller Effektorproteine .....	55
3.1.3.2 Apoptose/Nekrose-Assay mit Hefezellen zur Überprüfung des induzierten letalen Phänotyps der isolierten Bankplasmide .....	57

3.1.3.3	Induktion von Proteinen in Hefezellen .....	58
3.1.3.4	Mikroskopie von Hefezellen .....	58
3.1.3.5	Serielle Verdünnungstropftests .....	59
3.1.3.6	Hefe-Zwei-Hybrid Assay .....	59
3.1.3.7	Latrunculin B Assay .....	63
3.1.4	Kultivierung und Manipulation von <i>Escherichia coli</i> .....	64
3.1.4.1	Herstellung elektrokompeterer XL <sub>1</sub> -blue Zellen.....	64
3.1.4.2	Transformation in <i>E. coli</i> .....	64
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	65
3.2.1	Gewinnung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> Kulturen.....	65
3.2.1.1	Plasmid-Midipräparation .....	65
3.2.1.2	Plasmid-Minipräparation .....	65
3.2.2	DNA-Mengenbestimmung durch photometrische Messung .....	65
3.2.3	Analytische Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	66
3.2.4	Auftrennung von DNA-Molekülen durch Gelelektrophorese in Agarosegelen .....	66
3.2.4.1	Gelelektrophoresepuffer.....	66
3.2.5	DNA-Fällung.....	66
3.2.6	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	67
3.2.7	Berechnung der optimalen Annealing Temperatur von Oligonukleotiden.....	67
3.2.8	PCR-Reaktion (Polymerase Chain Reaction) .....	67
3.2.8.1	Bedingungen der PCR-Reaktion .....	67
3.2.8.2	Ansetzen einer PCR-Reaktion .....	67
3.2.8.3	PCR auf Hefezellen.....	68
3.2.9	Gesamt-DNA-Isolation aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	68
3.2.10	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	68
3.2.11	Integration von DNA-Fragmenten in Vektoren über homologe <i>in vivo</i> Rekombination .....	68
3.3	Biochemische Methoden.....	69
3.3.1	Induktion der Genexpression in <i>E. coli</i> .....	69
3.3.2	Affinitätschromatografische Aufreinigung von Proteinen .....	69
3.3.2.1	Reinigung von nativen GST-Fusionsproteinen .....	69
3.3.2.2	Reinigung von denaturierten Proteinen .....	69
3.3.2.3	Dialyse von denaturierten Proteinen .....	70
3.3.3	Proteinprobenaufarbeitung für SDS-Polyacrylamidgele .....	70
3.3.4	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	71
3.3.4.1	Herstellung des Trenngels .....	71
3.3.4.2	Herstellung des Sammelgels.....	71
3.3.4.3	SDS-Gelelektrophorese .....	72
3.3.5	Färbung eines Proteingels mittels Coomassie-Blau .....	72
3.3.5.1	Herstellung der Coomassie-Färbelösung .....	72
3.3.5.2	Färbung von Proteingelen.....	72

3.3.6	Proteinmengenbestimmung mittels Bradford-Reagenz.....	72
3.3.7	Westernblotanalyse.....	73
3.3.7.1	Aufbau der Blotapparatur.....	73
3.3.7.2	Abbau der Blotapparatur.....	73
3.3.7.3	Antikörperreaktion auf der Immobilon-P Membran.....	73
3.3.7.4	Farb-Entwicklung von Westernblots mittels alkalischer Phosphatase.....	74
3.3.8	Far Western Analyse zur Ermittlung möglicher direkter Protein-Protein-Interaktionen.....	74
3.3.9	Biochemische Methoden zur Suche nach Interaktionspartnern.....	75
3.3.9.1	Herstellung von Humanzell-Lysaten.....	75
3.3.9.2	GST-Pulldown Experimente.....	76
3.3.9.3	NHS-Pulldown Experimente.....	76
3.3.9.4	Immunpräzipitation aus infizierten Zellen nach intrazellulärem Crosslinking mittels DSP.....	77
3.3.10	Generierung polyklonaler Antikörper.....	77
3.3.11	Antigenreinigung polyklonaler Antikörper mit NHS-Sepharose.....	78
3.3.12	Dichtegradienten-Fraktionierung von infizierten Humanzellen.....	79
3.3.12.1	Fraktionierung mit Optiprep®.....	79
3.3.12.2	Fraktionierung mit Saccharose.....	80
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>81</b>
4.1	Neue potentielle Effektorproteine konnten mit Hilfe des Screenings identifiziert werden.....	81
4.1.1	Was ist über die potentiellen Effektorkandidaten bisher bekannt?.....	84
4.1.1.1	Viele der Kandidaten verfügen über ein vorhergesagtes N-terminales Sekretionssignal.....	86
4.1.1.2	Viele Kandidaten weisen die typischen Charakteristika von Inc-Proteinen auf.....	87
4.1.2	Die Kandidaten zeigen unterschiedliche Lokalisierungsmuster in Hefezellen.....	88
4.1.3	Welche Art von Zelltod wird in Hefe verursacht?.....	91
4.1.4	Hat die Expression der Kandidaten in Hefe Auswirkungen auf das Aktin-Zytoskelett?.....	94
4.2	Auswahl der interessantesten Kandidaten.....	96
4.2.1	Die ausgewählten Kandidaten verursachen unterschiedlich starke Wachstumsdefekte in Hefezellen.....	96
4.2.2	Analyse des potentiellen Effektorproteins CPn0350.....	97
4.2.2.1	CPn0350 lokalisiert bei ektopischer Expression im Zellkern.....	98
4.2.2.2	CPn0350 kann innerhalb der Inklusion und in Bakterienextrakten detektiert werden.....	100
4.2.2.3	CPn0350 zeigt eine Bakterienassoziation in der Infektion.....	103
4.2.3	Analyse des Screenkandidaten CPn0181.....	105
4.2.3.1	CPn0181 zeigte einen apoptotischen Phänotyp in Hefe und lokalisiert im Zellkern von Humanzellen.....	106

4.2.3.2 CPn0181 kann in Bakterienfraktionen detektiert werden .....	107
4.2.3.2 CPn0181 akkumuliert in der Nähe der Inklusionsmembran .....	108
4.2.4 Analyse des Effektorprotein-Kandidaten CPn0472 .....	109
4.2.4.1 CPn0472 lokalisiert bei ektopischer Expression fadenartig im Zellinneren ...	110
4.2.4.2 CPn0472 kann in der Infektion hauptsächlich als C-terminales Fragment nachgewiesen werden .....	111
4.2.4.3 In der Infektion kann CPn0472 mit den Bakterien assoziiert detektiert werden .....	114
4.2.5 CPn0809 könnte eine Rolle in der frühen Infektionsphase spielen .....	116
4.2.5.1 Die subzelluläre Lokalisierung von CPn0809 bei ektopischer Expression bleibt unklar.....	119
4.2.5.2 CPn0809 ist ein in EBs stark exprimiertes Protein .....	120
4.2.5.3 Die Immunfluoreszenz bestätigt die EB-Abundanz von CPn0809 .....	122
4.2.6 CPn1054, ein Vertreter der ppp-Familie .....	125
4.2.6.1 Die subzelluläre Lokalisation von CPn1054 in Humanzellen ähnelt der in Hefe beobachteten Lokalisierung .....	128
4.2.6.2 Die CPn1054 zeigt unterschiedliche Expressionsmuster.....	128
4.2.6.3 CPn1054 zeigt eine bakterienassoziierte Lokalisierung in der Infektion.....	131
4.2.7 CPn0147 ist ein Vertreter der chlamydialen Inc-Proteine.....	133
4.2.7.1 Der Transmembranbereich ist für den letalen Phänotyp in Hefe verantwortlich .....	134
4.2.7.2 CPn0147-GFP lokalisiert im ER der Hefe.....	136
4.2.7.3 In transfizierten Humanzellen lokalisiert CPn0147-GFP im ER .....	138
4.2.7.4 CPn0147 kann nach 24 Stunden in infizierten Zellen detektiert werden .....	140
4.2.7.5 CPn0147 zeigt eine Lokalisierung in der Inklusionsmembran.....	142
4.3 Weiterführende Analysen zu CPn0147 .....	144
4.3.1. Immunfluoreszenz-Analysen der CPn0147-Fäden.....	144
4.3.1.1 Momp ist teilweise auf den CPn0147-Fäden zu detektieren .....	144
4.3.1.2 Die CPn0147-Fäden umspannen den Zellkern.....	145
4.3.1.3 Die Häufigkeit von Faden-assoziierten Inklusionen nimmt in der späten Infektionsphase zu .....	147
4.3.1.4 Es konnte keine Wirtszell-Struktur mit den CPn0147-Fäden assoziiert werden .....	149
4.3.1.4 Sind die Fäden an der Bildung von Sekundärinklusionen beteiligt?.....	152
4.3.2 Die Sekretion von CPn0147 .....	155
4.3.2.1 CPn0147 wird früh in die Inklusionsmembran sekretiert.....	155
4.3.2.2 Die Inklusionsmembran zeigt ringförmige CPn0147-Signale .....	156
4.3.2.3 CPn0147 in der Inklusionsmembran ist von der zytosolischen Seite aus zugänglich .....	156
4.3.2.3 In fraktionierten Zellen kann CPn0147 in Membranfraktionen nachgewiesen werden.....	159
4.3.2.3.1 Analyse der anderen Kandidaten in fraktionierten Zellen .....	160
4.3.3 CPn0147 lokalisiert auf der Oberfläche von Lipidtröpfchen.....	162

4.3.4 Suche nach Interaktionspartnern von CPn0147.....	164
4.3.4.1 Screening nach humanen Interaktionspartner mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse.....	164
4.3.4.2 Screening nach chlamydialen Interaktionspartner mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse.....	164
4.3.4.3 Suche nach Interaktionspartnern mit biochemischen Ansätzen.....	165
4.3.4.3.1 Immunpräzipitation aus infizierten Zellen.....	165
4.3.4.3.2 Pulldown-Experimente mit rekombinantem Protein.....	165
4.3.4.3.3 Tandem-Affinitäts-Reinigung.....	166
4.3.4.4 Transfektionsanalysen mit CPn0147.....	167
4.3.4.5 Gezielte Suche nach Interaktionspartner mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse.....	170
4.3.5 Weiterführende Analysen zur Interaktion von CPn0147 mit Lipidtröpfchen.....	171
4.3.5.1 Durch Ölsäure-Stimulation bilden mehr Inklusionen die CPn0147-Fäden aus.....	171
4.3.5.2 Eine Inhibierung der Lipidtröpfchen-reduziert die Anzahl der CPn0147-Fäden und die Größe der Inklusionen.....	172
4.3.5.3 CPn0147 kann in der Lipidtröpfchen-Fraktion von infizierten Zellen nachgewiesen werden.....	175
4.3.5.4 Die CPn0147-Fäden scheinen eine Rolle in der Rekrutierung der Lipidtröpfchen zur Inklusion zu spielen.....	176
<b>5 DISKUSSION.....</b>	<b>180</b>
5.1. Der Hefescreen und die potentiellen Kandidaten.....	180
5.2. CPn0181 – ein Inc-Protein?.....	184
5.3 Cpn0350 scheint ein intrachlamydiales Protein zu sein.....	185
5.4 CPn0472 – ein mögliches Adhäsion?.....	187
5.5 Ist CPn0809 ein sekretiertes Effektorprotein oder ein Translokon-Protein?.....	188
5.6 CPn1054 und die ppp-Proteinfamilie.....	192
5.7 Modell der Funktionen der untersuchten Kandidaten.....	194
5.8 Das Inc-Protein CPn0147 kolokalisiert mit Lipidtröpfchen.....	195
5.8.1 CPn0147 lokalisiert in der Inklusionsmembran und auf zytoplasmatischen Fäden.....	195
5.7.1.1 Die mögliche Entstehung der Fäden als Ausstülpungen der Inklusionsmembran.....	196
5.7.1.2 Die Bildung von Sekundärinklusionen mit Hilfe der CPn0147-Fäden scheint unwahrscheinlich.....	199
5.8.1.1 Die CPn0147-Fäden umgeben den Zellkern.....	200
5.8.2 Rekrutiert CPn0147 Lipidtröpfchen zur Inklusion?.....	201
5.8.3 Die Suche nach Interaktionspartnern von CPn0147.....	203
5.8.3.1 Mögliche Interaktionspartner von CPn0147.....	206
5.8.4 Ein hypothetisches Modell der Funktion von CPn0147.....	207
<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>210</b>

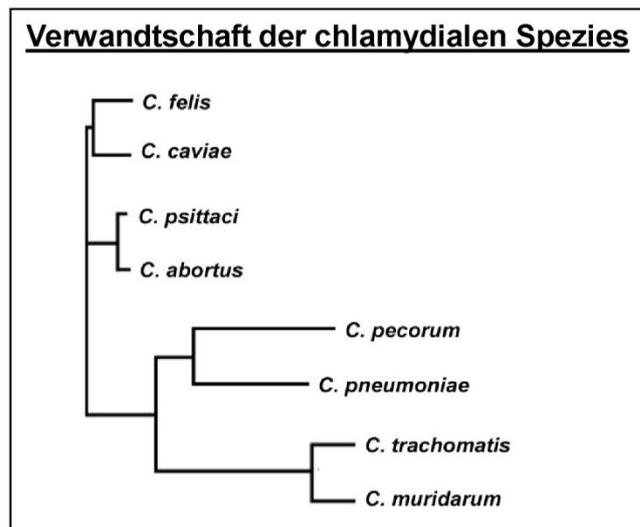
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>217</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>219</b>
<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>220</b>

## 1 Einleitung

Chlamydien sind obligat-intrazelluläre, gramnegative Bakterien, die aufgrund ihres einzigartigen, biphasischen Lebenszyklus in eine eigene Ordnung, die *Chlamydiales*, eingeteilt werden. Sie sind in der Lage, ein breites Spektrum an Wirtsorganismen zu infizieren und verursachen sehr unterschiedliche Krankheiten. Des Weiteren kommen auch endosymbiontische Organismen in dieser Gattung vor, die zum Beispiel in Amöben leben. Sie können nicht frei in der Umwelt überleben und benötigen immer eine Wirtszelle für die Replikation. Neben großen wirtschaftlichen Schäden hervorgerufen durch die Infektion von Nutztieren sind Chlamydien als humanpathogene Erreger von großer Bedeutung. Bisher gibt es kein Vakzin gegen eine Chlamydieninfektion und die Erforschung der für die Infektion relevanten chlamydialen Proteine könnte hier Abhilfe schaffen.

### 1.1 Taxonomie

Chlamydien werden aufgrund ihres einzigartigen Lebenszyklus und der fehlenden Peptidoglykanschicht in eine eigene Ordnung, die *Chlamydiales*, eingeteilt. Anstelle von Peptidoglykan wird die Integrität der Bakterienzellwand durch die Disulfid-Verknüpfung von Proteinen der äußeren Membran erreicht. Bei diesen Proteinen handelt es sich hauptsächlich um das Major Outer Membran Protein Momp und zu geringeren Anteilen um die Cystein-reichen Proteine OmcA und OmcB (outer membran complex Proteine A und B) (Caldwell, Kromhout et al. 1981; Hatch, Allan et al. 1984). Zu der Ordnung der *Chlamydiales* gehören mittlerweile 4 Familien. Neben der Familie der *Chlamydiaceae* wurden in den letzten Jahren auch die Familien der *Parachlamydiaceae*, *Waddliaceae* und *Simkaniaceae* den *Chlamydiales* zugeordnet, deren Vertreter zum Beispiel als Symbionten in freilebenden Amöben vorkommen (Everett, Bush et al. 1999; Rurangirwa, Dilbeck et al. 1999; Horn, Wagner et al. 2000). Die Familie der *Chlamydiaceae* wurde bisher aufgrund von rRNA-Analysen in zwei Gattungen unterteilt, *Chlamydia* und *Chlamydophila*. Zu den Arten der Gattung *Chlamydia* gehören *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia suis* und *Chlamydia muridarum*. *Chlamydia pneumoniae* gehörte zusammen mit *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia felis*, *Chlamydia caviae* und *Chlamydia abortus* zu den sechs Arten der Gattung *Chlamydophila*. Aufgrund neuerer Analysen und Sequenzvergleiche wurde im Jahr 2010 beschlossen, dass nun alle Arten der Familie der *Chlamydiaceae* unter dem Gattungsnamen *Chlamydia* zusammengefasst werden sollten, da dies die Biologie und Verwandtschaft der chlamydialen Spezies besser widerspiegelt (Stephens, Myers et al. 2009; Greub 2010). Nach diesen neueren Erkenntnissen ist zum Beispiel *C. pneumoniae* genetisch näher verwandt mit *C. trachomatis* als mit *C. felis* oder *C. psittaci*, mit denen es früher eine Gattung teilte (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Genetische Verwandtschaft innerhalb der Gattung *Chlamydia***

Ermittelt anhand von Sequenzanalysen 110 konservierter Gene (Everett and Hatch 1995; Stephens, Myers et al. 2009).

## 1.2 Chlamydien als Krankheitserreger

Die wichtigste Bedeutung als humanpathogene Erreger besitzen *C. trachomatis* und *C. pneumoniae*. Zu den Tier-pathogenen Chlamydien gehören *C. suis*, *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. psittaci*, *C. felis*, *C. caviae* und *C. abortus*. Sie sind in verschiedenen Nutztieren wie Rindern, Schafen, Pferden und Ziegen nachweisbar, aber auch Nagetiere und Katzen können infiziert werden. Die Chlamydien infizieren das Epithelgewebe der Augen, des Respirations-, Urogenital- oder Darmtraktes und können in den infizierten Tieren neben starken respiratorischen und intestinalen Erkrankungen zu Infertilität und dem Abort von Föten führen, was bei Nutztieren jährlich einen großen wirtschaftlichen Schaden verursacht (Busch, Thoma et al. 2000; Kerr, Entrican et al. 2005). *C. abortus* besiedelt die Plazenta von tragenden Schafen und löst einen enzootischen Abort (ovine enzootic abortion, OEA) aus, dessen wirtschaftlicher Schaden 1992 allein für Großbritannien mit 19-20 Millionen Pfund pro Jahr beziffert wurde und die häufigste Ursache der durch Infektionen verursachten Aborte in Flachland-Herden darstellt (Kerr, Entrican et al. 2005).

Daneben treten auch *C. abortus* und *C. psittaci* als zoonotische Erreger in Erscheinung. Bei schwangeren Frauen, die Umgang mit Tieren hatten, die mit *C. abortus* infiziert waren, konnten in vereinzelt Fällen Fehlgeburten beobachtet werden, die durch eine *C. abortus* Infektion ausgelöst wurden (Pospischil, Thoma et al. 2002). *C. psittaci* ist ein weit verbreiteter Erreger der so genannten Psittakose oder Ornithose in Vögeln. Im Gegensatz zu *C. abortus* kommt es häufig zu zoonotischen Erkrankungen, die sich in einem grippeähnlichen Krankheitsbild zeigen, das teilweise tödlich verläuft (Fryden, Kihlstrom et al. 1989; Peeling and Brunham 1996). Die Ornithose ist eine meldepflichtige Erkrankung und in Deutschland werden jährlich ca. 50 Personen mit *C. psittaci*-Infektionen registriert (Quelle: Robert Koch-Institut: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2009, Berlin, 2010)

In Winter 1929/1930 kam es zu einer Pandemie humaner Ornithosen, ausgelöst durch den Import infizierter Papageien aus Argentinien, bei der die Sterblichkeitsrate bei 40 % lag (Beeckman and Vanrompay 2009; Harkinezhad, Geens et al. 2009).

### 1.2.1 *Chlamydia trachomatis*

*C. trachomatis* wird in drei Biovare und diese wiederum in mehrere Serovare unterteilt. Die Vertreter des LGV-Biovars, benannt nach dem Lymphogranuloma venereum, verursachen generell eher systemische Erkrankungen und sind invasiver (Peterson, Hoshiko et al. 1990). Das Lymphogranuloma venereum ist eine sexuell übertragbare Erkrankung, die von den Serovaren L1-L3 ausgelöst wird. Nach einer anfänglichen Bildung von Geschwüren an der Kontaktstelle (genital, oral, rektal) dringt der Erreger in das Lymphsystem ein und verursacht dort unbehandelt eine chronische Infektion.

Die Serovare A-K des zweiten Biovars, Trachoma, verursachen Infektionen des Auges, das dritte Biovar infiziert Epithelien des Urogenitaltraktes (Serovare D-K). *C. trachomatis* gilt als Hauptauslöser sexuell übertragbarer Erkrankungen, zu denen die entzündlichen Erkrankungen Salpingitis, Epididymitis, Urethritis, Endometritis und Zervizitis zählen. Sehr häufig verlaufen die Infektionen asymptomatisch, wodurch sie meist unbehandelt bleiben und somit unbemerkt weiter verbreitet werden (Peeling and Brunham 1996). Zwischen 10 % und 40 % der Frauen mit unbehandelter *C. trachomatis*-Infektion entwickeln eine symptomatische Unterleibsentzündung, deren Auswirkungen einerseits zu einem gehäuften Auftreten von Eileiterschwangerschaften führen können. Andererseits kann es zu einem Eileiterverschluss und somit zur Unfruchtbarkeit kommen. Dies ist in 30 % bis 40 % aller Fälle von Unfruchtbarkeit bei Frauen der Auslöser. Bei Männern ist eine Infektion mit *C. trachomatis* der häufigste Auslöser der nichtgonorrhöischen Urethritis (NGU). Neben den genannten Erkrankungen des Urogenitaltraktes sind die Serovare A-C von *C. trachomatis* Auslöser des Trachoms, einer Entzündung der Bindehaut, die unbehandelt zur Erblindung führen kann. Weltweit sind 3,6 % aller Fälle von Blindheit auf eine *C. trachomatis*-Infektion zurückzuführen (Quelle: WHO). Vor allem in Entwicklungsländern ist diese Krankheit ein großes Problem. Weltweit sind etwa 84 Millionen Menschen betroffen, von denen ca. 8 Millionen visuelle Beeinträchtigungen aufweisen. Für das Jahr 1999 schätzte die WHO die Anzahl der Neuinfektionen mit *C. trachomatis* auf insgesamt 92 Millionen Fälle weltweit (Peeling and Brunham 1996; WHO 2011).

Des Weiteren ist eine Infektion mit *C. trachomatis* der häufigste bakterielle Auslöser für die Entwicklung einer reaktiven Arthritis (Rihl, Kohler et al. 2006; Carter, Inman et al. 2011).

### 1.2.2 *Chlamydia pneumoniae*

*C. pneumoniae* verursacht respiratorische Erkrankungen der oberen und unteren Atemwege, wie Pharyngitis, Sinusitis, Bronchitis und Pneumonien (Grayston, Wang et al. 1989). Es wird von einer Durchseuchung von 40-60 % der erwachsenen Bevölkerung weltweit ausgegangen, was für eine hohe Prävalenz und häufige Reinfektionen spricht (Peeling and Brunham 1996). In der Altersgruppe der 60-70jährigen wurde sogar eine Antikörperprävalenz von 70-80 % ermittelt (Blasi, Tarsia et al. 2009). Etwa 6-20% der ambulant erworbenen Pneumonien sind auf eine Infektion mit *C. pneumoniae* zurückzuführen (Hammerschlag 2000). Es konnte auch ein Zusammenhang zwischen *C. pneumoniae*-Infektionen und Asthma hergestellt werden, da viele Asthmatiker deutlich erhöhte Antikörperwerte gegen *C. pneumoniae* aufweisen. In 4-25 % der Asthmaerkrankungen konnte eine Infektion mit *C. pneumoniae* nachgewiesen werden (Hahn, Dodge et al. 1991; Blasi, Tarsia et al. 2009). Neben den respiratorischen Erkrankungen konnte *C. pneumoniae* auch mit vielen anderen Erkrankungen assoziiert werden, wobei noch nicht geklärt ist, ob die chlamydiale Infektion einen Auslöser oder eine Begleiterscheinung dieser Erkrankungen darstellt. Hierzu zählen Alzheimer, Atherosklerose, reaktive Arthritis, Migräne und Multiple-Sklerose (Grayston and Campbell 1999; Stratton and Wheldon 2006; Balin, Little et al. 2008; Watson and Alp 2008; Gerard, Whittum-Hudson et al. 2009; Lu, Xu et al. 2009). In den meisten Fällen beruht der hergestellte Zusammenhang auf dem serologischen Nachweis von Antikörpern gegen *C. pneumoniae* in Patienten mit den oben genannten Erkrankungen oder dem mikroskopischen bzw. PCR-basierten Nachweis von Bakterien in betroffenen Geweben. Im Falle von Alzheimer und Atherosklerose konnten lebende Bakterien aus den erkrankten Geweben isoliert werden (Ramirez 1996; Balin and Appelt 2001).

### 1.3 Pathogene Bakterien und die Interaktionen mit der Wirtszelle

Pathogene Bakterien können unterteilt werden in obligat-intrazelluläre und fakultativ-intrazelluläre Bakterien. Zu Letzteren gehören unter anderem Salmonellen, Listerien, Yersinien, *Helicobacter pylori* und pathogene *E. coli*-Stämme. Neben der Infektion von Zelloberflächen, die zum Teil mit der Bildung von Biofilmen einhergeht, können die Bakterien auch durch Phagozytose oder bakteriell-vermittelte Endozytose in die Zellen eindringen. Dort sind sie von einer Membran umschlossen, dem so genannten Phagosom. Die meisten fakultativ intrazellulären Bakterien entkommen dem Phagosom und liegen dann frei im Zytoplasma vor, durch das sie sich teilweise mittels Aktin-Rekrutierung und -Modifizierung bewegen können. Bemerkenswert ist hier zum Beispiel die Motilität von *Listeria monocytogenes*. Dieses Bakterium kann mittels eines Antriebs aus polymerisiertem Wirtszell-Aktin auch die Plasmamembranen zu Nachbarzellen durchstoßen und so weitere

Zellen infizieren (Robbins, Barth et al. 1999). Enteropathogene *E. coli* (EPEC) translozieren einen eigenen Rezeptor, Tir (translocated intimin receptor) in die Wirtszell-Membran, an den sie dann mit dem Oberflächenprotein Intimin binden und die eigene Aufnahme in die Wirtszelle durch Aktin-Rekrutierung einleiten (Kenny, DeVinney et al. 1997). Salmonellen, aber auch andere Erreger, verbleiben im Phagosom und vermehren sich dort (Holden 2002). Zu den obligat intrazellulären Bakterien gehören Chlamydien, Rickettsien und Mycoplasmen. Ihnen ist gemeinsam, dass sie aufgrund ihrer parasitären Lebensweise ein sehr kondensiertes Genom aufweisen. Rickettsien entkommen dem Phagosom und sind teilweise zur Aktin-vermittelten Bewegung innerhalb der Wirtszelle befähigt (Renvoise, Merhej et al. 2011). Chlamydien verbleiben während ihrer intrazellulären Replikation im Phagosom, das Einschluss oder Inklusion genannt wird.

### 1.3.1 Bakterielle Sekretionssysteme

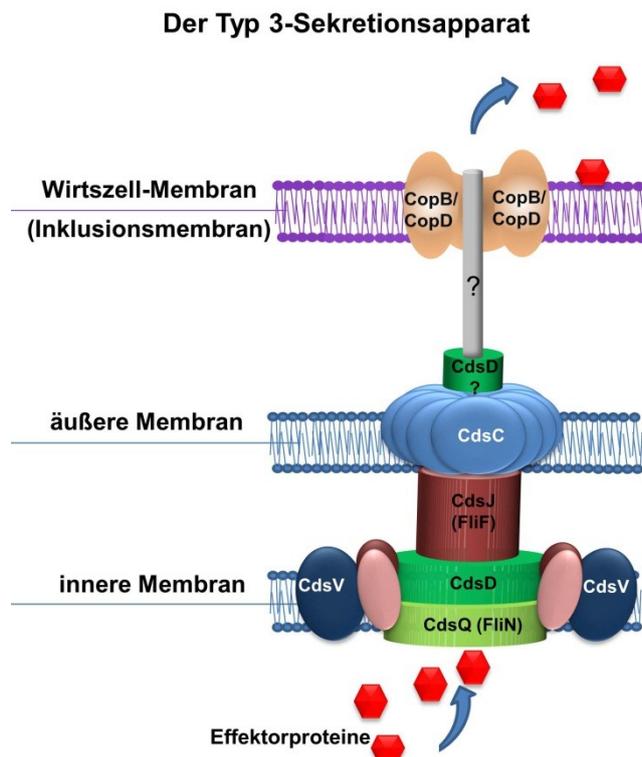
Pathogene Bakterien haben eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt, um ihr extra- oder intrazelluläres Leben im infizierten Wirt zu realisieren. Sie müssen ihre Adhäsion oder Internalisierung bewerkstelligen und dem Wirtszell-Immunsystem entgehen. Die obligat-intrazellulären Bakterien benötigen außerdem Wirtszell-Nährstoffe für ihre Replikation. Hierzu haben Bakterien verschiedene Sekretionssysteme entwickelt, die Effektorproteine in die Wirtszelle einschleusen und dort Zielstrukturen zu ihrem Vorteil verändern. Diese Systeme werden in mittlerweile sieben unterschiedliche Klassen eingeteilt, die Typ I bis VII-Sekretionssysteme. Das Typ I-Sekretionssystem besteht aus drei Komponenten und erlaubt eine Sec-unabhängige Sekretion von Polypeptiden bis 800 kDa durch die Zellwand. Es besteht aus einem ABC-Transporter, der Energie durch die Hydrolyse von ATP zur Verfügung stellt, einem multimeren Membran-Fusionsprotein (MFP) und einem Protein-Trimer in der äußeren Membran (Holland, Schmitt et al. 2005). Das Typ II-Sekretionssystem wird auch GSP (general secretory pathway) genannt und ist ein zweistufiger Prozess, bei dem zuerst der Transport durch die innere Membran ins Periplasma Sec- oder Tat-abhängig stattfindet. Der zweite Schritt ist die Sekretion durch die äußere Membran mittels des Typ II-Sekretionsapparates, der aus mindestens 12 Proteinen besteht und die Membran als großer Komplex durchspannt (Buddelmeijer, Krehenbrink et al. 2009).

Die Typ IV-Pili dienen Bakterien eigentlich zur Konjugation, aber viele pathogene gramnegative Bakterien nutzen dieses Sekretionssystem auch, um Effektorproteine zu translozieren. Es besteht aus drei Strukturen, zum einen Adhäsinen und /oder Pili, die den Zellkontakt herstellen, einem Sekretionskanal durch die Zellwand und einem Typ IV Kopplungsprotein (T4CP), welches als Substrat-Rezeptor am Eingang des Sekretionskanals dient (Hayes, Aoki et al. 2010). Bei dem Typ V-Sekretionssystem handelt es sich um Autotransporter, deren Transport ins Periplasma sec-abhängig erfolgt. Der zweite Schritt ist

die Bildung einer Pore in der äußeren Membran, die von den C-terminalen  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen des Autotransporters gebildet wird. Durch diese Pore wird der N-Terminus exportiert und kann dann abgespalten werden (Henderson, Navarro-Garcia et al. 1998). Die Typ VI-Sekretionssysteme gramnegativer Bakterien haben strukturelle und Sequenz-Ähnlichkeiten mit Systemen von Bakteriophagen, was einen gemeinsamen Ursprung nahelegt. Sie bestehen aus vielen Proteinen, die zum einen eine basale Verankerung auf der zytosolischen Seite der inneren Membran bilden und dann eine Art Röhre formen, die von einer Kappe verschlossen ist, die beim Durchstoßen der Zellwand der Fremdzelle (es kann sich auch um andere Bakterien handeln) freigesetzt wird und die Translokation von Effektorproteinen erlaubt (Hayes, Aoki et al. 2010; Russell, Hood et al. 2011). Das Typ VII-Sekretionssystem von Mycobakterien und grampositiven Bakterien wurde erst kürzlich entdeckt und ist noch nahezu unerforscht (Simeone, Bottai et al. 2009).

Das Typ III-Sekretionssystem (TTSS) ist ein Kontakt-abhängiges Sekretionssystem gramnegativer Bakterien, das Ähnlichkeit zu Flagellen aufweist. Der Typ III-Sekretionsapparat wird auch als Injektisom bezeichnet und bildet eine nadelähnliche Struktur aus, die in der inneren Membran verankert ist und bis ins Zytoplasma der Wirtszelle reicht. Das Injektisom besteht aus mindestens 20 unterschiedlichen Proteinen, die die drei Hauptkomponenten bilden: Der basale Teil des Systems ist aus zwei Hauptringen aufgebaut, die die innere und äußere Membran des Bakteriums durchspannen. Diese multimere Proteinstruktur ist mit einer membranständigen ATPase verknüpft, die ins Zytoplasma des Bakteriums ragt. Mit dem Basalkörper ist eine nadelförmige Proteinstruktur verknüpft, die den Kanal bildet, durch den die Effektorproteine in die Wirtszelle transportiert werden. Es wird angenommen, dass die Proteine ungefaltet transportiert werden, da die Nadel einen sehr geringen Durchmesser von nur 2-2,5 nm aufweist. Die Nadelspitze, auch Translokator genannt, wird von drei Proteinen gebildet (zwei hydrophoben und einem hydrophilen Translokator), die bei Zellkontakt durch die Nadel transportiert werden und eine Pore in der Wirtszell-Membran bilden.

Viele Komponenten des Typ III-Sekretionsapparates sind zwischen den Spezies konserviert, auf diese Weise konnten die vermutlichen Komponenten des chlamydialen TTSS identifiziert werden. Im Gegensatz zu anderen gramnegativen Bakterien befinden sich diese Komponenten jedoch nicht in einem einzigen Cluster oder auf einem Plasmid, sondern liegen in mehreren Subclustern im Genom verteilt vor. Typ III-Komponenten weisen außerdem üblicherweise im Vergleich zum Rest des Genoms einen niedrigen GC-Gehalt auf, in *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* hingegen weist das gesamte Genom einen niedrigen GC-Gehalt auf (Subtil, Blocker et al. 2000).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Typ III-Sekretionsapparates von Chlamydia**

Grafik modifiziert nach (Peters, Wilson et al. 2007)

Chaperonen. Der Ring des Injektisoms in der äußeren Membran wird wahrscheinlich von einem Hexamer aus CdsC gebildet, das homolog zu YscC aus *Yersinia* ist. Dieser Ring erlaubt der Typ III-Sekretionsnadel, die äußere Membran zu durchziehen (Peters, Wilson et al. 2007).

Neben den aufgezählten Sekretionsmechanismen können Bakterien auch über die Abschnürung von Membranvesikeln Proteine sekretieren. Hierzu werden Teile der äußeren Membran als Vesikel abgeschnürt und freigesetzt und erlauben so auch die Sekretion von unlöslichen Proteinen (Kulp and Kuehn 2010).

Bei den chlamydialen Spezies kommt soweit bekannt für die Sekretion von Effektorproteinen vor allem das Typ III-Sekretionssystem in Frage, aber auch Autotransporter und der generelle Sekretionsweg werden für die Sekretion verwendet (Fields, Mead et al. 2003; Hefty and Stephens 2007). Als Beispiele für Autotransporter gelten die chlamydialen Pmp-Proteine (pmp = polymorphic outer membrane proteins). Die Pmp-Proteinfamilie kommt nur in den *Chlamydiaceae* vor und stellt die größte Proteinfamilie dar. Es konnte bereits für einige ihrer Vertreter eine Funktion im Adhäsionsprozess der Bakterien beschrieben werden, für andere wird diese Funktion vermutet, da sie ebenfalls über die für die Bindung an Humanzellen notwendigen Motive verfügen (Wehrl, Brinkmann et al. 2004; Mollen, Schmidt et al. 2010).

Der chlamydiale Typ III-Sekretionsapparat besteht aus etwa 20-25 Proteinen (siehe Abbildung 2). Das vorhergesagte Lipoprotein CdsJ durchspannt vermutlich den periplasmatischen Raum und assoziiert mit einigen integralen Membranproteinen. Außerdem interagiert es wahrscheinlich mit CdsD, einem Protein in der inneren Membran, das aber auch auf der Oberfläche von *C. trachomatis* EBs gefunden wurde. CdsV besitzt sieben Transmembrandomänen und ist in der inneren Membran verankert, wobei der C-Terminus sehr hydrophil ist und wahrscheinlich im Zytoplasma der Bakterien lokalisiert. Dort interagiert er möglicherweise mit Effektorproteinen und

Das gut charakterisierte Effektorprotein CPAF wird sehr wahrscheinlich Sec-abhängig in die Wirtszelle sekretiert (Shaw, Dooley et al. 2000; Henderson and Lam 2001).

### 1.3.1.1 Die Typ III-Translokationspore

Die Gene für den hydrophilen und die beiden hydrophoben Translokatoren werden auf einem Operon kodiert, das auch das Gen des Chaperons der Translokator-Proteine enthält. Als Modell dient das Typ-III-Sekretionssystem von Yersinien. In Yersinien heißt der hydrophile Translokator V Antigen und die beiden hydrophoben Porenbildner YopB und YopD (Hayes, Aoki et al. 2010; Mattei, Faudry et al. 2011). Die porenbildenden Proteine YopB (SseC) und YopD sind zusammen mit ihrem Chaperon, SycD alias LcrH, in einem Operon codiert. Es konnte gezeigt werden, dass das Chaperon sowohl mit YopD als auch mit YopB interagiert (Neyt and Cornelis 1999). Vergleichbar zu dieser Gruppe von Translokationsproteinen aus Yersinien, besitzen Chlamydien ebenfalls strukturell verwandte Proteine, die neben einem LcrH-homologen Chaperon in einem Operon codiert sind (Subtil, Blocker et al. 2000). Im Gegensatz zu fast allen anderen pathogenen Bakterien, die über Proteine der SseC-Familie verfügen, existieren in Chlamydien jedoch zwei unterschiedliche Operone, die nach neuesten Erkenntnissen wahrscheinlich beide für die Porenbildung verantwortlich sind (Chellas-Gery, Wolf et al. 2011). Bei *C. trachomatis* sind dies *ct578* (CopB) und *ct579* (CopD) neben *lcrH-1* und *ct860* und *ct861* (CopB2) neben *lcrH-2*. In *C. pneumoniae* entsprechen YopB und YopD die hypothetischen Proteine CPn0809 (homolog zu CT578) und CPn0808, die neben *lcrH-1* codiert sind und CPn1019 und Cpn1020, die neben *lcrH-2* codiert sind. Diese Gruppen werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert und es wird angenommen, dass sie alternierend die Translokationspore ausbilden, wobei CopB in den EBs vorliegt und die Translokation früher Effektoren vermitteln soll, während CopB2 in der Mitte des Infektionszyklus diese Rolle übernehmen soll (Subtil, Blocker et al. 2000; Slepkin, Motin et al. 2003; Ouellette, Abdelrahman et al. 2005; Chellas-Gery, Wolf et al. 2011). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass CopB mit dem Chaperon interagiert und in der Inklusionsmembran lokalisiert (Fields, Fischer et al. 2005). Für die entsprechenden Proteine aus *C. pneumoniae* (CPn0808, Cpn0809, CPn1019 und CPn1020) liegen jedoch noch keine Erkenntnisse vor, die diese Theorie unterstützen.

### 1.3.2 Der chlamydiale Lebenszyklus

Chlamydien existieren in zwei unterschiedlichen Lebensformen, den metabolisch-inaktiven, infektiösen Elementarkörperchen (elementary bodies, EBs) und den metabolisch-aktiven, nicht-infektiösen Retikularkörperchen (reticulate bodies, RBs) (Matsumoto and Manire 1970). EBs sind mit einem Durchmesser von 0,3 µm klein und zeichnen sich durch einen

kondensierten Nucleoproteinkern aus, RBs sind mit einem Durchmesser von ca. 1  $\mu\text{m}$  deutlich größer und weisen keine kondensierte DNA auf (Friis 1972).

Der chlamydiale Infektionszyklus beginnt mit der Adhäsion des EBs an die Wirtszelle. Die Bindung erfolgt wahrscheinlich in zwei Schritten, zuerst reversibel über elektrostatische Wechselwirkungen mit Glykosaminoglykanen auf der Wirtszell-Oberfläche, anschließend erfolgt die irreversible Bindung der Bakterien über Interaktion mit Rezeptoren der Wirtszelle (Zhang and Stephens 1992; Davis and Wyrick 1997). Es konnte gezeigt werden, dass das OmcB-Protein auf der Bakterienoberfläche mit Glykosaminoglykanen auf der Wirtszell-Oberfläche interagiert und so wahrscheinlich das Bakterium auf der Oberfläche stabilisiert, um spezifischere Interaktionen zu ermöglichen (Moelleken and Hegemann 2008). Die weitere Interaktion mit Rezeptoren wird sehr wahrscheinlich über die Pmp-Proteine vermittelt, zudem kommen die kürzlich identifizierten Proteine CPn0677 und CPn0678 in Frage, für die ebenfalls adhäsive Eigenschaften ermittelt werden konnten (Molleken, Schmidt et al. 2010; Murra 2010). Es ist sehr wahrscheinlich, dass unterschiedliche Rezeptoren genutzt werden, da Chlamydien ein breites Spektrum von Wirtsorganismen und Zelltypen infizieren und unterschiedliche Krankheiten hervorrufen, so dass die chlamydialen Spezies ganz unterschiedliche Adhäsionswege nutzen könnten (Dautry-Varsat, Subtil et al. 2005). Tatsächlich konnten bisher mehrere Wirtszell-Rezeptoren identifiziert werden, die eine Rolle spielen könnten, unter anderem der Östrogen-Rezeptor, der PDGFR $\beta$  (platelet-derived growth factor receptor  $\beta$ ) und der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (Elwell, Ceesay et al. 2008; Abromaitis and Stephens 2009).

Der genaue Mechanismus der Aufnahme der Bakterien ist unverstanden, doch es wird eine Rezeptor-vermittelte Clathrin-abhängige Endozytose vermutet, als auch eine Aufnahme via Mikrofilament-abhängigem „Zipper“-Mechanismus (Ward and Murray 1984; Hodinka and Wyrick 1986). In Knockdown-Studien konnte gezeigt werden, dass Clathrin eine wichtige Rolle im Aufnahmeprozess der Bakterien spielt (Hybiske and Stephens 2007). Neuere Studien zeigen außerdem, dass die Rekrutierung von Aktin an die Eintrittsstelle eine wichtige Rolle spielt und dass die Bakterien bevorzugt an Lipid-Mikrodomänen auf der Wirtszell-Oberfläche binden, die eine Anreicherung von Cholesterin und Sphingolipiden aufweisen (Carabeo, Grieshaber et al. 2002; Stuart, Webley et al. 2003). Aktin polymerisiert nach Sekretion eines Typ III-Effektors namens Tarp (translocated actin-recruiting protein) an der Eintrittsstelle, wodurch Mikrovilli oder sockelähnliche Strukturen an der Eintrittsstelle ausgebildet werden (Wolf, Fischer et al. 2000; Carabeo, Grieshaber et al. 2002; Clifton, Fields et al. 2004; Engel 2004; Zriq 2009). Es konnte gezeigt werden, dass die GTPase Rac1 an der Eintrittsstelle aktiviert wird, was zu einer Rekrutierung von WAVE2 und Abi-1 führt. Hierdurch wird der Arp2/3-Komplex aktiviert und es kommt zur lokalen Reorganisation des Aktinzytoskeletts (Carabeo, Dooley et al. 2007). Es wurde gezeigt, dass durch

Chlamydien auch die Phosphoinositid-3-Kinase (PI-3 Kinase) und MEK-ERK-Kinasen aktiviert werden, wodurch weitere Signalkaskaden in der Zelle ausgelöst werden. Diese Signalwege scheinen aber speziesspezifisch zu sein (Dautry-Varsat, Subtil et al. 2005). Es ist also denkbar, dass Chlamydien über zwei unterschiedliche Wege in die Zelle gelangen: einerseits über Clathrin-vermittelte Endozytose und andererseits über Tarp-vermittelte Aktin-Reorganisation. Denkbar ist aber auch ein gemeinsamer Signalweg (Hybiske and Stephens 2007)

Nach der Aufnahme befindet sich das Bakterium in einer Membran-umhüllten Vakuole, der so genannten Inklusion (Abbildung 3). Diese verlässt früh den endozytischen Weg und wird durch den Einbau unterschiedlicher bakterieller Proteine umgestaltet. Diese Proteine heißen Inc-Proteine (Inclusion membrane proteins). Für *C. trachomatis* konnte gezeigt werden, dass die Inklusion früh in der Infektion in einem Dynein-abhängigen Prozess zum Mikrotubuli-organisierenden Zentrum an der Kernperipherie transportiert wird, wobei die beteiligten chlamydialen Effektoren noch nicht bekannt sind (Clausen, Christiansen et al. 1997; Grieshaber, Grieshaber et al. 2003). Der Transport erfolgt aber wahrscheinlich über die Interaktion der Mikrotubuli mit so genannten Mikrodomänen auf der Inklusionsoberfläche, die aktive Wirtszell-Src-Kinasen, Cholesterin und spezifische Inc-Proteine enthalten und mit den Zentrosomen assoziiert vorliegen (Mital, Miller et al. 2010).

Etwa acht bis zwölf Stunden nach der Internalisierung beginnt bei *C. pneumoniae* die Umwandlung des EBs in die metabolisch-aktive und replikationsfähige, größere RB-Form und diese beginnen dann, sich durch Zweiteilung zu vermehren (Wolf, Fischer et al. 2000). Etwa 48 hpi wird der Zyklus asynchron, da die Bakterien teilweise anfangen, sich zurück zu EBs zu differenzieren, während andere Bakterien sich weiter teilen. Ab 72 hpi ist die Entwicklung abgeschlossen und es liegen überwiegend EBs in der Inklusion vor. Diese werden entweder durch Lyse der Wirtszelle oder einen Prozess namens Extrusion freigesetzt und können neue Zellen infizieren (Wolf, Fischer et al. 2000; Hybiske and Stephens 2007). Es gibt aber auch Vermutungen, dass die Freisetzung über Exozytose oder einen apoptotischen Signalweg eingeleitet wird (Todd and Caldwell 1985; Perfettini, Hospital et al. 2003). Der Entwicklungszyklus wird von den verschiedenen chlamydialen Spezies unterschiedlich schnell durchlaufen, so brauchen die Serovare L1-L3 von *C. trachomatis* nur 48 Stunden, um den Zyklus abzuschließen (Davis and Wyrick 1997).

Während der Replikation sind die Chlamydien auf die Zufuhr von Nukleotiden, ATP, Eisen, Lipiden und Aminosäuren von der Wirtszelle angewiesen (McClarty 1994; Al-Younes, Rudel et al. 2001; Kumar, Cocchiari et al. 2006).

## Der Entwicklungszyklus von *Chlamydia pneumoniae*

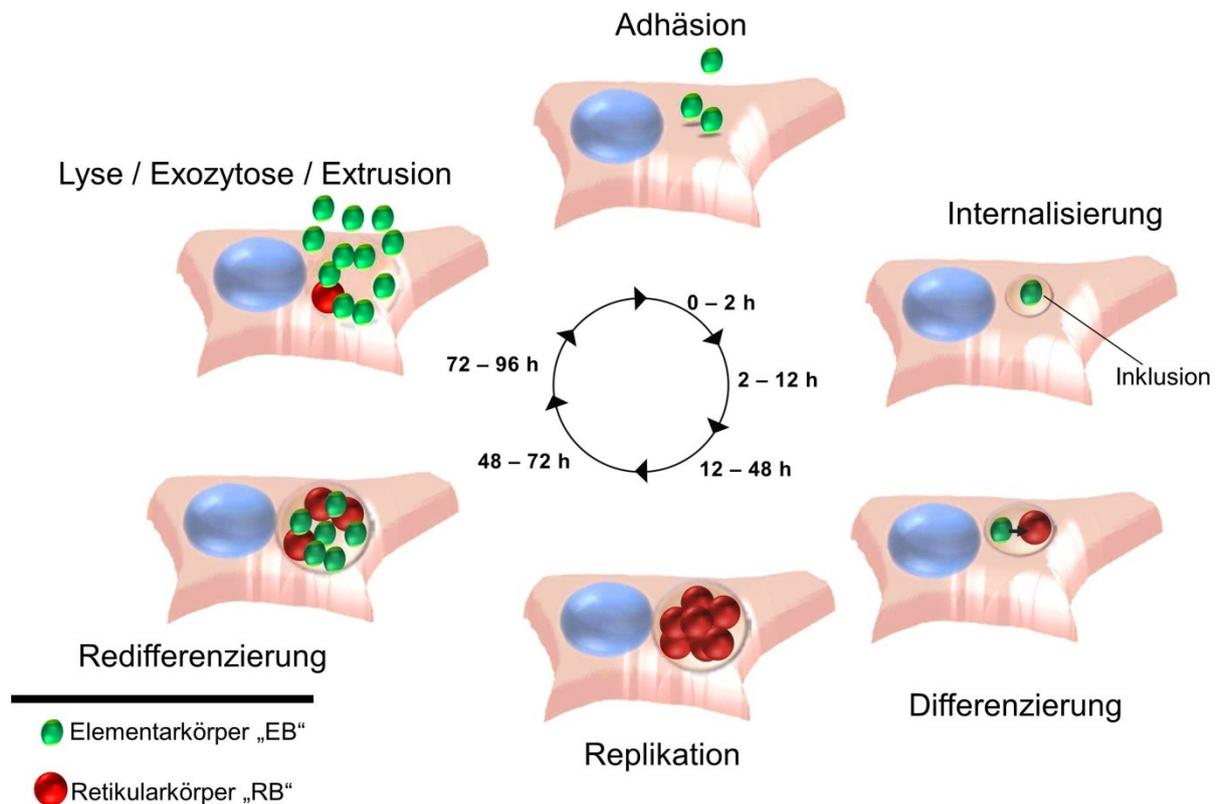


Abbildung 3: Schema des Entwicklungszyklus von *C. pneumoniae*

### 1.3.3 Effektorproteine der Chlamydien

Chlamydien müssen eine Vielzahl von humanen Signalwegen modulieren, um ihr intrazelluläres Überleben zu sichern. Ein wichtiger Schritt ist zum Beispiel das Verlassen des endozytotischen Weges kurz nach der Internalisierung und die Vermeidung der Fusion mit Lysosomen. Chlamydien modifizieren die Inklusionsmembran durch Einlagerung verschiedener Proteine, die so genannten Inc-Proteine. Alle Inc-Proteine besitzen einen charakteristischen hydrophoben Bereich, der Transmembrandomänen repräsentiert. Für einige der Inc-Proteine konnte bereits eine Interaktion mit humanen Proteinen nachgewiesen werden, während bei vielen anderen die Funktion noch nicht aufgeklärt ist.

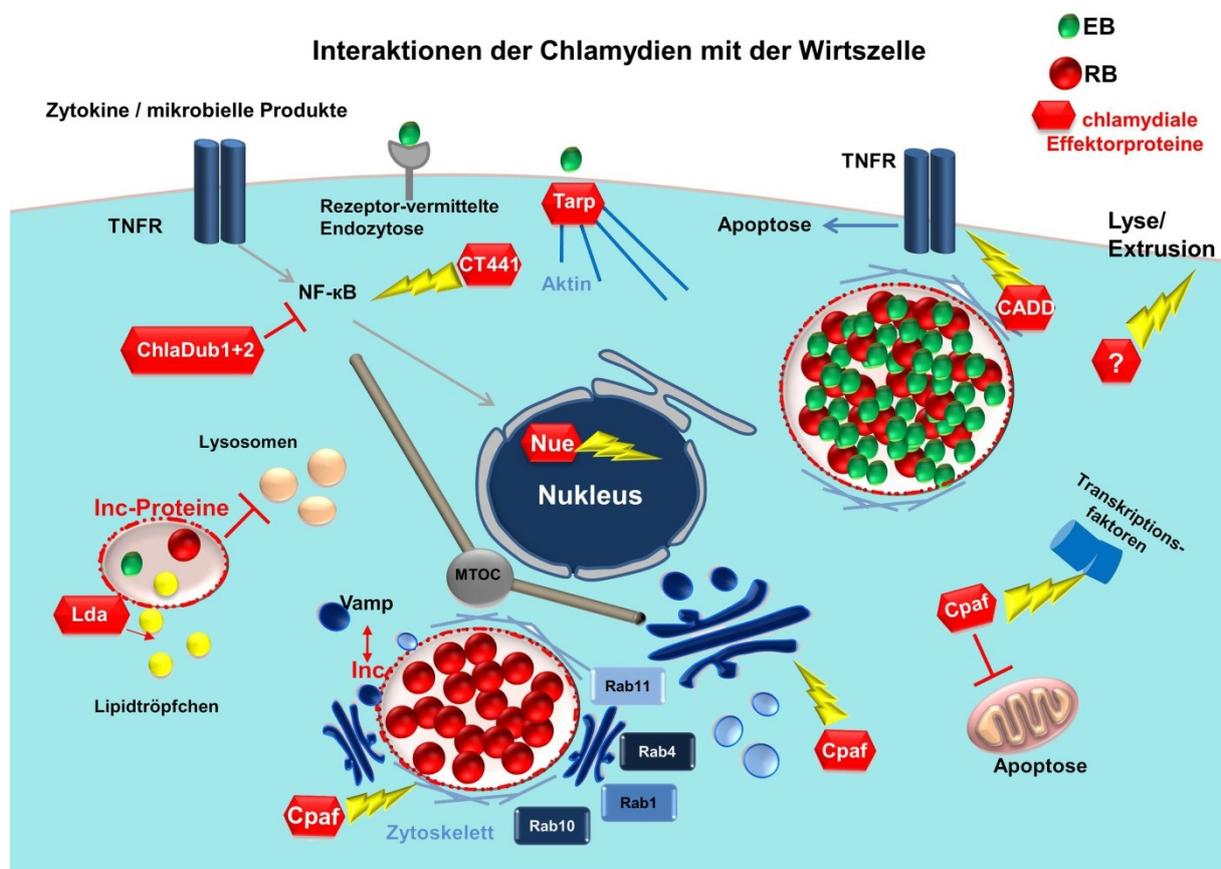
Auch die Versorgung der Bakterien mit Nährstoffen aus der Wirtszelle muss über bakterielle Effektorproteine gesteuert werden. Die Interaktion mit Vesikeln wird in *C. trachomatis* unter anderem durch das IncA-Protein gesteuert, für das eine Interaktion mit SNARE-Proteinen (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor) gezeigt werden konnte, und das neben der Fusion mit Vesikeln über eine Homodimer-Bildung auch die homotypische Fusion von Inklusionen vermittelt (Hackstadt, Scidmore-Carlson et al. 1999; Suchland,

Rockey et al. 2000; Delevoye, Nilges et al. 2004; Delevoye, Nilges et al. 2008). Die nur schwach homologen IncA-Proteine der anderen chlamydialen Spezies besitzen mit Ausnahme von IncA aus *C. pneumoniae* alle SNARE-Motive (Delevoye, Nilges et al. 2008). Eine Interaktion von IncA mit sich selber konnte ebenfalls nur für das Protein aus *C. trachomatis* bestätigt werden, IncA aus *C. psittaci* interagiert nicht mit sich selbst, während für *C. pneumoniae* eine Interaktion bisher nicht untersucht wurde (Hackstadt, Scidmore-Carlson et al. 1999).

Neben den Inc-Proteinen, die später noch näher beschrieben werden, wird aber noch eine Vielzahl weiterer Proteine von den Bakterien sekretiert. Das wohl bekannteste und am besten charakterisierte Effektorprotein ist die Serin-Protease CPAF (chlamydial protease-like activity factor), für die bereits mehrere Funktionen beschrieben wurden: zum einen ist CPAF in der Lage, pro-apoptische oder MHC Klasse II-aktivierende, also eine Immunantwort stimulierende Transkriptionsfaktoren zu degradieren, zum anderen prozessiert CPAF Intermediärfilamente, die dann zusammen mit Aktin eine Art Schutzhülle um die Inklusion bilden (Zhong, Fan et al. 2001; Dong, Su et al. 2004; Pirbhai, Dong et al. 2006; Kumar and Valdivia 2008). CPAF interferiert über die Spaltung des humanen p65/RelA auch mit dem NF- $\kappa$ B-Signalweg, der bei Entzündungsreaktionen eine Rolle spielt und degradiert früh sekretierte chlamydiale Effektoren (Christian, Vier et al. 2010; Jorgensen, Bednar et al. 2011). Auch die Fragmentierung des Golgi-Apparates in so genannte Golgi-Ministapel, die um die Inklusion herum verteilt vorliegen, geschieht über die Spaltung von Golgin-84 durch CPAF und hat einen positiven Effekt auf die chlamydiale Entwicklung (Heuer, Rejman Lipinski et al. 2009; Rejman Lipinski, Heymann et al. 2009; Christian, Heymann et al. 2011). Im Gegensatz zu den meisten anderen bereits identifizierten Effektorproteinen wird CPAF nicht über das Typ III-Sekretionssystem sekretiert, sondern verfügt über ein Typ II-Sekretionssignal und wird sec-abhängig zuerst in das Lumen der Inklusion sekretiert, bevor die Translokation ins Zytoplasma der Wirtszelle erfolgt (Chen, Lei et al. 2010). Eine teilweise antagonistische Funktion zu CPAF scheint das chlamydiale CADD-Protein (Chlamydia protein associating with death domains) zu besitzen. Für dieses Protein aus *C. trachomatis* konnte eine Interaktion mit den so genannten „Todesdomänen“ von Proteinen der Tumornekrosis-Faktor-Rezeptor-Familie (TNFR1, Fas, DR4 und DR5) nachgewiesen werden und die transiente Expression löst in der Zelle die Apoptose aus. Die Apoptose wird Caspase-abhängig ausgelöst, was bedeutet, dass CADD die Wirtszell-Apoptose-Maschinerie stimuliert. Es handelt sich um ein spät-exprimiertes Protein, das gegen Ende der Infektion ins Zytoplasma sekretiert wird und dort mit Fas kolokalisiert und hierdurch vielleicht die Freisetzung der infektiösen EBs stimuliert (Stenner-Liewen, Liewen et al. 2002; Schwarzenbacher, Stenner-Liewen et al. 2004).

Ein weiteres gut charakterisiertes Effektorprotein ist das bereits erwähnte Tarp-Protein, welches über das Typ III-Sekretionssystem in die Wirtszelle eingeschleust wird und das Aktin-Zytoskelett moduliert. Im Jahr 2010 wurde ein weiteres Aktin-reorganisierendes Protein aus *C. trachomatis* gefunden, das innerhalb der ersten 60 min der Infektion in die Wirtszelle sekretiert wird (Thalmann, Janik et al. 2010). Wie bereits erwähnt modulieren viele Pathogene das Aktin-Zytoskelett der Wirtszelle. In Salmonellen konnten bisher sechs Aktin-modulierende Effektoren identifiziert werden (Cain, Hayward et al. 2008). Es ist daher denkbar, dass noch weitere chlamydiale Effektoren identifiziert werden, die mit dem Aktin-Zytoskelett interagieren.

Kürzlich wurde ein chlamydiales Protein beschrieben, das in den Zellkern der Wirtszelle



**Abbildung 4: Übersicht über die Interaktionen der Chlamydien mit der Wirtszelle**

Dargestellt sind einige chlamydiale Effektorproteine und ihr Einfluss auf die Wirtszelle, sowie einige durch Chlamydien ausgelöste Modulierungen, die durch noch nicht identifizierte Effektoren verursacht werden. Zytokine und mikrobielle Produkte (z.B. LPS) stimulieren über den TNF-Rezeptor eine NF-κB-Immunantwort, diese wird von den Proteinen ChlaDub1+2 und CT441 aus *C. trachomatis* inhibiert. Tarp wird nach der Adhäsion des Bakteriums in die Wirtszelle transloziert und vermittelt eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts. Der Einbau von Inc-Proteinen in die Inklusionsmembran verhindert wahrscheinlich die Fusion mit Lysosomen. Inc-Proteine interagieren mit Vamp-Proteinen und Rab-GTPasen der Wirtszelle und modulieren so die Vesikelwege. CPAF degradiert Wirtszell-Transkriptionsfaktoren und inhibiert auf diese Weise die Apoptose und spaltet Intermediärfilamente, die sich zusammen mit Aktin als Schutz um die Inklusion gruppieren. Der Golgi wird durch CPAF fragmentiert und lagert sich ebenfalls um die Inklusion. CADD interagiert mit den Todesdomänen der Rezeptoren der TNF-Familie und löst so evtl. in der Wirtszelle Apoptose aus. Am Ende der intrazellulären Entwicklung wird durch bisher nicht identifizierte Faktoren die Lyse der Wirtszelle oder die Extrusion der Inklusion eingeleitet.

TNFR= Tumor-Nekrosis-Faktor-Rezeptor, MTOC= Mikrotubuli-organisierendes Zentrum, LPS=Lipopolysaccharid.

sekretiert wird. Dieser Effektor, genannt Nue (nuclear effector), ist in der Lage, Histone zu methylieren, und somit die Transkription der Wirtszelle zu beeinflussen (Pennini, Perrinet et al. 2010). In den letzten Jahren wurden einige weitere chlamydiale Proteine identifiziert, die mit humanen Proteinen interagieren oder in die Wirtszelle sekretiert werden (siehe Tabelle „beschriebene Effektorproteine“ im digitalen Anhang). Bei vielen dieser Proteine kann bisher aber über die Funktion nur spekuliert werden. Des Weiteren sind zelluläre Prozesse bekannt, die von bisher nicht identifizierten chlamydialen Effektoren ausgelöst werden. In Abbildung 4 sind die Interaktionen der Chlamydien mit der Wirtszelle schematisch gezeigt. Die Identifizierung von Effektorproteinen und die Analyse ihrer Funktion bildet die Grundlage, um neue anti-chlamydiale Wirkstoffe zu entwickeln.

### **1.3.4 Die Inklusionsmembran**

Die gesamte Intrazelluläre Entwicklung der Chlamydien findet innerhalb der Inklusion statt, wobei die Inklusion in ihrer Gesamtheit als ein Organell angesehen werden kann. Die Inklusionsmembran stellt eine wichtige Barriere aber auch eine Kommunikationsplattform zwischen der Wirtszelle und den Bakterien dar. Sie ist undurchlässig für Stoffe mit einem Molekulargewicht von mindestens 500 Da, daher ist eine passive Diffusion einiger Nährstoffe (z.B: ATP), die von den Bakterien benötigt werden, ausgeschlossen (Heinzen and Hackstadt 1997). Sie ist aber durchlässig für zytoplasmatische Ionen (Grieshaber, Swanson et al. 2002). Die Inklusionsmembran enthält im Gegensatz zu anderen parasitophoren Vakuolen weder frühe noch späte endosomale oder lysosomale Marker und ist auch nicht acidifiziert (Heinzen, Scidmore et al. 1996; Al-Younes, Rudel et al. 1999). Stattdessen zeigte sich eine Interaktion mit exozytischen Vesikeln. Es konnte gezeigt werden, dass Membranen verschiedener intrazellulärer Kompartimente in die Inklusionsmembran inseriert werden, u.a. basolateral-gerichtete Sphingomyelin-haltige exozytische Vesikel und multivesikuläre Körperchen (Beatty 2006; Moore, Fischer et al. 2008). Eine Fusion mit Lysosomen wird nur vermieden, wenn eine chlamydiale Proteinbiosynthese stattfindet, während in anderen Kompartimenten keine Inhibierung der Lysosomenaktivität stattfindet, so dass es sehr wahrscheinlich ist, dass die Inklusionsmembran für den Wechsel vom endozytischen zum exozytischen Weg verantwortlich ist (Fields and Hackstadt 2002). Bisher konnten nur wenige Wirtszellproteine in oder assoziiert mit der Inklusionsmembran identifiziert werden, aber einige chlamydiale Proteine, die so genannten Inc-Proteine, wurden in der Inklusionsmembran gefunden. Von vielen weiteren Proteinen wird aufgrund bioinformatischer Analysen angenommen, dass sie ebenfalls in der Inklusionsmembran lokalisieren.

### 1.3.4.1 Die Inc-Proteine

Inc-Proteine zeigen kaum Sequenzhomologien untereinander. Inc-Proteine zeichnen sich durch eine ähnliche Struktur aus, die durch einen großen 40 bis 60 Aminosäuren umfassenden, hydrophoben Abschnitt gekennzeichnet ist, der in Hydrophobizitätsprofilen ein charakteristisches zweiblättriges Muster aufweist. Dieser Bereich bildet zwei Transmembranhelices aus. Eine genomweite Suche nach diesem Motiv führte zu einer bioinformatischen Vorhersage für Inc-Proteine von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* (Bannantine, Griffiths et al. 2000; Toh, Miura et al. 2003). Die Vorhersage beruht auf der Analyse bereits bekannter Inc-Proteine und ihrer Strukturvorhersage. Dabei spezifizierte die Arbeitsgruppe um Toh die von Bannantine erstellten Kriterien in Hinblick auf die Lage des hydrophoben Bereichs und analysierte verschiedene *C. pneumoniae* Stämme. Es handelt sich demnach um ein Inc-Protein, wenn folgende Eigenschaften zutreffen: 1. Die zweiblättrige hydrophobe Domäne besteht aus 55-65 Aminosäuren und befindet sich entweder 20-100 AS vom N-Terminus oder 20-100 AS vom C-Terminus entfernt. 2. Es gibt keine weiteren hydrophoben Domänen größer als 20 AS außer weiteren zweiblättrigen Inc-Domänen. 3. Der N-Terminus enthält kein klassisches Sekretionssignal (d.h. für andere Sekretionssysteme als für das Typ III-System) und keine hydrophobe Domäne. Es konnten außerdem nur sehr wenige Inc-Protein-ähnliche OLR in anderen Spezies gefunden werden, so dass die Inc-Proteine eine nur in Chlamydien zu findende Proteinfamilie darstellen (Bannantine, Griffiths et al. 2000; Toh, Miura et al. 2003).

Nach einer kürzlich publizierten Studie handelt es sich zudem um ein Inc-Protein, wenn das charakteristische zweiblättrige Hydrophobizitätsprofil von einem typischerweise höchstens 30 Aminosäuren langen, hydrophilen Bereich verknüpft ist, während weitere hydrophobe Bereiche nicht zwingend ein Ausschlusskriterium darstellen (Dehoux, Flores et al. 2011). Etwa 7-10 % des chlamydialen Genoms kodieren demnach Proteine, bei denen es sich ihrer vorhergesagten Struktur nach um Inc-Proteine handeln könnte (Dehoux, Flores et al. 2011). Bei einigen Inc-Proteinen konnten N-terminale Sekretionssignale für die Typ III-Sekretion gefunden werden, weshalb davon ausgegangen wird, dass die Inc-Proteine über diesen Mechanismus in die Inklusionsmembran sekretiert werden (Subtil, Parsot et al. 2001). Der genaue Ablauf der Insertion in die Membran ist jedoch noch ungeklärt. Es wird angenommen, dass zumindest ein Teil eines Inc-Proteins Kontakt zum Zytoplasma hat, was in einigen Fällen bereits experimentell bestätigt werden konnte und andererseits durch die hohe Immunogenität vieler Inc-Proteine naheliegend ist (Rockey, Grosenbach et al. 1997; Hackstadt, Scidmore-Carlson et al. 1999; Li, Chen et al. 2008). Auch die Identifizierung einiger Wirtszell-Interaktionspartner chlamydialer Inc-Proteine unterstützt diese Theorie. So konnte für IncG aus *C. trachomatis* gezeigt werden, dass es mit humanem 14-3-3 $\beta$  interagiert. Das Inc-Protein CPn0585 aus *C. pneumoniae* zeigte Interaktionen mit mehreren

Rab-GTPasen (Scidmore and Hackstadt 2001; Cortes, Rzomp et al. 2007). IncD aus *C. trachomatis* interagiert mit CERT (ER-to-Golgi ceramide transfer protein), wodurch wahrscheinlich der Kontakt der Inklusion zum ER hergestellt wird (Derre, Swiss et al. 2011). Sowohl SNARE-Proteine als auch Rab-GTPasen sind an der Regulation vesikulärer Wege beteiligt.

Die fundamentale Bedeutung des Umbaus der Inklusionsmembran durch Inc-Proteine wird anhand von Genexpressionsanalysen deutlich: Viele der untersuchten Inc-Proteine von *C. trachomatis* wurden schon zwei Stunden nach der Infektion exprimiert, während die Bakterien erst nach 12 Stunden mit der Teilung beginnen, also erst, wenn die Membran erfolgreich umgestaltet ist (Fields and Hackstadt 2002). Da Inc-Proteinen eine so wichtige Rolle in der chlamydialen Biologie zugewiesen wird, scheint es verwunderlich, dass diese Proteine innerhalb der unterschiedlichen chlamydialen Spezies kaum bis gar nicht konserviert sind. Es wird jedoch vermutet, dass dies mit der exponierten Lage der Proteine und ihrer damit verknüpften Immunogenität zusammenhängt (Fields and Hackstadt 2002). Neben den Inc-Proteinen konnten aber auch andere chlamydiale Proteine in der Inklusionsmembran detektiert werden, die nicht über das charakteristische Hydrophobizitätsprofil der Inc-Proteine verfügen. Hierzu gehört zum Beispiel das Cap1-Protein, welches von CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannt wird und über dessen Funktion bisher nichts bekannt ist (Fling, Sutherland et al. 2001).

Das wohl am besten untersuchte Inc-Protein ist jedoch IncA aus *C. trachomatis*. Die bereits beschriebene SNARE-vermittelte Fusion mit Vesikeln kommt durch eine Interaktion des SNARE-Motivs von IncA mit einer Subpopulation von Wirtszell-SNAREs zustande, wobei jedoch einige andere Inc-Proteine sehr wahrscheinlich ebenfalls in der Lage sind, mit SNARE-Proteinen zu interagieren. Die durchgeführten Analysen legen aber für IncA eine dominierende Funktion nahe (Delevoye, Nilges et al. 2008). IncA wird in *C. trachomatis* 10 Stunden nach der Infektion exprimiert, etwa zur gleichen Zeit können auch die ersten homotypischen Fusionen von Inklusionen in multipel infizierten Zellen beobachtet werden, die sehr wahrscheinlich über die Homodimerisierung von IncA vermittelt werden (Hackstadt, Scidmore-Carlson et al. 1999). Zudem wurden IncA-Proteine verschiedener chlamydialer Spezies (*C. trachomatis*, *C. psittaci* und *C. pneumoniae*) auf zytoplasmatischen fadenartigen Fortsätzen der Inklusion detektiert, deren Entstehung und Natur bisher nicht aufgeklärt ist (Brown, Skeiky et al. 2002). Für diese „IncA-Fäden“ konnte in *C. trachomatis*-infizierten Zellen eine Rolle in der Bildung von Sekundärinklusionen nachgewiesen werden, vermutlich um bei einer Zellteilung eine Infektion beider Tochterzellen zu gewährleisten (Suchland, Rockey et al. 2005). Des Weiteren wurden einige chlamydiale Antigene auf diesen Fäden identifiziert, weshalb spekuliert wird, dass über die Fäden diese Antigene zum ER transportieren werden, wo sie zur Antigenpräsentation genutzt werden (Brown, Skeiky et al.

2002). Fraglich bleibt jedoch, welchen Vorteil die Bakterien durch diesen Mechanismus gewinnen und ob es sich hierbei tatsächlich um eine Funktion der Fäden handelt oder lediglich um einen Nebeneffekt der Fadenbildung.

## 1.4 Chlamydien benötigen Wirtszellnährstoffe zur Proliferation

Chlamydien benötigen ATP, GTP und UTP von der Wirtszelle für die Energiegewinnung und DNA-Synthese, da sie nicht in der Lage sind, diese Nukleotide komplett selbst zu synthetisieren (Tipples and McClarty 1993). Sie benötigen außerdem Aminosäuren und Lipide von der Wirtszelle, wobei vor allem Tryptophan eine interessante Rolle spielt, da gezeigt werden konnte, dass Interferon-gamma über die Abreicherung intrazellulären Wirtszell-Tryptophans die Replikation von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* blockiert (Byrne, Lehmann et al. 1986; Summersgill, Sahney et al. 1995; Pantoja, Miller et al. 2000). Chlamydien besitzen mehrere Transportsysteme, um Nährstoffe aus dem Inklusionslumen in die Bakterien transportieren, aber wie die Substrate in die Inklusion gelangen, ist weitestgehend ungeklärt, erfolgt aber wahrscheinlich über Fusionen von Vesikeln mit der Inklusionsmembran (Saka and Valdivia 2010). Für Chlamydien konnte gezeigt werden, dass sie Wirtszell-Lipidtröpfchen in die Inklusion aufnehmen (Kumar, Cocchiario et al. 2006). Die Aufnahme ganzer Organellen, der Lipidtröpfchen, in die Inklusion zeigt, dass neben der Fusion mit Vesikeln auch dies eine von den Chlamydien genutzte Möglichkeit zur Nährstoffversorgung darstellt (Saka and Valdivia 2010).

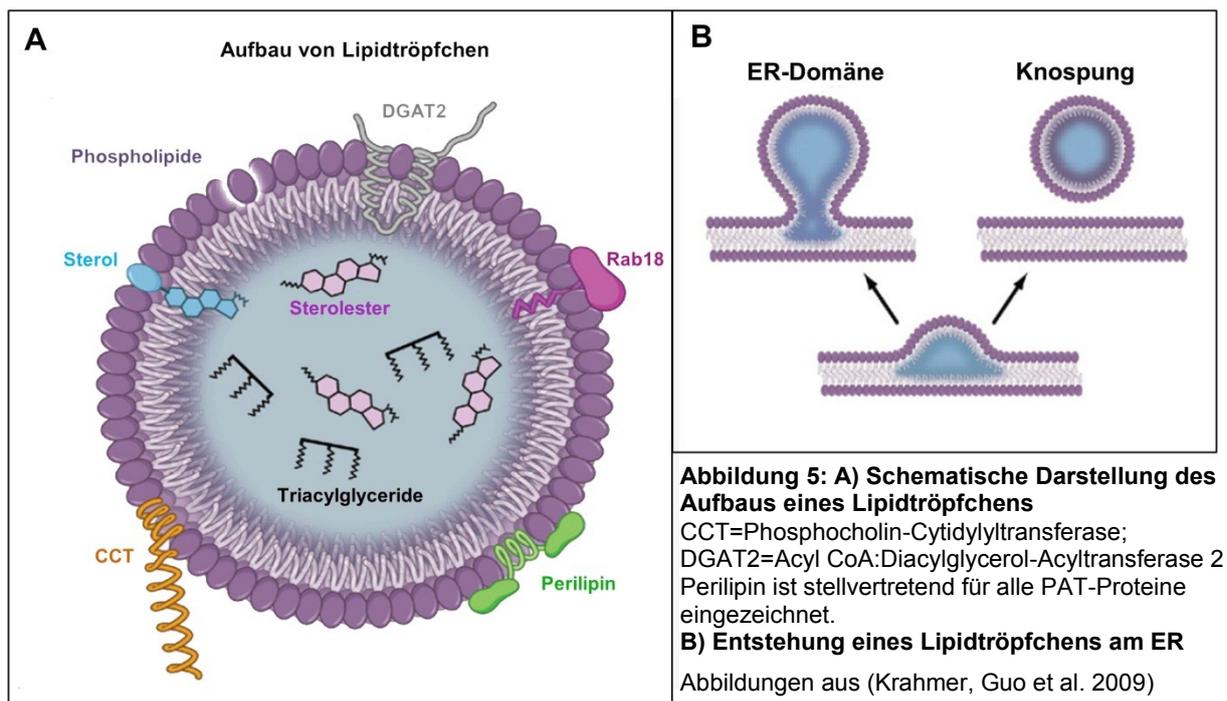
### 1.4.1 Was sind Lipidtröpfchen?

Lipidtröpfchen (LT) sind universelle zelluläre Organellen zur Speicherung von Neutralfetten, vor allem Triacylglyceriden und Sterolestern, die dem Speichern von Energie dienen und für die Synthese von Membranen wichtig sind. Des Weiteren wird die Zelle durch das Lagern der Lipide in Lipidtröpfchen vor dem lipotoxischen Effekt nicht-veresterter Lipide geschützt (Krahmer, Guo et al. 2009). Lipidtröpfchen spielen bei verschiedenen Krankheiten, wie zum Beispiel Fettleibigkeit, Typ 2-Diabetes und Atherosklerose eine Rolle (Buers, Hofnagel et al. 2011; Greenberg, Coleman et al. 2011). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass das Hepatitis C-Virus mit Lipidtröpfchen interagiert und diese zur Reifung benötigt (Herker and Ott 2011). Neben den Chlamydien ist bereits für einige andere pathogene Bakterien eine Interaktion mit Lipidtröpfchen beschrieben. So induziert *Mycobacterium leprea* die Bildung von Lipidtröpfchen in Makrophagen, während *Mycobacterium tuberculosis* Lipidtröpfchen als Eisenlieferanten benutzt (Murphy 2011).

Es wird davon ausgegangen, dass Lipidtröpfchen am ER gebildet werden, wo durch Einlagerung der Neutralfette zwischen den beiden Phospholipid-Schichten der ER-Membran

eine Auswölbung entsteht, die dann als Lipidtröpfchen abgeschnürt wird oder aber am ER verbleibt und eine spezialisierte ER-Domäne ausbildet (Abbildung 5 B). Das LT ist von einem Phospholipid-Monolayer umgeben, der mit einigen Proteinen assoziiert und in den vereinzelt freies Cholesterin eingelagert ist (siehe Abbildung 5 A). Neben einigen Enzymen des Lipidstoffwechsels (DGAT2 katalysiert die Bildung von Triacylglyceriden, CCT ist an der Phosphatidylcholin-Synthese beteiligt) befinden sich auf der LT-Oberfläche auch so genannte PAT-Proteine. Zu diesen Proteinen gehören Perilipin, ADFP, TIP47, S3-12 und OXPAT. Sie regulieren die Interaktion von Lipasen mit den Lipidtröpfchen und die Interaktion mit der zellulären Maschinerie, die für die Biogenese von Lipidtröpfchen relevant ist (Bickel, Tansey et al. 2009).

Lipidtröpfchen, die nur von einem Phospholipid-Monolayer umgeben sind, sind in der Lage, mit anderen Lipidtröpfchen über SNARE-Proteine zu fusionieren. Sie können aber auch mit Lipiddoppelmembranen zu fusionieren, jedoch ist dieser Vorgang noch nicht völlig aufgeklärt. Es wird aber davon ausgegangen, dass die Fusion mit einer Lipiddoppelschicht ebenfalls SNARE-vermittelt stattfindet und spiegelbildlich zu der Entstehung eines Lipidtröpfchens am



ER abläuft (Olofsson, Bostrom et al. 2009; Murphy 2011).

Neuere Studien legen nahe, dass es sich bei Lipidtröpfchen nicht nur um reine Speicherorganellen handelt, sondern um sehr dynamische Organellen, die Dynein-abhängig entlang der Mikrotubuli in der Zelle transportiert werden und eine Rolle in der Membranverteilung und Signalübermittlung spielen könnten (Martin and Parton 2006).

### 1.4.2 Chlamydien interagieren mit Lipidtröpfchen der Wirtszelle

Für eine Gruppe von Effektorproteinen (Lda1-Lda3, Lipid Droplet-associated protein 1-3) aus *C. trachomatis* konnte bei transienter Expression eine Lokalisierung auf den Lipidtröpfchen der Zelle beobachtet werden. Diese Proteine wurde zusammen mit einem weiteren Protein in einem Hefe-basierten Assay identifiziert, bei dem alle vier Proteine in Hefe einen Tropismus für Lipidtröpfchen zeigten (Sisko, Spaeth et al. 2006). In der Infektion lokalisierten diese Proteine auf der zytosolischen Seite der Inklusionsmembran (Tabelle 1). Es wird daher angenommen, dass sie eine Rolle in der Aufnahme von Lipidtröpfchen in die Inklusion spielen (Kumar, Cocchiario et al. 2006; Cocchiario, Kumar et al. 2008). Zudem konnten Lipidtröpfchen, die nach transienter Expression von Lda3-GFP ein Lda3-Signal zeigten, innerhalb der Inklusion gefunden werden. Außerdem wurde durch die transiente Expression von Lda3 das humane Lipidtröpfchen-assoziierte ADFP-Protein von der Oberfläche der Lipidtröpfchen verdrängt (Cocchiario, Kumar et al. 2008). Zumindest für Lda3 wird daher eine Rolle in der Aufnahme von Lipidtröpfchen in die Inklusion vermutet. Es konnte jedoch keine Lokalisierung von endogenen Lda-Proteinen auf Lipidtröpfchen infizierter Zellen beobachtet werden. Bei den Lda-Proteinen handelt es sich, mit Ausnahme von Lda2, für das eine Transmembrandomäne vorhergesagt ist, sehr wahrscheinlich um lösliche Proteine. Lda2 und IncA aus *C. trachomatis* sind zudem die einzigen chlamydialen Proteine, die bisher in Lipidtröpfchen-Fractionen infizierter Zellen detektiert werden konnten (Kumar, Cocchiario et al. 2006; Cocchiario, Kumar et al. 2008).

*C. pneumoniae* besitzt ein Lda3-homologes Protein sowie schwach homologe Proteine zu Lda1 und Lda2 (Tabelle 1).

CT-Protein	Größe (AS)	Name	TM	Lokalisierung nach Transfektion	Lokalisierung in der Infektion	CPn-Homolog	Homologie	Größe (AS)	TM CPn
CT156	113	Lda1	0	auf LTs	auf der IM	CPn0399	schwach	215	0
CT163	548	Lda2	1	N-Terminus auf LTs	auf der IM	CPn0415	schwach	426	0
CT473	104	Lda3	0	auf LTs	auf der IM	CPn0592	73% von 70%	103	1

**Tabelle 1: Lda-Proteine aus *C. trachomatis* und Homologe aus *C. pneumoniae***

Aufgelistet sind die Lda-Proteine aus *C. trachomatis*, die Protein-Länge in Aminosäuren, die Anzahl der vorhergesagten Transmembrandomänen (TM) und die Lokalisierung der GFP-markierten Proteine nach Transfektion in Humanzellen und, soweit bestimmt, die Lokalisierung der Proteine in der Infektion. Daten nach (Kumar, Cocchiario et al. 2006). Außerdem sind homologe Proteine aus *C. pneumoniae* mit Länge und Anzahl der Transmembrandomänen aufgelistet. Homologievergleich mit Blast, Transmembranvorhersage mit Phobius und TMHMM. nd= nicht determiniert, LT=Lipidtröpfchen, IM= Inklusionsmembran, VL= Volllänge.

Das *C. pneumoniae*-Protein CPn0592 ist zu 49 % homolog zu Lda3, genauer gesagt weisen 70% des Proteins eine 73%ige Homologie auf. Beide Proteine sind in etwa gleich groß und besitzen im N-terminalen Bereich einen hydrophoben Abschnitt, der bei CPn0592 mit der Phobius-Vorhersage als Transmembrandomäne vorhergesagt ist, bei CT473 (Lda3) jedoch unterhalb des Grenzwerts für eine Transmembrandomäne liegt. Mit einem weiteren Transmembranvorhersage-Programm (TMHMM, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) liegt auch die Domäne von CPn0592 unterhalb des Grenzwerts. Es ist also nicht sicher, ob es sich tatsächlich um eine Transmembrandomäne handelt.

Intakte Lipidtröpfchen konnten mittels EM-Aufnahmen in der *C. trachomatis*-Inklusion detektiert werden. Diese waren von einer Membran umgeben und außerdem teilweise mit IncA assoziiert, weshalb davon ausgegangen wird, dass die Lipidtröpfchen über einen endozytotischen Weg in die Inklusion gelangen (Cocchiaro, Kumar et al. 2008).

Lipidtröpfchen dienen den Bakterien zur Nährstoffversorgung, genauer gesagt zur Versorgung mit Neutralfetten. Es wird spekuliert, dass die Lipolyse innerhalb der Inklusion durch das Verdrängen des schützenden Wirtszell-Proteins ADFP durch Lda3 von der Lipidtröpfchen-Oberfläche ermöglicht wird (Cocchiaro, Kumar et al. 2008).

Neben der Nährstoffversorgung sind durchaus auch andere Gründe für die Aufnahme und Interaktion mit Lipidtröpfchen denkbar. Diese Organellen sind nicht nur reine Speicherorganellen, sondern spielen auch eine wichtige Rolle in Signalwegen und im Membrantransport. Es wird daher angenommen, dass durch die Lipidtröpfchen-Interaktion nicht-vesikulär Phospholipide und Cholesterole erworben werden (Kumar, Cocchiaro et al. 2006). So konnte gezeigt werden, dass 40 % des chlamydialen Phospholipidgehalts aus Wirtszell-Phosphatidylcholinen besteht, die vermehrt auf der Oberfläche von Lipidtröpfchen vorkommen (Wylie, Hatch et al. 1997; Bartz, Li et al. 2007; Cocchiaro, Kumar et al. 2008). Des Weiteren wird vermutet, dass es sich auch um eine Form von Organellen-Mimikry handeln könnte, indem die Inklusion in Lipidtröpfchen-ähnliche Strukturen verpackt wird und somit einer Fusion mit degradierenden Kompartimenten entgeht (Kumar, Cocchiaro et al. 2006). Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die Aufnahme von Lipidtröpfchen in die Inklusion essentiell für die chlamydiale Entwicklung ist (Kumar, Cocchiaro et al. 2006).

## 1.5 Identifizierung von Effektorproteinen

Chlamydien sind nicht genetisch manipulierbar, wodurch die Suche nach Effektorproteinen erschwert wird. So wurden Effektorproteine in Chlamydien bisher hauptsächlich aufgrund ihrer Homologie zu bekannten Effektoren anderer Spezies identifiziert. Als Beispiel ist hier das CopN-Protein zu nennen, das Homologie zu dem Typ III-sekretierten Effektor YopN von *Yersinia* aufweist und das in der Inklusionsmembran detektiert werden konnte (Fields and

Hackstadt 2000). Die zweite Möglichkeit ist die Identifizierung via Antisera. Es wird davon ausgegangen, dass Patienten, die mit Chlamydien infiziert sind, vor allem Antikörper gegen sekretierte Proteine bilden, die entweder auf der Bakterienoberfläche, in der Inklusionsmembran oder im Zytoplasma der Wirtszelle lokalisieren. Bei diesen Proteinen könnte es sich demnach um Effektoren handeln (Gupta, Srivastava et al. 2009; Wang, Chen et al. 2009).

Eine speziellere Suche führten Sisko und Kollegen durch, indem sie gezielt Inklusionsmembranen aus infizierten Zellen aufreinigten und zur Immunisierung von Kaninchen verwendeten. Mit Hilfe der generierten Antisera überprüften sie dann eine Auswahl hypothetischer, rekombinant hergestellter Proteine aus *C. trachomatis* auf eine Immunreaktivität. Proteine, die von den generierten Antisera detektiert wurden, befinden sich demzufolge mit großer Wahrscheinlichkeit in der Inklusionsmembran (Sisko, Spaeth et al. 2006). Sisko et al. verwendeten noch eine weitere Methode, um potentielle Effektoren zu identifizieren. Es ist bekannt, dass die Expression eines Effektorproteins, welches konservierte eukaryotische Zielstrukturen besitzt, bei Expression in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* einen Wachstumsdefekt auslösen kann (Papatheodorou, Domanska et al. 2006; Siggers and Lesser 2008; Salomon and Sessa 2010). Aufgrund dieser Annahme exprimierten Sisko und Kollegen eine Auswahl an hypothetischen Proteinen aus *C. trachomatis* in der Hefe und analysierten die Wachstums-Phänotypen (Sisko, Spaeth et al. 2006). Zudem studierten sie die subzelluläre Lokalisierung der Kandidaten in Hefe, in der Annahme, dass die Proteine die benötigten Informationen zur korrekten Lokalisierung an der Zielstruktur besitzen und somit auch in Hefe zeigen würden. Diese Analysen führten zum Beispiel zur Identifizierung der bereits erwähnten Lda-Proteine, die auch in Hefe eine Lipidtröpfchen-Kokolisierung zeigten und teilweise starke Wachstumsphänotypen zeigten (Sisko, Spaeth et al. 2006). Auch andere eingangs beschriebene Effektoren wie Cap1(1.3.3) und CopB (1.3.1.1) induzierten in diese Analysen Wachstumsdefekte in Hefezellen (Sisko, Spaeth et al. 2006).

Das bereits beschriebene Effektorprotein CPAF wurde aufgrund seiner enzymatischen Aktivität in der Wirtszelle identifiziert. So wurde in *C. trachomatis* infizierten Zellen eine Degradation von Wirtszell-Transkriptionsfaktoren beobachtet. Das chlamydiale Protein konnte aus der enzymatisch-aktiven Zell-Fraktion isoliert und somit bestimmt werden (Zhong, Liu et al. 2000; Zhong, Fan et al. 2001).

Auch bioinformatisch können Effektorproteine identifiziert werden, zum Beispiel über die Vorhersage von Signalsequenzen für Sekretionssysteme oder die Suche nach bekannten Motiven oder Domänen, die charakteristisch für Effektorproteine sind oder bei denen eine Interaktion mit Wirtszell-Strukturen naheliegend ist. Die Arbeitsgruppe von Thomas Rattei

sucht bioinformatisch genomweit nach Proteinen, die über ein bekanntes N- terminales Typ-III-Sekretionssignal verfügen (Arnold, Brandmaier et al. 2009).

Experimentell konnten einige Proteine identifiziert werden, deren N-Terminus zur Sekretion eines Reporterproteins in einem heterologen Typ III-Sekretionssystem aus *Shigella flexneri* führte. Bei diesen Proteinen handelt es sich demnach wahrscheinlich um sekretierte Effektoren (Subtil, Parsot et al. 2001; Subtil, Delevoye et al. 2005). Auf diese Weise konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass das Effektorprotein Nue (Abschnitt 1.3.3) über das Typ III-System sekretiert wird.

Typ III-sekretierte Effektorproteine befinden sich im Genom von Pathogenen häufig in der Nähe von Genen, die strukturelle Komponenten des Typ III-Sekretionsapparates kodieren (Subtil, Blocker et al. 2000; Noel, Thieme et al. 2002). Hypothetische Proteine in diesen Genabschnitten kommen demzufolge als potentielle Effektoren in Frage. Bei den meisten Pathogenen sind diese Gene auf Pathogenitätsinseln angesiedelt, bei den chlamydialen Spezies hingegen liegen sie über das gesamte Genom verteilt vor. Daher kann diese Hypothese zur Identifizierung von Effektorproteinen hier nicht eingesetzt werden (Subtil, Blocker et al. 2000).

### 1.5.1 Hefe als Tool zur Identifizierung neuer Effektorproteine

In dieser Arbeit sollten mit Hilfe der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* neue Effektorproteine von *Chlamydia pneumoniae* identifiziert werden. Viele Strukturen sind von der Hefe bis zur Humanzelle konserviert. Hierzu zählen zum Beispiel das Zytoskelett, die Transkriptions- und Translationsmaschinerie, Vesikeltransportwege, die Zellzykluskontrolle und sogar Aspekte der Apoptose. Chlamydiale Effektoren, die diese humanen Strukturen in der Infektion angreifen, lösen deshalb bei Expression in der Hefe möglicherweise einen Wachstumsdefekt aus und können so identifiziert werden. Des Weiteren kann die Lokalisierung eines potentiellen Effektors in Hefe auch Hinweise auf seine Funktion liefern. So konnte Dr. Rafat Zrieq zeigen, dass das *C. pneumoniae*-Homolog des Tarp-Proteins, CPn0572, in Hefe einen starken Wachstumsdefekt verursachte und als GFP-Fusionsprotein mit dem Aktin der Hefe kolokalisierte, wobei das Aktin-Zytoskelett durch die Expression von CPn0572 seinen filamentösen Aufbau verlor und in Aktin-Aggregate transformiert wurde. Mit Hilfe Hefe-basierter Assays konnte schließlich maßgeblich die Funktion dieses Effektors in der Infektion aufgeklärt werden (Zrieq 2009).

Hefe eignet sich als Modellorganismus sehr gut, da sie einfach zu kultivieren und genetisch zu manipulieren ist.

## 1.6 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit einer genomweiten Suche neue potentielle Effektorproteine von *Chlamydia pneumoniae* zu identifizieren. Hierzu sollte eine genomische Expressionsbibliothek von *C. pneumoniae* in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert und gezielt nach Klonen gesucht, die reduziertes Wachstum aufwiesen. Diese Klone sollten dann in Hefe näher analysiert werden, um potentielle Zielstrukturen zu finden und Aufschluss über die mögliche Lokalisierung der Kandidaten zu gewinnen. Eine Kooperation mit den Arbeitsgruppen Subtil, Paris und Rattei, München sollte genutzt werden, um einerseits experimentell und andererseits bioinformatisch Aussagen über die mögliche Sekretion der Kandidaten treffen zu können. Anschließend sollten einige Kandidaten ausgewählt werden, die potentiell als Effektoren in Frage kommen könnten. Diese Kandidaten sollten mit Hilfe spezifischer Antiseren in der Infektion analysiert werden. Sollte sich für die Kandidaten eine Sekretion nachweisen lassen, sollten sie weiter charakterisiert werden, um möglichst ihre Funktion in der Infektion aufzuklären.

## 2 Materialien

### 2.1 Gebrauchsartikel

Amicon Zentrifugenröhrchen	Millipore
Dialyseschlauch	Serva
Gewebekultur-Röhrchen (GK): PS-Röhrchen, 6 ml, steril	Greiner
Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen)	Nunc
Gewebekulturplatten (24 Vertiefungen)	Nunc
Glasperlen ( $\varnothing \sim 0,5$ mm)	Braun
Glasplättchen (für Chlamydienkultur in Well-Platten):	
Deckgläser, $\varnothing$ 12 mm	Roth
Immobilon-P Membran	Millipore
Isopropanol-Einfrierbox	Roth
Kulturflaschen: Polystyrene-Flaschen, 25 cm <sup>2</sup> /50 ml und 80 cm <sup>2</sup> /260 ml, steril	Nunc
Kryo-Röhrchen (1,8 ml)	Nunc
Saugpapier für Westernblots	VWR
Zentrifugationsröhrchen, 12 ml: PP-Röhrchen, steril	Greiner
Zentrifugationsröhrchen, 50 ml: PP-Röhrchen, steril mit Schraubverschluss	Sarstaedt
Zellschaber: 23 cm, steril	Nunc

### 2.2 Geräte und Maschinen

Avanti Zentrifuge J-25	Beckmann
Binokular Axiovert 25C	Zeiss
Biofuge pico (mit Hereus Sepatech-Rotor #3324)	Heraeus
Biofuge Primo R	Heraeus
Blotapparatur	Biometra
Brutschrank Thermo FormaSterikult 100	Thermo
Centrifuge J2-21	Beckmann
Dounce-Homogenisator	Haeberle
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 50	Zeiss
Gen Pulser	Bio-Rad
Herasafe Sicherheitswerkbank	Heraeus
Megafuge 1.0 (mit Tragringrotor (#3360))	Heraeus
NanoDrop ND-2000C Spectrophotometer	PeqLab
PCR-Thermocycler: Gene Amp 9700	MJ Research
PCR-Thermocycler PTC-200	Bio-Rad
Photometer DU-800 Spectrophotometer	Beckmann
Proteingelsystem SE260	Hofer

Rotanta 460R (mit Rotor #4444 und Einsätzen #4428)	Hettich
Speed-Vac Vacuum-Concentrator	Savant
Schüttler Unitron	Infors
Ultrazentrifuge TLA100	Beckmann
Ultraschallstab Sonoplus HD2200	Bandelin
Ultraschallwasserbad RK102H	Bandelin
Vibrax VXR	IKA
Zählkammer	Thoma

## 2.3 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamidlösung (30%: 0,8% Bisacrylamid)	Roth
Actidione (Cycloheximid)	Sigma
Adenin	Roth
Agar	Difco
Agarose: SeaKem LE	Biozym
AnnexinV-Fluos	Roche
Ampicillin	Sigma
Bacto Trypton	Difco
BES (N,N-Bis(2-hydroxyethyl)taurin)	Sigma
Beta-Glucuronidase/Arylsulfatase	Roche
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva
Bovines Serumalbumin, fettsäurefrei	Serva
Bradford Reagenz	Biorad
5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)	Sigma
Borsäure (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	Sigma
Bromphenolblau	Fluka
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Roth
Calcofluor White	Sigma
Casein Pepton	Difco
Ciprofloxacin	Santa Cruz
Coomassie Brilliant Blau R250	Serva
Cycloheximid	Sigma
Desoxynukleosid-5'-Triphosphat (dNTPs)	MBI Fermentas
Dimethylformamid (DMF)	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma
DMEM GlutaMAX™ +Glukose +Pyruvat	Invitrogen
DSP	Thermo Scientific
Essigsäure	Riedel-deHaën

Ethanol (96 %)	VWR
Ethanolamin	Sigma
Ethidiumbromidlösung (10mg/ml)	Roth
Ethylendiamintetraacetat (Na <sub>2</sub> -EDTA)	Roth
Filipin	Sigma
Fötale Kälberserum (FKS)	Invitrogen
Fungizone (Amphotericin B)	Invitrogen
Galaktose	Roth
Gastrographin	Schering
Gentamycin	Invitrogen
Glucuronidase/Arylsulfatase	Roche
Glucose Monohydrat	Roth
Gluthation-Agarose	Pierce
Glyzin	Roth
Glyzerin	Roth
Hanks´ Salzlösung (HBSS)	Invitrogen
Harnstoff	VWR
Hefeextrakt	Difco
Hefe Stickstoffquelle (YNB)	Difco
Imidazol	Sigma
IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)	Sigma
Iscove´s Modified Dulbecco´s Medium (IMDM)	Invitrogen
Isopropanol	Roth
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Peqlab
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Lachssperma DNA	Sigma
Latrunculin B	Invitrogen
L-Glutathion, reduziert	Sigma
Lithiumacetat (LiOAc)	Roth
Lyticase	Roche
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> + 6 H <sub>2</sub> O)	Roth
Methanol	Riedel-deHaën
Methylenblau	Sigma
Milchpulver	Roth
Natriumacetat (NaOAc)	Roth
Natriumcarbonat (NaCO <sub>3</sub> )	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	VWR
Natriumdeoxycholat	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
di-Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	VWR

Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	VWR
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )	VWR
NHS-Sepharose	GE Healthcare
Nicht-essentielle Aminosäuren (MEM)	Invitrogen
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma
Nickel-NTA Agarose	Qiagen
N-Lauroylsarcosin (Sarkosyl)	Sigma
NP-40	Sigma
Ölsäure	Sigma
Optiprep®	Sigma
Phloxin B	AppliChem
PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride)	Sigma
Polyethylenglycol 3350 (PEG)	Sigma
Poly-L-Lysin	Sigma
Propidiumiodid	Roth
Proteaseinhibitoren Cocktail complete	Roche
Saccharose Monohydrat	Roth
Salzsäure (HCl)	Roth
Saponin	Roth
Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )	Merck
Silbernitrat ( $\text{AgNO}_3$ )	Roth
Sorbitol	Roth
TEMED	Serva
Thiabendazole (TBZ)	Sigma
Triacsin C	Santa Cruz
Triethanolamin	Roth
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Merck
Trypton Pepton	Difco
Tween 20	Merck
Vectashield (Anti-fade, mounting fluid)	Linaris
Vitaminlösung (MEM)	Biochrom
Xylencyanol	Serva
X-alpha-Gal	Clontech
Zwittergent 3-14	Sigma

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

## 2.4 Enzyme

### 2.4.1 Nukleasen

DNase I (RNase frei)	Roche
RNase A	Qiagen

### 2.4.2 Restriktionsenzyme

Die Restriktionsenzyme wurden von der Firma MBI Fermentas bezogen. Verwendet wurden folgende Enzyme:

*Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Hinc*II, *Nco*I, *Not*I, *Sac*I, *Scal*, *Sma*I, *Pst*I, *Pvu*I, *Pvu*II, *Xho*I, *Xho*II, *Xba*I

### 2.4.3 Polymerasen

Taq DNA Polymerase	eigene Herstellung durch Frau Volfson
TrueStart Taq Polymerase	Fermentas
Platinum PFX DNA Polymerase	Invitrogen

### 2.4.4. Andere Enzyme

Proteinase K	Roche
Trypsin/EDTA	Invitrogen
Lysozym	Sigma

## 2.5 Antikörper

Primär-antikörper	Reaktivität	Ursprung	Verdünnung Western	Verdünnung IF	Referenz
Pathfinder (mAB)	Chlamydiales LPS	Maus	Nur IF	1:4	Bio-Rad
Momp-Serum	<i>Cpn</i> Momp	Kaninchen	1:100	1:10	(Wuppermann, Hegemann et al. 2001)
DnaK (mAB)	Chlamydiales DnaK	Maus	1:500	1:50	(Birkelund, Lundemose et al. 1990)
anti- <i>Cpn</i> (mAB)	<i>Cpn</i> Momp	Maus	1:50	1:5	Dako
<i>C. trachomatis</i> S1 (mAB)	<i>Ctr</i> ribosom. S1 Protein	Maus	1:500	1:40	(Birkelund, Lundemose et al. 1990)
Zhong anti-Momp (mAB)	<i>Cpn</i> Momp	Maus	Nur IF	1 :50	(Luo, Jia et al. 2007)
Zhong anti-IncA (mAB)	<i>Cpn</i> IncA	Maus	Nur IF	1 :50	(Luo, Jia et al. 2007)
#2455	<b>Cpn0147</b>	Kaninchen	1:100	1:3	diese Arbeit
#2456	Cpn0147	Kaninchen	1:100	1:50	diese Arbeit

#2457	Cpn0181	Kaninchen	1:100	1:50	diese Arbeit
<b>#2458</b>	<b>Cpn0181</b>	Kaninchen	1:30	unverdünnt	diese Arbeit
#2459	Cpn0350	Kaninchen	1:100	1:50	diese Arbeit
<b>#2460</b>	<b>Cpn0350</b>	Kaninchen	1:100	1:3	diese Arbeit
#1366	Cpn0472	Kaninchen	1:100	1:50	diese Arbeit
<b>#1367</b>	<b>Cpn0472</b>	Kaninchen	1:30	unverdünnt	diese Arbeit
#2218	Cpn0809	Kaninchen	1:100	1:50	diese Arbeit
<b>#2219</b>	<b>Cpn0809</b>	Kaninchen	1:50	unverdünnt	diese Arbeit
#1368	Cpn1054	Kaninchen	1:100	1:50	diese Arbeit
<b>#1369</b>	<b>Cpn1054</b>	Kaninchen	1:50	unverdünnt	diese Arbeit
Penta His AK (mAB)	Histidin-Tag	Maus	1:2500	Nur WB	Roche
Anti-cMyc (mAB)	cMyc-tag	Maus	1:400	Nur WB	Roche
Anti-HA (mAB)	HA-Tag	Maus	1:80	Nur WB	Roche
Anti-GST	GST-Tag	Rabbit	1:1000	Nur WB	Santa Cruz
Anti-Calnexin	Calnexin	Maus	1:1000	1:100	Santa Cruz
Anti-Aktin	humanes Aktin	Maus	1:2000	Nur WB	Sigma
Anti-Vimentin-Cy3 Konjugat	Vimentin C- Term	Maus	Nur IF	1:200	Sigma Aldrich
Anti-ADFP	Humanes ADFP	Huhn	1:500	1:200	Sigma Aldrich
Anti-alpha-Tubulin	Humanes alpha-Tubulin	Maus	Nur IF	1:300	Acris

**Tabelle 3: Verwendete Primär-Antikörper**

**Fettgedruckt: aufgereinigter Antikörper vorhanden und verwendet, Protokoll siehe 3.3.11**

In dieser Arbeit generierte Seren: Präimmunsere (PPI) und Vorseren (PP und GP) besitzen die gleiche Nummer und wurden immer 1:50 für die IF und 1:100 für Western Blots eingesetzt. Gleiches gilt für nicht-gereinigte Vollseren.

<b>Sekundär-Antikörper</b>	<b>Ursprung</b>	<b>Referenz</b>
Alexa Fluor 488-Kaninchen	Ziege	Invitrogen
Alexa Fluor 594-Kaninchen	Ziege	Invitrogen
Alexa Fluor 633-Kaninchen	Ziege	Invitrogen
Alexa Fluor 488-Maus	Ziege	Invitrogen
Alexa Fluor 594-Maus	Ziege	Invitrogen
AP-Anti-Kaninchen	Maus	Promega
AP-Anti-Maus	Kaninchen	Promega
Cy3-Anti-Maus	Kaninchen	Sigma
Cy3-Anti-Kaninchen	Maus	Sigma
FITC anti-Kaninchen	Schwein	Dako
FITC anti-Maus	Kaninchen	Dako
FITC anti-Huhn	Ziege	Santa Cruz
Texas Red anti-Huhn	Ziege	Santa Cruz

Tabelle 4: Verwendete Sekundär-Antikörper

## 2.6 Fluoreszenzfarbstoffe

Nile Red	Sigma
Bodipy 493/503	Invitrogen
DAPI	Sigma
Filipin	Sigma
Rhodamin-Phalloidin	Invitrogen
WGA, Alexa Fluor 633	Invitrogen

Tabelle 5: Verwendete Fluoreszenz-Farbstoffe

Verdünnungen und Aufbereitung laut Herstellerangaben

## 2.7 Kits

Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System III, Clontech

Mate&Plate™ Library – Human Testis, Clontech

PureLink Plasmid Midi Kit, Invitrogen

QiaexII Gel Extraction Kit, Qiagen

Plasmid Midi Kit, Qiagen

TurboFect™ Protein Transfection Reagent, Fermentas

## 2.8 DNA Größenstandard

1 kb DNA-Ladder Mix, Fermentas,

O' GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas

## 2.9 Proteingrößenstandard

PageRuler™ prestained Protein Ladder, Fermentas

## 2.10 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide befinden sich im digitalen Anhang.

## 2.11 Plasmide

Die Tabelle enthält eine Auflistung aller Ursprungsplasmide. Die klonierten Plasmide befinden sich im digitalen Anhang.

Nr. i. d. Sammlung	Name	Hefe-marker	<i>E. coli</i> -Marker	Vektor-typ	Funktion
#1720	mCherry CEN TRP ARS	<i>TRP1</i>	<i>kan</i>	CEN	Humaner Expressionsvektor mcherry-Fusion
#235	p426-MET25	<i>URA3</i>	<i>amp</i>	2μ	Hefe-Expressionsvektor
#1353	pBYE	<i>URA3</i>	<i>amp</i>	CEN	Humaner Expressionsvektor GFP-Fusion
#1612	pFT8	<i>TRP1</i>	<i>amp</i>	CEN	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor GST- und 6His-Fusion
#1941	pKM32	<i>URA3</i>	<i>amp</i>	CEN	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor 6His-Fusion

#1362	pRZ7	<i>URA3</i>	<i>amp</i>	2 $\mu$	Hefe-Expressionsvektor tetO-Promoter
#848	pUG34	<i>HIS3</i>	<i>amp</i>	CEN	Hefe-Expressionsvektor GFP-Fusion

Tabelle 6: Verwendete Ursprungsplasmide

## 2.12 Zellen und Zelllinien

### 2.12.1 Prokaryotische Zellen / Isolate

#### 2.12.1.1 Chlamydia pneumoniae

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

#### 2.12.1.3 Escherichia coli

**XL<sub>1</sub>-blue:** *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac- [F' proAB lac]<sup>R</sup>  $\Delta$ M15 Tn10(Tc<sup>R</sup>)* (Stratogene)

**BL21:** *F ompT hsdSB (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm* (DE3) (Invitrogen)

### 2.12.2 Eukaryotische Zellen / Zelllinien

#### 2.12.2.1 Saccharomyces cerevisiae

**CEN.PK2:** *MAT $\alpha$  leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3- $\Delta$ 1 MAL2-8<sup>C</sup> SUC2*  
*MAT $\alpha$  leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3- $\Delta$ 1 MAL2-8<sup>C</sup> SUC2*  
 (Entian, Schuster et al. 1999)

**CEN.PK 2-1C:** *MAT $\alpha$  leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3- $\Delta$ 1 MAL2-8<sup>C</sup> SUC2*  
 (Entian, Schuster et al. 1999)

**AH109:** *MAT $\alpha$  trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4 $\Delta$  gal80 $\Delta$  LYS2::GAL1<sub>UAS</sub> – GAL1<sub>TATA</sub> – HIS3 GAL2<sub>UAS</sub> – GAL2<sub>TATA</sub> – ADE2 URA3::MEL1<sub>UAS</sub> – MEL1<sub>TATA</sub> – LacZ MEL1* (Clontech)

**Y187:** *MAT $\alpha$  ura3-52 his3-200 ade2-101 trp1-901 leu2-3,112 gal4 $\Delta$  gal80 $\Delta$  met- URA3::GAL1<sub>UAS</sub> – GAL1<sub>TATA</sub> – LacZ MEL1* (Clontech)

**YUG37:** *MAT $\alpha$  ura3-52 trp1-63 LEU2 pCM149* an *leu2- $\Delta$ 1* integriert (Güldener 2000)

#### 2.12.2.2 Adhärenente Zellkulturzellen

**HEp-2 Zelllinie:** epitheliale Larynxkarzinom-Zelllinie menschlichen Ursprungs, HeLa-Morphologie (ECACC Nr.: 86030501; ATCC Nr.: CCL-23)

**HeLa 229 Zelllinie:** epitheliale Zelllinie menschlichen Ursprungs (Zervixkarzinom) (ECACC Nr.: 86090201; ATCC Nr.: CCL-2.1)

**HEK-293 Zelllinie** : humane embryonale Nierenzellen (ATCC Nr.: CRL-1573, (Graham, Smiley et al. 1977))

## 2.13 Medien und Medienzusätze

Cycloheximid (Actidione) (0,1 mg/ml)

Fötale Kälberserum (FKS), dialysiert

Fungizone (Amphotericin B)

Gentamycin

Nicht-essentielle Aminosäuren (MEM) Endkonzentration (100 x)

Vitaminlösung (MEM) Endkonzentration (100 x)

Hanks´ Salzlösung (HBSS)

Ciprofloxazin

### 2.13.1 Zell- und Chlamydienkulturmedium

Minimal Essential Medium DMEM GlutaMAX™ +Glukose +Pyruvat

Iscove´s Modified Dulbecco´s Medium (IMDM)

### 2.13.2 Medien für *Escherichia coli*

#### LB Medium

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

In einem Liter deion. Wasser lösen, autoklavieren und in 200 ml Flaschen portionieren bzw. Platten gießen. Nach dem Autoklavieren: Zugabe von Ampicillin, Endkonzentration 50 mg/l oder Kanamycin 10 mg /l.

### 2.13.3 Medien für *Saccharomyces cerevisiae*

#### YPD<sup>+</sup>-Medium

20,0 g	Glukose
10,0 g	Hefeextrakt
20,0 g	Trypton Pepton
13,5 g	Agar (nur bei Festmedien)
2 ml	Adeninstocklsg. (2 mg/ ml)
4 ml	Tryptophanstocklsg. (5 mg/ ml)

Alle Zutaten in einem Endvolumen von 1 Liter lösen (im Falle von Flüssigmedium in 250 ml Flaschen portionieren) und autoklavieren.

#### SD- Minimalmedium (Platten):

20,0 g	Glucose
20,0 g	Agar
1,7 g	Hefe Nitrogen Base (YNB)

5,0 g Ammoniumsulfat

2,0 g Aminosäure-Mix

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

### Aminosäure-Mix:

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

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

Tabelle 7: Zusammensetzung des Aminosäure-Mixes

### SD-Minimalmedium (flüssig):

20,0 g Glukose

1,7 g Hefe Stickstoffquelle (YNB)

5,0 g Ammoniumsulfat

2,0 g Aminosäure-Mix

Die entsprechende Aminosäure oder Base für die Selektion im Minimalmedium nicht dazu geben.  
In 1000 ml deion. Wasser lösen.

Medienzusätze für Hefemedium (fest und flüssig):

0,5 M NaCl

0,8 M Sorbitol

30 µg /ml bzw. 50 µg/ml TBZ

1 µg /ml Doxyzyklin

2,08 µg /ml Phloxin B

## 3. Methoden

### 3.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen in der Zellkultur

##### 3.1.1.1 Herstellung des Zellkulturmediums

Für die Kultivierung von HEK293 Zellen: Zu 500 ml Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) wird 50 ml FKS gegeben.

Für die Kultivierung von HEp-2 Zellen und HeLa 229 Zellen: 500 ml Minimal Essential Medium (DMEM Glutamax + HEPES (25 mM) + Earle's salts) wird um folgende Zusätze erweitert (DMEM+5):

50 ml FKS (hitzeinaktiviert 1 Std bei 56 °C)	Endkonzentration: 9,09 %
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

##### 3.1.1.2 Herstellung aller Stammlösungen für die Zellkultur

###### Hitzeinaktivierung von fötalem Kälber-Serum (FKS)

- Das Kälber-Serum wird bei Raumtemperatur aufgetaut.
- Die Hitzeinaktivierung erfolgt bei 56 °C für 60 min im Wasserbad, dabei sollte das FKS durch gelegentliches Schütteln gemischt werden.
- Die Lagerung erfolgt in Portionen zu je 50 ml bei -20°C.

###### Vitamine, Aminosäuren und Antibiotika

Vitamine und Amphotericin werden in gebrauchsfertige Portionen aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

###### Herstellung der Trypsinlösung

10 x Trypsin/EDTA-Lösung (Invitrogen) wird in 5 ml Aliquots portioniert weggefroren und zum Gebrauch werden 5 ml mit 95 ml Hank's Lösung (HBSS) ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  verdünnt. Die Gebrauchslösung (0,5 x Trypsin/EDTA) wird bei 4 °C gelagert.

##### 3.1.1.2 Auftauen von adhärenenten epithelialen Zellen

- Das Einfrierröhrchen mit HEp-2 Zellen wird aus -70 °C möglichst schnell aufgetaut. Dazu wird das Röhrchen im 37 °C warmen Brutschrank erwärmt.
- Wenn das Eis aufgelöst ist, wird der Inhalt kurz gemischt.
- Die Zellsuspension wird in 10 ml Zellkulturmedium, welche in ein steriles 12 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt wurde, pipettiert und gemischt.
- Dann wird die Suspension bei 43,3 x g (500 Upm / Rotanta 460R) für 10 min bei 15 °C zentrifugiert.
- Das Sediment wird mit 2 ml Zellkulturmedium vorsichtig resuspendiert und dann in eine kleine 25 cm<sup>2</sup> Flasche oder eine große 80 cm<sup>2</sup> Flasche mit 4 ml bzw. 12 ml Zellkulturmedium geimpft.

### 3.1.1.3 Trypsinbehandlung zum Ablösen adhärenter epithelialer Zellen

- Aus einer konfluent mit Zellen bewachsenen Zellkulturflasche (80 cm<sup>2</sup>) wird das Zellkulturmedium abgesaugt.
- Der Zellrasen wird einmal mit 5 ml Hank's-Lösung (HBSS) vorsichtig bei RT gewaschen.
- Die Zellen werden mit 5 ml Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung überschichtet und bis zum Ablösen der Zellen, was durch leichtes Schwenken der Flasche gefördert wird, bei RT für ca. 10 min inkubiert.
- Es werden 5 ml Zellkulturmedium hinzu pipettiert und die Suspension wird vorsichtig gemischt.
- Die Suspension wird in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 43,3 x g (500 Upm / Rotanta 460R) bei 15 °C zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen und das Sediment in 5 ml Zellkulturmedium vorsichtig resuspendiert.

### 3.1.1.4 Passagieren von adhärenen epithelialen Zellen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind epitheliale Zellen mit sehr ähnlichem Wachstumsverhalten.

#### Passage von adhärenen epithelialen Zellen in 24 Well-Platten

- Die 24 Well-Platten werden steril geöffnet und ein steriles Glasplättchen wird mit einer Pinzette in jedes Well gelegt.
- Je nach Bedarf werden die Zellen im Verhältnis 1:10 bis 1:30 mit Zellkulturmedium verdünnt.
- Aus dieser Lösung wird jeweils 1 ml entnommen und ein vorbereitetes Well pipettiert, so dass keine Luft zwischen den Boden des Wells und das Glasplättchen gelangt.
- Die Platten werden nun einen bis mehrere Tage bei 37 °C inkubiert, bis die gewünschte Zelldichte erreicht ist.

#### Passage von adhärenen epithelialen Zellen in kleinen Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>)

- In jede Flasche werden 5 ml Zellkulturmedium vorgelegt.
- Die durch Abtrypsinisieren gewonnene Suspension wird aufgeschüttelt und in jede Zellkulturflasche werden 0,2 – 0,5 ml Suspension pipettiert.
- Die Flaschen werden gut verschlossen und leicht geschwenkt, um die Zellen im Medium zu verteilen.
- Die Zellkulturflaschen werden bei 37 °C, 6 % CO<sub>2</sub> und leicht geöffnetem Deckel für 3-4 Tage inkubiert.

#### Passage von adhärenen epithelialen Zellen in großen Zellkulturflaschen (80 cm<sup>2</sup>)

- In jede Zellkulturflasche werden 15 ml Zellkulturmedium pipettiert.
- Die durch Abtrypsinisieren gewonnene Zellsuspension wird aufgeschüttelt und anschließend werden 0,5-1,5 ml dieser Suspension in jede Zellkulturflasche pipettiert.
- Durch leichtes Schwenken werden die Zellen im gesamten Medium verteilt.
- Die Zellkulturflaschen werden 3-4, maximal 7 Tage bei 37 °C, 6 % CO<sub>2</sub> und leicht geöffnetem Deckel inkubiert.
- HeLa 229 und HEp-2 Zellen wird zur Vermeidung von Mykoplasmenkontaminationen Ciprofloxacin in einer Endkonzentration von 10 µg/ml im Medium zugesetzt.

- Die Ciprofloxacin-Behandlung wird nach jeder dritten bis vierten Passage für eine Passage unterbrochen.

#### 3.1.1.5 Einfrieren von Humanzellen

- Aus einer konfluent bewachsenen 80 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche wird das Zellkulturmedium abgesaugt.
- Der Monolayer wird mit 5 ml HBSS-Lösung vorsichtig gespült, um Mediumreste zu entfernen.
- Die HBSS-Lösung wird vollständig abgesaugt.
- Zum Ablösen der Zellen werden diese mit 5 ml Trypsin/EDTA (0,5 x) überschichtet und bei leichtem Schwenken der Flasche bei RT für ca. 10 min inkubiert.
- Zugabe von 5 ml Zellkulturmedium und vorsichtiges Mischen der Suspension.
- Die Suspension wird in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 43,3 x g zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen und das Sediment in 1 ml Einfriermedium (90 % FKS, 10 % DMSO) resuspendiert.
- Die Suspension wird in ein Kryo-Röhrchen überführt.
- Die Zellen werden schonend in einer Isopropanol-Einfrierbox bei -70 °C eingefroren.

#### 3.1.1.6 Bestimmung von Zellzahlen

Um gleiche Zellzahlen in verschiedenen Experimenten einzusetzen und das Verhältnis zwischen infektiösen Partikeln und Zellen zu bestimmen, wird die Zellzahl quantifiziert.

- Die Zellen werden mittels Trypsinbehandlung aus den Zellkulturflaschen abgelöst.
- Die Zellen werden sedimentiert bei 43,3 x g für 10 min und anschließend in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert.
- 10 µl dieser Suspension wird in eine Neubauer-Zählkammer eingefüllt.
- Die Zellzahl wird bestimmt und mittels des Zählkammer-spezifischen Verdünnungsfaktors wird die Zellzahl pro ml berechnet.

#### 3.1.1.7 Transfektion adhärenter epithelialer Zellen mittels Calciumphosphat

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

- Ca. 10<sup>5</sup> HEK293T-Zellen oder HeLa 229-Zellen werden 24 Std vor der Transfektion in 24-Well Platten mit Deckgläschen ausgesät.
- 2 µg Plasmid-DNA, 10 µl 1 M CaCl<sub>2</sub> und 30 µl ddH<sub>2</sub>O werden in einem sterilen Reaktionsgefäß gemischt.
- Die DNA/CaCl<sub>2</sub> Lösung wird tropfenweise unter Vortexen zu 40 µl 2 x BBS (50 mM BES pH 6.96, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) gegeben und 15 - 20 min bei RT inkubiert.
- Die zu transfizierenden Zellen werden einmal mit Zellkulturmedium ohne FKS gewaschen und anschließend mit 500 µl Zellkulturmedium ohne FKS überschichtet.
- Die Präzipitat-Lösung wird unter leichtem Schwenken zu den Zellen pipettiert.

- Nach 3-6 Std Inkubation bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> wird der Überstand abgenommen und die Zellen mit Zellkulturmedium (mit FKS) gewaschen und mit frischem Medium überschichtet.
- Nach 24 Std Inkubation bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> wird das Medium abgenommen, 2 x mit HBSS gewaschen und die Zellen werden mit 3 % para-Formaldehyd (frisch zubereitet aus 30 % pFA aus -20°C) oder Methanol für die Mikroskopie fixiert.
- Wahlweise können die Zellen 24 Std vor oder nach der Transfektion auch infiziert werden. Dabei sollte aber auf die Zugabe von Cycloheximid für die Dauer der Transfektion verzichtet werden.

### 3.1.1.8 Transfektion adhärenter epithelialer Zellen mit Primärantikörpern

Für die Transfektion von Primärantikörpern wird das TurboFect™ Protein Transfection Reagent von Fermentas verwendet.

Die Transfektion erfolgt nach Herstellerangaben.

### 3.1.2 Chlamydienkultur

#### 3.1.2.1 Herstellung des Chlamydienkulturmediums

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

#### 3.1.2.2 Lösungen für die Chlamydienkultur

10 mg Cycloheximid werden in 100 ml HBSS aufgelöst, steril filtriert und aliquotiert.

Die Aliquots werden bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

#### Herstellung des Saccharose-Phosphat-Glutaminsäure-Puffer (SPG-Puffer)

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

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

#### 3.1.2.3 Auftauen einer Chlamydien suspension zur Kultivierung

- Ein Kryo-Röhrchen wird aus -70 °C entnommen und im Brutschrank bei 37 °C erwärmt.
- Die Chlamydien suspension wird in 10 ml Zellkulturmedium pipettiert und leicht gemischt.
- Bei geringen Infektionsdosen (<1000 IFU / ml) infiziert man mit dieser Suspension einzelne Wells. Bei hohen Infektionsdosen können 1-4 kleine Zellkulturflaschen infiziert werden.

#### 3.1.2.4 Passage von Chlamydien in 24-Well-Platten

- Wells, welche in der gewünschten Zelldichte bewachsen und nicht älter als 3 Tage sind, werden für die Infektion verwendet.
- Eine zu passagierende Chlamydien suspension wird in die benötigte Menge Zellkulturmedium pipettiert und gemischt.

- In jedes Well werden 1 ml der infektiösen Suspension pipettiert.
- Die Platten werden für 60 min bei 30 °C und 4000 x g in der Rotanta 460R Zentrifuge zentrifugiert, daran schließt sich eine einstündige Inkubation bei 37 °C an (Adsorptionsphase).
- Nach der Adsorptionsphase wird das Medium aus jedem Well abgezogen und vorsichtig durch 1 ml Chlamydienkulturmedium ersetzt.
- Die Platten werden dann 1-4 Tage bei 37 °C und gut verschlossenen Deckeln inkubiert.

#### **3.1.2.5 Passage von Chlamydien in kleinen Zellkulturflaschen**

- Eine aufgetaute Chlamydien suspension wird durch Zugabe von Medium auf ein Volumen von 6 ml pro Zellkulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) aufgefüllt.
- Die Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) werden unter sterilen Bedingungen geöffnet und das überstehende Zellkulturmedium wird abgezogen.
- Die Chlamydien suspension wird vorsichtig in die Flasche pipettiert.
- Die Flaschen werden fest verschlossen und 60 min bei 1560 x g (3000 Upm / Rotanta 460R), 30 °C zentrifugiert und anschließend 60 min zur Adsorption bei 37 °C inkubiert.
- Nach der Adsorption werden die Flaschen unter sterilen Bedingungen geöffnet und das Medium wird vorsichtig abgesaugt.
- Die infizierten Zellen jeder Flasche werden vorsichtig mit 6 ml Chlamydienkulturmedium überschichtet.
- Dann werden die infizierten Zellen bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> für 3-4 Tage inkubiert.
- Nach 3-4 Tagen werden die Flaschen aus dem Brutschrank entnommen und im Phasenkontrastmikroskop bei 100- 200 facher Gesamtvergrößerung durchgemustert. Ein Ablösen der Zellen und das Auftreten von Einschlusskörpern in den Zellen deuten auf eine starke Infektion hin.
- Bei starker Ablösung der Zellen vom Flaschengrund liegt eine starke Infektion vor und die Chlamydien können bei der nächsten Passage 1:4 oder stärker verdünnt werden. Ist das aber nicht der Fall, dann sollte bei der nächsten Passage keine Verdünnung der Chlamydien vorgenommen werden.
- Mit Hilfe eines sterilen Zellschabers werden die infizierten Zellen vom Flaschengrund gelöst.
- Die Suspension von bis zu 6 kleinen Flaschen wird in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml) pipettiert. Zur Verdünnung wird in ein solches Röhrchen eine entsprechende Menge an Zellkulturmedium vorgelegt, bei einer 1:2 Verdünnung werden 12 ml Medium vorgelegt und die Suspension aus 2 Flaschen (2 x 6 ml) hinzugefügt.
- Die Suspension wird 45 s mit dem Ultraschallstab beschallt.
- Die Suspension wird 10 min bei 1560 x g (3000 Upm / Rotanta 460R) und 20 °C zentrifugiert (Differentialzentrifugation).
- Der Überstand wird in ein neues Röhrchen überführt und die Zentrifugation wird wiederholt.
- Der Überstand des zweiten Zentrifugationsschrittes wird zur Infektion neuer Zellkulturflaschen verwendet oder eingefroren.

- Bei einer starken Infektion kann der Überstand 1:2 mit SPG-Puffer gemischt und in Portionen zu je 1,5ml bei -70°C eingefroren werden.

### 3.1.2.6 Sedimentation und Einfrieren von Chlamydien

- Die Chlamydien suspension, die nach der Differentialzentrifugation nicht der weiteren Passage dient, wird sedimentiert. Dazu wird die Chlamydien suspension in ein steriles Ultrazentrifugenröhrchen überführt und 40 min bei 30000 x g und 4 °C (Avanti J-25) zentrifugiert.
- Der Überstand wird abgesaugt und verworfen.
- Das Sediment wird vorsichtig mit Hilfe einer Pipette und durch Mischen in 1 ml SPG-Puffer resuspendiert.
- Die Suspension wird in ein Kryo-Röhrchen überführt und bei -70 °C gelagert.

### 3.1.2.7 Reinigung von Chlamydien durch Zentrifugation

Chlamydien werden mittels Dichtegradientenzentrifugation von eukaryotischen Zelltrümmern gereinigt. Für die Reinigung werden die Chlamydien ernten von bis zu 32 kleinen Zellkulturflaschen auf einem Gradienten aufgetrennt.

- Die differentialzentrifugierte Chlamydien suspension wird bei 15.000 Upm (Hereaus Biofuge Primo R) und 4 °C für 30 min sedimentiert.
- Das Pellet wird in 1 ml PBS (137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid und 12 mM Dinatriumhydrogenphosphat) resuspendiert.
- In ein frisches Glas-Zentrifugenröhrchen (Beckmann) werden 9 ml 30% Gastrografin in sterilem Wasser gegeben.
- Die Chlamydien suspension wird vorsichtig darauf pipettiert.
- Bei 30000 x g (Beckmann J2-21) und 4 °C wird 1 Std zentrifugiert.
- Das Pellet wird 2 x mit 10 ml PBS gewaschen, erneut sedimentiert und in 1 ml SPG aufgenommen und eingefroren.

### 3.1.2.8 Titration von Chlamydien suspensionen

Chlamydien suspensionen werden titriert, um ihre Infektiosität und die Menge an einschussbildenden Einheiten pro Milliliter zu ermitteln.

- Eine Chlamydien suspension wird 1:10 bis zur Verdünnungsstufe  $10^{-10}$  schrittweise mit Medium verdünnt.
- Eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen, in die zwei Tage zuvor Zellen (HEp-2) ausgesät wurden, wird bereitgestellt. Der Zellrasen muss dazu konfluent sein.
- Das Medium wird vorsichtig aus den Vertiefungen abgesaugt.
- Die Chlamydien suspension (100 µl) wird in die Vertiefungen pipettiert; dabei werden mit jeder Verdünnungsstufe 4 Vertiefungen inokuliert.
- Die Platte wird für 60 min bei 30 °C und 1560 x g (3000 Upm / Rotanta 460R) zentrifugiert.
- Danach folgt eine Adsorptionsphase von 60 min im Brutschrank bei 37 °C und 6 Vol. % CO<sub>2</sub>.
- Nachdem das Inokulum abgesaugt wurde, werden die Vertiefungen mit 200 µl frischem Chlamydienkulturmedium beschickt (siehe Abschnitt 3.3.1.).

- Nach 2 Tagen wird die Platte ausgeklopft und die Zellen mit 100 µl Methanol je Vertiefung für mind. 10 min fixiert.
- Danach werden die infizierten Zellen gefärbt, mittels eines gattungsspezifischen FITC-markierten Antikörpers, der gegen das chlamydiale LPS gerichtet ist (siehe Abschnitt 3.3.11.2.).
- Die Einschlüsse je Vertiefung werden gezählt und die Zahl der Einschluss-bildenden Partikel/ml in der Ausgangssuspension errechnet.

#### 3.1.2.9 Test von Zellkultur- und Chlamydienkultur auf Kontaminationen durch *Mycoplasma sp.*

Mycoplasmen stellen häufige Kontaminationen der Zellkultur dar. Vor allem *Mycoplasma arginini* und *Mycoplasma hominis* treten meistens als Kontaminanten auf. Zum Nachweis wird eine mycoplasmenspezifische PCR eingesetzt (Ossewaarde, de Vries et al. 1996). Als Zielsequenz dient das 16 S rRNA Gen. Die Analyse der Zellkultur sollte in regelmäßigen Abständen, mind. einmal pro Monat, durchgeführt werden.

Die PCR wird mit der TrueStart Taq Polymerase von Fermentas durchgeführt.

#### Probenherstellung

- 100 µl Überstand von infizierten oder nicht infizierten Zellen werden in ein Reaktionsgefäß überführt.
- Die Probe wird für 10 Min bei 100°C erhitzt.
- Die Probe kann weggefroren werden (-20 °C).
- Als Matrizen-DNA werden 5 µl je 50 µl PCR-Ansatz verwendet.

#### PCR-Bedingungen

##### Ansatz:

Oligonukleotid GPO 3	[50 pmol]
Oligonukleotid MGSO	[50 pmol]
10 µl MgCl <sub>2</sub>	[2,5 mM]
10 µl dNTP+dUTP	[200 µM]
10 µl PCR-Puffer	
0,3 µl Taq	[2 U]
5 µl Matrizen-DNA	
auf 50 µl mit deion. Wasser auffüllen.	

##### Programm:

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

#### Analyse

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

### 3.1.2.10 Immunologischer Nachweis von Chlamydien mittels Fluoreszenzmikroskopie

#### Fixierung von *C. pneumoniae* infizierten eukaryotischen Zellen

Es gibt verschiedene Verfahren, um Zellen zur immunologischen Analyse zu fixieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die im Folgenden beschriebenen Fixierungen mittels Methanol oder durch 3,7 % Formaldehyd in PBS angewandt.

Fixierung durch Methanol

- Das Zellkulturmedium wird vorsichtig abgezogen und verworfen.
- Die Zellen werden mit PBS oder HBSS gewaschen.
- Die Zellen werden mit Methanol überschichtet und für 10-20 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Das Methanol wird abgesaugt und die Zellen werden mit PBS überschichtet.
- Die fixierten Zellen können bei 4 °C mehrere Wochen gelagert werden.

Fixierung durch Formaldehyd

- Das Zellkulturmedium wird vorsichtig abgezogen und verworfen.
- Die Zellen werden mit PBS oder HBSS gewaschen.
- 30 %para-Formaldehyd (gelagert bei -20°C) wird mit PBS auf 3 % Formaldehyd verdünnt.
- Die Zellen werden mit 3 % Formaldehyd in PBS überschichtet und für 10-20 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Die Formaldehyd-Lösung wird abgesaugt und die Zellen werden mit PBS überschichtet.
- Die fixierten Zellen können bei 4 °C eine Woche gelagert werden.

Die Zellen müssen vor der Färbung mit Antikörpern permeabilisiert werden. Hierzu werden sie entweder dreimal mit 0,1 % TritonX-100 in PBS gewaschen oder unter der ständigen Anwesenheit von 0,05% Saponin gefärbt. Die Chlamydien werden durch diese Behandlung nicht permeabilisiert.

#### Direkte Immunfluoreszenz

Dieser Nachweis identifiziert chlamydienspezifische Lipopolysaccharid-Komponenten mit einem FITC-konjugierten, monoklonalen Antikörper.

- Die fixierten Zellen werden dreimal mit 1 ml PBS gewaschen.
- Es werden 20 µl Antikörper (genusspezifischer FITC-konjugierter *Chlamydia* spezifischer Antikörper 1:4 in PBS verdünnt) auf dem Plättchen verteilt.
- Das Plättchen wird für 30 min in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert.
- Auf einen Objektträger wird ein Tropfen Vectashield aufgesetzt.
- Das Plättchen wird in der 24 Well-Platte zweimal 5 min mit PBS gespült, anschließend entnommen und getrocknet.
- Dann wird das Glasplättchen mit dem Zellrasen nach unten auf den Tropfen Vectashield gelegt.
- Zur längeren Lagerung und Verhinderung eines Verrutschens wird der Rand des Plättchens mit Nagellack abgedichtet.
- Mittels des Fluoreszenzmikroskops können die Chlamydien in den Zellen als grüne Einschlüsse nachgewiesen werden.

Die Lagerung der Proben ist für 2-3 Wochen bei 4 °C im Dunkel möglich.

### **Indirekter immunologischer Nachweis von Chlamydien in der Zellkultur**

Der indirekte immunologische Nachweis von chlamydialen Einschlüssen erfolgt über die Verwendung von *Chlamydia* spezifischen Primär-Antikörpern in Kombination mit Fluoreszenz-konjugierten Sekundär-Antikörpern.

Alle indirekten Immunfluoreszenzfärbungen wurden nach diesem Protokoll, unter Verwendung verschiedener Primär und Sekundär-Antikörper, durchgeführt.

- Die infizierten Zellen aus einer 24-Well-Patte werden fixiert und gewaschen.
- Ein Primär-Antikörper wird mit PBS verdünnt (siehe Tabelle 3.) und 30 µl dieser Verdünnung werden auf das Glasplättchen gegeben.
- Inkubation für 30-60 min bei RT oder 37 °C.
- Das Plättchen wird dreimal 5 min mit PBS unter leichtem Schwenken gewaschen.
- 30 µl eines fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörper (verdünnt nach Herstellerangaben mit PBS) werden auf das Glasplättchen getropft.
- Die Inkubation erfolgt für 30-60 min bei RT.
- Es folgt dreimaliges Waschen mit PBS für 5 Minuten bei leichtem Schütteln.
- Die Zellen werden mit 1 µg DAPI/ml in PBS für 5 min gefärbt.
- Es folgt dreimaliges Waschen mit PBS für 5 Minuten bei leichtem Schütteln.
- Das Präparat wird getrocknet und wie für die direkte Immunfluoreszenz weiter behandelt.

#### **3.1.2.11 Gewinnung von chlamydialer DNA für PCR-Reaktionen**

Genomische chlamydiale DNA wurde unter Verwendung der Genomic Kit G20 von Qiagen aus Gradienten-gereinigten Chlamydien isoliert. Die Aufreinigung der DNA erfolgte nach Herstellerangaben und wurde von Frau Dr. Anne Kerrres durchgeführt.

#### **3.1.2.12 Bestimmung der Inklusionsgröße**

Die Größe der Inklusionen kann mikroskopisch bestimmt werden. In der Annahme, dass die durchschnittliche Zellkerngröße bei 10 µm Durchmesser liegt, wurde der Durchmesser von 20 Zellkernen in Pixeln gemessen und die Werte gemittelt. Dieser gemittelte Wert wurde dann mit 10 µm gleichgesetzt. Anschließend wurde der Durchmesser von 25 Inklusionen (im Fall von Triacsin C) bis 160 Inklusionen mikroskopisch bestimmt. Von den erhaltenen Werten wurde der Median gebildet, um die Auswirkung von „Ausreißern“ zu minimieren.

### **3.1.3 Kultivierung und Manipulation von *Saccharomyces cerevisiae***

Die verwendeten Hefestämme werden in Fest- und Flüssigmedien bei 30 °C kultiviert. Die verwendeten Medien sind wie unter 2.12.3. beschrieben zusammengesetzt.

#### **3.1.3.1 Durchführung des Screenings zur Identifizierung potentieller Effektorproteine**

Für die Suche nach potentiellen neuen Effektorproteinen von *C. pneumoniae* wurde eine Shotgun-Bibliothek bei der Firma GATC in Auftrag gegeben. Hierzu wurde chlamydiale DNA des GiD-Isolats

von Herrn Dr. Zrieq aufgereinigt und zusammen mit dem von ihm generierten Vektor pRZ7 an die Firma GATC gesandt.

Das chlamydiale Genom wurde dann in Fragmente von durchschnittlich 800 bp geschnitten und „blunt end“ in den Vektor pRZ7 ligiert. Im Vektor pRZ7 (2 $\mu$ -high copy-Vektor, *URA3*-Selektionsmarker) befinden sich die Inserts unter der Kontrolle des *tetO*-Promotors, so dass durch Zugabe von Doxzyklin ins Medium die Expression abgeschaltet werden kann. Der verwendete Hefestamm ist YUG37, der den Transaktivatorbereich genomisch integriert besitzt.

Eine PCR-Überprüfung der fertigen Bank ergab einen Leervektoranteil von 15%.

#### **Berechnung der benötigten DNA-Menge**

Für das Screening wurde eine mindestens 20fache genomische Abdeckung festgelegt. Dies bedeutet, dass mindestens 207 000 Transformanten durchgemustert werden sollten. Dieser Zahl liegt folgende Rechnung zugrunde:

Genomgröße *Chlamydia pneumoniae* = 1,2 Mbp

Insertgröße Bank = 800 bp

1.200.000 bp / 800 bp = 1500 → einfache Abdeckung

1500 x 20 = 30 000 → 20 fache Abdeckung

30 000 x 6 (aufgrund der möglichen unterschiedlichen Leseraster) = 180 000 Transformanten

Leervektoranteil = 15%

d.h. 180 000 + 27 000 = 207 000 zu untersuchende Transformanten

Bei einer zuvor bestimmten Transformationseffizienz von  $2 \times 10^5$  Transformanten pro  $\mu\text{g}$  Bank-DNA ergibt sich eine benötigte DNA-Menge von 1,1  $\mu\text{g}$ .

#### **Durchführung**

Nach der Transformation wurde der Transformationsansatz in insgesamt 10 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert und komplett in Portionen zu je 100  $\mu\text{l}$  auf jeweils eine große Platte (150 mm Durchmesser) mit nicht-induzierendem Selektivmedium (SD –Ura + 1  $\mu\text{g}$  / ml Doxzyklin) ausplattiert. Die insgesamt 100 Platten wurden für 28 Std bei 30 °C inkubiert und dann mit sterilen Samttüchern replika-plattiert.

Dabei wurde jede ursprüngliche Transformationsplatte insgesamt zweimal replika-plattiert. Einmal auf nicht-induzierendes (Masterplatte) und einmal auf induzierendes Selektivmedium (SD –Ura + 2,08  $\mu\text{g}$  /ml Phloxin B). Phloxin B wurde dem Medium zugesetzt, um die Selektion auf Kolonien mit erhöhter Letalität zu erleichtern, da dieser Farbstoff in Zellen mit Verlust der Plasmamembranintegrität akkumuliert. Kolonien mit einem erhöhten Anteil toter oder geschädigter Zellen zeigen im Gegensatz zu den weißlichen wildtypisch wachsenden Kolonien eine rosa Färbung.

Die Repliken wurden für weitere 48 Stunden bei 30 °C inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Platten mit dem induzierenden Medium noch ein weiteres Mal replika-plattiert.

Die Platten wurden anschließend miteinander verglichen. Kolonien, die im Vergleich zur Masterplatte eine deutliche Phloxin B-Färbung aufwiesen, wurden auf nicht-induzierendem Selektivmedium vereinzelt.

Die Platten mit den vereinzelt Kolonien wurden für 24 Stunden bei 30 °C inkubiert und anschließend neu auf induzierendem Medium ausgestrichen, wiederum für 24 Stunden bei 30 °C inkubiert und noch einmal neu auf induzierendem Medium ausgestrichen, um den letalen Phänotyp zu verifizieren.

Kolonien, die ein vermindertes Wachstum und / oder eine deutliche Phloxin B-Färbung aufwiesen, wurden weiter vereinzelt. Mit einer PCR auf die Hefezellen mit den Oligonukleotid-Primern 1690 und 1691, die vor und hinter dem Insertbereich binden, wurde überprüft, ob ein einzelnes Bankplasmid oder unterschiedliche Bankplasmide vorhanden waren. Zeigte die PCR mehrere Banden, wurden Einzelkolonie-Ausstriche vorgenommen und die Einzelkolonien zuerst wieder auf ihren Phänotyp hin analysiert und anschließend einer neuen PCR unterzogen.

#### **Verifikation und Isolation**

Von Kolonien mit nur einem Insert und letalem Phänotyp wurden Hefe-DNA-Minipräparationen angefertigt.

Die erhaltene DNA wurde dann zur Vervielfältigung in *E. coli* transformiert und isoliert. Die gewonnene DNA wurde dann zuerst wieder in den Hefestamm transformiert, um den letalen Phänotyp durch Ausstreichen auf induzierendem Selektivmedium zu verifizieren. Klone, die weiterhin ein vermindertes Wachstum zeigten, wurden anschließend sequenziert. Alle Sequenzierungen wurden von der Firma GATC (Konstanz) durchgeführt.

Durch einen Sequenzvergleich mit dem annotierten Genom des Referenz-Chlamydienstamms CWL029 wurde ermittelt, welcher Genabschnitt sich in dem Plasmid befand und überprüft, ob sich der Genabschnitt im Leseraster befand.

#### **3.1.3.2 Apoptose/Nekrose-Assay mit Hefezellen zur Überprüfung des induzierten letalen Phänotyps der isolierten Bankplasmide**

Bei dem Apoptose-Assay macht man sich die Reaktion von FITC-markiertem Annexin V mit Phosphatidylserin zu Nutze. Hefezellen weisen zu frühen Zeitpunkten der Apoptose eine noch intakte Plasmamembran auf, daher kann das nun auf der Oberfläche präsentierte Phosphatidylserin mit Annexin V-FITC angefärbt werden, während Propidiumiodid von diesen Zellen nicht aufgenommen wird. Nekrotische und spät-apoptotische Zellen zeigen einen Verlust der Plasmamembran-Integrität und nehmen Propidiumiodid und Annexin V auf, so dass die DNA dieser Zellen mit PI angefärbt werden kann und Annexin V das Phosphatidylserin auf der Innenseite der Plasmamembran (Nekrose) oder der Oberfläche (späte Apoptose) färbt. Nekrotische und spät-apoptotische Zellen sind also Propidiumiodid und Annexin V-FITC-positiv, früh-apoptotische Zellen zeigen nur ein Annexin V-FITC-Signal (Buttner, Ruli et al. 2011). Für die Annexin V-Färbung ist es nötig, die Zellwand enzymatisch zu spalten, um die Reaktion von Annexin V mit dem Phosphatidylserin auf der Oberfläche zu ermöglichen.

#### **Puffer und Lösungen:**

Puffer B (10x): 350 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6.8

Puffer B (1x) + 1,2 M Sorbitol

Inkubationspuffer: 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4

Glucuronidase / Arylsulfatase

Lyticase (1000 U/ml)

Annexin-V-Fluos

#### **Annexin Färbung:**

- 1,5 - 2 x 10<sup>7</sup> Zellen einer logarithmisch gewachsenen Kultur werden in ein Reaktionsgefäß überführt und für 1 min bei 10 000 Upm pelletiert.
- Die Zellen werden in 500 µl Puffer B + Sorbitol gewaschen und in 330 µl Puffer B + Sorbitol resuspendiert.
- Da es sich um junge Zellen handelt, werden 2,5 µl Lyticase und 15 µl Glucuronidase/Arylsulfatase hinzu pipettiert. (Bei Zellen, die älter als drei Tage sind, werden 5 µl Lyticase und 20 µl Glucuronidase / Arylsulfatase hinzugegeben)
- Wichtig: nach diesem Schritt sind die Zellen Spheroblasten, sie dürfen nicht mehr gevortext werden und sollten nur noch für maximal 15 sek bei 10 000 Upm zentrifugiert werden.
- Die Zellen werden für 1-1,5 Std bei 28°C schüttelnd inkubiert (145 Upm).
- Anschließend werden die Zellen in 500 µl Puffer B + Sorbitol gewaschen und in 30 µl Inkubationspuffer + 0,6 M Sorbitol resuspendiert.
- 3 µl Propidiumiodid (100 µg/ml in ddH<sub>2</sub>O) und 3 µl Annexin-V (Roche) werden zu den Zellen pipettiert.
- Die Proben werden für 20 min im Dunkeln bei RT inkubiert.
- Danach werden 500 µl Inkubationspuffer + 0,6 M Sorbitol hinzugegeben und die Zellen können im FACS analysiert werden.

#### 3.1.3.3 Induktion von Proteinen in Hefezellen

Zur Proteininduktion werden 5 ml Hefekulturen in Selektivmedium angesetzt und üN inkubiert. Die Kulturen werden dann wiederum in Selektivmedium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 - 0,4 überimpft und für weitere 4 Std bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 induziert.

#### Aufarbeitung von Proteinproben für SDS-Polyacrylamidgele

- Für Proteinextrakte aus Hefezellen wird eine OD<sub>600</sub> von 4 an Zellen geerntet und für 1 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert.
- Das Zellpellet wird in 1 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen und erneut für 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert.
- Das Pellet wird in 32,5 µl deion. Wasser resuspendiert.
- Es werden 12,5 µl Ladegelpuffer (4fach konzentriert) (50 mM Tris/HCL pH 6,9; 2 % SDS; 0,1 % Bromphenolblau; 5 % Glyzerin) zugegeben.
- Es werden 5 µl 1 M DTT zugegeben.
- Die Probe wird 30 min bei 100 °C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt.
- Die Probe wird mittels Westernblot analysiert.

#### 3.1.3.4 Mikroskopie von Hefezellen

Zur Proteininduktion werden 5 ml Hefekulturen in Selektivmedium angesetzt und üN inkubiert. Die Kulturen werden dann wiederum in Selektivmedium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 - 0,4 überimpft und für weitere 4 Std induziert.

#### Präparation und Fixierung der Hefezellen für die Mikroskopie

- 1 ml einer 5 ml Hefe-Induktionskultur wird in ein Reaktionsgefäß überführt, mit 1 µl DAPI (1mg/ml) versetzt und für 30 Min bei 30°C leicht schüttelnd inkubiert.

- Die Kultur wird für eine Minute bei 13.000 Upm zentrifugiert, einmal mit 500 µl PBS gewaschen und mit 200 µl frisch angesetztem para-Formaldehyd (3,7 %, aus 30 %iger Stocklösung (gelagert bei -20 °C) in PBS verdünnt) versetzt und für 15 min bei RT inkubiert.
- Die Zellen werden bei 13.000 Upm bei RT kurz abzentrifugiert.
- Das Pellet wird vorsichtig zweimal mit 1 ml PBS gewaschen.
- Das Zellpellet wird in 100 µl PBS resuspendiert.
- Die Zellsuspension wird auf ein mit Polylysin-beschichtetes Deckgläschen aufgebracht und trocknen gelassen, anschließend wird das Deckgläschen auf einen Objektträger mit 5 µl Vectashield gelegt und mit Nagellack fixiert.

#### 3.1.3.5 Serielle Verdünnungstropftests

Bei der Durchführung serieller Tropftests werden die zu untersuchenden Transformanten üN in induzierendem Selektivmedium angezogen, am Morgen in frisches Medium überimpft und für weitere 4 Std induziert. Bei Hefetransformanten mit sehr letalem Phänotyp wird auf das Überimpfen verzichtet. Es werden jeweils 10.000, 1.000, 100 und 10 Zellen zu untersuchender Hefetransformanten auf entsprechende feste Selektionsmedien getropft, für mindestens zwei Tage bei der gewünschten Temperatur inkubiert und anschließend auf ihr Wachstum hin untersucht.

#### 3.1.3.6 Hefe-Zwei-Hybrid Assay

Der Hefe-Zwei-Hybrid Assay dient der Identifizierung direkter Interaktionen zwischen zwei Proteinen *in vivo*. Grundlage des Systems ist der Transkriptionsfaktor Gal4p der Hefe *S. cerevisiae*. Dieser besteht aus zwei funktionellen Domänen, der DNA-Bindedomäne (BD), die an die GAL UAS (GAL Upstream-Aktivierungssequenz) bindet, und einer Aktivierungsdomäne (AD), die mit der basalen Transkriptionsmaschinerie interagiert und so die Transkription aktiviert. Zum Nachweis der Interaktionen zwischen zwei Proteinen wird ein zu testendes Gen mit der GAL4-DNA-Bindedomäne und das andere zu testende Gen mit der GAL4-Aktivator-domäne jeweils in einem Expressionsvektor fusioniert. Die beiden Expressionsvektoren (Vektor pEB2 mit der BD, Vektor pGADT7 mit der AD) werden anschließend in *S. cerevisiae* transformiert. Der Nachweis der Interaktion zwischen zwei Proteinen erfolgt mit Hilfe von Reporterproteinen. Bei einer bestehenden Interaktion zwischen den zu testenden Proteinen kommen die DNA-Bindedomäne und die Aktivierungsdomäne in räumliche Nähe und die Funktionalität des Gal4p Transkriptionsfaktors wird wieder hergestellt. Es kommt zu Transkription der Reportergene, welche in das Genom von *S. cerevisiae* integriert wurden. Als Reportergene wurden *ADE2*, *HIS3* und *MEL1* genutzt (Hefestamm: AH109).

Um mögliche neue Protein-Protein-Interaktionen zu identifizieren, können mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid Systems DNA-Bibliotheken analysiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei DNA-Bibliotheken verwendet: Zum einen wurde eine humane Testis-cDNA-Bibliothek der Firma Clontech verwendet, welche bereits in den Expressionsvektor pGADT7 an die GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert und in den *S. cerevisiae* Stamm Y187 vortransformiert ist. Zum anderen wurde eine genomische Shotgun-Bibliothek von *C. pneumoniae* bei der Firma LGC genomics in Auftrag gegeben, bei der die Fragmente ebenfalls in den Vektor pGADT7 ligiert wurden. Diese Bank-DNA muss vor der eigentlichen Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse noch in den Hefestamm Y187 transformiert werden (siehe unten).

Das zu testende Gen wird in den Expressionsvektor pEB2 an die *GAL4*-DNA-Bindedomäne fusioniert und in den Hefestamm AH109 transformiert. Die beiden Hefestämme AH109 und Y187 besitzen unterschiedliche Paarungstypen und können im Folgenden miteinander gepaart werden. Dadurch gelangen die beiden Expressionsvektoren zusammen in die resultierenden diploiden Hefezellen und bei Interaktion der Proteine können die Reportergene wie oben beschrieben aktiviert werden. Nach Selektion auf diploide Zellen kann mit entsprechenden Selektivmedien dann auf die Aktivität der Reportergene selektiert werden.

#### **Vortransformation der chlamydialen Shotgun-Bibliothek**

- Laut Herstellerangaben liegt der Leervektoranteil der chlamydialen Shotgun-Bibliothek bei unter 5 % und beinhaltet ca. 730 000 Primärklone.
- Die zuvor bestimmte Transformationseffizienz der Bank-DNA in den Hefestamm Y187 liegt bei  $2,6 \times 10^5$  Klonen /  $\mu\text{g}$ .
- Bei Transformation von 3  $\mu\text{g}$  DNA sind demnach  $7,8 \times 10^5$  Klone zu erwarten, was etwas mehr als der Zahl der Primärklone entspricht.
- Die durchschnittliche Insertgröße der Bibliothek liegt bei 800 bp, demnach entspricht eine einfache Genomabdeckung unter Berücksichtigung des Leervektoranteils ca. 9500 Klonen. Die 730 000 Primärklone entsprechen also einer 76 fachen Genomabdeckung.
- Der gesamte Transformationsansatz wurde auf 80 große SD -Leu Platten ausplattiert, dies entspricht ca. 10 000 Klonen pro Platte und erlaubt ein ausreichendes Wachstum jedes einzelnen Klons.
- Die Platten wurden für zwei Tage bei 30 °C inkubiert und die Hefetransformanten anschließend mit Hilfe eines Drigalskispatels und sterilem H<sub>2</sub>O von den Platten abgespült und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden in YPD mit 25 % Glycerin in einer Zelldichte von  $1 \times 10^9$  Zellen / ml aufgenommen, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

#### **Zugrunde liegende Rechnung :**

Genomgröße *Chlamydia pneumoniae* = 1,2 Mbp

Insertgröße Bank = 800 bp

$1\,200\,000 \text{ bp} / 800 \text{ bp} = 1500 \rightarrow$  einfache Abdeckung

$1500 \times 6 = 9\,000$  (aufgrund der möglichen unterschiedlichen Frames)

Leervektoranteil = 5%  $\rightarrow$  aufgerundet 9500 Klone entsprechen der einfachen Genomabdeckung.

Bei einer gewünschten 20 fachen Genomabdeckung müssen demnach fast 200 000 Klone getestet werden.

Die Paarungseffizienz wurde im Vorfeld bestimmt und lag bei 5 %.

Von der Bibliothek mussten also mindestens 4 Millionen Klone eingesetzt werden, um schließlich 200 000 diploide Klone zu erhalten.

#### **Hefe-Paarung und Ablauf des Hefe-Zwei-Hybrid Assays am Beispiel der humanen Testis-DNA-Bibliothek**

Die Hefe-Paarung stellt eine effizientere Alternative zur Ko-Transformation von Hefe-Zwei-Hybrid-Expressionsvektoren dar, bei der die beiden unterschiedlichen Vektoren simultan in einen Hefestamm transformiert werden. Für eine Paarung wird ein Hefestamm des Paarungstyps MATa (hier AH109) mit

dem Expressionsvektor transformiert, der das zu untersuchende Protein fusioniert an die GAL4-DNA-Bindedomäne enthält. Ein anderer Hefestamm des Paarungstyps MAT $\alpha$  (hier Y187) enthält die vortransformierte humane Testis-cDNA-Bibliothek, in der die humanen Gene an die GAL4-Aktivator-domäne fusioniert sind.

Die Paarung wird nach dem Protokoll der Firma Clontech für vortransformierte DNA-Bibliotheken durchgeführt.

Das Ausplattieren der gepaarten Hefen erfolgt zuerst aus Nährmedium mit einer geringen Stringenz (SD/-Trp/-Leu/-His mit X- $\alpha$ -Gal), um auch schwache Proteininteraktionen detektieren zu können. Beim wiederholten Ausstreichen von Kandidaten wird dann Medium mit hoher Stringenz (SD/-Trp/-Leu/-His/- Ade mit X- $\alpha$ -Gal) gewählt, um nur tatsächliche Kandidaten mit stabiler Interaktion der Proteine zu erhalten.

Aus diesen Kandidaten wird dann das Bankplasmid isoliert, welches über eine Ampicillin-Resistenz als *E. coli* Selektionsmarker verfügt, während der BD-Vektor eine Kanamycin-Resistenz als Selektionsmarker besitzt.

Die DNA wird dann in einer Kontrolltransformation zum einen mit dem Leervektor pEB2 auf Autoaktivierung getestet und zum anderen mit dem potentiellen Interaktionspartner, in diesem Fall Cpn0147 in pEB2, auf tatsächliche reproduzierbare Interaktion.

Falls keine Autoaktivierung auftritt und die Interaktion mit dem Kandidaten reproduzierbar ist, wird das genomische Insert sequenziert.

#### **Ablauf des Hefe-Zwei-Hybrid Screening mit der humanen cDNA-Bibliothek**

Hefezellen, die CPn0147 ohne Transmembranbereich fusioniert an die Gal4-Bindedomäne exprimierten (im Vektor pEB2), wurden mit Hefezellen, die die humane Testis-cDNA-Bank fusioniert an die Gal4-Aktivierungsdomäne exprimierten, gepaart und die resultierenden diploiden Zellen wurden auf Selektivmedium ausplattiert.

Insgesamt wurden ca. 25,2 Millionen Klone der humanen cDNA-Bibliothek durchgemustert, die Minimalvoraussetzung lag laut Herstellerangaben bei 1 Millionen Klonen, um eine ausreichende Abdeckung zu erreichen. Die Paarungs-Effizienz lag mit 18,75 % auch deutlich über der Mindestanforderung von 2 % Paarungseffizienz.

Dieser Screen wurde mit Selektivplatten mit niedriger Stringenz durchgeführt, das bedeutet, die Interaktion zeigte sich durch Wachstum und Blaufärbung auf den niedrig-stringenten SD-Platten (SD-Trp/Leu/His +X- $\alpha$ -Gal).

Von den theoretisch 25,2 Millionen diploiden Klonen, die auf die Selektivplatten ausplattiert wurden, hatten nach drei Tagen Inkubation 867 Klone Kolonien gebildet, die eine blaue Färbung aufwiesen. Nach weiteren 2 Tagen Inkubation konnten noch einmal 286 Kolonien vereinzelt werden. Diese insgesamt 1153 Klone wurden auf Medium mit hoher Stringenz plattiert, bei dem auch auf das dritte Reporterprotein, Ade2p, selektiert wurde. Hier zeigte sich, dass die Interaktion bei vielen Klonen nicht stabil war, es konnten nur 248 Klone auf dem hochstringenten Medium wachsen. Von diesen Klonen zeigten 103 eine sehr starke Blaufärbung schon nach 16 stündiger Inkubation vergleichbar mit der Positivkontrolle, die restlichen 145 wurden erst nach 30 stündiger Inkubation blau. Die Klone wurden weitere Male vereinzelt, um falsch positive und Mischkolonien zu eliminieren.

Letztendlich wurde so die Zahl der Kandidaten auf 114 eingegrenzt, wobei von den 103 Klonen, die schon zu Beginn starke Interaktion zeigten, keine aussortiert wurde. Nur von den Kolonien, die erst spät eine Blaufärbung zeigten, wurden viele als falsch positiv aussortiert. Die Klone wurden in einer Hefe-Kolonie-PCR analysiert, die Plasmide isoliert und gezielt zusammen mit dem Köder CPn0147 in den Hefestamm AH109 transformiert. Zur Kontrolle wurde auch der leere Vektor pEB2, der die Bindedomäne enthält, zusammen mit den Kandidaten in AH109 transformiert. Jeweils 2 Kolonien wurden dann auf Medium mit hoher Stringenz vereinzelt, um die Interaktion zu verifizieren.

#### **Ablauf des Hefe-Zwei-Hybrid Screenings mit der chlamydialen Shotgun-Bibliothek**

Die Hefen mit der vortransformierten DNA-Bibliothek wurden mit dem Hefestamm AH109, der den Köder CPn0147 ohne Transmembranbereich (im Vektor pEB2) enthielt, gepaart. Es ergab sich eine Paarungseffizienz von 23,6 % und insgesamt wurden mehr als 76 Millionen Klone durchgemustert. Von diesen Klonen wuchsen insgesamt ca. 4000 Klone auf den hochstringenten Platten. Insgesamt wurden im ersten Schritt 1000 Klone von den ersten 20 der insgesamt 80 Platten vereinzelt.

Von diesen 1000 Klonen wurden die ersten 100 zuerst weiter analysiert. Diese 100 Klone entsprachen ungefähr 1,2 Millionen durchgemusterten Klonen und damit immer noch einer mehr als hundertfachen genomischen Abdeckung. Die Klone wurden vereinzelt und zwei Mal neu auf Medium mit hoher Stringenz ausgestrichen, um falsch positive auszusortieren. Insgesamt zeigten nur 3 Kolonien nach dem Vereinzeln kein Wachstum mehr.

Die restlichen Kolonien wurden mit vektorspezifischen Oligonukleotid-Primern in einer Hefe-Kolonie-PCR analysiert. Dies sollte eigentlich zur Überprüfung der Größe des inserierten Genomabschnitts dienen und um zu kontrollieren, dass die analysierte Kolonie nur ein einziges Plasmid trägt. Bei 79 von 97 überprüften Kolonien gab es aber überhaupt kein PCR-Produkt. Weder eine Leervektorbande noch eine größere Insert-Bande war zu sehen. Lediglich bei 10 Klonen konnte eine Insertbande amplifiziert werden, 8 Klone zeigten eine Bande von ca. 200 bp und entsprachen damit wahrscheinlich dem leeren Vektor. Da manchmal größere Fragmente in der Hefe-Kolonie-PCR schwer zu amplifizieren sind, wurde die PCR mehrmals unter modifizierten Bedingungen wiederholt. Trotzdem zeigten immer nur die wenigen zuvor schon in der PCR positiven Kandidaten PCR-Produkte. Die DNA wurde deshalb isoliert und eine Restriktionsanalyse sollte zeigen, wie groß die inserierten Bankfragmente sind. Hier zeigte sich allerdings, dass der isolierte Vektor aus diesen Kandidaten nicht mit dem Leervektor pGADT7 übereinstimmte. Es handelte sich um ein Plasmid, das wesentlich größer war und über andere Schnittstellen verfügte. Eines der isolierten Plasmide wurde deshalb testweise mit beiden Oligonukleotidprimern sequenziert. Nur mit dem 3'5'-Primer ergab sich eine lesbare Sequenz. Es handelte sich bei dieser ersten Sequenz um einen Bereich, der große Ähnlichkeit mit einem entsprechenden Abschnitt in pGADT7 hatte, allerdings fehlte die direkt hinter der Gensequenz der Aktivierungsdomäne liegende Sequenz, an die der der 5'-3'-gerichtete Primer eigentlich binden sollte. Um herauszufinden, um was für einen Vektor es sich handelte, wurde der Vektor weiter sequenziert. Es stellte sich heraus, dass die gesamte *GAL4*-Sequenz, also auch der Bereich, der für die Bindedomäne codiert, auf dem Vektor zu finden war. Ein Sequenzvergleich zeigte, dass es sich um ein Kontrollplasmid des Matchmaker-Systems von Clontech handelte. Dieser Vektor, pCL1, wurde zuvor jedoch nicht verwendet und es bleibt rätselhaft, wie dieser Vektor in die Bank gelangen konnte.

Eine PCR-Überprüfung der Bank-DNA zeigte, dass der pCL1-Vektor in der ursprünglichen DNA schon vorhanden ist, mit der der Hefestamm für die hier durchgeführte Analyse transformiert wurde.

Um die Bank dennoch verwenden zu können, wurde versucht, das Plasmid pCL1 vor der Transformation enzymatisch zu schneiden. Hierzu sollte ein Enzym verwendet werden, das nur pCL1, nicht aber den Vektor pGADT7 mit der genomischen Bank schneidet. Das Enzym *Sma*I schien ein geeigneter Kandidat zu sein, da pCL1 eine Schnittstelle besitzt und somit linearisiert werden konnte und pGADT7 nur dann geschnitten würde, wenn kein genomisches Insert vorhanden wäre. Die Bank wurde nämlich durch Insertion an der *Sma*I-Schnittstelle hergestellt. Auf diese Weise sollte auch der relativ hohe Leervektorgehalt minimiert werden. Bei einer Test-Sequenzierung von insgesamt 16 zufälligen Klonen besaßen nur insgesamt 8 Klone ein chlamydiales Insert. Eine Test-PCR auf weitere 40 Klone zeigte ebenfalls einen Leervektoranteil von ca. 50 %. Laut Herstellerangabe sollte der Leervektoranteil bei unter 5 % liegen. Das Genom von *C. pneumoniae* besitzt allerdings auch insgesamt 52 *Sma*I-Schnittstellen. Bank-Plasmide, die Fragmente mit diesen Abschnitten enthielten, würden also auch linearisiert und die Bank auf diese Weise abgereichert.

Die Bank-DNA wurde insgesamt zwei Mal mit *Sma*I inkubiert und zwischen den beiden Inkubationsschritten gefällt. Dann wurde 1 µg der DNA zur Kontrolle mit dem Leervektor pEB2 in den Hefestamm AH109 transformiert. Als Vergleich wurde die DNA auch zusammen mit CPn0147 in pEB2 in AH109 transformiert. Die Transformanten wurden dann auf Selektivmedium mit hoher Stringenz plattiert. Leider zeigten beide Kontrollen in etwa gleich viele blaue Kolonien nach 3 Tagen Inkubation bei 30 °C. Außerdem waren sehr viele Kolonien hochgewachsen, was auf viele autoaktivierende Proteine schließen ließ.

#### 3.1.3.7 Latrunculin B Assay

Mit Hilfe des Latrunculin B Assays kann der Einfluss von Proteinen auf das Aktin-Zytoskelett der Hefe untersucht werden. Latrunculin B ist ein marines Toxin und bindet Aktin-Monomere, so dass die Polymerisation von Aktin-Filamenten gestört wird. Latrunculine haben hingegen keinen Einfluss auf die Mikrotubuli.

- Eine Hefe-üN-Induktionskultur wird morgens in frisches Medium überimpft und für weitere 4 Std induziert
- Die OD<sub>600</sub> der Kultur wird bestimmt und die Zellen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 verdünnt.
- 2 ml dieser Kultur werden mit 2 ml 0,8 % steriler Agarlösung gemischt und auf induzierende Selektivmedienplatten gegossen, so dass die Platte mit der Agar-Zellsuspension dünn überschichtet wird.
- Nach dem Erkalten werden 2 sterile Filterpapierplättchen mit mindestens 2 cm Abstand zueinander und zum Rand auf die erkaltete Agarschicht gelegt.
- Auf den einen Filter werden 12 µl einer 2 mM Latrunculin B-Lösung in DMSO getropft, auf den anderen Filter werden als Kontrolle 12 µl DMSO getropft.
- Die Platten 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert und anschließend werden die entstandenen Halos um die Filterplättchen vermessen.

### 3.1.4 Kultivierung und Manipulation von *Escherichia coli*

Die verwendeten *E. coli* Stämme werden in LB-Medium in aeroben Schüttelkulturen bei 140 Upm und 37 °C kultiviert. Zur Selektion von Plasmid-Transformanten werden dem Medium je nach Plasmid-Marker zusätzlich 50 µg/ ml Ampicillin oder 15 µg/ ml Kanamycin zu gegeben.

#### 3.1.4.1 Herstellung elektrokompetenter XL<sub>1</sub>-blue Zellen

XL<sub>1</sub>-blue Zellen werden aus der Stammsammlung auf einer LB-Platte mit Tetracyclin (30 µl/ Platte) ausgestrichen und üN bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden einzelne Kolonien gepickt und davon zwei 5 ml üN-Kulturen angesetzt. Die beiden 5 ml üN Kulturen werden jeweils in 1 l LB-Medium überimpft und bei 37 °C und 140 Upm schüttelnd inkubiert bis eine OD<sub>600</sub> von 0,7 - 0,8 erreicht ist. Die 1 Liter-Kulturen werden 30 min auf Eis abgekühlt und 15 min bei 4.000 Upm (Beckmann J2-21) und 4 °C pelletiert. Das Pellet jeder Kultur wird zweimal mit 1000 ml eiskaltem, sterilem ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Pellets werden anschließend in je 20 ml eiskaltem, sterilem 10 %igem Glycerin resuspendiert und erneut 15 min bei 4.000 Upm und 4 °C abzentrifugiert. Die Zellen werden dann in je 2 – 3 ml 10 %igem Glycerin resuspendiert, aliquotiert und 1 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die elektrokompetenten Zellen werden bis Gebrauch bei -80 °C gelagert.

#### 3.1.4.2 Transformation in *E. coli*

##### Ein-Minuten Transformation

Um Plasmid-DNA in *E. coli* zu transformieren, werden schnelle, aber wenig effiziente Ein-Minuten Transformationen durchgeführt. Diese sind aufgrund der niedrigen Effizienz nur für die Transformation von höher konzentrierter Plasmid-DNA geeignet und bei Kanamycin als Plasmid-Marker nicht effizient genug, um Kolonien zu erhalten

Es werden 7 µl DMSO kompetente Zellen (XL<sub>1</sub> oder BL21; hergestellt von der Arbeitsgruppe der Funktionellen Genomforschung wie beschrieben von Sambrook und Maniatis (Sambrook, Fritsch et al. 1989)) auf Eis aufgetaut. Die Zellen werden mit ca. 100 ng DNA auf Eis gemischt. Anschließend wird der Ansatz für 1 min bei 42 °C erhitzt. Die Probe wird dann sofort in 100 µl LB aufgenommen und auf einer LB-Platte mit dem Ampicillin zur Selektion des Plasmids ausplattiert.

Die Platten werden üN bei 37 °C inkubiert, die Kolonien können am nächsten Tag vereinzelt werden.

##### Transformation durch Elektroporation

Um weniger hochkonzentrierte Plasmid-DNA, zum Beispiel einer Gesamt-DNA-Isolation aus Hefe zu transformieren, wird eine Transformation von *E. coli* durch Elektroporation nach einem abgewandelten, hoch effizienten Protokoll (Sambrook, Fritsch et al. 1989) durchgeführt. Auch Transformationen mit Plasmiden, die den Kanamycin-Selektionsmarker tragen, werden nach diesem Protokoll transformiert.

Für die Elektroporation werden 10 µl elektrokompetente Zellen je Transformationsansatz auf Eis aufgetaut. Sterile Elektroporationsküvetten werden auf Eis vorgekühlt. 2-10 µl kalte und möglichst salzfreie DNA (0,01 ng – 1 µg) werden in 40 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und mit den Zellen auf Eis gemischt. Das Zell/DNA-Gemisch wird in die eiskalten Küvetten pipettiert. Die Küvette wird an den

Metallkontakten gut getrocknet und die Elektroporation unter folgenden Geräteparametern durchgeführt: Spannung: 2,1 kV, 200  $\Omega$ , 25  $\mu$ F (Bio-Rad Gene Pulser und Bio-Rad Pulse Controller). Anschließend wird sofort 1 ml LB-Medium zugeben und der ganze Ansatz in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und 30 min bis 1 Std bei 37 °C unter rotierendem Schütteln bei 140 Upm inkubiert.

Die Zellen werden dann 5 sek bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge pico) pelletiert und der Überstand abgekippt. Im verbleibenden Volumen wird das Pellet resuspendiert und auf LB-Platten mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum ausplattiert.

Die Platten werden üN bei 37 °C inkubiert.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Kulturen

Das Verfahren beruht auf einer von der Firma Qiagen modifizierten Methode der alkalisch Lyse nach Maniatis (Sambrook, Maniatis et al. 1989).

#### 3.2.1.1 Plasmid-Midipräparation

Zur Isolation von sauberer Plasmid DNA in hohen Mengen wird eine 50 ml üN *E. coli* Kultur mit dem Qiagen Plasmid Midi-Kit gereinigt.

Für Transfektionen wurde eine 50 ml üN *E. coli* Kultur mit dem PureLink™ Kit von Invitrogen aufgereinigt, um die Menge an Endotoxinen in der isolierten DNA möglichst gering zu halten.

#### 3.2.1.2 Plasmid-Minipräparation

Bei der Plasmid-Minipräparation wird Plasmid-DNA aus einer 2 ml üN Kultur gewonnen. Die Zusammensetzung der Puffer entspricht denen des Qiagen Plasmid Midi Kits.

Eine üN *E. coli* Kultur wird in 2 ml LB-Flüssigmedium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum bei 37 °C angezogen. Die Kulturen werden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 300  $\mu$ l Puffer P1 mit RNase A (100  $\mu$ g/ ml) resuspendiert. Anschließend werden 300  $\mu$ l Puffer P2 zugegeben und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Der Ansatz wird für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden 300  $\mu$ l Puffer P3 hinzugegeben und durch kurzes, kräftiges Schütteln gemischt. Den Ansatz anschließend für 10 min bei Raumtemperatur und 13.000 Upm abzentrifugieren. Der Überstand wird in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und das Zellbruchpellet verworfen. Durch Zugabe des 0,5fachen Volumens Isopropanol zum Überstand und 20 minütiger Zentrifugation bei 13.000 Upm wird die Plasmid-DNA pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das DNA-Pellet mit 200  $\mu$ l 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wird der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet.

Die so gewonnene Plasmid-DNA wird in 50 – 100  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

### 3.2.2 DNA-Mengenbestimmung durch photometrische Messung

- 2  $\mu$ l der DNA-Lösung wird unverdünnt im Nanodrop gemessen.
- Der Abgleich erfolgt gegen 2  $\mu$ l deion. H<sub>2</sub>O.

- Das Absorptionsergebnis bei 260 nm ist die Menge DNA in  $\mu\text{g}$  pro  $\mu\text{l}$  in der Ausgangslösung. Die Reinheit der DNA-Lösung kann durch Messung des Quotienten zwischen der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt werden. Dieser Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### 3.2.3 Analytische Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die Spaltungen der DNA mit den jeweiligen Enzymen erfolgt im Regelfall in dem vom Hersteller mitgelieferten Spezialpuffer unter den angegebenen Reaktionsbedingungen. Zur Überprüfung der Spaltung wird der gesamte (bei Restriktionsanalysen zur Überprüfung eines Plasmids) bis ein Zehntel des Reaktionsansatzes (bei Spaltung von Plasmiden zur anschließenden Homologen Rekombination und bei DNA-Mengen über 500 ng) auf einem 0,7 %igen Agarosegel aufgetrennt.

### 3.2.4 Auftrennung von DNA-Molekülen durch Gelelektrophorese in Agarosegelen

Zur Analse von DNA wird die jeweilige Probe mit Ladungspuffer (10X) gemischt, auf ein 0,7-1,0 %iges Agarosegel aufgetragen und bei 80-140 V elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Zugabe von Ethidiumbromid wird die DNA unter UV-Licht sichtbar.

Zur Längenbestimmung der einzelnen DNA-Fragmente wird auf jedes Gel als Längenmarker der O'GeneRuler von Fermentas aufgetragen (100-10 000 bp).

#### 3.2.4.1 Gelelektrophoresepuffer

Als Laufpuffer bei der Gelelektrophorese mit Flachbettgelen wurde stets 1 x TBE verwendet.

1 x TBE	89 mM Tris/HCL	
	89 mM Borsäure	
	2 mM EDTA	
6 x-Ladungspuffer	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylen Cyanol
	30 %	Glyzerin

### 3.2.5 DNA-Fällung

- Die DNA-haltige Lösung (100  $\mu\text{l}$ ) wird in ein Reaktionsgefäß pipettiert.
- Zu der Lösung werden 10  $\mu\text{l}$  NaAc (3M, entspricht 1/10 des Volumens der DNA-Lösung) pipettiert, und mit der dreifachen Menge Ethanol (96 %) aufgefüllt.
- Die Probe wird gevortext und für 30 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert.
- Der Überstand wird möglichst vollständig entnommen und verworfen.
- Das Präzipitat wird mit 1ml eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen.
- Das Reaktionsgefäß wird 10 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert und der Überstand verworfen.
- Die DNA wird 10 min im Vakuum-Konzentrator getrocknet und in mindestens 20  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 3.2.6. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Methode ist kommerziell von der Firma Qiagen als „Qiaex II-Gel Extraction Kit“ erhältlich. DNA-Fragmente können nach der Gelelektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert werden. Dabei wird der Agaroseblock gelöst, die DNA zuerst an ein Trägermaterial gebunden, mehrmals gewaschen und schließlich in einem bestimmten Puffervolumen eluiert.

### 3.2.7. Berechnung der optimalen Annealing Temperatur von Oligonukleotiden

Als Annealing Temperatur wird die Temperatur bezeichnet, bei der sich die einzelsträngigen Oligonukleotid-Moleküle an das denaturierte (einzelssträngige) Matrizenmolekül anlagern.

- a = Die Anzahl an Guanin-Basen und Cytosin-Basen innerhalb einer Oligonukleotidsequenz.
- b = Die Anzahl aller Adenin-Basen und Thymin-Basen innerhalb derselben Oligonukleotidsequenz.
- Die optimale Annealing Temperatur °C =  $3 \times a + 2 \times b$

### 3.2.8. PCR-Reaktion (Polymerase Chain Reaction)

#### 3.2.8.1 Bedingungen der PCR-Reaktion

Die Bedingungen der einzelnen Schritte bei der PCR-Reaktion sind entscheidend für die Effizienz der Reaktion. Um die Genauigkeit bei der Amplifikation eines Gens z.B. für Klonierungszwecke zu erhöhen, wird eine Polymerase mit „proof-reading“ Aktivität (Pfx-Polymerase, Invitrogen) verwendet. Für alle anderen PCR-Reaktionen die kein „proof-reading“ erfordern wird die Taq-Polymerase eingesetzt. Für die PCR-Reaktion mit der Pfx-Polymerase wird eine Elongationstemperatur von 68°C benötigt, für die PCR-Reaktion mit der Taq-Polymerase hingegen sind 72°C erforderlich.

	Temperatur	Zeit
1. Erste Denaturierung	95°C	5 min
2. Denaturierung	95°C	1 min
3. Annealing	45-55°C	max. 1 min
4. Elongation	68°C / 72°C	1-4 min
5. finale Elongation	68°C / 72°C	7 min
Zyklen (von 2-4)	35-40	

Tabelle 8: PCR-Programm

#### 3.2.8.2 Ansetzen einer PCR-Reaktion

Das Reaktionsvolumen beträgt in der Regel 50 µl.

- 1 µl Matrizen DNA (10-100 ng)
- 37,5 - 50 pmol pro Oligonukleotid
- 300 µM dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- MgCl<sub>2</sub> zur Endkonzentration von 2,5 mM
- 1x Reaktionspuffer

- 1-2 U Polymerase
- auffüllen auf 50 µl mit deion. Wasser.

Die Reaktion wird im Thermocycler durchgeführt.

Die Effizienz der PCR-Reaktion wird durch Auftragen von 10 µl der Reaktion + 5 µl Blaumarker auf ein Agarosegel und nachfolgender Gelelektrophorese überprüft.

#### **3.2.8.3 PCR auf Hefezellen**

Die PCR kann auch auf Hefe-Zellen durchgeführt werden. Hierfür werden als Template DNA ungefähr  $1 \times 10^5$  Zellen eines möglichst frisch ausgestrichenen Hefestammes mit einer Mikropipettenspitze abgenommen und dem PCR-Ansatz zugefügt. Eine längere Lagerung der Hefestämme bei 4°C erschwert die PCR. Die PCR-Reaktion wird wie folgend mit der Taq Polymerase durchgeführt:

Je 30µl Ansatz:

1x Puffer

15 pmol je Oligonukleotid

0,3 U Taq

200 µM dNTP's

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>

#### **3.2.9 Gesamt-DNA-Isolation aus *Saccharomyces cerevisiae***

Die Isolation der DNA erfolgt über Aufschluss der Hefezellen mittels Glasperlen und unter Verwendung des Prinzips der alkalischen Lyse beschrieben in „Methods in yeast genetics“ (Fink 1983).

#### **3.2.10 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae***

Um Plasmide und Integrationskassetten in Hefe zu transformieren, wurde ein hocheffizientes Transformationsprotokoll basierend auf der Lithiumacetat-Methode angewandt (Gietz, Schiestl et al. 1995).

#### **3.2.11 Integration von DNA-Fragmenten in Vektoren über homologe *in vivo* Rekombination**

Um ein gewünschtes DNA-Fragment in einen Expressionsvektor einzubringen, wird das DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert. Für die PCR werden zwei spezifische Oligonukleotide verwendet, die im 5'-Bereich jeweils 40 Nukleotide Homologie zum Ziel-Plasmid sowie im 3'-Bereich je 20 Nukleotide Homologie zum Zielgen besitzen.

Für die Integration in Expressionsvektoren wird das erhaltene PCR-Produkt zusammen mit dem zuvor linearisierten Ziel-Plasmid in die Hefe transformiert. In der Hefe wird infolge der homologen Bereiche das amplifizierte Gen über homologe Rekombination in das Plasmid integriert.

### 3.3 Biochemische Methoden

#### 3.3.1 Induktion der Genexpression in *E. coli*

Zur Expression von Fusionsproteinen unter der Kontrolle des *lac*-Promotors wird der *E. coli* Kultur bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 IPTG zugesetzt, so dass die Endkonzentration 1 mM im Medium entspricht. Die Induktion der Genexpression wird durch Aufarbeitung von Proteinproben und deren gelelektrophoretische Analyse auf einem SDS-Gel überwacht.

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

#### 3.3.2 Affinitätschromatografische Aufreinigung von Proteinen

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

##### 3.3.2.1 Reinigung von nativen GST-Fusionsproteinen

- 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 Std auf Eis. Bei schwer löslichen Proteinen wird zusätzlich 1 % Triton X-100 oder 1 % Sarkosyl hinzugegeben.
- Das Lysat wird in vorgekühlte Metallbecher überführt und 3 x 10 sek mit dem Ultraschallstab auf Eis sonifiziert wobei zwischen jedem Schritt Pausen von 30 sek zur Abkühlung des Lysates gemacht werden.
- Das Lysat wird 20 min bei 15 000 Upm (Avanti J-25) und 4 °C zentrifugiert.
- Der geklärte Überstand wird vor der affinitätschromatografische Reinigung mittels ÄKTA Prime Plus durch einen Filter mit 0.45 µm Porengröße sterilfiltriert.
- Es werden die ÄKTAprime™ Plus 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.

##### 3.3.2.2 Reinigung von denaturierten Proteinen

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

- Es wird eine Säule mit einem Durchmesser von etwa 1 cm verwendet, die unten durch eine Klemme verschlossen wird. Innen befindet sich ein Gazestopfen, der die Ni-NTA Agarose daran hindert, durchzulaufen.

- Das Zellpellet einer induzierten 1 l Kultur wird vorsichtig aufgetaut und in 5 ml pro Gramm Nassgewicht Puffer B (8 M Harnstoff; 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0) resuspendiert.
- Die Zellen werden 60 min geschüttelt (150 Upm, 20 °C) und auf diese Weise lysiert.
- Das Lysat wird 20 min bei 10000 x g (Avanti J-25) und 20 °C zentrifugiert.
- Der geklärte Überstand wird weiter verwendet.
- Es wird zu dem klaren Lysat (etwa 30 ml) 3 ml Ni-NTA Agarose zugegeben und 2 Std geschüttelt (150 Upm, 20 °C).
- Die leere Säule wird mit diesem Material durch Einschwemmen beladen. Die Durchflussrate sollte etwa 2 ml/min betragen.
- Die Säule wird anschließend mit 15 ml Puffer B (2 ml/min) gewaschen.
- Die Säule wird mit 15 ml Puffer C (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris/HCl, pH 6.3, 10-80 mM Imidazol) gewaschen.
- Das 6 x Histidin-markierte Protein wird mit je 2 ml Puffer C (+ 500 mM Imidazol) eluiert. Dazu wird die Säule mit dem Elutionspuffer beladen und 5 min inkubiert. Dann wird das Eluat aufgefangen und der Vorgang noch 2-mal wiederholt.
- Alle Fraktionen werden mittels einer Gelelektrophorese auf einem SDS-Gel analysiert.

#### 3.3.2.3 Dialyse von denaturierten Proteinen

- Der ca. 5 cm lange Abschnitt des Dialyseschlauchs wird 10 min in deion. Wasser bei 100°C erhitzt.
- Die Proteinsuspension (2 ml) wird mittels einer sterilen Pipette in einen Dialyseschlauch-Abschnitt gefüllt, der durch sterile Klemmen an einem Ende verschlossen ist.
- Der Dialyseschlauch wird am verbleibenden Ende mit einer weiteren Klammer luftblasenfrei verschlossen.
- Die Proteinsuspension wird dreimal gegen 2 l PBS für 10-12 Std unter leichtem Rühren bei 4-8 °C dialysiert.
- Die Suspension wird aus dem Dialyseschlauch mittels einer sterilen Pipette entnommen. Es wird eine Proteinmengenbestimmung durchgeführt und die Proteinlösungen werden auf Proteingelen weiter analysiert.
- Wird eine konzentriertere Proteinlösung benötigt, kann die Lösung mit Hilfe einer Amicon-Zentrifugationssäule eingeeengt werden. Hierzu wird die Lösung auf die Säule pipettiert, die Säule wird verschlossen und für die gewünschte Dauer bei 4 °C und 4000 Upm zentrifugiert.

#### 3.3.3 Proteinprobenaufarbeitung für SDS-Polyacrylamidgele

Proteinproben müssen denaturiert werden, um sie der Größe nach über ein Polyacrylamidgel zu separieren. Bei Proteinextrakten aus *E. coli* Kulturen wird 1 OD<sub>600</sub> Zellen aufgearbeitet.

- Die Zellsuspension wird für 1 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge Pico) zentrifugiert.
- Das Zellpellet wird in 32.5 µl deion. Wasser aufgenommen und resuspendiert.
- Es werden 12.5 µl Ladegelpuffer (4fach konzentriert) (50 mM Tris/HCL pH 6.9; 2 % SDS; 0.1 % Bromphenolblau; 5 % Glycerin) zugegeben.
- Es werden 5 µl 1 M DTT zugesetzt.

- Die Probe wird 10 min bei 100 °C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt.
- Bei Proteinproben aus der Affinitätschromatographie oder der Dialyse werden 32.5 µl Probe wie oben beschrieben mit Ladegelpuffer sowie DTT versetzt und 10 min bei 100 °C erhitzt.

### 3.3.4 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Für die Analyse von Proteinen werden 10 %ige bis 15 %ige Polyacrylamidgele verwendet. Die Glasplatten und Abstandhalter werden sorgfältig mit 70 %igen Ethanol und deion. Wasser gereinigt und getrocknet. Es werden kleine Proteingele mit den Maßen 7 cm x 9 cm benutzt.

#### 3.3.4.1. Herstellung des Trenngels

Prozentigkeit des Trenngels	Acrylamidlösung	4x-Trenngelpuffer	Ammoniumpersulfat	TEMED	ddH <sub>2</sub> 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
15 %	20.0 ml	10 ml	200 µl	50 µl	10.0 ml

Tabelle 9: Zusammensetzung eines Trenngels (10-15%)

Im Trenngel werden die Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe separiert.

- Acrylamid (30:0.8), Wasser und Trenngelpuffer (1,5 M Tris/HCl pH 8.8; 0.4 % SDS) werden zusammenpipettiert und gut gemischt.
- Als letztes werden TEMED und Ammoniumpersulfat (10 %ige Stocklösung) hinzugegeben.
- Die Gelmasse wird zügig ohne Blasenbildung zwischen die Glas und Aluminiumplatte bis 2 cm unter den oberen Rand gegossen.
- Das Gel wird mit Isopropanol überschichtet.
- Nach dem Auspolymerisieren wird das Isopropanol abgenommen und das Gel vorsichtig mehrfach mit deion. Wasser gespült.

#### 3.3.4.2 Herstellung des Sammelgels

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

- 1,5 ml Acrylamidlösung (30:0.8) wird mit 2,5 ml 4 x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris/HCL pH 6.8; 0.4 % SDS) und 6 ml deion. Wasser gemischt.
- Es werden noch 200 µl 10 %ige Ammoniumpersulfatlösung und 20 µl TEMED hinzugegeben.
- Das Sammelgel wird auf das Trenngel gegossen, wobei sich keine Luftblasen bilden dürfen.
- Der Kamm wird in das Sammelgel gesteckt, sodass sich Ladetaschen bilden können.
- Nach dem Auspolymerisieren kann das Gel für die Elektrophorese verwendet werden.
- Der Kamm wird gezogen und die Ladetaschen mehrfach mit Laufpuffer gespült.

### 3.3.4.3 SDS-Gelelektrophorese

- Das Gel wird in die Apparatur eingespannt und beide Kammern mit Laufpuffer (0,05 M Tris/HCL pH 8.3; 0.2 M Glyzin; 0.2 % SDS) soweit gefüllt, dass das Gel Kontakt zum Laufpuffer hat.
- Die Proben (max. 20 µl/ Ladetasche) werden aufgetragen.
- Der Strom wird angelegt (max. 100 V bei etwa 20 mA) für 1,5 h.

### 3.3.5 Färbung eines Proteingels mittels Coomassie-Blau

#### 3.3.5.1 Herstellung der Coomassie-Färbelösung

- 80 mg Coomassie Brilliant Blau (R250) werden in 1 l Wasser unter Rühren gelöst.
- 3 ml konz. HCl werden dazugegeben.
- Falls das Coomassie-Pulver nicht vollständig gelöst sein sollte, kann die Lösung auf einem Heizrührer erhitzt werden, bis das Pulver vollständig gelöst ist.
- Die Lösung kann nun mehrfach zum Färben von Proteingelen eingesetzt werden.

#### 3.3.5.2 Färbung von Proteingelen

- Das Proteingel wird zweimal mit deion. H<sub>2</sub>O gewaschen. Hierzu wird das Gel zuerst in Wasser in der Mikrowelle (300 Watt) für 15 sek erhitzt und dann für 10 min unter leichtem Schwenken bei RT inkubiert.
- Das Proteingel wird mit der Färbelösung zuerst ebenfalls in der Mikrowelle (300 Watt) für 10 sek erhitzt und dann für mindestens 30 min unter leichtem Schwenken bei RT inkubiert.
- Die Färbelösung wird vorsichtig abgenommen und wiederverwendet werden.
- Das Gel wird mit Wasser unter leichtem Schwenken inkubiert.

### 3.3.6 Proteinmengenbestimmung mittels Bradford-Reagenz

Die Proteinmengenbestimmung nach Bradford basiert auf einer spezifischen Farbreaktion, bei der Coomassie Brilliant Blau 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 µg Gesamtprotein zu bestimmen. Die Proteinbestimmung erfolgt mit dem BioRad®-Proteinassay (BioRad) unter paralleler Erstellung einer Standardkurve bekannten Proteingehaltes mit Rinderserumalbumin.

Je nach Proteinkonzentration werden 800 – x µl ddH<sub>2</sub>O, 200 µl Bradford-Reagenz und x µl Proteinlösung gemischt und 10 min bei RT inkubiert (x = 1 – 10 µl) und die Absorption bei 595 nm mit dem Beckman DU-800 Spektralphotometer bestimmt.

Die Absorptionwerte von Lösungen mit 0 – 10 µg BSA liefern die Steigung einer Eichkurve.

Die Proteinendkonzentration bei Einsatz von 10 µl Proteinlösung errechnet sich folgendermaßen: Proteingehalt [µg/ml] = Absorption 595 nm x 18,64 x 100

### 3.3.7 Westernblotanalyse

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

#### 3.3.7.1 Aufbau der Blotapparatur

- Es werden 2 Filterpapiere zurechtgeschnitten; die Maße betragen 7 cm x 9 cm. Die Filterpapiere werden in Transferpuffer (25 mM Tris/HCL, 150 mM Glyzin, 0,05 % (v/v) SDS, 10 % Methanol) inkubiert.
- Es wird ein Stück Immobilon-P Membran (Millipore) (7 cm x 9 cm) in Methanol inkubiert und dann mit Transferpuffer gespült.
- Ein Filterpapier wird sorgfältig auf die Graphitplatte der Blotapparatur gelegt und alle Luftblasen werden entfernt.
- Die Membran wird aufgelegt und sichergestellt, dass sich keine Luftblasen zwischen Membran und Filterpapier befinden.
- Die Gelapparatur wird auseinandergelöst und das Gel wird von der Glasplatte gelöst und luftblasenfrei auf die Membran gelegt.
- Der Stapel wird schließlich mit dem anderen Stück Filterpapier bedeckt.
- Luftblasen werden durch vorsichtiges Auswalzen mittels einer sterilen Glaspipette entfernt.
- Die zweite Graphitplatte wird auf den Stapel gelegt und die Kontakte an das Stromgerät angeschlossen. Ein Gewicht von etwa 1 kg wird auf die Apparatur gestellt, um den Transfer zu begünstigen.
- Bei 200 mA und max. 8 Watt findet der Transfer der Proteine auf die Membran für 30 min statt.

#### 3.3.7.2 Abbau der Blotapparatur

- Der Strom wird abgeschaltet und die Apparatur wieder abgebaut.
- Die Membran wird mittels einer sterilen Pinzette in ein sauberes Gefäß transferiert und in Blockierungslösung (3% Milchpulver, 0.05% Tween-20 in 1 x PBS) bei 4 °C über Nacht oder 1 Std bei RT inkubiert.

#### 3.3.7.3 Antikörperreaktion auf der Immobilon-P Membran

Um spezifische Proteine auf der Nylonmembran zu detektieren werden verschiedene Antikörper eingesetzt.

- Die Membran wird mit dem Primär-Antikörper (5 ml), welcher das spezifische Protein erkennt, inkubiert. Die Verdünnung des Antikörpers geschieht mittels Blockierungslösung.
- Die Nylonmembran wird 2 Std bei Raumtemperatur oder üN bei 4°C mit der Antikörperlösung unter leichtem Schwenken inkubiert.
- Die Antikörperlösung wird abgezogen und die Membran dreimal mit PBS für jeweils 10 min gewaschen.

- Es folgt die Inkubation der Membran für 1 Std bei Raumtemperatur mit dem Sekundär-Antikörper (Anti-Kaninchen bzw. Anti-Maus), welcher konjugiert mit alkalischer Phosphatase vorliegt. Der Sekundär-Antikörper wird 1:7500 in Blockierungspuffer verdünnt.
- Die Membran wird dreimal 10 min mit PBS gewaschen.

#### 3.3.7.4 Farb-Entwicklung von Westernblots mittels alkalischer Phosphatase

- Die Membran wird mit 20 ml Farbsubstrat-Lösung (Detektionspuffer (0,1 M Tris/HCl, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5) +66 µl BCIP-Lösung (0.5 g BCIP in 5 ml DMF) + 66 µl NBT-Lösung (0.5 g NBT in 10 ml 70 %igem DMF) für mindestens 5 min bis zu mehreren Stunden inkubiert.
- Die Farbreaktion wird durch mehrfaches Waschen mit Wasser abgestoppt.

#### 3.3.8 Far Western Analyse zur Ermittlung möglicher direkter Protein-Protein-Interaktionen

Die Methode des Far Westerns bietet sich an, um festzustellen, ob eine Interaktion eines Proteins mit einem oder mehreren Proteinen eines Lysats zustande kommt. Um z.B. geeignete Lysispuffer für eine Immunpräzipitation zu ermitteln, können Lysate mit verschiedenen Puffern generiert werden und anschließend mit dem gewünschten Protein mittels Far Western analysiert werden. Zum anderen können mit Hilfe des Far Westerns Protein-Protein-Interaktionen direkt zwischen zwei möglichen Interaktionspartnern analysiert werden.

Für den Far Western wird das zu untersuchende Protein oder das Zell-Lysat wie unter 3.3.7 beschrieben geblottet und anschließend auf der Membran mit Guanidin-HCl erst denaturiert und dann schrittweise renaturiert von 6M Guanidin-HCl bis 0M Guanidin-HCl ohne Waschschrte (Puffer siehe Tabelle). Die ersten Inkubationen der Membran erfolgen bei RT, ab 1M Guanidin-HCl erfolgen alle Schritte bei 4-8 °C. Dann wird der zu analysierende Interaktionspartner oder das zu analysierende Protein in möglichst nativer Form in PBS mit der Membran für mindestens 1 Std bei 4°C inkubiert. Dann wird die Membran gewaschen und kann anschließend mit Antigen-spezifischen oder gegen die Proteinmarkierung gerichteten (z.B. 6His) Antikörpern inkubiert werden, um mögliche Interaktionen zu detektieren (Wu, Li et al. 2007).

**Tabelle 10: Zutaten für Guanidin-HCl-Puffer**

Guanidin-HCl (M)	6	3	1	0,1	0
Glyzerin (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 (µl)	50	50	50	50	50
8 M Guanidin-HCl (ml)	37,5	18,6	6,3	0,6	0
ddH <sub>2</sub> O	4,9	12,8	36	41,8	42,4
Total (ml)	50	50	50	50	50

### 3.3.9 Biochemische Methoden zur Suche nach Interaktionspartnern

#### 3.3.9.1 Herstellung von Humanzell-Lysaten

Zur Gewinnung von Humanzell-Lysaten können verschiedene Puffer und Methoden gewählt werden. In dieser Arbeit wurden verschiedenen Puffer getestet und verwendet.

#### RIPA-Puffer zur Gewinnung eines totalen Proteinextrakts

- Die Zellen werden für 10 – 15 min mit RIPA-Puffer ( 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1 % SDS, 0.5 % Na.Deoxycholat, 1 % Triton-X 100 oder NP40, 1 mM PMSF oder 1 x complete Protease Inhibitor) inkubiert.
- Das Lysat wird anschließend durch Zentrifugation geklärt, der klare Überstand kann nun verwendet werden.

#### Gewinnung einer Membran- und Zytosolfraktion:

Das Protokoll stammt von Herrn Dr. Murra (Murra 2010)

Zytosol-Fraktion:

- Die Zellen werden aus einer konfluenten Flasche ausgekratzt, durch Zentrifugation pelletiert und in ein Reaktionsgefäß überführt.
- Nun werden die Zellen in Zytosol-Isolierungspuffer (1mM PMSF, 0,4 nM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0,2 % Saponin in 1 x PBS pH 7,4) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert.
- Anschließend werden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation für 15 min bei 15000 Upm pelletiert.
- Der gewonnene Überstand ist die zytosolische Fraktion.

Membran-Fraktion:

- Das Pellet der Zytosolfraktion wird mit Membranisolierungspuffer (1 mM PMSF, 0,4 nM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0,2 % Saponin, 1 % Triton X-100 in 1 x PBS pH 7,4) 30 min auf Eis inkubiert.
- Anschließend wird das Lysat für 2 min bei 15000 Upm pelletiert.
- Der gewonnene Überstand ist die Membranfraktion.

#### Lyse mit Zwittergent:

- Für diese Lyse werden die Zellen mit 1 ml PBS mit 1 % Zwittergent 3-14 und 1 mM PMSF für 1 Std bei 4°C inkubiert (Cortes, Rzomp et al. 2007). Das Lysat wird anschließend durch Zentrifugation geklärt und kann dann für die unterschiedlichen Experimente in diesem Abschnitt eingesetzt werden.

#### Weitere Lysis-Puffer:

- NOPS-Puffer (10 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 % NP40, 1 mM CaCl<sub>2</sub>)
- Phospholysispuffer ( 20 mM Tris, 140 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % NP40, 1 % Triton X-100, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> )
- Lysispuffer (1 x PBS, 2 % Sarkosyl, 2 % SDS)

### 3.3.9.2 GST-Pulldown Experimente

- 10 mg Glutathion Agarose (Pierce, Bindekapazität 5 – 10 mg/ml) werden in 2 ml Wasser für 30 min bei RT quellen gelassen, dann wird die Agarose bei 13000 Upm pelletiert und mit 1 ml 1 x PBS pH 7.4 gewaschen.
- Es werden jeweils 1.5 nM GST (40 µg) und GST-Fusionsprotein mit 100 µl Agarose in 2 ml GST-Bindepuffer (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 10 % Glycerin) für 1 Std bei 4°C in der Säule auf dem Rad inkubiert.
- Die Agarose wird in 1 ml 5 % BSA-Lösung in 20 mM Tris pH 8.0 üN bei 4°C inkubiert.
- Anschließend wird mit 500 µl GST- Bindepuffer gewaschen und mit dem gewünschten Zelllysate in 2 ml GST-Bindepuffer für 2 Std bei 4°C unter rotierendem Schütteln inkubiert.
- Die Agarose wird zweimal mit 2 ml GST-Bindepuffer gewaschen und für 5 min mit 75 µl eluiert (Elutionspuffer: 50 mM Tris pH 8.0 + 10 mM red. Glutathion).
- Es werden 20 µl 4 x SDS-Ladegelpuffer und 10 µl 1 M DTT zugegeben, für 10 min bei 100 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und die Proben mittels Westernblot und Coomassie analysiert.

### 3.3.9.3 NHS-Pulldown Experimente

Eine weitere Möglichkeit zur Suche von Interaktionspartnern von Proteinen bietet ein NHS-Pulldown. Hierzu wird das zu untersuchende Protein an NHS-Sepharose gekoppelt und mit Gesamtzelllysaten von Humanzellen inkubiert.

- 0,2 ml NHS-Sepharose werden in eine kleine Säule gegeben und das Isopropanol mit 1 mM HCl ausgewaschen.
- Die Säule wird mit 5 ml Kopplungspuffer (20 mM Tris pH 8, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 10 % Glycerin) gewaschen.
- Die Proteinlösung (z.B. Cpn0147-GST) wird in 2ml Kopplungspuffer zu der Sepharose gegeben und für 2h bei RT auf dem Rad inkubiert.
- Die Säule wird leer laufen gelassen und üN mit 4ml Blockierlösung inkubiert.
- Anschließend wird die Säule gewaschen: dreimal mit 1,5 ml Puffer 1 (0,1 M Tris pH 8) und dreimal mit 1,5 ml Puffer 2 (0,1 M Natriumacetat + 0,5 M NaCl pH4).
- Diese Waschstschritte werden insgesamt dreimal wiederholt.
- Das Lysat (z.B. von ½ konfluenten 80 cm<sup>2</sup> Flasche) wird in GST-Bindepuffer verdünnt und auf die Säule gegeben.
- Es wird für 2 Std bei 4°C auf dem Rad inkubiert.
- Die Säule wird erst mit 10 mM Tris pH7,5 und danach mit 500 mM NaCl + 10 mM Tris pH7,5 gewaschen.
- Die saure Elution erfolgt mit 90 µl 100 mM Glyzin pH 2,5 für 5 min.
- Die basische Elution erfolgt mit 90 µl 100 mM Triethanolamin pH 11,5 für 5 min.
- Die Elutionen werden jeweils mit 10 µl 1 M Tris pH 8,0 abgepuffert und mit 25 µl BM und 10 µl DTT für 10 min bei 100 °C erhitzt.
- Die Sepharose wird mit 70 µl H<sub>2</sub>O und 25 µl BM und 10 µl DTT ebenfalls für 10 min bei 100 °C erhitzt.

- Alle Proben werden dann auf einem Coomassie-Gel und mit Hilfe eines Westernblots analysiert.

#### **3.3.9.4 Immunpräzipitation aus infizierten Zellen nach intrazellulärem Crosslinking mittels DSP**

- HEp-2 Zellen werden in kleinen Flaschen ausgesät.
- Die konfluenten Flaschen werden infiziert und nach der gewünschten Zeit (z.B. 48 hpi) zweimal mit PBS gewaschen.
- Nun erfolgt das DSP-Crosslinking. Hierzu werden 25 mM DSP in DMSO gelöst und auf eine Endkonzentration von 1 mM mit PBS verdünnt.
- Das Crosslinking erfolgt durch Inkubation der Zellen mit 1 mM DSP für 30 min bei RT.
- 20 mM Abstopplösung (1 M Tris pH 7,5) werden hinzu pipettiert und es wird für weitere 15 min bei RT inkubiert.
- Die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen und anschließend nach der gewünschten Methode (s. 3.3.9.1) lysiert.
- Das Lysat wird abgenommen und für 20 min bei 12000 g zentrifugiert.
- 1 µg des Antikörpers (in diesem Fall anti-Cpn0147) wird zu dem Lysat gegeben und üN oder für 4 Std bei 4°C auf dem Rad inkubiert.
- Die benötigte Menge Protein G Sepharose wird mit PBS gewaschen, dann werden 50 µl Sepharose pro Reaktionsgefäß zu den Proben gegeben und üN oder für 4 Std auf dem Rad bei 4°C inkubiert.
- Das Immunpräzipitat wird pelletiert und das Pellet dreimal mit PBS gewaschen.
- Die saure Elution erfolgt für 10 min mit 100 µl 100 mM Glyzin pH 2,5, wobei das Eluat mit 12 µl 1 M Tris abgepuffert wird und anschließend mit 25 µl Blaumarker und 12 µl DTT bei 100 °C für 10 min erhitzt wird.
- Das Pellet wird ebenfalls mit 70 µl H<sub>2</sub>O und 25 µl BM 12 µl DTT und 12 µl 1 M Tris bei 100 °C für 10 min erhitzt und beide Fraktionen werden auf einem Coomassie-Gel und einem Westernblot analysiert. DSP wird bei Erhitzen mit DTT abgespalten.

#### **3.3.10 Generierung polyklonaler Antikörper**

Für die Immunisierungen von Kaninchen werden die Proteine wie unter Abschnitt 3.5.3. beschrieben unter denaturierenden oder nativen Bedingungen aufgereinigt. Theoretisch ist es ausreichend, Proteine für die Immunisierung von Kaninchen zur Generierung von Antikörpern aus einem Proteingel auszuschneiden und diese dann aufzubereiten. Trotzdem wurde, wenn möglich, versucht, natives Protein zusätzlich für die letzten beiden Immunisierungen zu verwenden, um in der Immunfluoreszenz ein besseres Ergebnis zu erzielen (detaillierte Auflistung zu jedem Protein siehe Tabelle). Für einen Antikörper werden insgesamt 800 µg Protein benötigt, da jeweils 4 aufeinanderfolgende Immunisierungen an zwei unterschiedlichen Kaninchen durchgeführt werden und pro Injektion 100 µg Protein benötigt werden. Die Immunisierungen und die Gewinnung des polyklonalen Serums wurden von der Firma Eurogentec in Belgien vorgenommen.

Die auszuschneidenden Proteine werden über ein 10%iges SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie Lösung angefärbt. Die Bande des Proteins wird aus dem Gel ausgeschnitten und der Firma Eurogentec zugesandt.

Serum Nr.	Antigen	Immunisierungen 1 und 2	Immunisierungen 3 und 4
2455 und 2456	CPn0147	GST-Fusionsprotein aus Gel (VL)	Dialysiertes His-Protein (ohne TM, Δ AS 41-91)
2457 und 2458	CPn0181	GST-Fusionsprotein aus Gel (VL)	GST-Fusionsprotein aus Gel (VL)
2459 und #2460	CPn0350	GST-Fusionsprotein aus Gel (VL)	1x His-Protein aus Gel 1x His-Protein dialysiert (VL)
1366 und #1367	CPn0472	His-Protein aus Gel (C-Terminus AS 501-775)	His-Protein aus Gel (C-Terminus AS 501-775)
2218 und #2219	CPn0809	His-Protein aus Gel (N-Terminus (AS 1-253))	His-Protein dialysiert (N-Terminus (AS 1-253))
1368 und #1369	CPn1054	His-Protein aus Gel (C-Terminus AS 551-811)	His-Protein aus Gel (C-Terminus AS 551-811)

Tabelle 11: Auflistung der generierten Seren und verwendete Proteine

VL= Volllänge, TM= Transmembrandomänen

### 3.3.11 Antigenreinigung polyklonaler Antikörper mit NHS-Sepharose

Um die Spezifität polyklonaler Antikörper zu erhöhen, kann mittels NHS-aktivierter Sepharose eine Antigenreinigung des Serums durchgeführt werden. Dabei bildet NHS (N-Hydroxysuccinimid) eine chemisch stabile Amidbindung mit primären Aminogruppen von Proteinsitenketten aus. Das entsprechende rekombinante Protein wird also an die NHS-Sepharose auf einer Säule gekoppelt und die Säule anschließend mit dem entsprechenden Serum inkubiert. Es 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 werden in eine leere Säule mit Fritte gegeben und durch Zugabe von 20 ml kaltem 1 mM HCl wird das Isopropanol herausgewaschen.
- Die NHS-Sepharose wird mit 10 ml Kopplungspuffer (0.2 M NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 M NaCl, pH 8,3) gewaschen.
- 1 mg Proteinlösung in PBS wird mit demselben Volumen an Kopplungspuffer gemischt und die verschlossene Säule üN bei 4°C auf dem Rad inkubiert.
- Um nicht-reagierte Gruppen zu blockieren, wird 4 ml Blockierungslösung (0.5 M Ethanolamin, 0.1 M Tris, pH 8.5) zugefügt und 4 Std bei 4°C auf dem Rad inkubiert.
- Es wird 3-mal 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 wird auf die Säule gegeben und 2 Std bei 4°C auf dem Rad inkubiert.
- Es wird mit 10 ml 10 mM Tris pH 7.5 und 10 ml 500 mM NaCl gewaschen.

- Die erste Elution des Antikörpers erfolgt mit 5 ml 100 mM Glyzin, pH 2.5 für 5 min (saure Elution) und das Eluat wird in 0.5 ml 1 M Tris, pH 8.0 aufgefangen, um den pH-Wert zu neutralisieren.
- Die zweite Elution des Antikörper erfolgt mit 5 ml 0.1 M Triethanolamin, pH 11.5 für 5 min (basische Elution) und das Eluat wird wieder in 0.5 ml 1 M Tris, pH 8.0 aufgefangen.
- Der gereinigte Antikörper wird portioniert und bei -20°C weggefroren.

#### **3.3.12 Dichtegradienten-Fraktionierung von infizierten Humanzellen**

Bei einer Gradientenfraktionierung werden die unterschiedlichen Zellbestandteile anhand ihrer Dichte im Gradienten aufgetrennt und können anschließend einzeln analysiert werden.

Es können Gesamtzell-Fraktionierungen angefertigt werden, bei denen jede einzelne Schicht analysiert wird, oder eine Fraktionierung kann so angelegt sein, dass bestimmte Kompartimente angereichert und von den übrigen Zellbestandteilen sauber getrennt werden.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Fraktionierungsmethoden angewandt.

Die Fraktionierung mit Optiprep® dient der Separierung in Zytosol, Kernfraktion, kleine Membranen, größere Membranen und Bakterien und wird nach einem modifizierten Protokoll von Jorgensen und Valdivia (Jorgensen und Valdivia, 2008) durchgeführt.

Die Fraktionierung mittels Saccharose dient der sauberen Trennung der Lipidtröpfchen von den anderen Zellbestandteilen und wird nach einem modifizierten Protokoll von Cocchiaro et al durchgeführt (Cocchiaro, Kumar et al. 2008).

##### **3.3.12.1 Fraktionierung mit Optiprep®**

- In 32 kleine Flaschen werden HeLa 229-Zellen ausgesät.
- Die konfluenten Zellen werden mit einer MOI von ca. 2 infiziert und nach 48 bzw. 65 Std geerntet.
- Hierzu wird das Medium abgesaugt und in jede Flasche 1 ml PBS mit Proteaseinhibitor gegeben.
- Die Zellen werden mit einem sterilen Zellschaber abgekratzt und in ein Falcon überführt.
- Die Zellen werden bei 1000 x g pelletiert und mit 7 ml PBS + Proteaseinhibitor gewaschen und anschließend in 7 ml PBS + Proteaseinhibitor resuspendiert.
- Die Lyse erfolgt mit einem Dounce-Homogenisator auf Eis, wobei 20-30-mal der grobe Pistill und 20-30-mal der feine Pistill verwendet wird.
- Das Lysat wird bei 500 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Das resultierende Pellet ist die Kernfraktion.
- Vom postnuklearen Überstand wird eine 300 µl Probe für die spätere Analyse entnommen und der restliche Überstand wird bei 100 000 x g für 1 Std bei 4 °C in der Ultrazentrifuge (Beckmann Rotor SW40Ti) zentrifugiert. Der Überstand ist die Zytosolfraktion, das Pellet (HSP für high speed pellet) enthält Membranen und Bakterien und wird im folgenden Gradienten weiter aufgetrennt.
- Das Pellet wird in 1,5 ml PBS mit Inhibitor resuspendiert, mit Optiprep® aus einer 60 %igen Stocklösung auf 30 % Optiprep® eingestellt und in ein Beckmann Ultrazentrifugenröhrchen pipettiert.

- Diese 30 % Lösung wird vorsichtig mit Optiprep®-Lösungen abnehmender Dichte überschichtet, die jeweils aus der Stocklösung mit PBS mit Inhibitor verdünnt werden: Zuerst 25 %, dann 20 % und zuletzt 5 %.
- Der Gradient wird bei 100 000 x g für 2 Std bei 4 °C in der Ultrazentrifuge (Beckmann Rotor SW40Ti) zentrifugiert. Die einzelnen Fraktionen werden von oben nach unten in 300 µl Portionen vorsichtig abgeerntet und die Proteinkonzentration jeder Fraktion wird bestimmt.
- Von jeder proteinhaltigen Fraktion wird die gleiche Menge Protein in einem Westernblot analysiert.

#### 3.3.12.2 Fraktionierung mit Saccharose

- In 32 kleine Flaschen werden HeLa 229-Zellen ausgesät.
- Die konfluenten Zellen werden mit einer MOI von ca. 2 infiziert, nach der Adsorptionsphase wird das Infektionsmedium entfernt und Chlamydienkulturmedium mit 100 µM Ölsäure zugegeben.
- Nach 48 Std werden die Zellen geerntet.
- Hierzu wird das Medium abgesaugt und in jede Flasche 1 ml TNE (20 mM Tris / HCl pH 8,0; 120 mM NaCl, 2 mM EDTA + complete Proteaseinhibitor) gegeben.
- Die Zellen werden mit einem sterilen Zellschaber abgekratzt und in ein Falcon überführt, pelletiert und einmal mit TNE gewaschen.
- Das Zellpellet wird in 5 ml TNE resuspendiert und die Zellen werden auf Eis mit dem Dounce-Homogenisator lysiert (30 x grob, 30 x fein).
- Das Lysat wird bei 1500 x g für 10 min zentrifugiert, um Kerne und nicht-lysierte Zellen zu beseitigen. Das Pellet (NP) enthält die Zellkerne.
- Das Lysat wird auf 0,45 M Saccharose eingestellt und in ein Beckmann Ultrazentrifugenröhrchen überführt.
- Das Überschichten erfolgt mit je 2 ml 0,27 M Saccharose /TNE, 0,135 M Saccharose/TNE und TNE.
- Der Gradient wird bei 100 000 x g für 1 Std bei 4 °C in der Ultrazentrifuge (Beckmann Rotor SW40Ti) zentrifugiert
- Die Lipidtröpfchen schwimmen oben auf dem Gradienten als dünne weiße Schicht, sie werden vorsichtig von oben abgeerntet.
- Die Lipidtröpfchen- Fraktion wird aufgeteilt: je 15µl werden mit Bodipy 493/503 (1:1000) oder Nile Red (1:2000) gefärbt und mikroskopiert, der Rest wird im Westernblot analysiert. Hierzu werden zuerst 100µg Protein entnommen und der Rest der Probe wird entfettet (s.u.), die Proteine werden danach gefällt und ebenfalls im Westernblot analysiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Neue potentielle Effektorproteine konnten mit Hilfe des Screenings identifiziert werden

Das Screening (beschrieben unter 3.1.3.1 Durchführung eines Screenings zur Identifizierung potentieller Effektorproteine) wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Anne Kerres durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten Hefen, die das *C. pneumoniae* TARP-Homolog CPn0572 exprimierten, welches von Herrn Dr. Rafat Zrieq bereits charakterisiert wurde und einen sehr starken Wachstumsdefekt in Hefezellen auslöst (Zrieq, 2009). Als Negativkontrolle dienten Hefen, die den leeren Vektor pRZ7 tragen. Der Screen wurde mit einer 33fachen Genomabdeckung durchgeführt, statt der gewünschten Mindestanzahl von 207 000 Klonen (entsprechen 20facher genomischer Abdeckung) wurden ca. 350 000 Klone analysiert. Die Selektion erfolgte durch Replika-Plattierung auf Genexpression-induzierendes Medium mit Phloxin B. Phloxin B ist ein Farbstoff, der von toten Hefezellen oder Zellen mit anderweitig ausgelöstem Verlust der Integrität der Plasmamembran aufgenommen und akkumuliert wird (Bonneu, Crouzet et al. 1991; Tsukada and Ohsumi 1993). Kolonien, die viele geschädigte Zellen enthalten, zeigen daher eine stärkere rosa Färbung als Kolonien mit wildtypisch

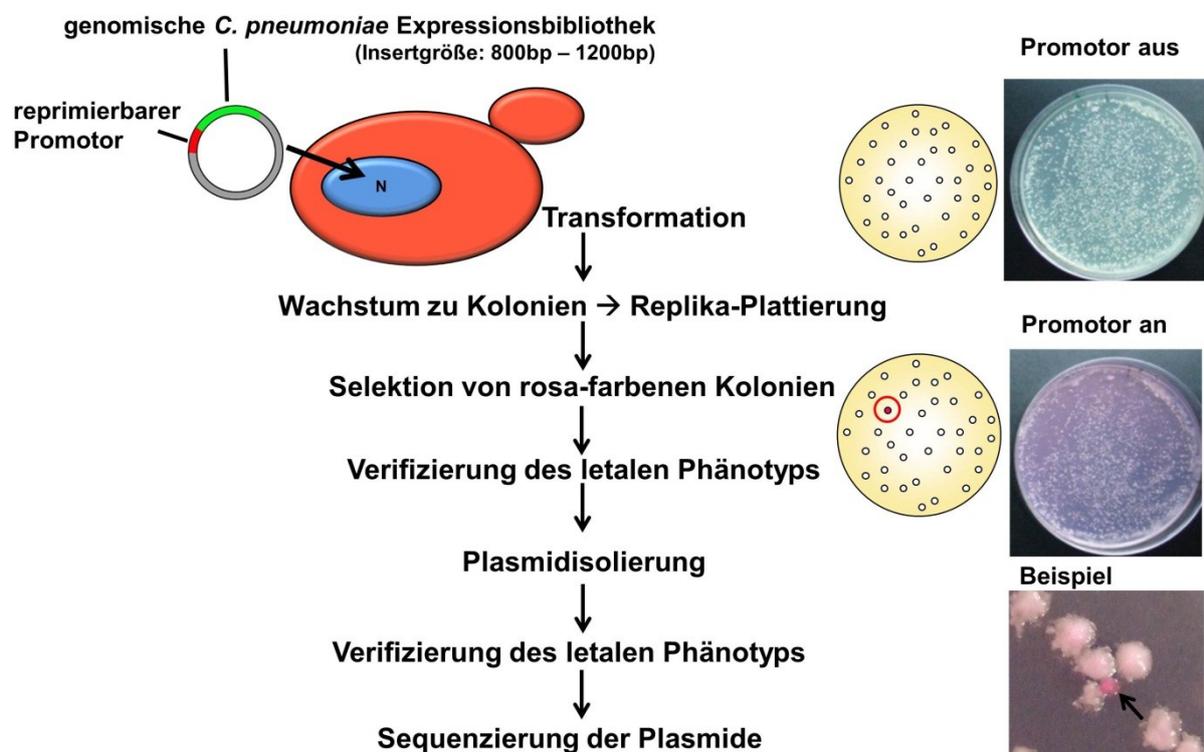
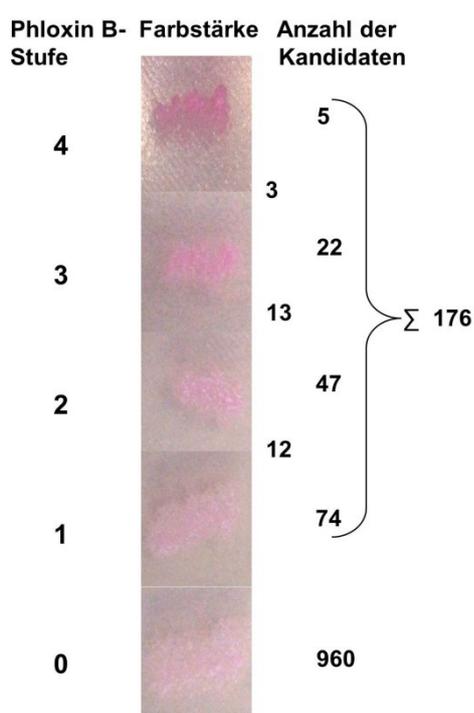


Abbildung 6: Schema der Durchführung des Screenings

Die Bibliothek-DNA wurde in Hefe transformiert und die Zellen wurden auf nicht-induzierendes Medium plattiert. Die resultierenden Kolonien wurden auf induzierendes und nicht-induzierendes Medium Replika-plattiert und rosafarbene Kolonien auf induzierendem Medium wurden vereinzelt. Rechts sind beispielhafte Fotos der Platten und einer rosafarbenen Kolonie umgeben von wildtypischen weißlichen Kolonien abgebildet.

wachsenden Hefezellen (Abbildung 6). Insgesamt wurden beim Durchmustern der Platten 1136 Klone vereinzelt, die auf induzierenden Platten mit Phloxin B eine rosa Färbung im Vergleich zur Negativkontrolle aufwiesen. Ursprünglich sollten auch Kolonien vereinzelt werden, die im Vergleich zu Kolonien auf der (nicht-induzierenden) Masterplatte kleiner waren, deren Zellen also ein vermindertes Wachstum zeigten. Aufgrund der Replika-Plattierung traten solche Kolonien jedoch gehäuft auf, da die Anzahl der Zellen, die bei der Replika-Plattierung übertragen werden, stark variiert. Es wurde daher ausschließlich auf Hefezellen mit einem Phloxin B-Phänotyp selektiert. Der letale Phänotyp wurde durch mehrmaliges Ausstreichen auf Phloxin B-haltige, induzierende SD-Platten verifiziert und anschließend wurde die Plasmid-DNA isoliert. Die zweite Verifikation des Phänotyps erfolgte durch erneute Transformation in Hefe und wiederholtes Ausstreichen auf Phloxin B-haltigen, induzierenden SD-Platten. Alle Klone wurden auf die Stärke ihres Phloxin B-Phänotyps hin kategorisiert. Die Positivkontrolle (Hefen, die das *Chlamydia pneumoniae* TARP-Homolog CPn0572 exprimierten) zeigte eine sehr starke rosa Färbung, also Akkumulation von Phloxin B und erhielt die Phloxin B-Stufe 4. Hefekolonien, die nur eine leicht stärkere Färbung als die Leervektor-Kontrollhefen zeigten, erhielten die Stufe 1. Hefen mit einer intermediären Färbung wurden demnach in Stufe 2 oder 3 eingeordnet.

Von ursprünglich 1136 vereinzelt Klone blieben nach der Verifizierung des letalen Phänotyps insgesamt 176 Klone übrig, die stabil und reproduzierbar einen schwachen bis starken Wachstumsdefekt in der Hefe auslösen (Abbildung 7). Bei insgesamt 960 Klonen konnte entweder schon bei der Vereinzlung und ersten Verifizierung kein letaler Phänotyp mehr festgestellt werden, oder aber nach der erneuten Transformation der isolierten



Plasmide in den Hefestamm yUG37 war bei der zweiten Verifizierung kein letaler Phänotyp mehr erkennbar.

Stabil und reproduzierbar zu einem Phloxin B-Phänotyp führende Plasmidinserts wurden schließlich sequenziert. Als Referenz-Genom wurde das bereits sequenzierte und annotierte Genom des *C. pneumoniae* Stamms CWL029 verwendet (Kalman, Mitchell et al. 1999). Dieser Stamm ist dem in dieser Arbeit verwendeten GiD-Stamm sehr ähnlich, es zeigten sich aber kleine Unterschiede,

#### Abbildung 7: Phloxin B-Phänotypisierung der isolierten Bankplasmide

Abgebildet sind beispielhafte Ausstriche der entsprechenden Phloxin B-Stufe. Rechts daneben ist jeweils die Anzahl der Klone mit der entsprechenden Stufe aufgelistet, eingerückte Zahlen stehen für die Anzahl der Klone mit intermediärem Phänotyp.

CPn OLR	Einstufung Phloxin B	CT-Homologe	Frequenz
cpn0043	3	-	1
cpn0072	2	CT324	1
cpn0130	3	-	1
cpn0146	3	-	1
cpn0147	3-4	-	5
cpn0181	2-3	-	1
cpn0188	2-3	CT132	2
cpn0211	3	-	1
cpn0263	2	CT221	1
cpn0266	3	-	1
cpn0267	2	-	1
cpn0277	2	-	1
cpn0293	2	CT234	2
cpn0369	3	CT058	1
cpn0413	1-2	CT264	2
cpn0419	3	CT270, CT682	2
cpn0439	3	-	1
cpn0456	2	-	1
cpn0467	2	ähnlich: CT869, CT870, CT871, CT874, CT412, CT872, CT413, CT414	3
cpn0472	4	-	7
cpn0473	3	-	2
cpn0474	3	CT365	3
cpn0554	2	-	1
cpn0564	2	CT448	2
cpn0572	2-3	CT456	1
cpn0598	2	CT479	1
cpn0615	2	CT496	1
cpn0648	2	CT529	1
cpn0746	2	CT632	1
cpn0786	2	CT595	1
cpn0798	3	-	1
cpn0809	4	CT578	7
cpn0813	2	CT574	2
cpn0815	1-2	CT572	1
cpn0850	2-3	CT709	1
cpn0908	3	CT764	2
cpn0912	2-3	CT768	1
CPn0942	3	CT794	1
cpn0965	1	CT411	2
cpn0966	1	CT410	1
cpn1014	2	CT856	1
cpn1019	3	CT860	3
cpn1046	3	-	1
cpn1054	3	-	3
cpn1060	2	CT331	1
cpn1062	2-3	CT329	2
cpn1070	1-2	-	1

hauptsächlich SNPs (small nucleotide polymorphisms). Durch die Sequenzierung der

genomischen Abschnitte konnte jedem Klon der entsprechende Genabschnitt auf dem chlamydialen Genom zugeordnet werden. In seltenen Fällen befand sich der komplette offene Leserahmen (OLR) im Leseraster mit dem 6fach-Histidin-Tag. Häufiger befanden sich nur Fragmente des OLR in dem DNA-Abschnitt, der in den Expressionsvektor ligiert wurde. In der Annahme, dass aber sehr wohl auch Teile eines Proteins dessen potentielle Funktion ausführen können, wurden auch diese Teilstücke dem entsprechenden chlamydialen Effektor Kandidaten zugeordnet. Schwieriger war die Einordnung von Kandidaten, deren Sequenz sich nicht im Leserahmen des 6fach-Histidin-Tags und des Promotors befand. Diese Kandidaten fanden nur dann Berücksichtigung, wenn sie noch mindestens ein weiteres Mal isoliert worden waren, da fraglich ist, ob der

**Tabelle 12: Liste der isolierten Kandidaten**

Aufgelistet sind alle 47 *C. pneumoniae* OLR, annotiert anhand des Referenzstamms CWL029, welche mindestens einmal in dem durchgeführten Screening isoliert wurden und sich im Leserahmen des 6fach-Histidin-Tags befanden. Angegeben ist die höchste Phloxin B-Stufenbewertung, Homologe in *C. trachomatis* und die Isolierungshäufigkeit des Kandidaten im Screening (Frequenz). In der Spalte ‚Frequenz‘ sind alle Kandidaten, die mehr als einmal isoliert wurden, grau unterlegt. In der Spalte der Phloxin-Einstufung sind durch graue Unterlegung die Phänotypen-Abstufungen hervorgehoben, je dunkler der Farbton, umso stärker der induzierte Phloxin-Phänotyp.

entsprechende Genabschnitt in einer solchen Konstruktion exprimiert wird. Des Weiteren gab es auch einige Plasmide, die Abschnitte von zwei benachbarten OLR enthielten. Diese wurden zuallererst dem Kandidaten zugeordnet, welcher im Leseraster des 6fach-Histidin-Tagswar. Wurde der andere OLR noch mindestens ein weiteres Mal isoliert, so wurde der Klon beiden zugeordnet. Es ist nicht auszuschließen, dass auch die intergenetischen Abschnitte oder Bereiche in dem annotierten ersten OLR in der Hefe als Promotorsequenzen erkannt werden und somit auch der eigentlich nicht im Leseraster befindliche Genabschnitt exprimiert wird und einen

Insgesamt konnten auf diese Weise 47 unterschiedliche OLR identifiziert werden, die in unterschiedlicher Häufigkeit und in verschiedenen Teilabschnitten in dem durchgeführten Screening isoliert wurden (Tabelle 12). Eine detaillierte Auflistung aller isolierten Kandidaten, ihrer postulierten Funktion und aller weiteren bekannten Daten, die bei der weiterführenden Analyse gefunden wurden, befindet sich im digitalen Anhang.

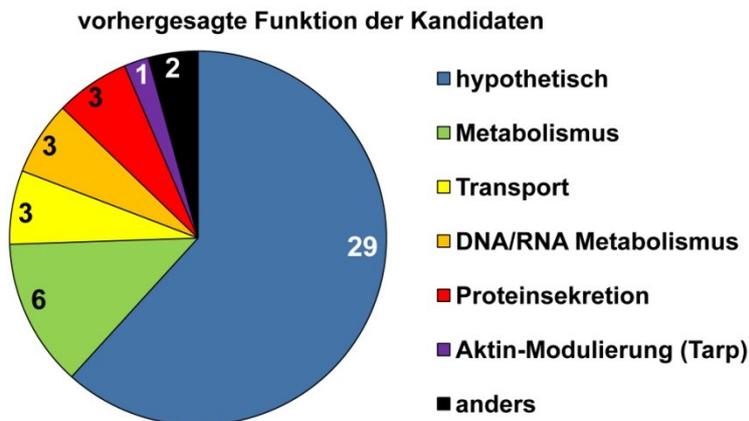
Bereiche der OLR von *cpn0472* und *cpn0809* wurden jeweils insgesamt sieben Mal isoliert, repräsentieren damit die beiden am häufigsten identifizierten Kandidaten und zeigen außerdem die höchste Phloxin B-Einstufung und somit den stärksten Wachstumsdefekt. Insgesamt fünf Mal wurden Abschnitte des OLR von *cpn0147* im Screening gefunden, wobei bei einem der Klone der OLR des benachbarten Proteins CPn0146 im Leseraster des Promotors war und der nachfolgende Teilabschnitt von CPn0147 lediglich potentiell exprimiert wird. Jeweils drei Mal wurden unterschiedliche Fragmente der chlamydialen Gene *cpn0467*, *cpn0474*, *cpn1019* und *cpn1054* isoliert. Die Kandidaten *cpn0188*, *cpn0293*, *cpn0413*, *cpn0419*, *cpn0473*, *cpn0564*, *cpn0813*, *cpn0908*, *cpn0965* und *cpn1062* wurden insgesamt jeweils zwei Mal isoliert.

Den stärksten Phloxin B-Phänotyp wiesen Teile der OLR von *cpn0472* und *cpn0809* auf, gefolgt von *cpn0147*. Auch die OLR *cpn0043*, *cpn0130*, *cpn0146*, *cpn0211*, *cpn0266*, *cpn0369*, *cpn0419*, *cpn0439*, *cpn0473*, *cpn0474*, *cpn0798*, *cpn0908*, *cpn0942*, *cpn1019*, *cpn1046* und *cpn1054* wiesen mit einer Phloxin B-Einstufung von 3 einen starken Phänotyp auf. Mit dem einmal isolierten Teilabschnitt des OLR von CPn0572 wurde auch die Positivkontrolle im Screening identifiziert, zeigte jedoch eine schwächere Phloxin B-Einstufung als das Vollängenkonstrukt.

#### 4.1.1 Was ist über die potentiellen Effektorkandidaten bisher bekannt?

Mit Hilfe der KEGG-Datenbank (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>) wurde den Effektorprotein-Kandidaten, falls möglich, eine potentielle Funktion zugewiesen. Die vorhergesagte Funktion beruht auf Homologievergleichen zu bekannten Proteinen. Die vorhergesagten Funktionen lassen sich in Funktionsklassen einteilen (Abbildung 8). In die Gruppe „Metabolismus“ (im Diagramm in

grün dargestellt) gehören z.B. Proteine, die an der Peptidoglykansynthese beteiligt sind oder im Aminosäurestoffwechsel eine Rolle spielen. 12 % der Kandidaten konnten in diese Funktionsklasse eingeteilt werden. Drei der potentiellen Effektorproteinkandidaten wurden funktionell in die Gruppe „Proteinsekretion“ (rot dargestellt) eingeordnet. Dabei handelt es



**Abbildung 8: Funktionsvorhersage der Kandidaten**

Einteilung der in der KEGG-Datenbank vorhergesagten Funktion der Kandidaten in Funktionsklassen. Proteine, über deren Funktion in der Datenbank nicht bekannt ist, wurden als hypothetisch eingestuft und sind in blau dargestellt.

aus dieser Gruppe ist CPn0564, dem eine Rolle in der Protein-Translokation, SecA-Regulierung und Freisetzung von Präproteinen nach der Translokation durch die Zytoplasmamembran vorhergesagt wird. Das dritte Sekretions-Protein ist CPn0815, welches als „general secretion protein D“ (gspD) annotiert ist und eine Rolle im Typ-II-Sekretionssignalweg spielen soll. Zu der Gruppe „Transport“ (im Diagramm gelb, 6 % der Kandidaten) gehören Sulfat-Transporter, ABC-Transporter und allgemeine Oligopeptid-transportierende Proteine. Unter „DNA /RNA-Metabolismus“ (orange, ebenfalls 6 % der Kandidaten) fallen, die z.B. Primasen und Polymerasen. Das *C. pneumoniae* Tarp-Homolog CPn0572 bildet den einzigen Vertreter der Gruppe „Aktin-Modulierung“ (lila), auch wenn es in der KEGG-Datenbank noch als hypothetisches Protein annotiert ist, da seine Funktionsweise weitestgehend aufgeklärt, wenn auch noch nicht publiziert ist. CPn0572 wurde von Dr. Rafat Zrieq charakterisiert und remodelliert Aktin für die Internalisierung des infektiösen EBs (Zrieq, 2009).

Bei über 60% der Kandidaten (29/47) ergab die KEGG-Analyse keinerlei Funktionsvorhersage, diese Proteine wurden daher als hypothetisch eingestuft.

CPn0146 und CPn0147 werden in der KEGG-Datenbank als hypothetische Proteine geführt, wurden aber bereits als chlamydiale Inc-Proteine beschrieben, die schon in der frühen Infektionsphase (bis 24 hpi) in der Inklusionsmembran detektiert werden konnten (Luo, Liu et al. 2007). Das *C. pneumoniae*-Homolog des beschriebenen Inklusionsmembran-assoziierten

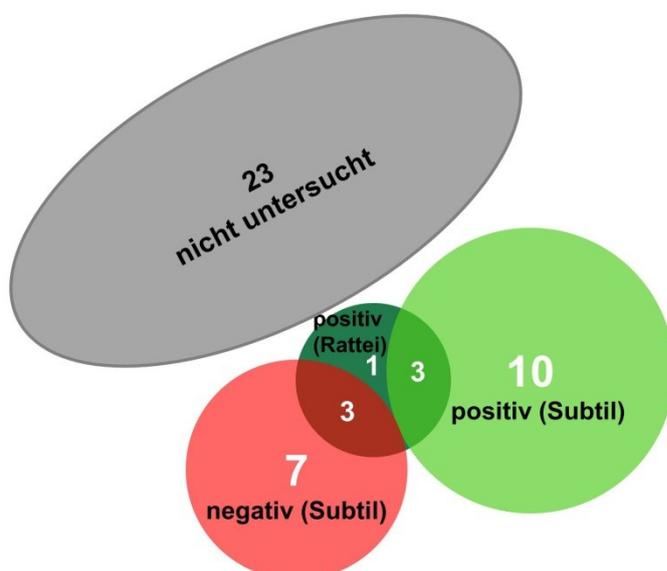
sich zum einen um CPn0467 (pmp16), einen Vertreter aus der Klasse der Pmp-Proteine (polymorphic outer membrane proteins), bei denen es sich um vorhergesagte Autotransporter handelt, die auf der Oberfläche der Bakterien eine Rolle in der Adhäsion spielen (Henderson and Lam 2001; Wehr, Brinkmann et al. 2004; Molleken, Schmidt et al. 2010). Der zweite Kandidat

Effektors Cap1, CPn0648, wurde ein Mal im Screening isoliert (Fling, Sutherland et al. 2001; Balsara, Roan et al. 2006). Bei CPn0809, das zusammen mit CPn0472 die höchste Frequenz und den stärksten Wachstumsdefekt zeigte, handelt es sich um ein bereits publiziertes Effektorprotein, über dessen Funktion während der Infektion jedoch nichts bekannt war (Lugert, Kuhns et al. 2004).

#### 4.1.1.1 Viele der Kandidaten verfügen über ein vorhergesagtes N-terminales Sekretionssignal

Bisher bekannte chlamydiale Effektorproteine werden häufig über das Typ III-Sekretionssystem in die Wirtszelle eingeschleust. Für diesen Transportweg verfügen die Effektoren über ein N-terminales Sekretionssignal. Die Liste der Kandidaten wurde daher mit den Daten zur Sekretionsvorhersage der Arbeitsgruppe von Dr. Agathe Subtil, Paris, abgeglichen. Zum einen stammten die Daten aus einer Publikation (Subtil, Delevoye et al. 2005), zum anderen wurden neuere Daten dank einer Kooperation mit dieser Arbeitsgruppe und der Arbeitsgruppe um Prof. Thomas Rattei, Wien, auch unpubliziert zur Verfügung gestellt. Von den 47 gefundenen Kandidaten waren insgesamt 24 von einer oder beiden Arbeitsgruppe analysiert worden (Abbildung 9). Von den 13 Kandidaten, deren N-Terminus im heterologen Sekretionssystem der Arbeitsgruppe Subtil zur Sekretion des Reporterproteins führten, waren drei Kandidaten auch laut bioinformatischer Vorhersage der Arbeitsgruppe Rattei positiv für ein Sekretionssignal (CPn0211, CPn0809 und CPn1019). Insgesamt waren 7 der Kandidaten durch die Bioinformatik als sekretiert vorhergesagt, drei dieser Kandidaten zeigten aber im heterologen Sekretionssystem keine Sekretion des Reporterproteins (CPn0072, CPn0467 und CPn0472). Insgesamt wurden von allen 23 getesteten Kandidaten zehn im heterologen Sekretionssystem als nicht-sekretiert befunden, hierzu zählen neben den zuvor genannten noch CPn0188, CPn0293, CPn0456, CPn0473, CPn0908, CPn0912 und CPn1046. CPn0572 wurde im heterologen System nicht analysiert,

konnte von Dr. Rafat Zrieq aber bereits als sekretiert nachgewiesen werden (Zrieq, 2009).



**Abbildung 9: Diagramm der Sekretionsvorhersage der isolierten Kandidaten**

Basierend auf den von den Arbeitsgruppen Subtil und Rattei zur Verfügung gestellten Daten zur Sekretionsvorhersage ist die Verteilung der 24 Effektorkandidaten des Screenings dargestellt, für die bisher Aussagen zur Sekretion gemacht werden konnten. Positive Aussagen zur Sekretion sind grün dargestellt, negative rot, überlappende Bereiche in Mischfarben.

#### 4.1.1.2 Viele Kandidaten weisen die typischen Charakteristika von Inc-Proteinen auf

Die Listen der nach Bannantine und Toh vorhergesagten Inc-Proteine (siehe Einleitung) wurden mit den gefundenen Kandidaten verglichen, um herauszufinden, bei welchem der Kandidaten es sich um ein Inc-Protein handeln könnte (Tabelle 13) (Bannantine, Griffiths et al. 2000; Toh, Miura et al. 2003).

CPn	Sekretions- vorhersage Rattei / Subtil	vorherges. Inc- Proteine (Autor)	Spezies- Spezifität	Transmembran- Domänen (Phobius)
CPn0043	ja	Bannantine, Toh, Dehoux	CPn	2
CPn0072	ja (Rattei), nein (Subtil)	Dehoux	C	3
CPn0130	ja	Bannantine, Toh, Dehoux		2
CPn0146	ja	Bannantine, Toh, Dehoux	CPn	3
CPn0147	nicht getestet	Bannantine, Toh, Dehoux	CPn	2
CPn0181	ja	Dehoux		2
CPn0211	ja	Toh, Dehoux	CPn	2
CPn0266		Toh, Dehoux	CPn	4
CPn0267	ja	Toh, Dehoux	CPn	4
CPn0277	ja	Toh, Dehoux)		2
CPn0369	nicht getestet	Bannantine, Toh, Dehoux	C	2
CPn0439	nicht getestet	Toh		2
CPn0474	ja	Toh, Dehoux	C	8
CPn0554	nicht getestet	Bannantine, Toh, Dehoux	CPn	2
CPn1054	nicht getestet	Toh, Dehoux	C	2

**Tabelle 13: Bioinformatische Vorhersage potentieller Inc-Proteine**

Auflistung der im Screening gefundenen Kandidaten, die in einer oder mehreren Publikationen als Inklusionsmembran-Protein (Inc-Protein) bioinformatisch vorhergesagt sind (Bannantine, Griffiths et al. 2000; Toh, Miura et al. 2003; Dehoux, Flores et al. 2011). In der rechten Spalte ist die vorhergesagte Anzahl an Transmembrandomänen gezeigt, links daneben die Spezies-Spezifität, CPn= *C. pneumoniae*-spezifisch, C= Chlamydia-spezifisch. Die Sekretionsvorhersage bezieht sich wiederum auf die Daten von Subtil und Rattei (siehe voriger Abschnitt), nicht getestet bedeutet in den Analysen von Subtil nicht untersucht und kein bioinformatisch vorhersagbares Sekretionssignal in den Analysen von Rattei. Die Vorhersagen der Transmembrandomänen erfolgten mit Phobius, (<http://phobius.sbc.su.se/>), einem Programm des „Stockholm Bioinformatics Centre“.

2011 erschien eine weitere Publikation mit *in silico* Vorhersagen für Inc-Proteine verschiedener chlamydialer Spezies (Dehoux, Flores et al. 2011). In dieser Studie legten die Autoren nicht, wie Toh, das Hauptkriterium auf die Lage der Transmembranbereiche, sondern auf die Größe des zwischen zwei Transmembranbereichen liegenden Loops.

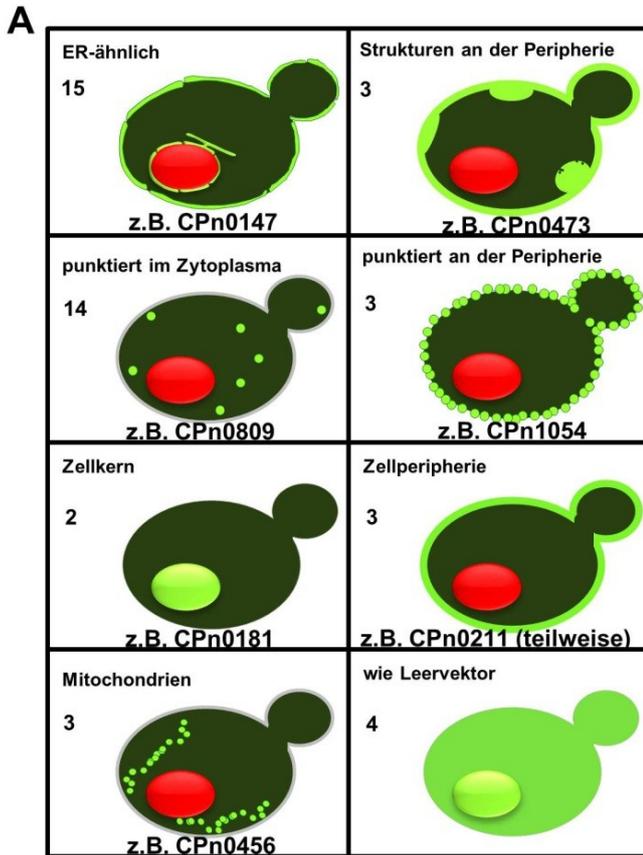
Da dieser bei bekannten Inc-Proteinen maximal 22 AS umspannte, wurde die Obergrenze auf 30 AS festgelegt. Auch diese vorhergesagten Inc-Proteine wurden mit der Liste der Kandidaten abgeglichen. Die übereinstimmenden Kandidaten sind zusammen mit ihrer Sekretionsvorhersage (siehe voriger Abschnitt), ihrer Spezies-Spezifität und der Anzahl ihrer Transmembranhelices aufgelistet (Tabelle 13). Wie zu erwarten besitzen alle potentiellen Inc-Proteine mindestens zwei Transmembranhelices und sind häufig *C. pneumoniae*-spezifisch. Interessant sind hier die Kandidaten, die laut Phobius mehr als zwei Transmembranhelices besitzen. Nach den Kriterien von Toh kann es sich nur dann um Inc-Proteine handeln, wenn die anderen hydrophoben Bereiche ebenfalls eine zweiblättrige Inc-Struktur bilden. So ist zu erklären, dass CPn0072 mit drei Transmembranhelices nur von Dehoux als Inc-Protein vorhergesagt ist, nicht aber von Toh. CPn0146 hat nach Phobius ebenfalls drei Transmembranhelices, mit dem von Toh verwendeten Kyte-Doolittle-Algorithmus verfügt es jedoch nur über zwei Transmembranhelices (Kyte and Doolittle 1982). Bei insgesamt 15 der isolierten 47 OLR handelt es sich um potentielle Inc-Proteine.

#### **4.1.2 Die Kandidaten zeigen unterschiedliche Lokalisierungsmuster in Hefezellen**

Um Hinweise auf mögliche eukaryotische Zielstrukturen der potentiellen Effektorproteine zu erhalten, sollten alle 47 Kandidaten als Vollängen-GFP-Fusionen in den Vektor pUG34 kloniert werden, um ihre subzelluläre Lokalisierung in der Hefe zu untersuchen. Ein Kandidat (CPn0043) konnte nicht kloniert werden. CPn1054 wurde aufgrund eines N-terminalen poly-C-Abschnitts erst ab AS 14 kloniert. Die Klonierungen wurden von Dr. Anne Kerres, Frau Irina Volfson und mir durchgeführt. Die Mikroskopie der Hefezellen, die die GFP-Fusionsproteine exprimierten, wurde von Frau Dr. Anne Kerres durchgeführt. CPn0572 wurde nicht analysiert, da bekannt war, dass das GFP-Fusionsprotein mit dem Hefe-Aktin-Zytoskelett kolokalisiert (Zrieq, 2009).

Viele der Kandidaten zeigten ein ähnliches Lokalisierungsmuster und wurden daher von Frau Dr. Kerres in Lokalisierungsgruppen eingeordnet (Abbildung 10). 15 der Kandidaten zeigen ein Signal um den Zellkern herum und an der Zellperipherie, als auch in tubulären Strukturen, die ins Zytoplasma ragen (Abbildung 10 B am Beispiel von CPn0147). Dies ist ein typisches Muster für eine ER-Lokalisierung. Diese Kandidaten wurden demnach in die Gruppe der „ER-ähnlichen“ Lokalisierung eingeordnet. Jeder der Kandidaten, der wahrscheinlich im ER der Hefe lokalisierte, wies mindestens eine vorhergesagte

Transmembrandomäne auf. Von den 15 Kandidaten, die nach Bannantine, Toh oder Dehoux als Inc-Proteine eingestuft wurden, zeigten acht eine Lokalisierung im ER der Hefe. CPn0211, ebenfalls als potentielles Inc-Protein vorhergesagt, lokalisierte hingegen an der Zellperipherie und in Strukturen im Zellinneren, aber nicht im ER. CPn0267 und CPn0277, die gleichfalls vorhergesagte Inc-Proteine sind, lokalisierten beide punktiert im Zytoplasma, dasselbe gilt für CPn0474 (Daten im digitalen Anhang). Die Mikroskopie von CPn0809 dient als Beispiel für eine solche punktierte Lokalisierung (insgesamt 14 Kandidaten)(Abbildung 10 B). CPn1054 hingegen, obwohl ebenfalls als Inc-Protein vorhergesagt, zeigte eine punktierte Lokalisierung an der Zellperipherie. Dieses Lokalisierungsmuster trat noch bei zwei weiteren Kandidaten auf: CPn0266, ein ebenfalls als Inc-Protein vorhergesagter Kandidat, und CPn0850, das in der Datenbank als MreB-Protein (Rod-shape determining protein MreB/Hsp70 sugar kinase) annotiert ist. Drei Kandidaten lokalisierten kontinuierlich an der Zellperipherie, und ebenfalls drei schienen mit den Mitochondrien zu kolokalisieren (CPn0456, CPn0746 und CPn1062), die in der DAPI-Färbung in Hefe gut zu erkennen sind (Abbildung 10 B am Beispiel von CPn0456). Interessanterweise zeigten zwei Kandidaten eine Lokalisierung im Zellkern. Dabei handelt es sich um CPn0966, eine annotierte PolyA-Polymerase (pcnB2, zu 54 % homolog zu der PolyA-Polymerase pcnB aus *E. coli*) und CPn0181, wobei CPn0181 eine sehr schwache Fluoreszenz aufwies. CPn0181 zeigt neben dem Kernsignal aber auch punktierte Signale im Zytoplasma und wurde daher beiden Gruppierungen zugeordnet (siehe Abbildung 10 B). Bei CPn0181 handelt es sich nach der Vorhersage von Dehoux außerdem um ein weiteres potentielles Inc-Protein (Dehoux, Flores et al. 2011). CPn0912 lokalisierte ebenfalls punktiert im Zytoplasma, aber zeigte auch ein Signal an der Zellperipherie und wurde deshalb ebenfalls zwei Gruppen zugeteilt. CPn0472 unterschied sich in seiner subzellulären Lokalisierung von allen anderen Kandidaten und konnte daher in keine Kategorie eingeteilt werden. Es lokalisiert in Strukturen im Zellinneren und ähnelt darin CPn0211 (beide dargestellt in Abbildung 10 B), allerdings zeigt CPn0472 kein Signal an der Zellperipherie. Vier Kandidaten ähnelten mit ihrem diffus verteilten GFP-Signal der Lokalisierung von GFP allein. Lediglich drei Kandidaten zeigten kaum Fluoreszenz und konnten daher nicht eingeordnet werden. Frau Dr. Kerres überprüfte in einer weiteren Analyse, ob es Zellzyklus-abhängige Unterschiede in der Lokalisierung gibt, es konnten jedoch keine Unterschiede beobachtet werden. Zusammenfassend konnte durch die Analyse der Subzellulären Lokalisierung in Hefe eine erste Einteilung der Kandidaten vorgenommen werden, die teilweise Rückschlüsse auf mögliche eukaryotische Zielstrukturen zuließ.



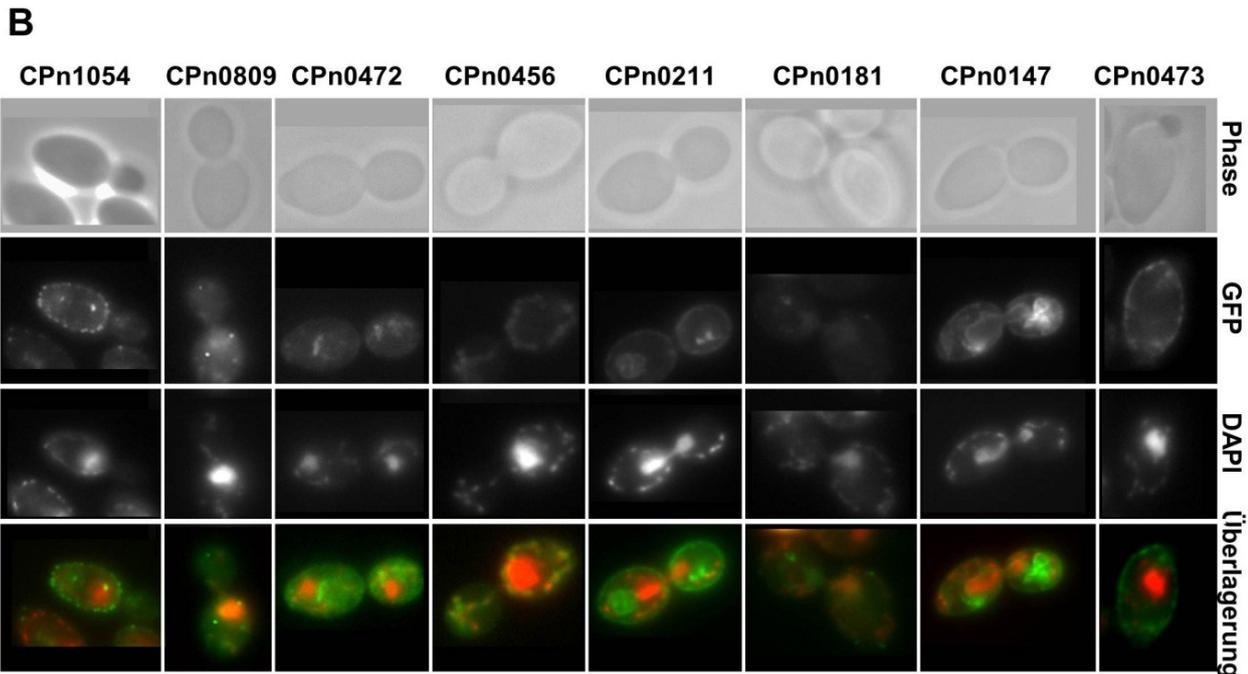
**Abbildung 10: Subzelluläre Lokalisierung der Kandidaten in Hefezellen**

Die Abbildung stammt von Frau Dr. Kerres und wurde von mir modifiziert. Die Mikroskopieanalysen wurden von Frau Dr. Kerres durchgeführt und ausgewertet. Jeweils zwei Transformanten wurden in induzierendem Selektivmedium angezogen, mit einer OD<sub>600</sub> von 0,2 überimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 weiter in Selektivmedium induziert. Der CEN-Vektor pUG34 enthält den Met25-Promoter.

(A) Lokalisierungsmuster der Kandidaten bei Expression als GFP-Fusion in Hefezellen. GFP-Signal (hellgrün), Zellkern (rot), Hefezelle (dunkelgrün). Zahl= Anzahl der Kandidaten in dieser Gruppe.

(B) Beispielhafte Mikroskopie-Aufnahmen der Lokalisierung der Kandidaten. Oberste Zeile = Durchlicht-Mikroskopie, darunter GFP (grün) und DAPI (rot).

Verwendete Plasmide: LV#848, #1498, 1409, 1493, 1491, 1472, 1450, 1447, 1454.

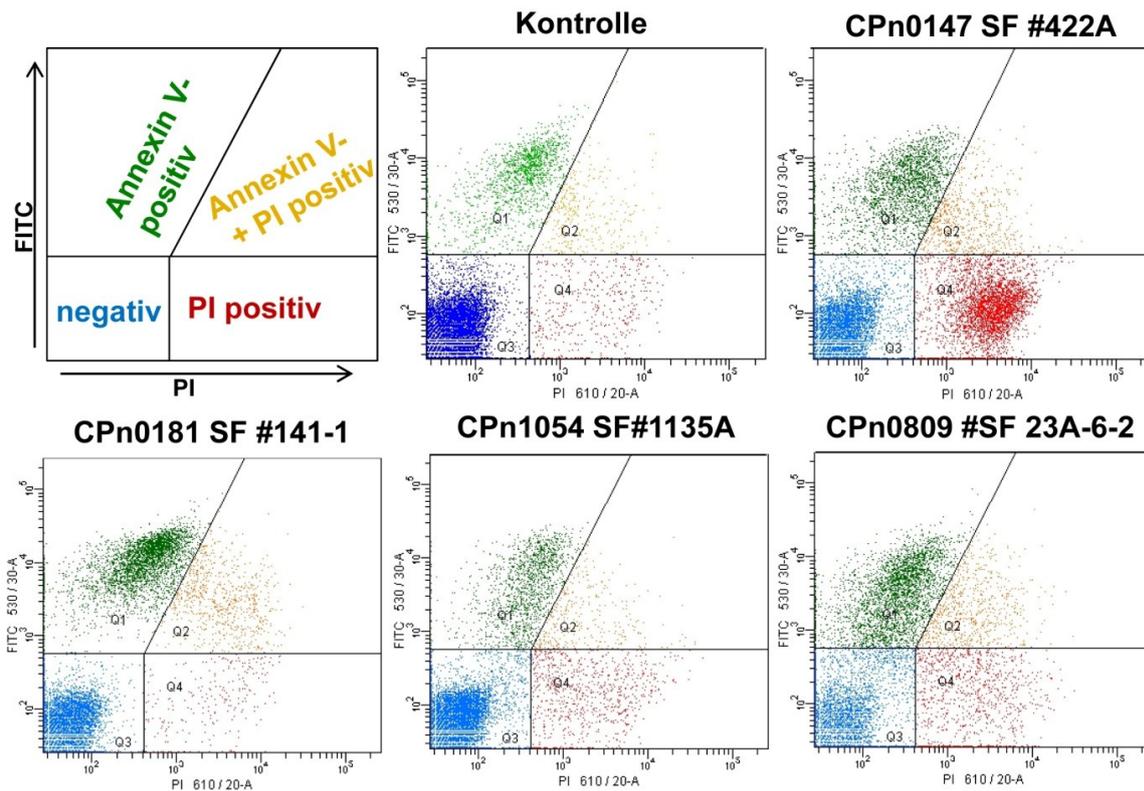


### 4.1.3 Welche Art von Zelltod wird in Hefe verursacht?

Die isolierten Kandidaten zeigten allesamt einen Wachstumsdefekt in Hefe, allerdings sollte überprüft werden, um was für eine Art Zelltod es sich handelt, sollten die Hefezellen tatsächlich aufgrund der Expression eines potentiellen Effektorproteins sterben. Es ist bekannt, dass Hefezellen nicht nur einen nekrotischen, sondern auch einen apoptotischen Zelltod durchlaufen können (Madeo, Frohlich et al. 1997). Ein früher Marker für Apoptose ist die Externalisierung von Phosphatidylserin auf die Zelloberfläche, welches normalerweise auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran lokalisiert. (Martin, Reutelingsperger et al. 1995). Um zu analysieren, um welche Art von Zelltod es sich handelt, wurde ein Hefe-Apoptose/Nekrose-Assay wie unter 3.1.3.2 beschrieben durchgeführt. Für diesen Assay wurden die im Screening isolierten Plasmide der 47 Kandidaten verwendet. Von jedem Effektor-Kandidaten, der mehrmals isoliert wurde, wurde ein repräsentatives Plasmid ausgewählt (große Abdeckung des OLR und/oder starker Phänotyp). Die Plasmide wurden in den Hefestamm YUG37 transformiert und die Proteinexpression für ca. 14 Stunden induziert, anschließend wurden die Zellen gefärbt. Die Auswertung erfolgte durch Herrn Klaus Meyer mit dem FACSAria Durchflusszytometer (BD FACSAria, Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung).

Da auch in einer wildtypischen Hefekultur Zellen apoptotisch oder nekrotisch sterben, wurden als Kontrolle Hefezellen analysiert, die lediglich den leeren Vektor pRZ7 exprimieren. Die für diese Kontrollzellen ermittelte Verteilung der Fluoreszenzen für Annexin V und Propidiumiodid wurden von den ermittelten Werten der zu analysierenden Klone subtrahiert. Schon für eine wildtypisch wachsende, logarithmische Hefekultur zeigte sich ein relativ hoher Anteil (20-30 %) an Zellen, die entweder Annexin V-positiv, Propidiumiodid-positiv oder beides sind (Abbildung 11, Kontrolle). Der Apoptose-Assay wurde aufgrund des hohen Zeitaufwands an drei unterschiedlichen Tagen mit jeweils einem Drittel der Kandidaten durchgeführt, so dass drei unterschiedliche Datensätze generiert wurden. Die Kontrollmessungen dieser Datensätze unterschieden sich, so dass von einem Datensatz mit den dazugehörigen Kontrollen nur die prozentualen Werte mit anderen Datensätzen zu vergleichen sind, wobei die Kontrollen jeweils auf 0 % gesetzt wurden.

Mit dem isolierten Screenkandidaten 422A, der den mittleren Bereich des OLR von CPn0147 codiert und damit hauptsächlich den hydrophoben Teil des Proteins, konnte ein Konstrukt identifiziert werden, welches dazu führt, dass Hefezellen hauptsächlich nekrotisch sterben. Im Gegensatz dazu zeigt der Kandidat #141-1, der fast den gesamten OLR von CPn0181 codiert, einen apoptotischen Phänotyp in Hefezellen. Es gab aber auch einige Kandidaten, die im Apoptose-Assay, im Gegensatz zu ihrem Phloxin B-Phänotyp, keine oder nur eine leichte induzierte Letalität zeigten. Zu dieser Gruppe gehört das untersuchte Screenplasmid 1135A, welches den N-Terminus von CPn1054 codiert. Dieser Kandidaten zeigte sogar



**Abbildung 11: FACS-Dotplot-Darstellungen des Hefe-Apoptose-Assays**

Gezeigt sind repräsentative Dotplot-Darstellungen des Hefe-Apoptose-Assays. X-Achse: Propidiumiodid-Fluoreszenz; Y-Achse: FITC-Fluoreszenz. Annexin V-positive Populationen sind grün gefärbt, Propidiumiodid-positive rot und PI- und Annexin V-positive Populationen sind orange dargestellt. Populationen ohne Fluoreszenz sind blau eingefärbt. Oben links ist schematisch dargestellt, welche Zellen die eingegrenzten Populationen repräsentieren. Hierzu wurde die Fluoreszenz von Hefezellen bestimmt, die nicht gefärbt wurden (Autofluoreszenz), oder die nur mit Annexin V-FITC oder nur mit Propidiumiodid gefärbt wurden. Von jedem Konstrukt wurden zwei Klone getestet und die prozentualen Werte gemittelt (siehe auch Tabelle im digitalen Anhang).

ÜN-Kulturen von jeweils zwei Transformanten in selektivem induzierendem Medium wurden überimpft und bis zu einer  $OD_{600}$  von 1 weiter induziert. Jeweils 1 OD Zellen wurde für die Analyse verwendet.

etwas weniger Annexin V- und Annexin V+PI-positive Hefezellen als die Leervektorkontrolle. Nur der Wert der PI-positiven Zellen war für SK #1135A leicht erhöht. Dieser Phänotyp wurde als „leicht-nekrotisch“ bezeichnet. Der Phänotyp von Kandidaten, die keinerlei erhöhte Letalität in diesem Assay verursachten, wurde als „negativ“ bezeichnet (Tabelle im digitalen Anhang). Das Screenplasmid #23A-6-2, welches fast den kompletten C-Terminus von CPn0809 codiert, inklusive der zwei vorhergesagten Transmembrandomänen, zeigte sowohl erhöhte Werte für die Annexin V-positive Population, als auch für die doppelt positive und die Propidiumiodid-positive Population. Ein solcher Phänotyp wurde als „tot“ eingeordnet, da eine genauere Einstufung nicht möglich war.

Da die in diesem Assay ermittelten Daten im Vergleich zu den Kontrollen leichten Schwankungen unterworfen waren, wurden nur die Kandidaten berücksichtigt, die einen sehr deutlichen Phänotyp zeigten. Die Daten aller 47 Kandidaten befinden sich im digitalen Anhang. Die ermittelten prozentualen Werte wurden in Abstufungen eingeteilt (+/- 1% um Kontrolle; 1-2 % Erhöhung gegenüber der Kontrolle; 2-3 % Erhöhung gegenüber der Kontrolle, 3-6% Erhöhung gegenüber der Kontrolle, 6-15 % Erhöhung gegenüber der Kontrolle und mehr als 15 % Erhöhung gegenüber der Kontrolle). In Tabelle 14 sind alle analysierten Kandidaten aufgelistet, die gegenüber der Leervektor-Kontrolle eine Erhöhung von mindestens 6 % innerhalb der eingegrenzten Population gegenüber der Kontrolle zeigten.

Den auffälligsten Phänotyp in diesem Assay zeigte das Screenplasmid von CPn0809. Neben einer deutlichen Erhöhung der Anzahl der Annexin-positiven und doppelt-positiven Zellen von 22,5 % bzw. 29,05 % war auch die Anzahl der PI-positiven Zellen erhöht. CPn1019 und CPn0147 folgen an zweiter und dritter Stelle mit einer Erhöhung der Anzahl der doppelt-positiven Zellen um 21,5 % und einer ebenfalls deutlichen Zunahme der PI-positiven Zellen (18 bzw. 15 %). An vierter Stelle findet sich CPn1070 mit einer deutlichen Erhöhung von knapp 19 % der doppel-positiven und 16 % der PI-positiven Zellen.

Konstrukt Nr.	OLR	[%] Annexin V	[%] beides	[%] PI	Phloxin	Schlussfolgerung
454-2	<i>cpn0146</i>	3,6	15,4	11,8	3	nekrotisch
422A	<i>cpn0147</i>	3,45	21,5	18,05	3	nekrotisch
141-1	<i>cpn0181</i>	8,5	10,45	1,95	2-3	apoptotisch
449A	<i>cpn0188</i>	8,7	12,35	3,65	2-3	apoptotisch
1364-1	<i>cpn0263</i>	5,25	7,15	1,9	2	apoptotisch
445	<i>cpn0419</i>	0,3	9,7	9,4	3	nekrotisch
109A-1	<i>cpn0473</i>	-1,8	8,2	9,9	2	nekrotisch
32B-4	<i>cpn0474</i>	3,2	7,2	4,0	2-3	tot
119c-3	<i>cpn0648</i>	5,5	9,6	4,1	2	tot
23A-6-2	<i>cpn0809</i>	22,5	29,05	6,55	3	tot
1134-1	<i>cpn0908</i>	6,6	7,25	0,65	3	apoptotisch
332	<i>cpn0942</i>	6,95	8,75	1,8	3	apoptotisch
1206A-7	<i>cpn0966</i>	4,75	7,45	2,7	1	tot
1367	<i>cpn1019</i>	6,25	21,55	14,7	3	tot
1365	<i>cpn1070</i>	2,95	18,95	16	1-2	nekrotisch

**Tabelle 14: Liste der Kandidaten mit deutlichem Phänotyp im Hefe-Apoptose-Assay**

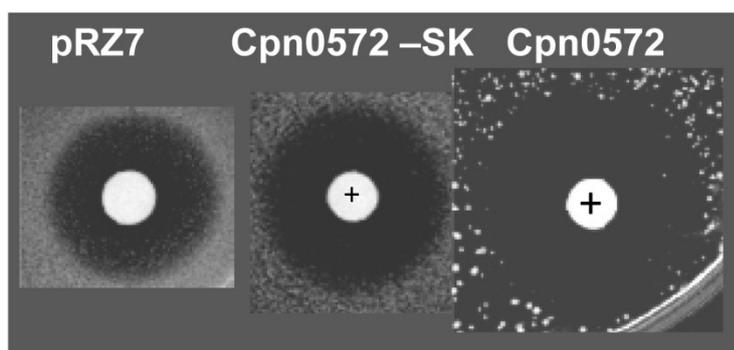
Aufgelistet sind alle Kandidaten, die einen deutlichen Phänotyp (mind. 6 % Erhöhung gegenüber WT) im Apoptose-Assay zeigten. Die Spalte „Konstrukt Nr.“ beinhaltet die Nummer des isolierten und hier verwendeten Screenplasmids, gefolgt von der Spalte mit den codierten OLR, daneben die prozentualen Werte der Populationen nach Abzug der prozentualen Werte der Leervektor-Populationen. Die Spalte „Phloxin“ zeigt die Einstufung des Phloxin-Phänotyps des Screenplasmids in Hefe und die letzte Spalte gibt die Einstufung dieses Konstrukts im Hefe-Apoptose-Assay wieder.

Für insgesamt fünf untersuchte Screenplasmide konnte die Induktion eines apoptotischen Phänotyps festgestellt werden: CPn0181, CPn0188, CPn0263, CPn0908 und CPn0942. Einen nekrotischen Phänotyp verursachten die Plasmide mit Teilen der OLR von CPn0146, CPn0147, CPn0419, CPn0473 und CPn1070. Die Plasmide, die Genabschnitte von CPn0474, CPn0648, CPn0809, CPn0966 und CPn1019 tragen, zeigten bei allen Populationen deutliche Erhöhungen und sind somit nicht eindeutig einem Phänotyp zuzuordnen, aber dennoch sehr letal für die Hefezellen. Sie wurden somit als tödlich charakterisiert. Insgesamt konnten mit Hilfe dieses Assays einige Kandidaten identifiziert werden, die in Hefe einen apoptotisch Letalitäts-Phänotyp auslösten und somit potentiell auch in der Humanzelle die Apoptose induzieren könnten.

#### 4.1.4 Hat die Expression der Kandidaten in Hefe Auswirkungen auf das Aktin-Zytoskelett?

Das Aktin-Zytoskelett ist essentiell für die Lebensfähigkeit der Zelle. Außerdem verändern viele intra- als auch extrazelluläre pathogene Bakterien das Aktin-Skelett der Wirtszelle, um zum Beispiel die Adhäsion oder die Internalisierung zu erleichtern, oder um sich innerhalb der Zelle zu bewegen. Aktin ist somit ein wichtiges zelluläres Zielmolekül potentieller Effektoren. Mit Hilfe des Latrunculin B Assays, der in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Anne Kerres durchgeführt wurde, sollte der Einfluss der Kandidaten auf das Aktin-Zytoskelett der Hefe untersucht werden. Latrunculin B ist ein marines Toxin und bindet Aktin-Monomere, so dass die Polymerisation von Aktin-Filamenten gestört wird. Latrunculine haben hingegen keinen Einfluss auf die Mikrotubuli (Spector, Shochet et al. 1983).

Von allen Kandidaten des Screenings wurde jeweils ein isoliertes Screenplasmid in Doppelbestimmung im Latrunculin B-Assay analysiert (wie unter 3.1.3.7 beschrieben). Ein



verkleinerter Hemmhof im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle (pRZ7) deutet auf eine Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts durch die Expression des Kandidaten hin. Eine Vergrößerung des

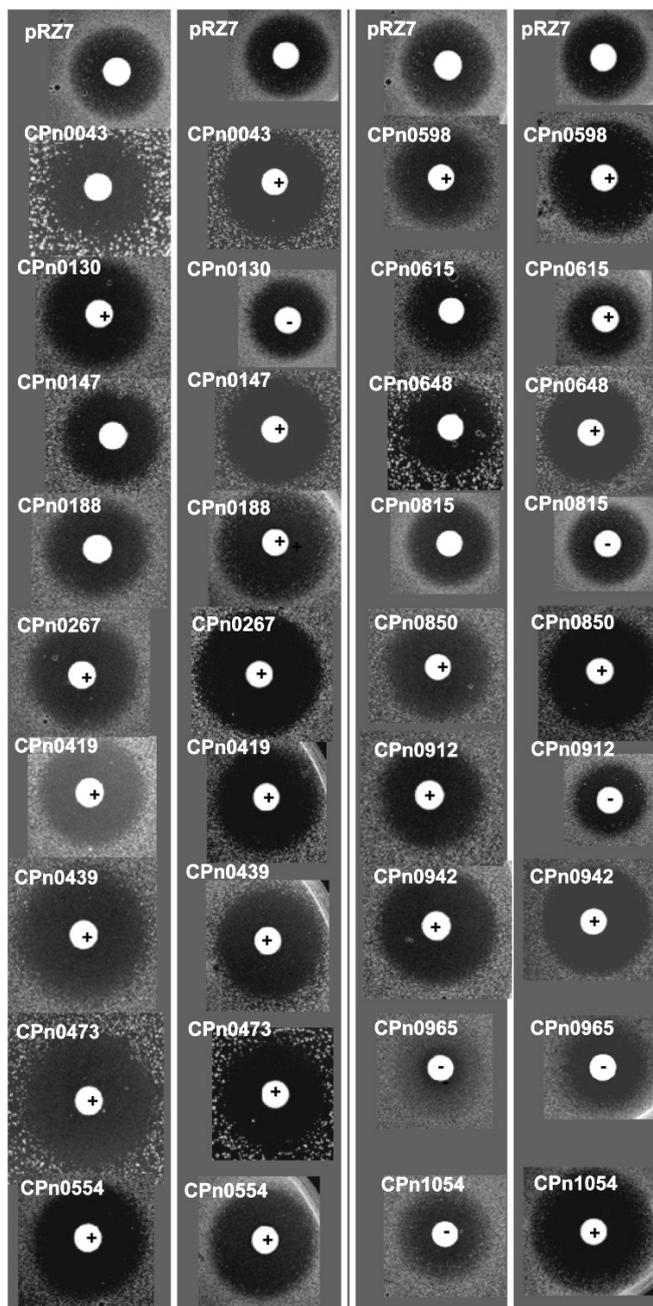
**Abbildung 12: Latrunculin B-Assay des Aktin-modulierenden Proteins CPn0572**

Die Transformanten wurden üN in induzierendem Selektivmedium angezogen, überimpft und bis zu einer OD von maximal 1 weiter induziert und auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 verdünnt. Die Zellen wurden dann in flüssiger Agarlösung auf induzierende Selektivmedium-Platten gegossen. Auf die Filterplättchen wurde DMSO bzw. 2mM Lat B in DMSO aufgebracht und die Platten wurden für 2-3 Tage inkubiert.

Rechts neben der Leervektorkontrolle (pRZ7) befindet sich das Ergebnis des Latrunculin B-Assays für Hefezellen, die das im Screen isolierte Teilstück von CPn0572 exprimieren, daneben das Resultat bei Expression des Vollängen-Proteins CPn0572.

Hemmhofs, wie Dr. Rafat Zrieq ihn für die Expression von CPn0572 in Hefe beobachten konnte, deutet auf eine Destabilisierung des Aktin-Zytoskeletts hin (Abbildung 12). Das im Screen isolierte Teilstück des *cpn0572*-OLR zeigte im Vergleich zum Volllängenprotein eine schwächere Latrunculin B-Sensibilität.

Kandidaten, die im ersten Versuch einen Phänotyp zeigten, wurden ein weiteres Mal im Latrunculin B-Assay untersucht (Abbildung 13). Ein reproduzierbar kleinerer Hemmhof konnte nur für CPn0965 gefunden werden. Ein bei beiden Analysen größerer Halo war für CPn0267, CPn0419, CPn0439, CPn473, CPn0554, CPn0598, CPn0850 und CPn0942 zu beobachten. Bei diesen Kandidaten könnte es sich also um Aktin-modulierende Proteine handeln. CPn0130, CPn0912 und CPn1054 zeigten bei den beiden Versuchen ein gegensätzliches Verhalten, so dass hier weitere Analysen notwendig sind.



Frau Dr. Kerres überprüfte alle GFP-Fusionskonstrukte auch auf eine Kolkalisierung mit dem Aktin-Zytoskelett der Hefe, konnte aber für keinen der Kandidaten eine Kolkalisierung beobachten, so dass den Ergebnissen des Latrunculin B Assays auch im Hinblick auf das gegensätzliche Verhalten einiger Kandidaten und den nicht zu reproduzierenden Phänotyp einiger anderer Kandidaten eine geringere Gewichtung gegeben wurde. Dennoch konnte für einige Kandidaten ein, wenn auch schwach ausgeprägter, Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett der Hefe gezeigt werden.

**Abbildung 13: Latrunculin B-Assay in Hefe**

Gezeigt sind die Ergebnisse aller Kandidaten, die in der ersten Analyse eine veränderte Hemmhofgröße im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen und daher noch ein weiteres Mal analysiert wurden. Die Resultate der ersten und der zweiten Analyse sind nebeneinander abgebildet. In der obersten Zeile befindet sich jeweils die Leervektor-Kontrolle für die gesamte Spalte. Ein '+' steht für einen größeren Halo als bei der Kontrolle, ein '-' kennzeichnet einen verkleinerten Halo. Nicht gekennzeichnete Hemmhöfe zeigen keinen Unterschied zur Kontrolle.

## 4.2. Auswahl der interessantesten Kandidaten

Von den 47 Kandidaten, die im Screening identifiziert wurden, konnten nicht alle weiter analysiert werden, da die Generierung von Antikörpern, die zwingend notwendig für die weitere Analyse war, zeit- und kostenintensiv ist. Daher wurde festgelegt, sechs potentielle Effektorproteine für die vorliegende Arbeit weiter zu untersuchen.

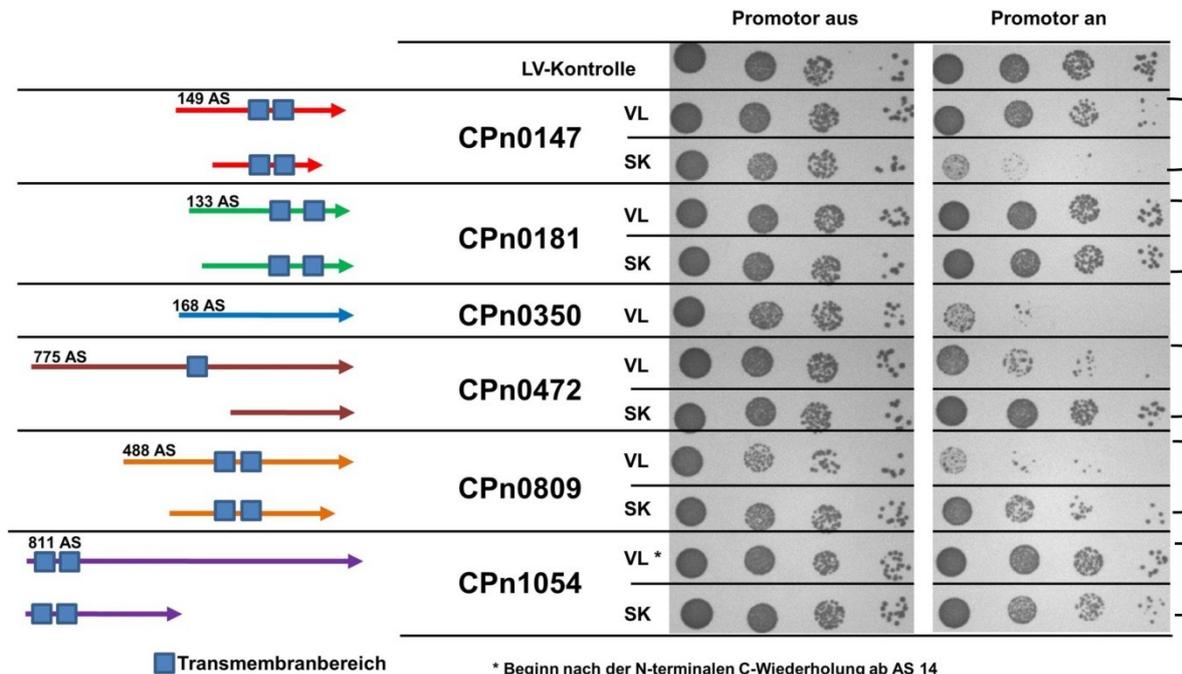
Kriterien für die Auswahl waren unter anderem eine repräsentative Lokalisierung in Hefe, ein starker Wachstumsdefekt in Hefe, eine hohe Frequenz im Screening und eine positive Sekretionsvorhersage. Letztendlich wurden die Effektorkandidaten CPn0147, CPn0181, CPn0472, CPn0809 und CPn1054 ausgewählt. Außerdem wurde noch ein weiterer chlamydialer OLR, *cpn0350*, als zusätzlicher Kandidat analysiert, der in einem Kandidatenbasierten Ansatz aufgrund seines starken Hefephänotyps bereits zuvor im Labor identifiziert worden war. Gegen diese sechs Kandidaten wurden Antikörper generiert, um damit u.a. die Lokalisierung in der Infektion zu untersuchen.

### 4.2.1 Die ausgewählten Kandidaten verursachen unterschiedlich starke Wachstumsdefekte in Hefezellen

Die ausgewählten Kandidaten verursachten alle einen Letalitäts-Phänotyp in Hefe. Dieser sollte allerdings genauer quantifiziert und des Weiteren sollte der Einfluss der Volllängen-OLR im Vergleich zu den isolierten Screenplasmiden untersucht werden.

Von den fünf ausgewählten Kandidaten des Screenings wurde jeweils ein isoliertes Screenplasmid, welches auch schon zuvor im Latrunculin B-Assay und Hefe-Apoptose-Assay analysiert worden war, und das Volllängen-Gen im gleichen Vektor in einem seriellen Verdünnungstropftest analysiert. *Cpn1054* konnte nicht komplett kloniert werden, da sich 15 Nukleotide nach dem Startkodon eine repetitive Sequenz von 13 Cytosinen befindet, welche nicht korrekt amplifiziert werden konnte. Daher wurde eine verkürzte Version kloniert, die hinter dieser Sequenz bei Nukleotid 40 beginnt. Das korrespondierende Screenfragment beginnt ebenfalls erst hinter diesem repetitiven Abschnitt. Zusätzlich wurde der komplette OLR von *cpn0350* analysiert (Abbildung 14).

Den stärksten Wachstumsdefekt erzeugte das Screenplasmid von CPn0147, welches beide Transmembrandomänen enthält, sowie die Volllängenproteine von CPn0809 und CPn0350. Sogar auf nicht-induzierendem Medium ist für diese Kandidaten ein leicht vermindertes Wachstum zu beobachten, vor allem im Fall von CPn0809. Dies könnte einerseits durch die 20 stündige Induzierung der Proteinexpression vor dem Tropftest bedingt sein, andererseits ist der Promotor auch unter nicht-induzierenden Bedingungen nicht völlig abgeschaltet, so dass auch die geringen Proteinmengen ausreichen könnten, um das Wachstum der Hefezellen zu beeinträchtigen.



**Abbildung 14: Serieller Verdünnungstropftest der Kandidaten in Hefe**

Links sind schematisch die analysierten Proteine oder Teilstücke der Proteine gezeigt, blaue Kästchen repräsentieren vorhergesagte Transmembranbereiche, die Zahlen geben die Anzahl der Aminosäuren der Vollängenproteine an. Rechts ist der serielle Verdünnungstropftest jedes Kandidaten abgebildet.

Die transformierten Hefezellen des Stamms YUG37 wurden für 20 Stunden induziert und dann auf nicht-induzierendes („Promotor aus“) und induzierendes („Promotor an“) Medium getropft, wobei der erste Tropfen links ca. 10 000 Hefezellen beinhaltet und die Zellkonzentration nach rechts um jeweils eine Zehnerpotenz abnimmt, so dass der letzte Tropfen ca. zehn Zellen enthält. SK = Screenkonstrukt, VL = Volllänge, LV = Leervektor. Alle Konstrukte wurden in den ursprünglichen Screenvektor pRZ7 kloniert (Plasmidnummern: LV #1362, #1410, 1412, 1440, 1492, 1484, 1568).

Die Vollängenkonstrukte unterschieden sich von den isolierten Screenplasmiden teilweise deutlich. So ist im Fall von CPn0147 und (wenn auch schwächer ausgeprägt) CPn1054 die Expression des Screenkonstruktes letaler als das Vollängenprotein. Für CPn0809 und CPn0472 gilt das Gegenteil: Hier führt die Expression des Vollängenproteins zu einem stärkeren Phänotyp als das isolierte Screenfragment. CPn0181 führte hingegen zu keiner sichtbaren Reduktion der Wachstumsfähigkeit im Vergleich zu den Hefezellen, die mit dem leeren Vektor transformiert wurden. Die Ausprägung der durch die Screenkandidaten verursachten Phänotypen unterscheidet sich demnach deutlich.

#### 4.2.2 Analyse des potentiellen Effektorproteins CPn0350

Das hypothetische Protein CPn0350 verursacht bei Expression des Vollängen-OLR einen starken Wachstumsdefekt in Hefe (siehe voriger Abschnitt). Das homologe Protein aus *C. trachomatis*, CT066, zeigte in Untersuchungen von Sisko et al. einen schwachen Wachstumsdefekt in Hefe, aber das GFP-Fusionsprotein lokalisierte im Zellkern von Hefe- und Humanzellen (Sisko, Spaeth et al. 2006). CPn0350 ist ein *Chlamydia*-spezifisches

Protein von 168 AS Länge. CT066 und CPn0350 sind zu 84 % identisch und zu 93 % homolog (Abbildung 15) (Sequenzvergleich mit Multalign, <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>).

Die KEGG-Datenbank lieferte zu CPn0350 keine Treffer für bekannte Domänen oder Motive und es gibt keine paraloge Proteine. In dem heterologen Sekretionssystem von

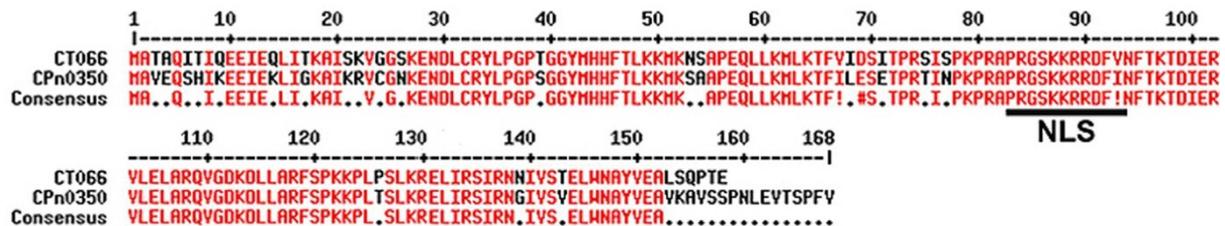


Abbildung 15: Sequenzvergleich von CT066 und CPn0350

Vergleich der Aminosäureabfolge der beiden homologen Proteine CT066 (obere Reihe) und CPn0350 (Mitte) und die resultierende Konsensus-Sequenz. Identische und ähnliche Aminosäuren sind in rot dargestellt. Die Kernlokalisationssequenz an AS-Pos. 83-93 (vorhergesagt mit dem Programm NLS Mapper; [http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS\\_Mapper\\_form.cgi](http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi)) ist mit einem schwarzen Balken markiert. Gleiche oder ähnliche AS sind in rot dargestellt, Punkte in der Konsensussequenz bedeuten Unterschiede. ! = AS I oder V, # = AS D, E, N oder Q.

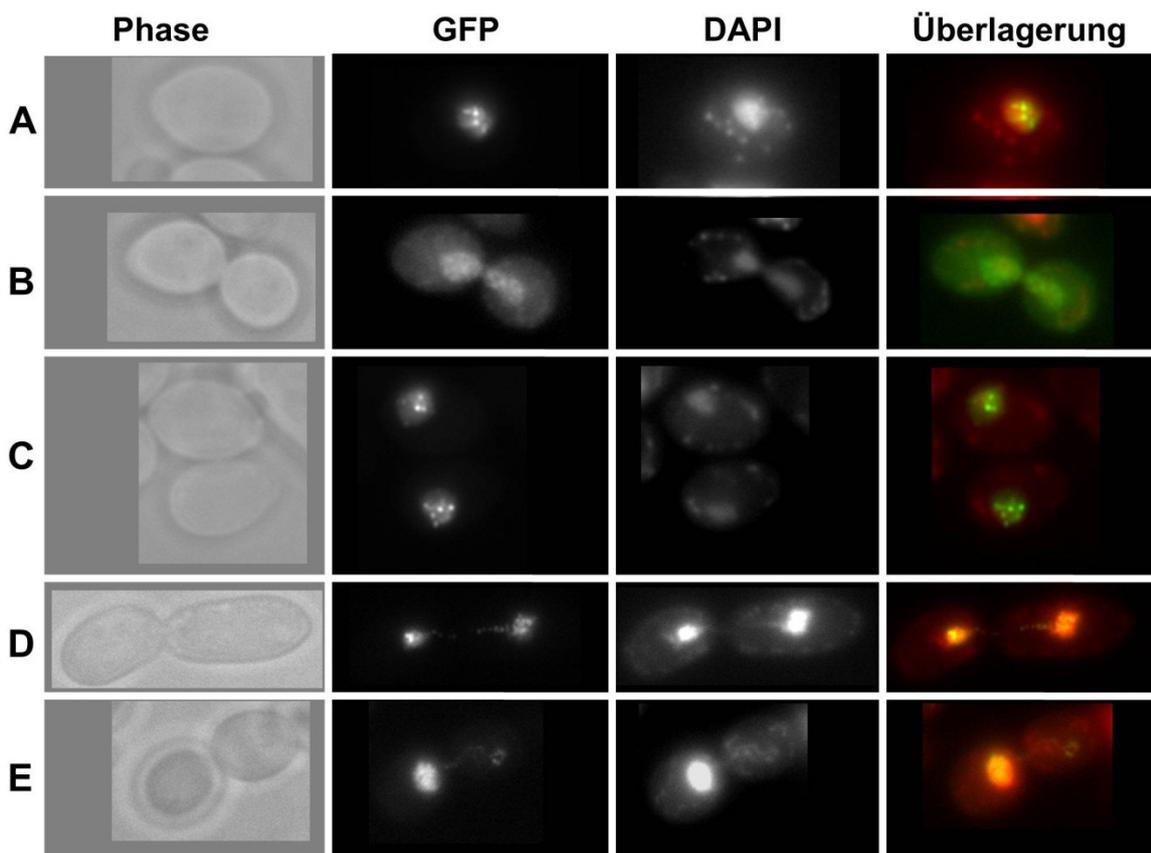
*Shigella flexneri* führte der N-Terminus von CPn0350 nicht zur Sekretion des Reporterproteins, es scheint also kein N-terminales Typ III-Sekretionssignal vorhanden zu sein (Subtil, Delevoye et al. 2005). Aufgrund der beschriebenen Kernlokalisierung von CT066 in der Hefe wurde bioinformatisch nach einer Kernlokalisationssequenz gesucht. Die Aminosäuresequenz PRGSKKRRDF(V/I) an Position 83-93 stellt eine mögliche NLS (nuclear localization site) dar. Proteine dieser Größe können jedoch auch durch Diffusion in den Kern gelangen. Eine generelle Lokalisierungsvorhersage mit SubLoc (<http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/>) ergab für prokaryotische Proteine eine vorhergesagte Lokalisierung im Periplasma und für eukaryotische Proteine eine potentielle Mitochondrien-Lokalisierung. Eine bioinformatische Vorhersage der subnukleären Lokalisierung (Subnuclear Compartments Prediction System, <http://array.bioengr.uic.edu/subnuclear.htm>) ergab eine vorhergesagte Kernlamina-Kolokalisierung. Es handelt sich zudem um ein basisches Protein, so dass eine Bindung an DNA möglich ist.

#### 4.2.2.1 CPn0350 lokalisiert bei ektopischer Expression im Zellkern

Zunächst sollte überprüft werden, wo CPn0350 in der Hefe lokalisiert. Von CPn0350 wurde hierzu ein GFP-Fusionsprotein in den Vektor pUG34 kloniert und in Hefe exprimiert. Das Fusionsprotein kolokalisiert mit der mit DAPI gefärbten DNA der Hefezelle (Abbildung 16). Zum Teil ist eine punktierte subnukleäre Lokalisierung zu erkennen (Abbildung 16 A, C und

D), die im DAPI-Signal nicht zu erkennen ist, außerdem ist das GFP-Signal manchmal größer als das DAPI-Signal (Abbildung 16 B und C). Unklar ist, ob sich das GFP-Signal damit außerhalb der Kernmembran befindet. Manchmal sind fadenartige Fortsätze zu erkennen, die vom Haupt-Signal aus in die Tochterzelle reichen und auch in der DAPI-Färbung zu erkennen sind (Abbildung 16 D und E). Die Mikroskopie der CPn0350-exprimierenden Hefezellen wurde von Frau Dr. Anne Kerres durchgeführt. Sie versuchte auch, eine Immunpräzipitation zur Identifizierung potentieller Interaktionspartner mit diesen Zellen mit Hilfe eines GFP-Antikörpers, dies führte jedoch zu keinem Ergebnis. Es bleibt daher unklar, um welche Struktur genau es sich handelt, mit der CPn0350 im Zellkern kolokalisiert.

Die ektoische Expression von CPn0350 in humanen HEK293 Zellen bestätigte die Beobachtungen aus der Hefe. CPn0350 lokalisierte auch in Humanzellen im Zellkern (Abbildung 17). Interessanterweise bleibt diese Lokalisierung auch während der Mitose erhalten, wie auf den mittleren Bildern zu sehen ist. Die Kernlamina, die als mögliche

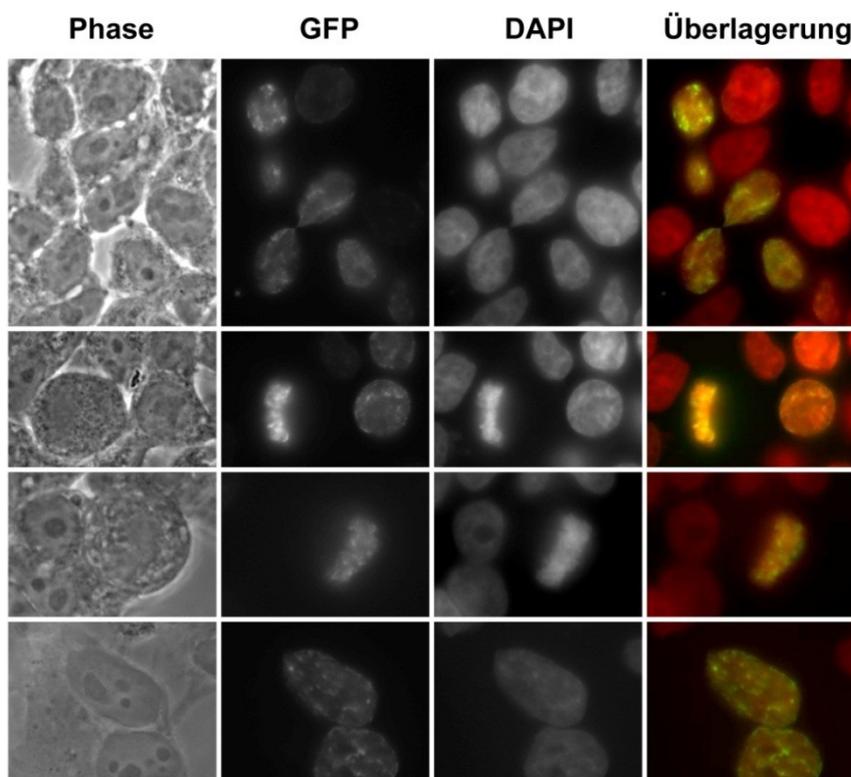


**Abbildung 16: Mikroskopie der subzellulären Lokalisierung von CPn0350 in Hefe**

Eine  $\bar{u}N$ -Kultur in induzierendem Selektivmedium wurde in frisches Medium überimpft und für weitere 4 Std induziert; anschließend wurden die Zellen lebend mit DAPI gefärbt und dann fixiert. GFP befindet sich N-terminal an CPn0350 fusioniert, das Fusionsgen befindet sich unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors.

Gezeigt sind verschiedene Mikroskopie-Aufnahmen. In der linken Spalte ist jeweils die Durchlicht-Mikroskopie zu sehen, daneben GFP und die mit DAPI gefärbte DNA. In der Überlagerung ist DAPI in rot und GFP in grün dargestellt. Plasmid #1321.

Zielstruktur bioinformatisch vorhergesagt war, beschränkt sich allerdings auf die Peripherie des Zellkerns und wird während der Mitose abgebaut, die beobachtete Lokalisierung stimmt demnach nicht mit einer Lamina-Lokalisierung überein, sondern deutet auf eine klare Kolokalisierung von CPn0350 und der mit DAPI gefärbten DNA. In Hefezellen konnte dies nicht analysiert werden, da bei Hefen eine geschlossene Mitose stattfindet, also die Kernmembran bei der gesamten Zellteilung erhalten bleibt. In Humanzellen lässt sich auch besser erkennen, dass das GFP-Signal nicht diffus im Kern verteilt ist, sondern Strukturen aufweist. CPn0350 scheint also direkt mit der DNA oder mit DNA-assoziierten Proteinen zu kolokolalisieren.



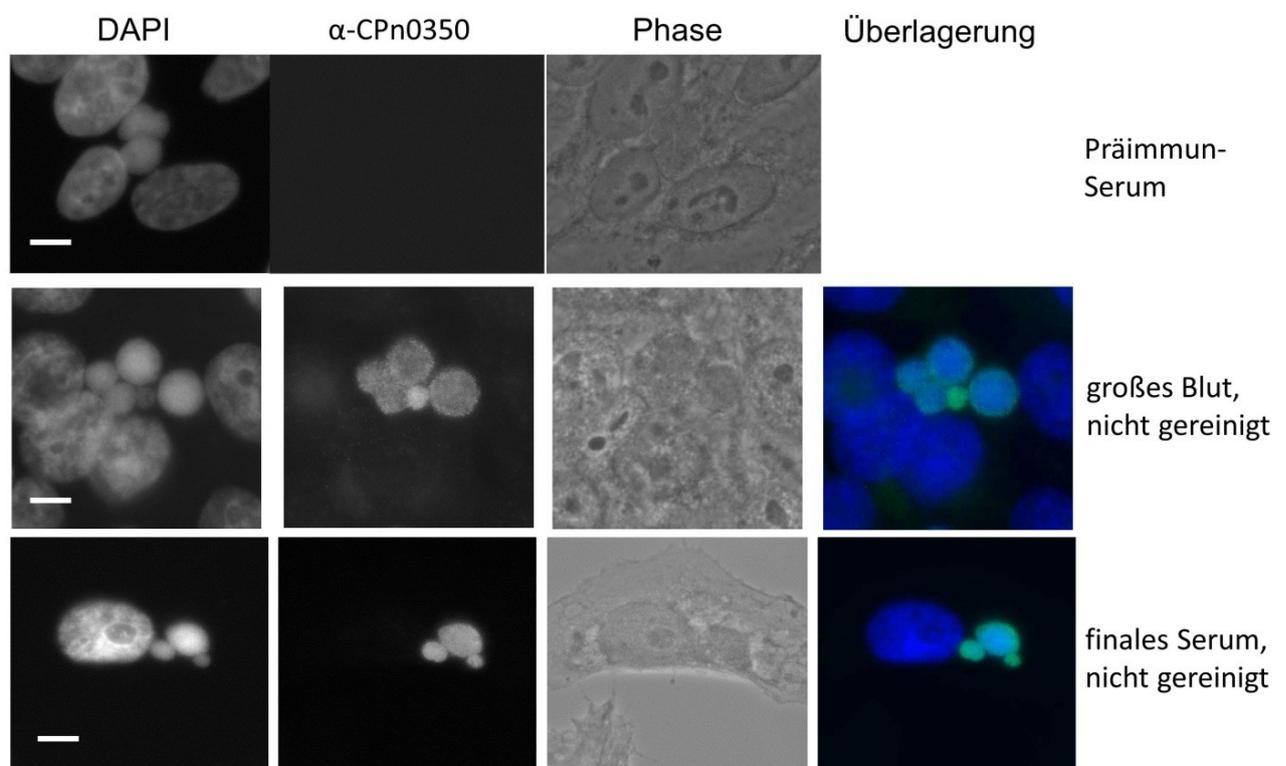
**Abbildung 17: Subzelluläre Lokalisierung von CPn0350 in Humanzellen**

Mikroskopie von humanen HEK293 Zellen, die CPn0350-GFP (GFP N-terminal, Plasmidnr. 1517) exprimieren. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion fixiert. Links ist die Durchlicht-Mikroskopie gezeigt, daneben das GFP- und das DAPI-Signal, in der Überlagerung ist GFP in grün und DAPI in rot gezeigt. Die mittleren Bilder zeigen jeweils eine mitotische Zelle, bei der sich die Chromosomen in der Äquatorialebene angeordnet haben.

#### 4.2.2.2 CPn0350 kann innerhalb der Inklusion und in Bakterienextrakten detektiert werden

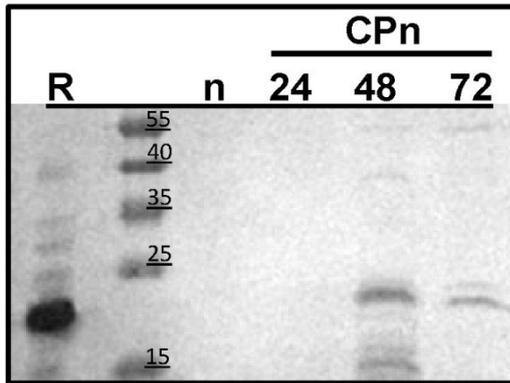
Um die Expression von CPn0350 während der chlamydialen Infektion untersuchen zu können, wurde ein Antikörper gegen das CPn0350-Vollängen-Protein generiert. Die ersten beiden Immunisierungen der zwei Kaninchen erfolgten mit aus dem Gel ausgeschnittenem GST-Fusionsprotein, die dritte Immunisierung mit 6His-Fusionsprotein aus dem Gel und die

letzte Immunisierung mit nativem6His-Protein (siehe auch 3.3.10). Schon die Vorab-Seren (kleines und großes Blut, Entnahme erfolgt nach der 3. und 4. Immunisierung) zeigten eine deutliche Färbung der Inklusion, während das Präimmun-Serum beider Kaninchen die Inklusionen nicht detektierte (Abbildung 18). Beide Kaninchenserum wurden zuerst in der Immunfluoreszenz auf infizierten Zellen getestet und zeigten ähnlich gute Signale und wenig Hintergrundfärbung. Subjektiv war das Serum des zweiten Kaninchens (SAB #2460) etwas besser, so dass von diesem Serum wie unter 3.3.11 beschrieben eine Antigenreinigung durchgeführt wurde. Eine Anfärbung des Kerns konnte nicht beobachtet werden.



**Abbildung 18: Immunfluoreszenz Vorversuche mit dem generierten Serum gegen CPn0350**

Infizierte HEp-2 Zellen wurden 48 hpi mit Methanol fixiert und mit dem Präimmun-Serum und dem nicht gereinigten großen Blut bzw. finalen Serum (jeweils 1:50), einem FITC-konjugierten anti-Kaninchen Sekundärantikörper und DAPI gefärbt und mikroskopiert. Längenmarker = 5 $\mu$ m.

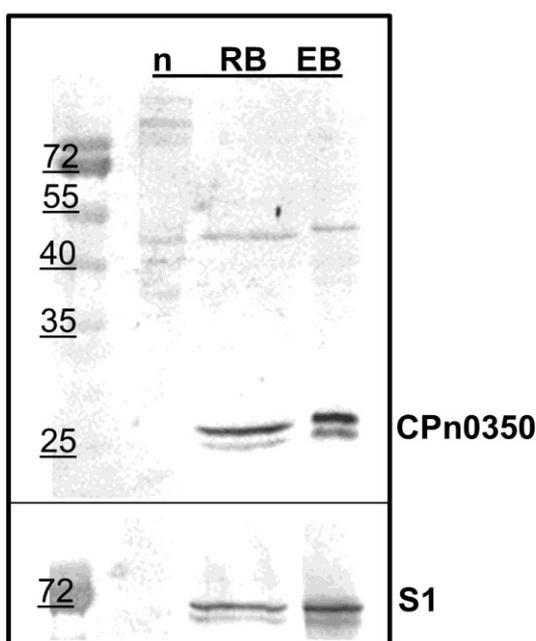


**Abbildung 19: Western Blot-Analyse der Expression von CPn0350**

CPn0350 wurde mit 1:100 verdünntem Vollserum #2460 detektiert. R= rekombinantes 6His-CPn0350, n= nicht infizierte Zellen, 24/48/72 = Zeitpunkt in Stunden nach der Infektion, zu dem die Bakterien aus den infizierten Zellen (je 4 Flaschen Zellen pro Zeitpunkt) durch Zentrifugation angereichert wurden. Es wurden HEp-2 Zellen mit einer MOI von 2 infiziert. MW CPn0350 = 19,1 kDa.

Das Serum wurde auf seine Reaktivität mit dem rekombinanten 6His-markierten Protein (berechnetes Molekulargewicht 21 kDa) und Bakterien-Extrakten aus infizierten Zellen getestet (Abbildung 20). Dabei ist zu erkennen, dass bei Bakterien, die nach 24 stündiger Infektion geerntet wurden, kein Signal detektiert werden konnte. Nach 48 Stunden ist ein deutliches Signal zu sehen, außerdem sind einige niedermolekulare Degradationsbanden vorhanden. Bakterien, die nach 72 Stunden geerntet wurden, weisen ein etwas schwächeres Signal auf. Oberhalb der intensiven Bande ist noch eine schwache zweite Bande zu erkennen. Es könnte sich also um eine prozessierte Form des Proteins handeln. In Kontrollexperimenten mit weiteren chlamydialen Antikörpern war von 24 Std bis 72 Std eine deutliche Zunahme in der Signalstärke zu erkennen, was sich durch die Zunahme an Bakterien generell im Zuge der Replikation erklären lässt (Vergl. Abschnitt 4.2.3.2 und 4.2.6.2). CPn0350 scheint also in der Mitte des Infektionszyklus stärker exprimiert zu sein.

Um die mögliche Abnahme der CPn0350-Expression nach 72 Stunden zu überprüfen, wurde ein Western Blot von gereinigten RB- und EB-Fractionen durchgeführt. Hierzu wurden Bakterien zu Zeitpunkten, an denen hauptsächlich RBs bzw. EBs vorliegen, aus den infizierten Zellen angereichert. Beide



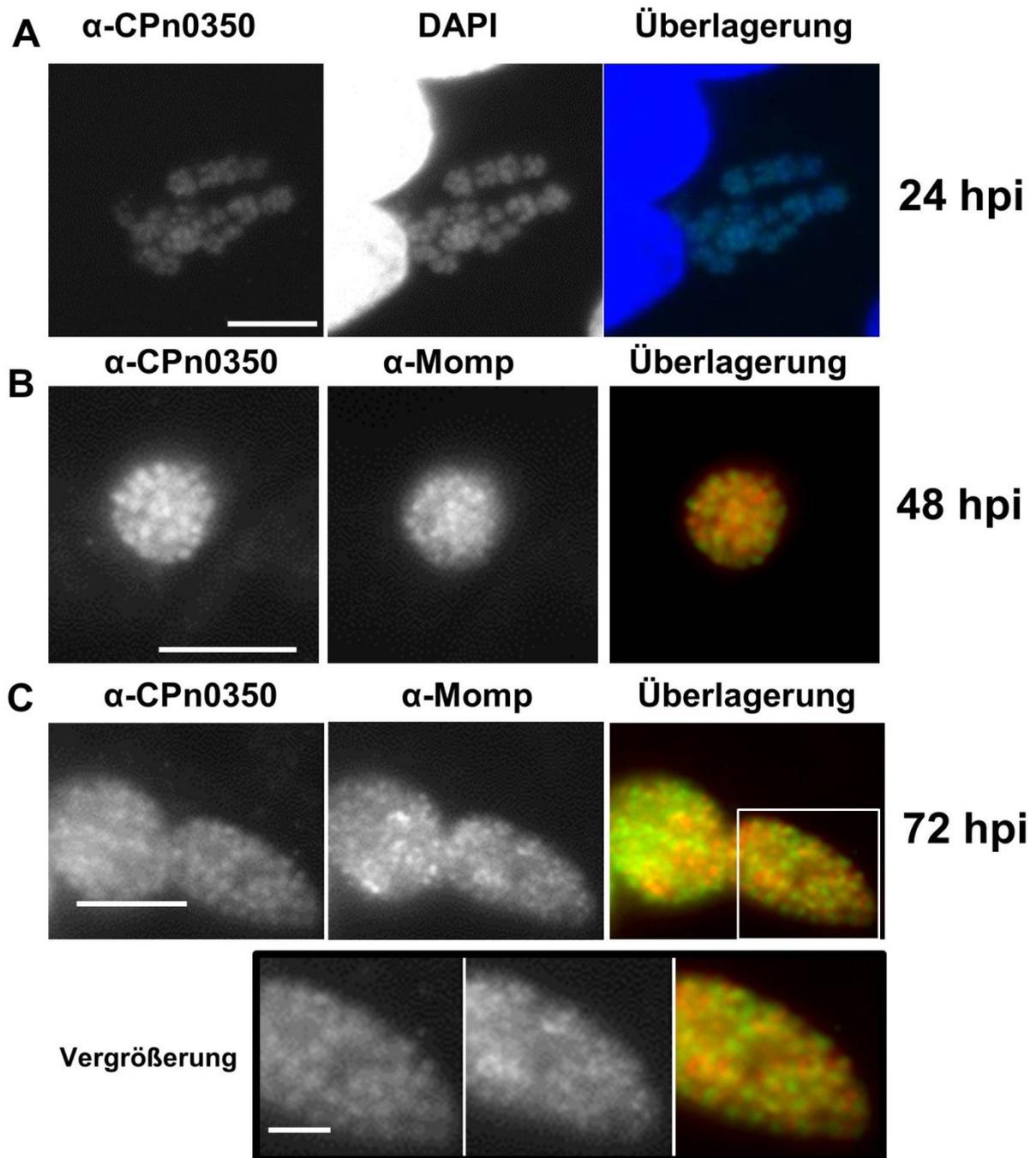
**Abbildung 20: Western Blot-Analyse von RB- und EB-Fractionen mit Antigen-gereinigtem  $\alpha$ -CPn0350**

Gelblottet wurden Extrakte nicht infizierter Zellen (n) sowie RB- und EB-Fractionen. Die Bakterien wurden nach 40 Std (RB) bzw. 84 Std (EB) mittels Gradientenreinigung isoliert (Zeitpunkte gewählt nach (Wolf, Fischer et al. 2000)). Die Proben wurden zusätzlich mit 2 % SDS versetzt und mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen das chlamydiale ribosomale S1-Protein auf einen möglichst gleichen bakteriellen Proteingehalt eingestellt. CPn0350 wurde mit 1:100 verdünntem, antigengereinigtem Serum detektiert.

Fraktionen wurden mit Hilfe des intrachlamydialen, ribosomalen S1-Proteins auf den gleichen Bakterienprotein-Gehalt eingestellt und mit dem Antigen-gereinigten CPn0350-Antiserum analysiert. CPn0350 zeigte in dieser genaueren Analyse keine Abnahme der Signalstärke in der späten Infektionsphase. Es scheint sich somit um eine ähnlich starke Expression sowohl in RBs als auch in EBs zu handeln. Interessanterweise war diesmal sehr deutlich sowohl in der RB- als auch in der EB-Fraktion eine Doppelbande zu beobachten. Dies könnte auf eine Prozessierung oder Phosphorylierung des Proteins hindeuten. Auch in der vorherigen Western Blot Analyse war eine Doppelbande zu erkennen, jedoch nicht so deutlich und mit umgekehrten Intensitäten. Diesmal ist die höhermolekulare Bande deutlich intensiver. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die veränderte Probenaufarbeitung sein, da für die RB- und EB-Fraktionen die Proben zusätzlich mit 2 % SDS aufgekocht wurden, um auch schwer lösliche Proteine in Lösung zu bringen. Insgesamt scheinen aber EBs und RBs in etwa die gleiche Menge CPn0350 zu enthalten.

#### **4.2.2.3 CPn0350 zeigt eine Bakterienassoziation in der Infektion**

CPn0350 kann in der Immunfluoreszenz im Gegensatz zum Western Blot bereits 24 Stunden nach der Infektion in Methanol-fixierten Zellen detektiert werden. Es zeigten sich punktförmige Signale innerhalb der Inklusion, die mit dem DAPI-Signal der Bakterien überlagern (Abbildung 21 A). Wurde die äußere Membran der Bakterien mit einem monoklonalen Antikörper gegen das chlamydiale „major outer membrane protein“ MOMP angefärbt, so konnte teilweise eine Kolo-kalisierung beobachtet werden, die Signale sind aber nicht ganz deckungsgleich: das Momp-Signal scheint etwas größer und ist zudem ringförmig. CPn0350 hingegen zeigt meist kleinere und punktierte Signale, was ein Hinweis auf eine intrachlamydiale Lokalisierung von CPn0350 ist (siehe Abbildung 21 B und C). Deutlich wird dies in vor allem in der Ausschnittvergrößerung, in der rote Momp-Signal die grünen CPn0350-Signale umgeben (Abbildung 21 C). Ein Signal für CPn0350 außerhalb der Inklusion, ein Hinweis auf eine Sekretion, konnte für diesen Kandidaten nicht gezeigt werden. Auch in weiterführenden biochemischen Analysen mit Fraktionen infizierter Zellen konnte für diesen Kandidaten keine Sekretion nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.3.2.3.1). Es scheint sich somit um ein Protein zu handeln, welches während der gesamten intrachlamydialen Entwicklung in den Bakterien lokalisiert und möglicherweise mit der DNA assoziiert vorliegt.



**Abbildung 21: Lokalisierung von CPn0350 in infizierten Zellen**

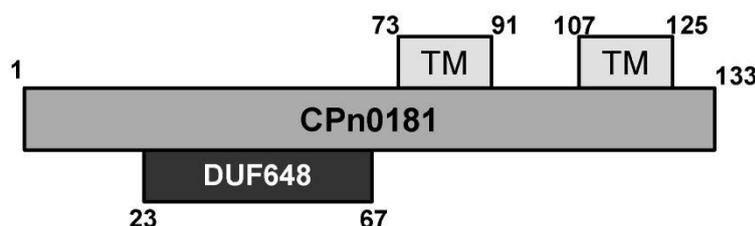
Mit einer MOI von 2 infizierte HEp-2 Zellen wurden nach 24 Std (A) bzw. 48 Std (B) und 72 Stunden (C) mit Methanol fixiert und dann gefärbt. CPn0350 wurde mit unverdünntem Antigen-gereinigtem Antiserum und einem FITC-markierten Sekundärantikörper detektiert, die Bakterien wurden mit DAPI (A) bzw. mit einem monoklonalen anti-MOMP-Antikörper und einem Alexa-594-markierten Sekundärantikörper angefärbt. Die unterste Reihe zeigt eine Vergrößerung des weiß umrahmten Ausschnitts aus C. Der Längenmarker repräsentiert 5  $\mu$ m und in der Vergrößerung 2  $\mu$ m.

### 4.2.3 Analyse des Screenkandidaten CPn0181

CPn0181 ist ein hypothetisches Protein von 133 AS ohne vorhergesagte Funktion. Es gibt kein homologes Protein in *C. trachomatis*, allerdings zeigt es schwache Homologie zu Proteinen aus den Spezies *C. caviae*, *C. abortus*, *C. felis* und *C. psittaci*. Laut KEGG-Datenbank ist nur eine Domäne vorhergesagt, DUF648, eine Domäne unbekannter Funktion, die in mehreren hypothetischen chlamydialen Proteinen gefunden wird (Abbildung 22). Es gibt keine paraloge Proteine zu CPn0181, allerdings sind ca. 30 % des Proteins schwach homolog zu CPn0203, einem ebenfalls hypothetischen Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von 30,5 kDa. CPn0203 verfügt ebenfalls über die vorhergesagte DUF648-Domäne und die Homologie befindet sich genau im Bereich dieser Domäne.

CPn0181 wurde nur ein einziges Mal in dem durchgeführten Screening zur Identifizierung neuer Effektorproteine isoliert (siehe Abschnitt 4.1). Bei dem isolierten Fragment fehlen allerdings nur die ersten sechs Aminosäuren, der restliche Teil des Proteins wurde vollständig exprimiert.

CPn0181 verfügt laut Phobius-Vorhersage über 2 Transmembrandomänen, die sich beide in der C-terminalen Hälfte des sehr kleinen Proteins befinden (Abbildung 22). Diese Transmembrandomänen werden durch einen 15 AS langen Loop getrennt und umfassen insgesamt 53 Aminosäuren. Somit erfüllt CPn0181 die von Dehoux festgelegten Kriterien eines Inc-Proteins (Dehoux, Flores et al. 2011). Zu Beginn dieser Arbeit war CPn0181 jedoch nicht als Inc-Protein vorhergesagt.



**Abbildung 22: Schema von CPn0181**

Eingezeichnet ist die Lage der Transmembrandomänen und der Domäne unbekannter Funktion DUF648. Die Zahlen zeigen die Aminosäureposition.

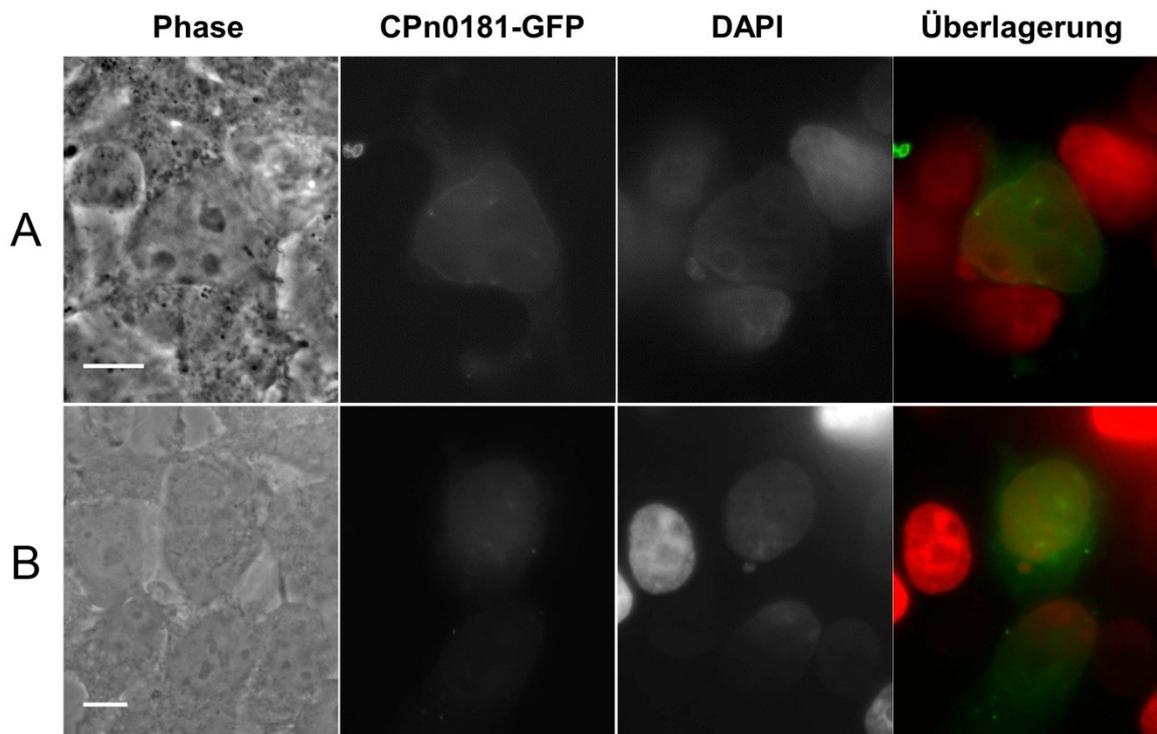
Eine bioinformatische Lokalisierungsvorhersage für CPn0181 mit SubLoc ergab für prokaryotische Proteine eine zytoplasmatische Lokalisierung, für eukaryotische Proteine wurde jedoch eine Kernlokalisierung vorhergesagt. CPn0181 scheint also eine eukaryotische Kernlokalisierungssequenz aufzuweisen. Tatsächlich konnte mit dem Programm cNLS Mapper ([http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS\\_Mapper\\_form.cgi](http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi)) eine zweiteilige Kernlokalisierungssequenz im Bereich von Aminosäure 88-118 vorhergesagt werden. Es handelt sich außerdem um ein sehr basisches Protein mit einem *pI* von 10,3.

Eine bioinformatische Vorhersage der subnukleären Lokalisierung (Subnuclear Compartments Prediction System, <http://array.bioengr.uic.edu/subnuclear.htm>) ergab eine vorhergesagte Kernlamina-Kolokalisierung.

#### 4.2.3.1 CPn0181 zeigte einen apoptotischen Phänotyp in Hefe und lokalisiert im Zellkern von Humanzellen

Die Expression von CPn0181 verursacht sowohl als Volllängenprotein als auch bei Expression der etwas verkürzten Screenvariante nur einen leichten Wachstumsdefekt in Hefezellen, allerdings konnte für diesen Kandidaten ein apoptotischer Phänotyp in Hefe nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 4.1.3). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass CPn0181 im Zellkern der Hefe lokalisiert, aber zudem auch punktierte Signale außerhalb des Kerns zeigte (siehe Abschnitt 4.1.2 Abbildung 4). Da es sich um ein hypothetisches Inc-Protein handelte, welches im heterologen Sekretionssystem in den Analysen von Subtil et al. zur Sekretion des Reporterproteins führte (siehe Abschnitt 4.1.1), wurde dieser Kandidat für die weitere Analyse ausgewählt.

CPn0181 wurde in den humanen Expressionsvektor pBYE kloniert, um die Lokalisierung in Humanzellen zu überprüfen. CPn0181-GFP lokalisiert im Kern von Humanzellen, wobei das Kernsignal manchmal an der Kernmembran leicht verstärkt zu sein scheint. Zudem konnten auch Signale außerhalb des Kerns beobachtet werden (Abbildung 23). Dies war auch schon in Hefe der Fall. Auch die Fluoreszenzintensität war, wie schon zuvor in Hefe, sehr schwach.



**Abbildung 23: Lokalisierung von CPn0181-GFP bei ektopischer Expression in Humanzellen**

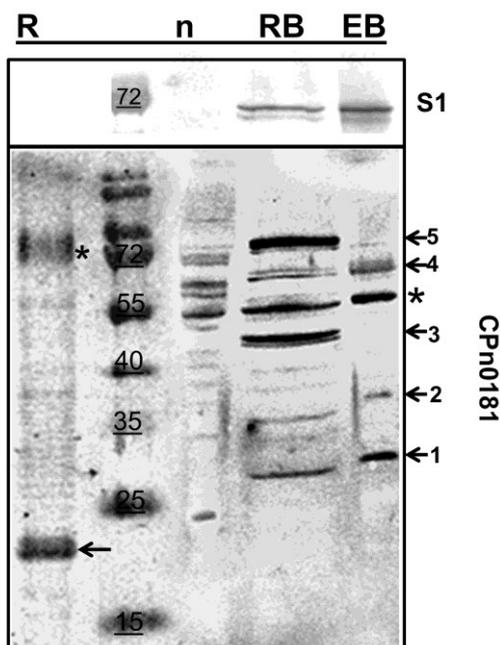
HEK293 Zellen wurden mit CPn0181-GFP transfiziert, nach 24 Stunden fixiert und die DNA mit DAPI gefärbt. Links ist die Durchlicht-Mikroskopie zu sehen, daneben das GFP-Signal, gefolgt von DAPI. In der Überlagerung ist GFP in grün und DAPI in rot dargestellt. Der Längenmarker repräsentiert 5  $\mu\text{m}$ . Verwendet wurde das Plasmid #1500.

Die Transfektionseffizienz war außerdem sehr schlecht und es waren viele tote Zellen zu beobachten, was darauf hin deutet, dass die Expression von CPn0181 in Humanzellen einen negativen Effekt hat. Aufgrund der schlechten Transfektionseffizienz konnten keine mitotischen Zellen beobachtet werden, so dass die Lokalisierung von CPn0181 während der Teilung nicht bestimmt werden konnte. Eine Lokalisierung an der Kernlamina konnte somit weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Insgesamt ähnelt die beobachtete Lokalisierung in Humanzellen sehr stark der Lokalisierung in Hefe.

#### **4.2.3.2 CPn0181 kann in Bakterienfraktionen detektiert werden**

Zur Detektion von CPn0181 während der Infektion wurde ein polyklonaler Antikörper generiert. Hierzu wurde CPn0181 sowohl als Volllängen-GST-Fusionsprotein als auch als 6His-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert. Da das 6His-Protein nur eine sehr geringe Expression aufwies, wurde das GST-Fusionsprotein für die Immunisierung der Kaninchen verwendet. Die Proteinexpression der GST-Fusion war etwas besser, allerdings ließ sich das Protein nicht nativ aufreinigen. Es akkumulierte in der Pelletfraktion und konnte nur mit 8 M Harnstoff-Lysispuffer in die lösliche Fraktion überführt werden. Eine anschließende Dialyse war nicht möglich, da wahrscheinlich die Rückfaltung des GST-Tags nicht funktionierte. Der Antikörper gegen CPn0181 wurde daher gegen das Volllängen-GST-Fusionsprotein generiert, welches aus dem Gel ausgeschnitten wurde. In einer ersten Analyse wurden 24 -72 Std nach der Infektion angereicherte Bakterien mittels Western Blot mit dem generierten Antiserum untersucht. Das Antiserum detektierte sowohl in den Extrakten infizierter Zellen als auch in der Probe der nicht-infizierten Zellen zahlreiche unspezifische Proteine (nicht gezeigt). Da dieser erste Nachweis von CPn0181 zu unspezifisch war, wurde das Antiserum durch Inkubation mit geblotteten Proben nicht-infizierter Zellen abgereichert und zur Detektion von EB- und RB-spezifischen Proteinextrakten eingesetzt (Abbildung 24). Das rekombinante Protein konnte auf der richtigen Höhe detektiert werden (Pfeil), zusätzlich zeigte sich ein weiteres Signal bei etwa 72 kDa (\*). Dieses höhermolekulare Signale wurde auch bei Western Blot-Analysen mit dem Penta-His-Antikörper detektiert (nicht gezeigt), daher handelt es sich sehr wahrscheinlich um eine oligomerisierte Form des Proteins. Sowohl in den RB- als auch in den EB-Extrakten konnte eine Bande bei ca. 25 kDa detektiert werden (1). Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um CPn0181, das ein berechnetes Molekulargewicht von 16 kDa aufweist. Diese Bande war nicht in der Probe der nicht-infizierten Zellen zu sehen. Ebenfalls in beiden Fraktionen sind zwei schwächere Banden bei ca. 35 kDa (2) und ca. 60 kDa (4) zu erkennen. Hierbei könnte es sich entweder um Signale für CPn0181 oder aber um unspezifische Hintergrundsignale handeln. In RBs waren zusätzlich noch zwei weitere sehr intensive Banden bei ca. 45 kDa (3) und 80 kDa (5) zu erkennen. CPn0181 scheint demnach in RBs

stärker exprimiert zu sein. Fraglich bleibt, warum CPn0181 in Banden mit einem viel höheren Molekulargewicht als errechnet zu detektieren ist. Möglich wäre, dass es sich um eine Oligomerisierung handelt. In weiterführenden biochemischen Analysen mit Fraktionen infizierter Zellen wurde mit dem CPn0181-Antiserum immer nur eine Bande von ca. 72 kDa detektiert, so dass es sich hierbei wohl um die hauptsächlich vorliegende Form des Proteins handeln könnte (siehe Kapitel 4.3.2.3.1). Diese Form würde rechnerisch einem Tetramer von CPn0181 entsprechen.

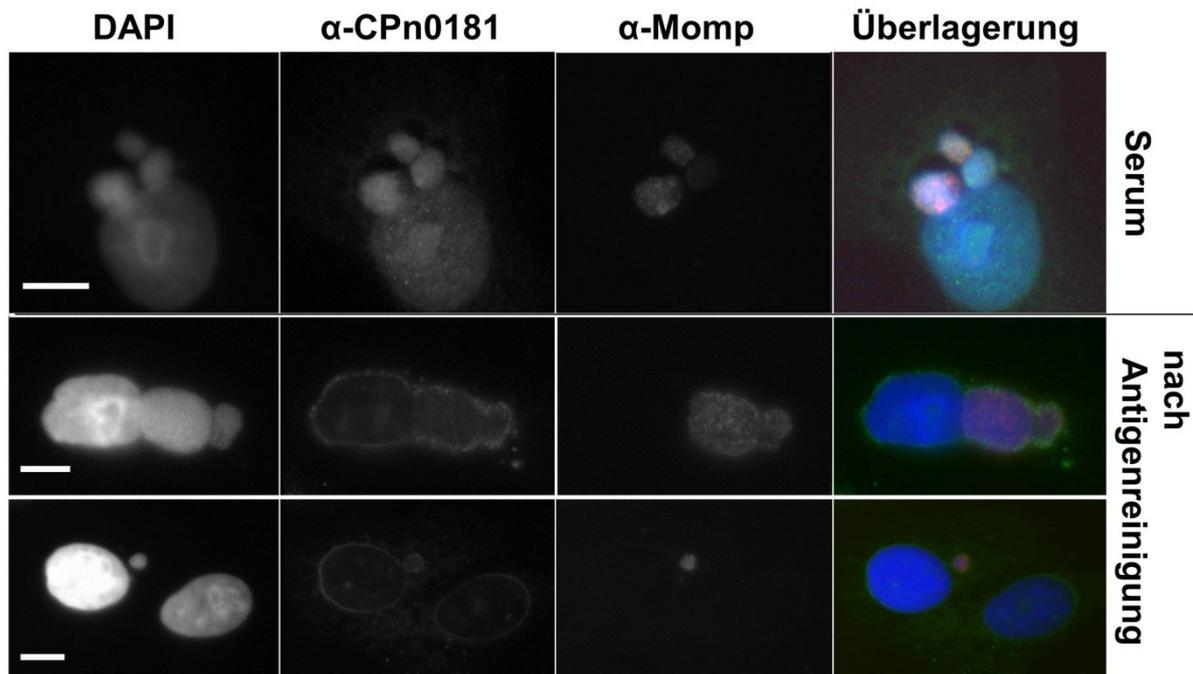


**Abbildung 24: Western Blot-Analyse von RB- und EB-Fractionen mit  $\alpha$ -CPn0181**

Analysiert wurden nicht infizierte Zellen (n) sowie RB- und EB-Fractionen. Die Bakterien wurden nach 40 Std (RB) bzw. 84 Std (EB) mittels Gradientenreinigung isoliert. Die Proben wurden zusätzlich mit 2 % SDS versetzt und mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen das chlamydiale ribosomale S1-Protein auf einen möglichst gleichen bakteriellen Proteingehalt eingestellt. CPn0181 wurde mit 1:100 verdünntem, abgereichertem Serum detektiert. MW CPn0181 = 16 kDa, R =rekombinantes 6His-CPn0181= 17,6 kDa. In den Bakterienproben sind unspezifische Signale mit einem \* markiert, spezifische Signale mit einem Pfeil.

#### 4.2.3.2 CPn0181 akkumuliert in der Nähe der Inklusionsmembran

In Immunfluoreszenz-Analysen infizierter Zellen zeigte sich mit dem anti-CPn0181-Antiserum generell nur ein sehr schwaches Signal und relativ viel Hintergrundfärbung, die auch in nicht-infizierten Zellen zu beobachten war und verstärkt den Zellkern anfärbte. Das Signal sah zu allen Zeitpunkten gleich aus, allerdings war eine genaue Lokalisierung aufgrund der hohen Hintergrundfluoreszenz schwer zu bestimmen. Das Antiserum detektierte auch schon in 24 Stunden infizierten Zellen schwach die Inklusionen. In der späten Infektion, bei Zellen, die nach 72 Stunden fixiert wurden, ergab sich ein Signal wie bei den nach 48 Stunden fixierten Zellen. Eine Fixierung mit para-Formaldehyd verschlechterte die Signalstärke (Daten nicht gezeigt). Der generierte Antikörper zeigte auch nach einer Antigenreinigung immer noch eine starke Hintergrundfärbung der Humanzellen mit verstärkter Anfärbung der Kernmembran (Abbildung 25, nicht-infizierte Zelle im unteren Bild). In infizierten Zellen konnten die Inklusionen mit dem anti-CPn0181-Antikörper gefärbt werden, hier zeigte sich eine Verstärkung des Signals an der Innenseite der Inklusionsmembran. Ob es sich um ein Artefakt handelt, oder ob das Protein eventuell tatsächlich sekretiert wird und dann an der



**Abbildung 25: Lokalisierung von CPn0181 in infizierten Zellen**

HEp-2 Zellen wurden für 48 Stunden mit *C. pneumoniae* infiziert und mit Methanol fixiert. Die oberste Zeile zeigt Mikroskopieaufnahmen einer infizierten Zelle, die mit dem 1:50 verdünnten Antiserum gefärbt wurde (grün), die beiden unteren Zeilen zeigen Zellen, die mit dem unverdünnten, Antigen-gereinigten Serum gefärbt wurden (grün). Zusätzlich wurden die Bakterien mit einem monoklonalen  $\alpha$ -Momp-Antikörper gefärbt (rot) und die DNA mit DAPI (blau). Der Längenmarker repräsentiert 5  $\mu$ m.

Membran akkumuliert, bleibt unklar und konnte aufgrund des unspezifischen Antikörpers in den weiterführenden Untersuchungen nicht geklärt werden.

In der Fraktions-Analyse infizierter Zellen konnte für diesen Kandidaten keine Sekretion nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.3.2.3.1). Es scheint sich somit um ein Protein zu handeln, dass innerhalb der Inklusion verbleibt.

#### 4.2.4 Analyse des Effektorprotein-Kandidaten CPn0472

CPn0472 besteht aus 775 Aminosäuren und hat ein berechnetes Molekulargewicht von 83,6 kDa. In dem in dieser Arbeit durchgeführten Screening wurden insgesamt sieben unterschiedliche Fragmente des OLR von *cpn0472* isoliert (siehe Abschnitt 4.1). Sechs der isolierten 7 Fragmente beinhalten den Bereich des Proteins, für den eine Transmembrandomäne vorhergesagt ist (Abbildung 26 B). Die Transmembrandomäne teilt das Protein, nach Phobius-Vorhersage liegt der N-Terminus außen und der C-Terminus innen, also zytosolisch. CPn0472 ist ein für Chlamydien relativ großes, hypothetisches Protein, für das laut KEGG-Datenbank eine Serin-reiche Region mit über 20 Serinen annotiert ist (Abbildung 26 A, im N-Terminus des Proteins zwischen AS 50 und 105). Über solche Anreicherungen bestimmter Aminosäuren ist nichts weiter bekannt, sie werden als „low-complexity regions“ bezeichnet. Des Weiteren ist eine Domäne unbekannter Funktion

vorhergesagt, DUF1542. Diese Domäne findet sich in mehreren Zell-Oberflächenproteinen, von denen einige mit Antibiotika-Resistenzen und /oder Adhäsion in Verbindung gebracht werden können. Zu Letzteren zählt zum Beispiel das Zellwand-assoziierte Ebh-Protein von *Staphylococcus aureus*, das Fibronektin bindet (Clarke, Harris et al. 2002). Das Volllängenprotein CPn0472 verursachte bei Expression in Hefe einen relativ starken Wachstumsdefekt (siehe Abschnitt 4.2.1). Das Screenfragment 1184 A/B zeigte in den Phloxin B-Einstufungen den stärksten Phänotyp der isolierten Screenfragmente von CPn0472, im seriellen Verdünnungstropftest zeigte es jedoch einen schwächeren Phänotyp als das Volllängenkonstrukt.

A

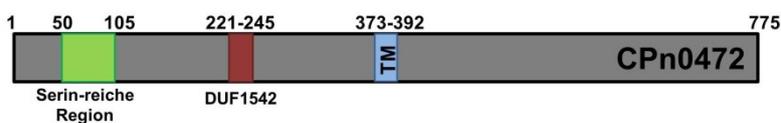
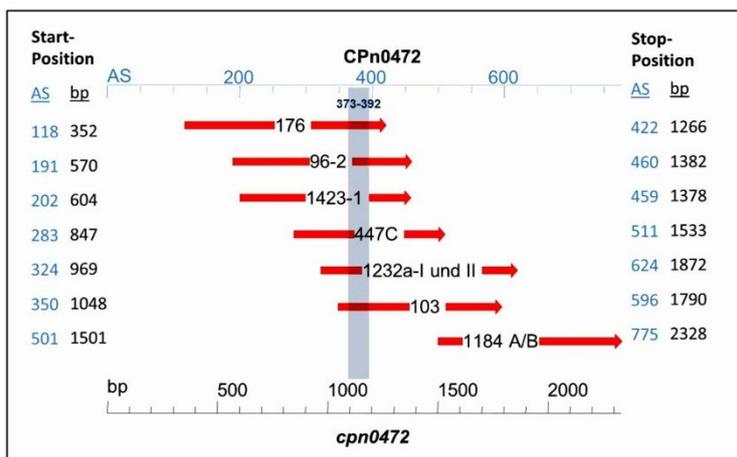


Abbildung 26: Darstellung der vorhergesagten Domänen und der isolierten Screenfragmente

B

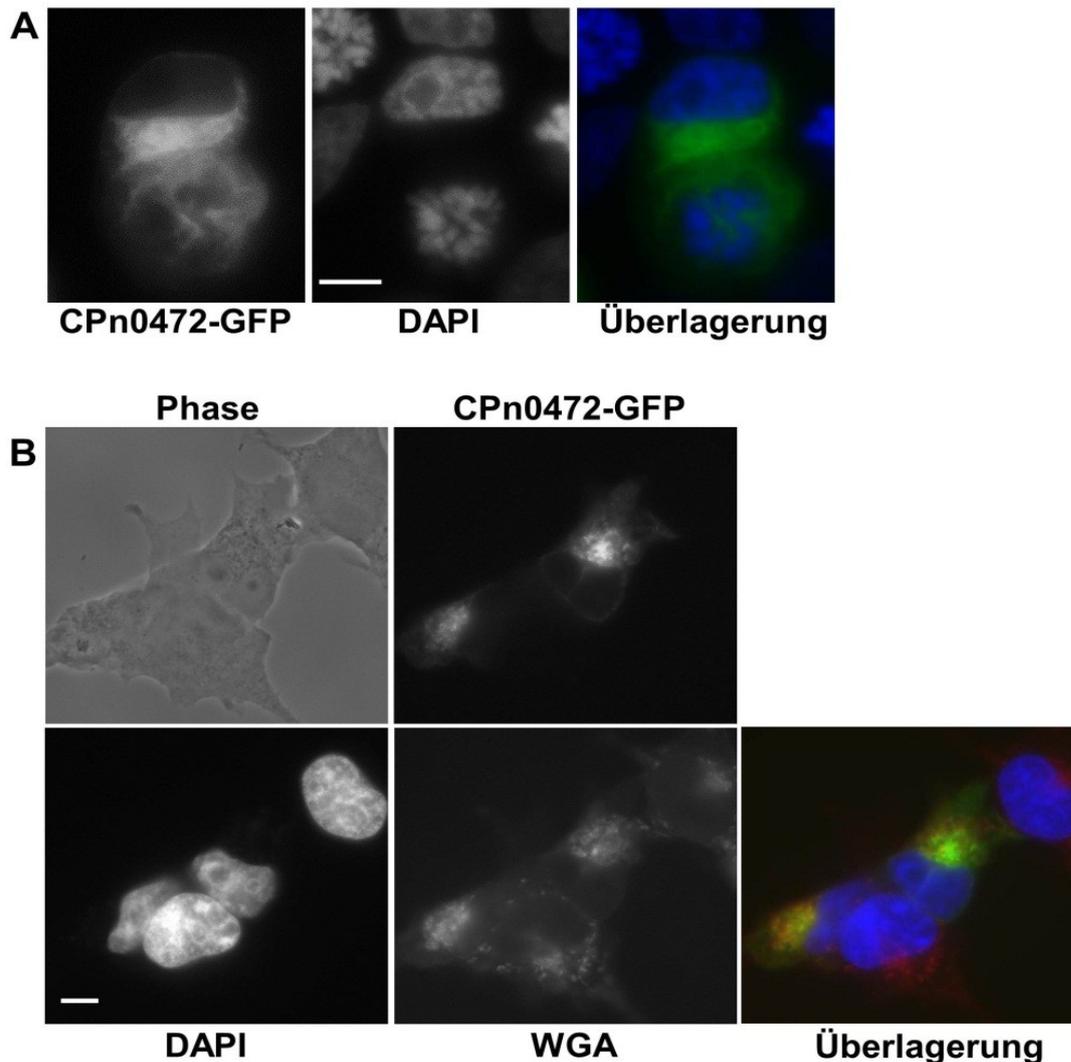


A) Schema der vorhergesagten Domänen, die Zahlen repräsentieren die Aminosäureposition, TM= Transmembrandomäne

B) Die roten Pfeile kennzeichnen die Lage und Länge der isolierten Screenfragmente, die Zahlen in den Pfeilen stehen für die intern vergebene Nummer der Fragmente. Der blaue Balken repräsentiert die Lage der Transmembrandomäne, die Zahlen geben den Aminosäure- (AS, blau) bzw. Nukleotid- (bp, schwarz) Abschnitt der Fragmente wieder.

#### 4.2.4.1 CPn0472 lokalisiert bei ectopischer Expression fadenartig im Zellinneren

CPn0472 konnte bei Expression als GFP-Fusion in Hefezellen kein typisches Lokalisierungsmuster zugeordnet werden (siehe Abschnitt 4.1.2 Abbildung 4). Es zeigte eine Anfärbung intrazellulärer Strukturen, bei denen es sich jedoch vermutlich nicht um das ER der Hefe handelte. Zur Expression in Humanzellen wurde das Volllängenprotein in Fusion mit GFP in den Vektor pBYE kloniert. Auch in Humanzellen färbte CPn0472-GFP Strukturen im Zellinneren an. Diese Strukturen sahen zum Teil fadenartig aus und lagen in der Nähe des Kerns (Abbildung 27 A). Eine parallele Färbung mit Alexa-633-markiertem WGA (wheat germ agglutinin) in HeLa 229 Zellen zeigte, dass es sich um membranöse Strukturen handelt (siehe Abbildung 27 B).



**Abbildung 27: Subzelluläre Lokalisierung von CPn0472-GFP in Humanzellen**

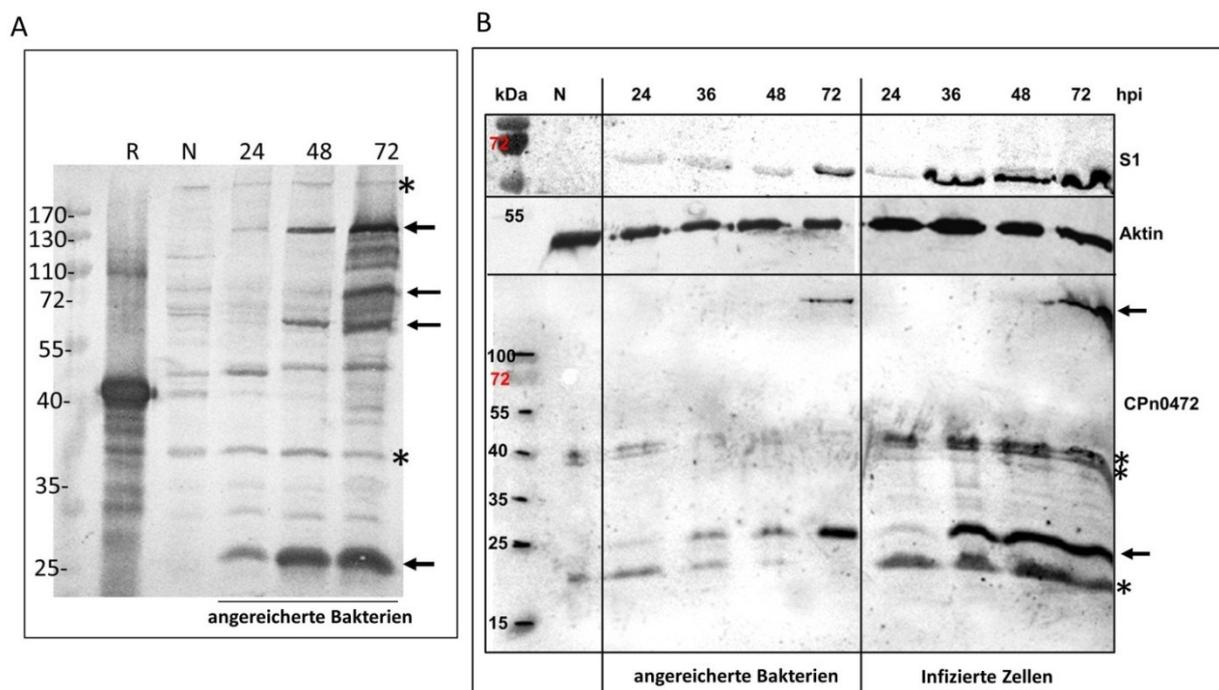
- A) HEK293 Zellen wurden mit CPn0472-GFP transfiziert und nach 24 Std fixiert. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt. In der Überlagerung ist GFP in grün und DAPI in blau gezeigt.
- B) Aufgrund des größeren zytoplasmatischen Anteils wurden HeLa 229 Zellen mit CPn0472-GFP (grün) transfiziert und nach 24 Stunden fixiert. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt (blau), die Membranen mit WGA (rot). Auf das Phasenkontrastbild wurde in der Überlagerung verzichtet.
- Der Längsmaßstab repräsentiert 5 µm. Verwendet wurde das Plasmid #1559.

#### 4.2.4.2 CPn0472 kann in der Infektion hauptsächlich als C-terminales Fragment nachgewiesen werden

Für Lokalisierungs- und Expressionsstudien in infizierten Zellen wurde ein Antiserum gegen CPn0472 generiert. Das Antiserum wurde gegen den C-Terminus des Proteins (AS 501-775) generiert, wobei 6His-markiertes Protein aus dem Gel ausgeschnitten und für die Immunisierung der Kaninchen verwendet wurde. Natives rekombinantes Proteins konnte nicht für die Immunisierungen eingesetzt werden, da die Proteinaufreinigung nicht gelang. Ein Vortest ergab, dass eines der beiden Seren ein etwas besseres Signal in der Immunfluoreszenz zeigte; dieses Serum wurde deshalb mit dem Antigen gereinigt. Parallel

wurde das Serum mit Humanzell-Extrakten abgereichert und für eine Western Blot-Analyse von Proteinextrakten infizierter Humanzellen verwendet. Hierbei zeigte sich, dass das abgereicherte Serum zahlreiche Hintergrundbanden in Extrakten nicht-infizierter Zellen detektierte (Abbildung 28 A). Des Weiteren konnten zwei distinkte Banden in den Proben der angereicherten Bakterien (im Folgenden immer als „gereinigte Bakterien“ bezeichnet) zu allen analysierten Zeitpunkten detektiert werden, zum einen bei ca. 25 kDa und zum anderen bei ca. 150 kDa (Pfeile). Da der Antikörper gegen den C-Terminus von CPn0472 gerichtet ist, könnte es sich bei dem kleinen zu detektierenden Fragment um ein C-terminales Degradationsprodukt oder eine prozessierte Form des Proteins handeln. Nach 48 Stunden kam noch eine Bande von ca. 60 kDa und nach 72 Stunden noch mehrere höhermolekulare Banden hinzu. Hierbei scheint es sich um einige distinkte Banden zu handeln (Pfeile), die weiteren sichtbaren Banden könnten Degradationsprodukte sein.

Für eine genauere Analyse wurden Bakterien zu verschiedenen Zeitpunkten (24, 36, 48 und



**Abbildung 28: Expressionsanalysen von CPn0472**

A) Analysiert wurde das rekombinante 6His-Protein (R, 31 kDa), ein Extrakt aus nicht-infizierten HEp-2 Zellen (N) sowie zu den angegebenen Zeitpunkten geerntete, über Differentialzentrifugation aus HEp-2 Zellen angereicherte Bakterien (24, 48 und 72 hpi). Die Detektion erfolgte mit dem Antiserum, das 1:3 mit Blockierlösung verdünnt wurde und vorher zur Abreicherung mit geblotteten Humanzellextrakten für 14 Stunden inkubiert worden war.

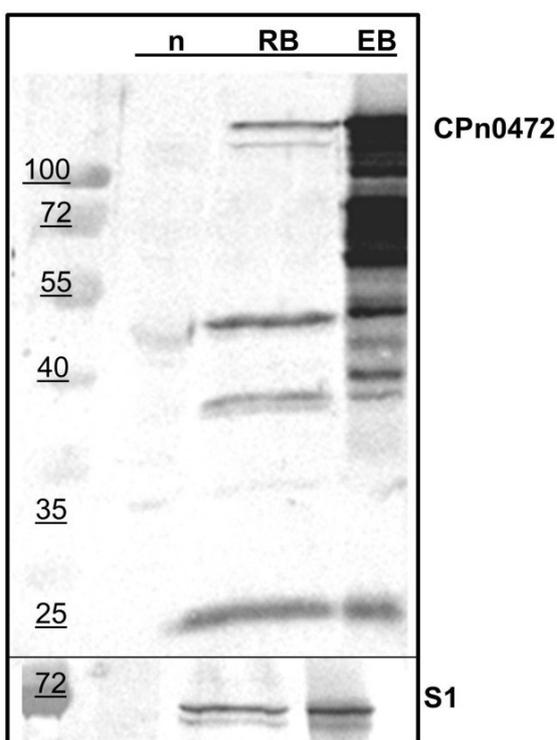
B) Aufgetragen wurden nicht-infizierte HEp-2 Zellen (N) sowie zu den angegebenen Zeitpunkten geerntete Bakterien, die über Differentialzentrifugation aus infizierten HEp-2 Zellen angereichert wurden („gereinigte Bakterien“) und Gesamtprotein-Extrakte infizierter Zellen („infizierte Zellen“). Die Detektion erfolgte mit dem Antigen-gereinigten Serum gegen CPn0472 sowie einem monoklonalen Antikörper gegen humanes  $\beta$ -Aktin und chlamydiales S1. Die Proben wurden mit Hilfe des humanen  $\beta$ -Aktin-Antikörpers auf einen etwa gleichen Gesamtproteingehalt eingestellt. Für die chlamydialen Blots wurde dieselbe Menge an Extrakten geladen, für den Aktin-Blot wurde die Hälfte (gereinigte Bakterien) bzw. 1/20 (infizierte Zellen) der Proteinmenge geladen. Hintergrundbanden sind mit einem \* markiert, CPn0472-spezifische Signale mit einem Pfeil.

72 Stunden nach Infektion) angereichert („gereinigte Bakterien“), sowie Extrakte kompletter infizierter Zellen für eine Western Blot-Analyse aufbereitet und mit dem Antigen-gereinigten Serum analysiert (Abbildung 28 B). Der aufgereinigte Antikörper gegen CPn0472 detektierte immer noch Hintergrundsignale in nicht-infizierten Humanzellen: eine kleinere Bande bei etwa 20 kDa und eine größere Doppelbande bei ca. 40 kDa (Abbildung 28 B). Diese Signale unterschieden sich von den zuvor beobachteten Hintergrundsignalen, die Reduktion der Anzahl der Hintergrundsignale könnte auf die Antigenreinigung zurückzuführen sein, nicht aber die nun veränderte Höhe der detektierten Banden. Eine Erklärung hierfür konnte nicht gefunden werden.

In infizierten Zellen ist wie schon zuvor nach 24 stündiger Infektion eine zusätzliche Bande bei ca. 25 kDa zu erkennen, die mit fortschreitender Infektionsdauer an Intensität gewinnt (Abbildung 28 B). In den gereinigten Bakterien ist das Signal nach 72 stündiger Infektion sehr stark, in den Proben der infizierten Zellen ist das Signal schon nach 36 Stunden deutlich zu erkennen, allerdings sind hier auch generell mehr Bakterien in der Probe vorhanden, was aus dem S1-Kontroll-Blot hervorgeht. Dies deutet darauf hin, dass bei der Aufreinigung der Bakterien viel Material verloren ging. Bei den Proben nach 72 Stunden ist eine zusätzliche Bande zu erkennen, die weit oberhalb der letzten erkennbaren Markerbande von 100 kDa liegt und möglicherweise das Volllängen-Protein darstellt, obwohl CPn0472 nur ein berechnetes Molekulargewicht von 83,6 kDa hat. Aus dem ersten Blot geht hervor, dass die hochmolekulare Bande bei ca. 150 kDa zu detektieren ist (Abbildung 28 A). Auch das GST-markierte rekombinante Protein zeigte im SDS-Gel ein deutlich langsames Laufverhalten: bei einem berechneten Molekulargewicht von 112 kDa konnte immer eine Bande von ca. 170 kDa detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Auch einige der isolierten Screenfragmente waren bei Expression in Hefe bei ca. 45 bis 55 kDa zu detektieren (berechnetes MW = 30-35 kDa). Das rekombinante 6His markierte Protein hat ein berechnetes Molekulargewicht von 31 kDa und war immer bei ca. 40 kDa zu detektieren (Abbildung 28 A). Insgesamt zeigen also alle CPn0472-Konstrukte ein höheres Laufverhalten als das berechnete, wobei allerdings nur das Volllängen-GST-Konstrukt und das in den infizierten Zellen detektierte Protein starke Abweichungen zeigten.

Der Vergleich der Proben gereinigter Bakterien und der Gesamt-Extrakte infizierter Zellen zeigte keine deutlichen Unterschiede, wenn davon abgesehen wird, dass die generelle chlamydiale Proteinmenge bei den Proben gereinigter Bakterien reduziert war. Die Sekretion eines Proteins könnte dazu führen, dass das Protein in größerer Menge in den Gesamtprotein-Proben infizierter Zellen zu finden ist und in geringerer Menge in den gereinigten Bakterien, immer in Relation zu dem intrachlamydialem, nicht-sekretierten S1-Protein. Ein solches Verhalten war hier aber nicht zu beobachten.

Wie schon für CPn0181 und CPn0350 wurde auch für CPn0472 die Expression in RB- und EB-Fractionen genauer analysiert. Bei CPn0472 handelt es sich tatsächlich um ein Protein, dass in EBs stärker exprimiert ist, außerdem sind viele zusätzliche starke Banden zu erkennen (Abbildung 29). Wie schon zuvor beobachtet, sind in der EB-Fraktion viele intensive höhermolekulare Banden und zusätzliche zahlreiche etwas schwächere Banden zu erkennen. Bei den schwächeren Banden könnte es sich um Degradationsprodukte handeln. In der RB-Fraktion sind neben dem möglichen Vollängenprotein und der zuvor schon beobachteten Bande bei etwa 25 kDa nun noch zwei weitere distinkte Banden bei ca. 38 und 50 kDa zu erkennen. Auch in diesem Blot war wieder ein anderes Muster bei der Detektion des Humanzell-Hintergrunds zu beobachten. Hierfür konnte keine Erklärung gefunden



werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CPn0472 in EBs stärker exprimiert wird als in RBs und das Vollängenprotein nur in der späten Infektion in infizierten Zellen nachgewiesen werden kann.

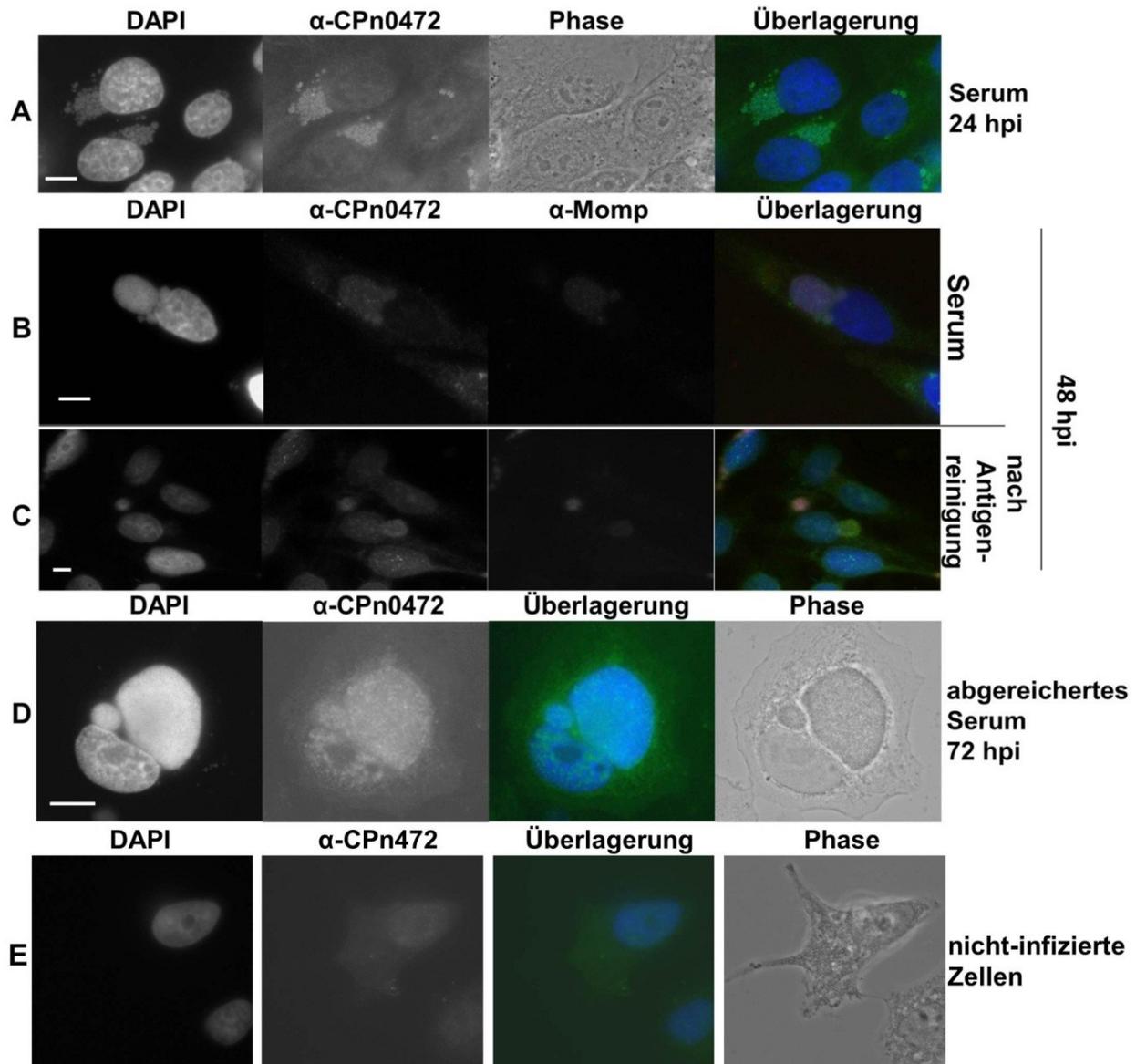
**Abbildung 29: Western Blot-Analyse von RB- und EB-Fractionen mit  $\alpha$ -CPn0472**

Analysiert wurden Proteinextrakte nicht infizierter HEP-2 Zellen (n) sowie RB- und EB-Fractionen. Die Bakterien wurden 40 (RB) bzw. 84 (EB) Std nach der Infektion über einen Gradienten gereinigt. Die Proben wurden zusätzlich mit 2 % SDS versetzt und mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen das chlamydiale ribosomale S1-Protein auf einen möglichst gleichen bakteriellen Proteingehalt eingestellt. Die Detektion erfolgte mit dem Antigen-gereinigten Antiserum gegen CPn0472 (1:100 in PBS) und einem monoklonalen Antikörper gegen chlamydiales S1.

#### 4.2.4.3 In der Infektion kann CPn0472 mit den Bakterien assoziiert detektiert werden

Die Lokalisierung von CPn0472 in infizierten Zellen wurde mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. In Methanol-fixierten HEP-2 Zellen konnten mit dem generierten, nicht gereinigten Antiserum schon nach 24 stündiger Infektion die Inklusionen angefärbt werden, wobei die Färbung eine Bakterien-Kokalisation nahelegte (Abbildung 30 A). Es zeigten sich punktierte Signale, die mit dem DAPI-Signal der Bakterien überlagerten. Das Serum zeigte jedoch eine sehr deutliche Hintergrundfärbung in nicht-infizierten Zellen, die auch durch verschiedene Abreicherungsmaßnahmen nicht minimiert werden konnte und sehr stark den Zellkern anfärbte (Abbildung 30 E). In Abbildung 30 D ist eine infizierte Zelle 72 hpi gezeigt, die mit anti-CPn0472-Serum gefärbt wurde, welches zuvor durch Inkubation mit lebenden HEP-2-Zellen abgereichert wurde. Die Inklusion ist stark gefärbt ist und weist

ein punktiertes Muster auf. Hier war jedoch immer noch eine starke Hintergrundfärbung zu beobachten, bei der sowohl der Kern als auch das Zytoplasma gefärbt wurde, so dass eine Antigen-Reinigung durchgeführt wurde. Die Antigen-Reinigung verringerte die Hintergrundfärbung etwas, aber auch die generelle Signalstärke nahm sehr deutlich ab. Der aufgereinigte Antikörper musste zusätzlich eingeeengt werden, so dass wiederum die Hintergrundfärbung verstärkt hervortrat. Deutlich zu erkennen ist dies in Abbildung 30 B und C. Lediglich die starke punktierte Anfärbung der Inklusion war zu beobachten. Eine genaue



**Abbildung 30: Lokalisierung von CPn0472 in infizierten Zellen**

HEp-2 Zellen wurden für 24 (A) 48 Stunden (B, C) bzw. 72 Stunden (D) mit *C. pneumoniae* (MOI 4) infiziert und mit Methanol fixiert oder nicht infiziert und fixiert (E). CPn0472 ist immer in grün, DAPI immer in blau dargestellt. In B und C wurde zusätzlich mit einem monoklonalen Antikörper gegen chlamydiales Momp gefärbt (rot). Der Längsmaßstab repräsentiert 5 µm.

A+B) Abgebildet sind Zellen, die 24 bzw. 48 hpi mit dem 1:50 verdünnten Antiserum gegen CPn0472 gefärbt wurden.

C) Zellen, die mit dem Antigen-gereinigten unverdünnten Serum gefärbt wurden (48 hpi).

D) Gezeigt ist eine infizierte Zelle, die mit abgereichertem Serum 72 hpi gefärbt wurden.

E) Nicht-infizierte Zellen wurden mit dem 1:50 verdünnten Antiserum gefärbt.

Aussage über die Lokalisierung von CPn0472 in der Infektion konnte aufgrund des unspezifischen Antikörpers nicht gemacht werden. Die generelle Signalstärke reichte für eine Analyse mittels Konfokal-Mikroskopie nicht aus. Es ist jedoch zu erkennen, dass die Inklusion angefärbt werden konnte und die für CPn472 detektierten Signale punktiert vorliegen, was auf eine Kolo-kalisierung mit den Bakterien hindeuten könnte. Eine Sekretion konnte durch die Immunfluoreszenz weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. In weiterführenden biochemischen Analysen mit Fraktionen infizierter Zellen konnte für CPn0472 keine Sekretion nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.3.2.3.1).

Zusammenfassend kann für CPn0472 festgestellt werden, dass es sich um ein Protein handelt, welches in EBs stärker exprimiert wird als in RBs und wahrscheinlich mit den Bakterien assoziiert vorliegt.

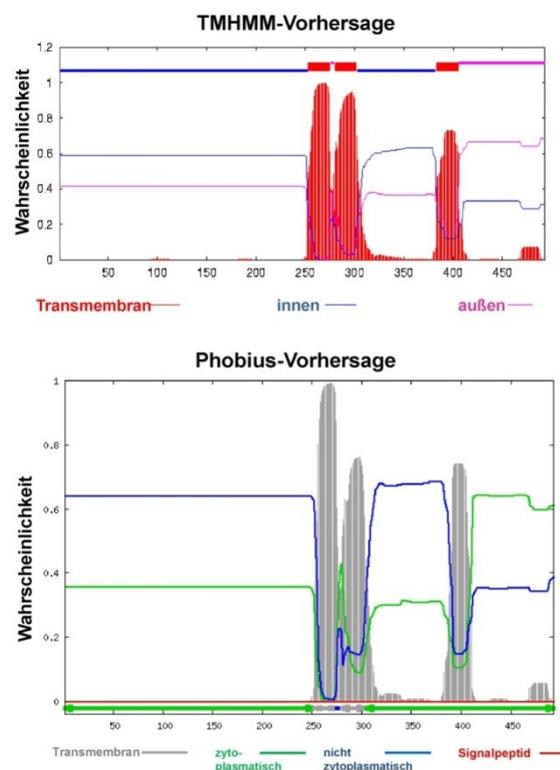
#### 4.2.5 CPn0809 könnte eine Rolle in der frühen Infektionsphase spielen

CPn0809 zeigte zusammen mit CPn0472 die höchste Isolierungsfrequenz in dem in dieser Arbeit durchgeführten Screening. Beide Proteine induzierten außerdem einen sehr starken Wachstumsdefekt in Hefezellen und wurden deshalb als Kandidaten zur weiteren Analyse ausgewählt. CPn0809 wird in der KEGG-Datenbank als hypothetisches Protein von 493 Aminosäuren geführt.

Die Phobius-Analyse zur Vorhersage von möglichen Transmembran-Helices ergab, dass das Protein wahrscheinlich 2 Transmembrandomänen besitzt, die sich im mittleren Abschnitt des

Proteins befinden. Mit dem TMHMM-Vorhersage-Programm

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) wurden allerdings 3 Transmembrandomänen ermittelt (siehe Abbildung 31), wobei die dritte Domäne im C-Terminus des Proteins lag und bei Phobius unterhalb des Grenzwerts zur Determinierung einer Transmembranhelix lag. Dies macht die vorhergesagte Orientierung des C-Terminus ungewiss. Nach der TMHMM-Vorhersage liegt dieser „außen“, also nicht-



**Abbildung 31: Transmembrandomänen-Vorhersage für CPn0809**

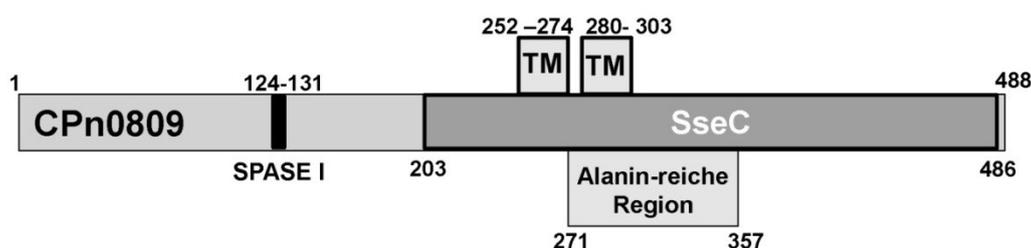
Vergleich der Transmembrandomänen-Wahrscheinlichkeitsvorhersage von TMHMM (oben) und Phobius (unten).

zytoplasmatisch, genau wie der gerade einmal 5 Aminosäuren umfassende Bereich zwischen den beiden ersten Transmembranhelices. Nach Phobius liegt sowohl der N- als auch der C- Terminus zytoplasmatisch vor.

CPn0809 ist zu 52 % identisch und zu 68 % homolog zu CT578 aus *C. trachomatis*. Für CT578 ist laut Phobius und TMHMM allerdings nur eine Transmembrandomäne in der Mitte des Proteins vorhergesagt und im Gegensatz zu CPn0809 soll der N-Terminus nicht-zytoplasmatisch vorliegen. Allerdings ähneln sich die Hydrophobizitätsplots der beiden Proteine trotzdem: Auch CT578 weist zwei weitere hydrophobe Areale auf, die sich ebenfalls im C-Terminus befinden. Beide werden jedoch von beiden TM-Vorhersageprogrammen nicht als Transmembrandomänen gewertet.

In dem *C. pneumoniae*-Stamm CWL029, der bereits komplett sequenziert ist, besteht das Protein aus 493 Aminosäuren (Kalman, Mitchell et al. 1999). Eine Sequenzierung des OLR von *cpn0809* des in dieser Arbeit verwendeten GiD-Stamms ergab, dass dieser eine C-terminale Verkürzung aufweist. Gegenüber dem Referenzstamm fehlen die letzten sechs Aminosäuren, an ihrer Stelle befindet sich nur ein Alanin. Somit besteht das GiD-CPn0809 aus 488 Aminosäuren und hat ein berechnetes Molekulargewicht von 49,8 kDa. Die KEGG-Datenbank gibt das benachbarte CPn0808 als paraloges Protein an, also als ein Protein, das durch Genduplikation aus CPn0809 entstanden sein könnte. Ein Sequenzvergleich zeigte aber nur eine sehr geringe Homologie zum N-terminalen Bereich von CPn0809. Hier sind 39 Aminosäuren zu 35 % identisch und zu 52 % homolog zu CPn0808.

Des Weiteren sind für CPn0809 einige funktionelle Domänen annotiert. Im AS-Bereich von 124 -131 befinden sich zwei Serine und ein Leucin, die potentiell das Aktivitätszentrum für eine Signal-Peptidase vom Typ I bilden könnten. Typ I-Signal-Peptidasen sind integrale Membranproteine, die Signal-Peptide von sekretorischen Proteinen entfernen und für die Prozessierung des Großteils der exportierten Präproteine verantwortlich sind (Quelle: ProSite, <http://prosite.expasy.org/>). Sie kommen in Bakterien, Archae, Pilzen, Pflanzen und tierischen Zellen vor und sind zumindest in gramnegativen Bakterien notwendig für das



**Abbildung 32: vorhergesagte Domänen von CPn0809**

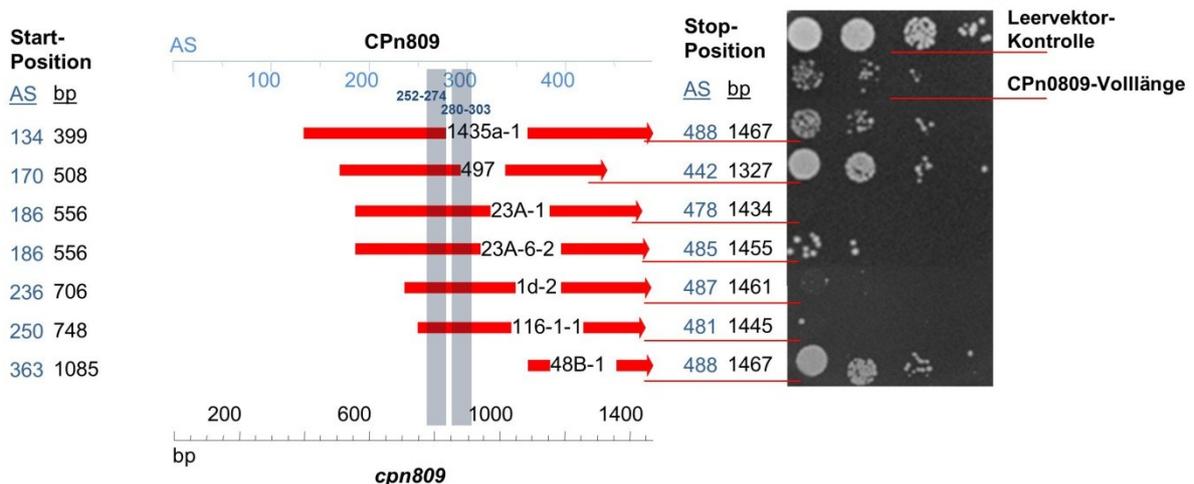
Schematische Darstellung der mit der KEGG-Datenbank und Phobius (spezifischer als TMHMM) vorhergesagten Domänen von CPn0809. Die Zahlen repräsentieren die Aminosäurepositionen. SPASE I = Signalpeptidase I-Aktivitätszentrum, TM= Transmembranhelix, SseC = Secretion system effector C (SseC) like family-Domäne.

Überleben der Zelle. In *E. coli* wurde zudem festgestellt, dass das aktive Zentrum der Signal Peptidase I von außen auf der Zytoplasmamembran zugänglich ist (Tuteja 2005).

Im AS-Bereich von 271 -357 befindet sich eine Alanin-reiche Region mit insgesamt 32 Alaninen.

Die interessanteste Domäne befindet sich im Aminosäurebereich von 203 -486. Hier ist für CPn0809 eine „Secretion system effector C (SseC) like family“-Domäne annotiert. Diese Domäne ist nach dem Typ III-sekretierten SseC-Protein aus Salmonellen benannt, das zusammen mit SseB und SseD auf der Oberfläche der Bakterien lokalisiert und in die Wirtszellmembran inseriert, wo sie eine Pore bilden (Nikolaus, Deiwick et al. 2001). Diese Pore erlaubt es den Bakterien, Proteine über das Typ III-Sekretionssystem in die Wirtszelle zu translozieren. Zu der Familie der SseC-Proteine gehören auch PopB aus *Pseudomonas aeruginosa*, YopB aus Yersinien und EspD aus enteropathogenen *E. coli* (Quelle: Pfam-Datenbank, <http://pfam.sanger.ac.uk/>). Die Sequenzhomologie zwischen den unterschiedlichen Proteinen mit SseC-Domäne ist sehr gering.

CPn0809 wurde in dem durchgeführten Screening zur Identifizierung potentieller Effektorproteine insgesamt sieben Mal in Fragmenten unterschiedlicher Größe isoliert. Es ist zu erkennen, dass alle isolierten Fragmente mit Ausnahme des kleinsten isolierten Fragments, #48B-1, die vorhergesagten Transmembranbereiche enthalten. Der serielle



**Abbildung 33: Darstellung der isolierten Screenfragmente von CPn0809 und ihr Hefe-Phänotyp**

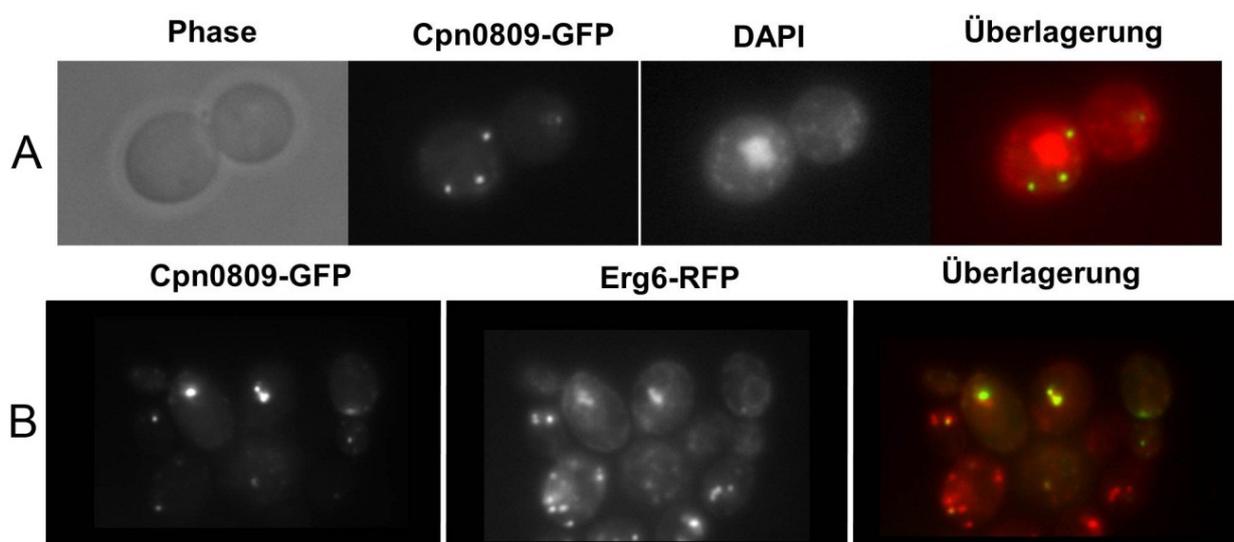
Die roten Pfeile kennzeichnen die Lage und Länge der isolierten Screenfragmente, die Zahlen in den Pfeilen stehen für die intern vergebene Nummer der Fragmente. Die blauen Balken repräsentieren die Lage der Transmembrandomänen, die Zahlen geben den Start- und Stop-Bereich des AS- (blau) bzw. Basenpaar- (bp, schwarz) Abschnitt der Fragmente wieder. Rechts ist ein serieller Verdünnungstropftest der entsprechenden Hefestämme gezeigt. Die oberste Reihe repräsentiert Hefen, die mit dem leeren Vektor transformiert wurden, gefolgt von Hefen, die das Vollängenprotein CPn0809 exprimieren. Darunter folgen die Screenkandidaten in der Reihenfolge des linken Schemas (durch die roten Linien gezeigt). Die Hefestämme wurden jeweils für 20 Stunden in Flüssigmedium induziert und dann auf induzierendes Medium getropft und für weitere 72 Stunden inkubiert.

Verdünnungstropftest (Abbildung 33, rechts) wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Anne Kerres durchgeführt. Hefezellen, die die verschiedenen Screenfragmente exprimieren, zeigten sehr unterschiedlich ausgeprägte Phänotypen. Die größte Letalität zeigten die Fragmente #23A-1, #23A-6-2, #1d-2 und #116-1-1. Das Fragment #48B-1 zeigte hingegen nur einen geringen Wachstumsdefekt in der Hefe und war vergleichbar zu Fragment #497, dem im Vergleich zu den anderen Fragmenten ein Stück des C-Terminals Bereichs fehlte. Der Bereich, der die größte Letalität verursacht, scheint somit ungefähr deckungsgleich mit dem zweitkleinsten Fragment, #116-1-1, zu sein, da sowohl ein Verlust der Transmembrandomänen (#48B-1) als auch eine C-terminale Verkürzung, wie sie bei #497 vorliegt, zu einer Abmilderung des Phänotyps führte.

#### 4.2.5.1 Die subzelluläre Lokalisierung von CPn0809 bei ektopischer Expression bleibt unklar

In Hefezellen lokalisierte CPn0809 punktiert im Zytoplasma (Abbildung 34 A). Frau Dr. Kerres konnte zeigen, dass CPn0809 als GFP-Fusionsprotein in Hefe teilweise mit dem Lipidtröpfchen-Marker Erg6p kolokalisierte (Abbildung 34 B).

Cpn0809 wurde als Vollängen-GFP-Fusionsprotein in den humanen Expressionsvektor pBYE kloniert, um die subzelluläre Expression in humanen Zellen zu analysieren. Die

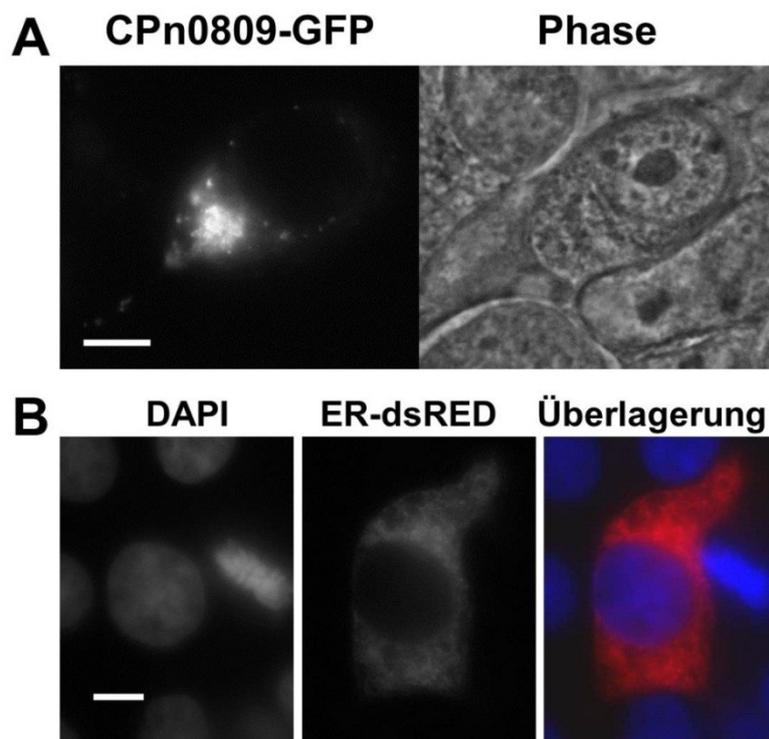


**Abbildung 34: Subzelluläre Lokalisierung von CPn0809 in Hefe**

Die Mikroskopie-Analysen wurden von Frau Dr. Anne Kerres durchgeführt. Die Hefezellen wurden für 20 Std in Flüssigmedium induziert, lebend mit DAPI gefärbt (A) und anschließend fixiert.

- A) In der Überlagerung ist GFP in grün und DAPI in rot dargestellt.
- B) CPn0809 wurde in einem Hefestamm exprimiert, in dem RFP fusioniert an ERG6 genomisch integriert wurde (EY1671, Stamm-Nr. 1585 (Huh, Falvo et al. 2003)). In der Überlagerung ist GFP in grün und RFP in rot dargestellt.

Transfektion in Humanzellen gelang für diesen Kandidaten erst nach vielen vergeblichen Versuchen und es zeigte sich immer wieder eine erhöhte Menge an toten Zellen, was den letalen Phänotyp in Hefe widerspiegelte. Außerdem war die Transfektionseffizienz viel geringer als bei allen anderen getesteten Konstrukten. Ähnliches wurde auch für die ektopische Expression des CPn0809-Homologs CT578 aus *C. trachomatis* berichtet (Chellas-Gery, Wolf et al. 2011). Vergleichbar zu der Lokalisierung in Hefe konnte in den in dieser Arbeit durchgeführten Lokalisierungsanalysen für CPn0809 eine punktierte zytosolische Lokalisierung beobachtet werden, allerdings waren deutlich mehr Punkte zu sehen als in Hefe (siehe Abbildung 35 A). Die Punkte liegen teilweise um den Kern herum und akkumulieren an einer Seite des Kerns, es könnte sich daher um eine partielle ER-Kolokalisierung handeln. Leider gelang eine Kotransfektion mit einem ER-Marker aufgrund der schlechten Transfektionseffizienz nicht. Der monoklonale Antikörper gegen Calnexin, ein



**Abbildung 35: Subzelluläre Lokalisierung von CPn0809 und Calreticulin in Humanzellen**

- A) HeLa 229 Zellen wurden mit CPn0809-GFP (Plasmid # 1555) transfiziert und nach 10 Stunden mit para-Formaldehyd fixiert.
- B) HEK293 Zellen wurden mit Calreticulin-dsRed transfiziert, fixiert und die DNA mit DAPI gefärbt.
- Der Längenmarker repräsentiert 5  $\mu$ m.

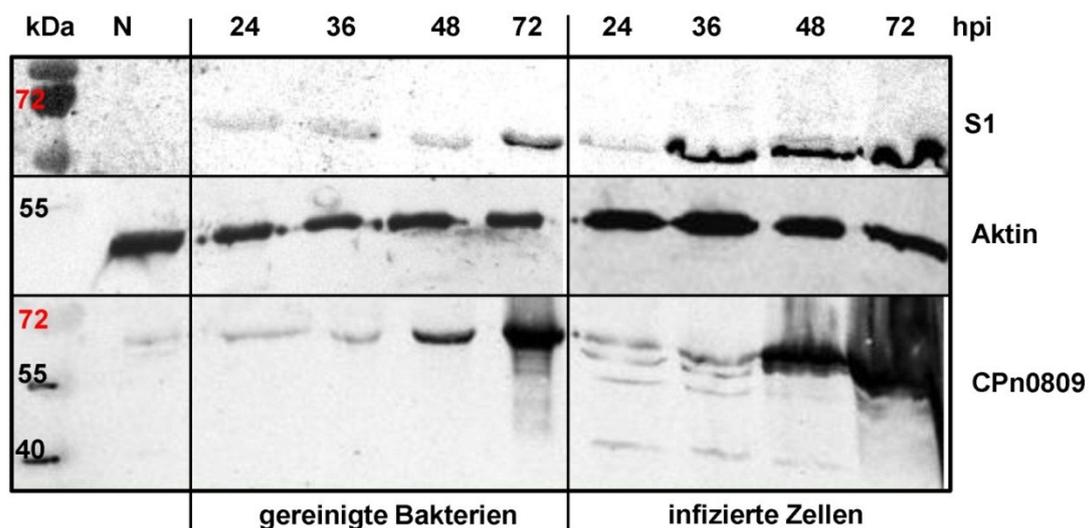
Protein des ER, färbte netzartig das gesamte Zytoplasma und brachte deshalb ebenfalls kein Ergebnis. Die alleinige Expression des ER-Markers Calreticulin zeigte, dass das ER eine eher retikuläre Struktur aufweist (siehe Abbildung 35 B) und die beobachteten Punkte von CPn0809 wahrscheinlich nicht mit dem (gesamten) ER kolokalisieren.

#### 4.2.5.2 CPn0809 ist ein in EBs stark exprimiertes Protein

Zur Analyse der Expression und Lokalisierung von CPn0809 während der Infektion wurde ein Antiserum gegen CPn0809 hergestellt. Es wurde gegen den N-terminalen Bereich von AS 1-253 generiert, da die Transmembrandomänen erfahrungsgemäß Probleme bei der

Expression in *E. coli* verursachen und sich neben den Transmembrandomänen im mittleren Bereich auch im C-Terminus des Proteins ein stark hydrophober Bereich befindet. Die ersten beiden Immunisierungen wurden mit 6His-markiertem, denaturiertem Protein, welches aus dem Gel ausgeschnitten wurde, durchgeführt, die beiden letzten Immunisierungen erfolgten mit nativem 6His-Protein. Der Antikörper zeigte in Vorab-Untersuchungen eine hohe Spezifität, jedoch wurden in der Immunfluoreszenz auch einzelne nicht-infizierte Humanzellen detektiert und in Western Blot Analysen wurde auch in Proben von nicht-infizierten Zellen immer eine Bande detektiert, die fast auf der gleichen Höhe wie das chlamydiale Protein CPn0809 lief. Auch eine Antigen-Reinigung konnte diese Reaktion mit Humanzellen nicht beseitigen.

Die Expression von CPn0809 wurde mit dem Antigen-gereinigten Antiserum analysiert. Für die Detektion von CPn0809 in Bakterien bzw. in infizierten Zellen, die im Zeitraum von 24 bis 72 Stunden nach der Infektion geerntet wurden, wurden dieselben Proben verwendet wie für den entsprechenden Western Blot mit dem CPn0472-Antiserum (vergl. Abschnitt 4.2.4.2 Abb. 13). CPn0809 zeigte von allen untersuchten Proteinen das stärkste Signal und war immer bei ca. 60 kDa zu detektieren (Abbildung 36). Aufgrund der schwach detektierten Bande, die auch in den nicht-infizierten Zellen zu sehen ist, ist es schwer zu sagen, ob evtl. auch schon nach 24 Stunden oder 36 Stunden ein schwaches Signal für CPn0809 zu detektieren ist. Auch ein längeres Auftrennen auf dem Gel brachte keine Verbesserung, denn das kreuzreaktive Humanprotein scheint die gleiche Größe wie das chlamydiale Protein

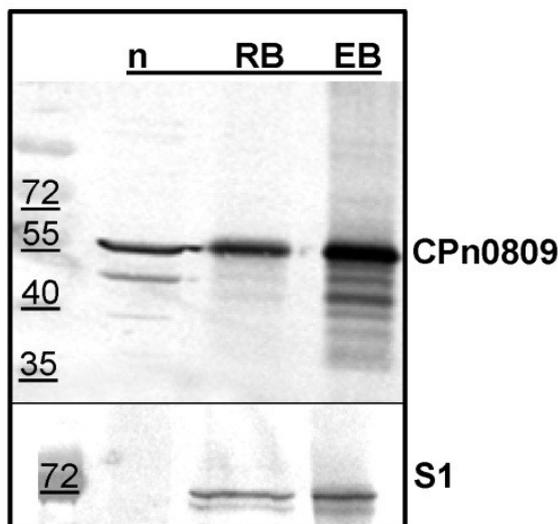


**Abbildung 36: Expressionsanalyse von CPn0809**

Aufgetragen wurden nicht-infizierte HEp-2 Zellen (N) sowie zu den angegebenen Zeitpunkten geerntete Bakterien, die über Differentialzentrifugation aus infizierten HEp-2 Zellen angereichert wurden („gereinigte Bakterien“) und Gesamtprotein-Extrakte infizierter Zellen („infizierte Zellen“). Die Detektion erfolgte mit dem Antigen-gereinigten Serum gegen CPn0809 (1:100 verdünnt) sowie einem monoklonalen Antikörper gegen humanes  $\beta$ -Aktin und chlamydiales S1. Die Proben wurden mit Hilfe des humanen  $\beta$ -Aktin-Antikörpers auf einen etwa gleichen Gesamtproteingehalt eingestellt. Für den Aktin-Blot wurde die Hälfte (gereinigte Bakterien) bzw. 1/20 (infizierte Zellen) der Proteinmenge geladen.

zu besitzen (Daten nicht gezeigt). Deutlich ist aber bei der Probe nach 48 stündiger Infektion eine Bande für CPn0809 zu erkennen, welche bei den 72-Stunden-Proben an Intensität zunimmt. Dieses Ergebnis passt zu Transkriptdaten, nach denen die Expression von CPn0809 nach 48 Stunden Infektion hochreguliert wird (Lugert, Kuhns et al. 2004; Murra 2005).

Der Vergleich der Proben angereicherter („gereinigter“) Bakterien und der Gesamtprotein-Extrakte infizierter Zellen zeigte keine deutlichen Unterschiede, wenn davon abgesehen wird, dass die generelle chlamydiale Proteinmenge bei den Proben gereinigter Bakterien aufgrund hoher Verluste bei der Aufreinigung reduziert war. Es konnte somit keine Sekretion anhand



**Abbildung 37: Western Blot-Analyse von RB- und EB-Fractionen mit  $\alpha$ -CPn0809**

Analysiert wurden Proteinextrakte nicht infizierter HEp-2 Zellen (n) sowie RB- und EB-Fractionen. Die Bakterien wurden 40 (RB) bzw. 84 (EB) Std nach der Infektion über einen Gradienten gereinigt. Die Proben wurden zusätzlich mit 2 % SDS versetzt und mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen das chlamydiale ribosomale S1-Protein auf einen möglichst gleichen bakteriellen Proteingehalt eingestellt. Zur Detektion von CPn0809 wurde nur 1/10 der Probenmenge geladen. Die Detektion erfolgte mit dem Antigen-gereinigten Antiserum gegen CPn0809 (1:100 in PBS) und einem monoklonalen Antikörper gegen chlamydiales S1.

der Western Blot-Analyse festgestellt werden.

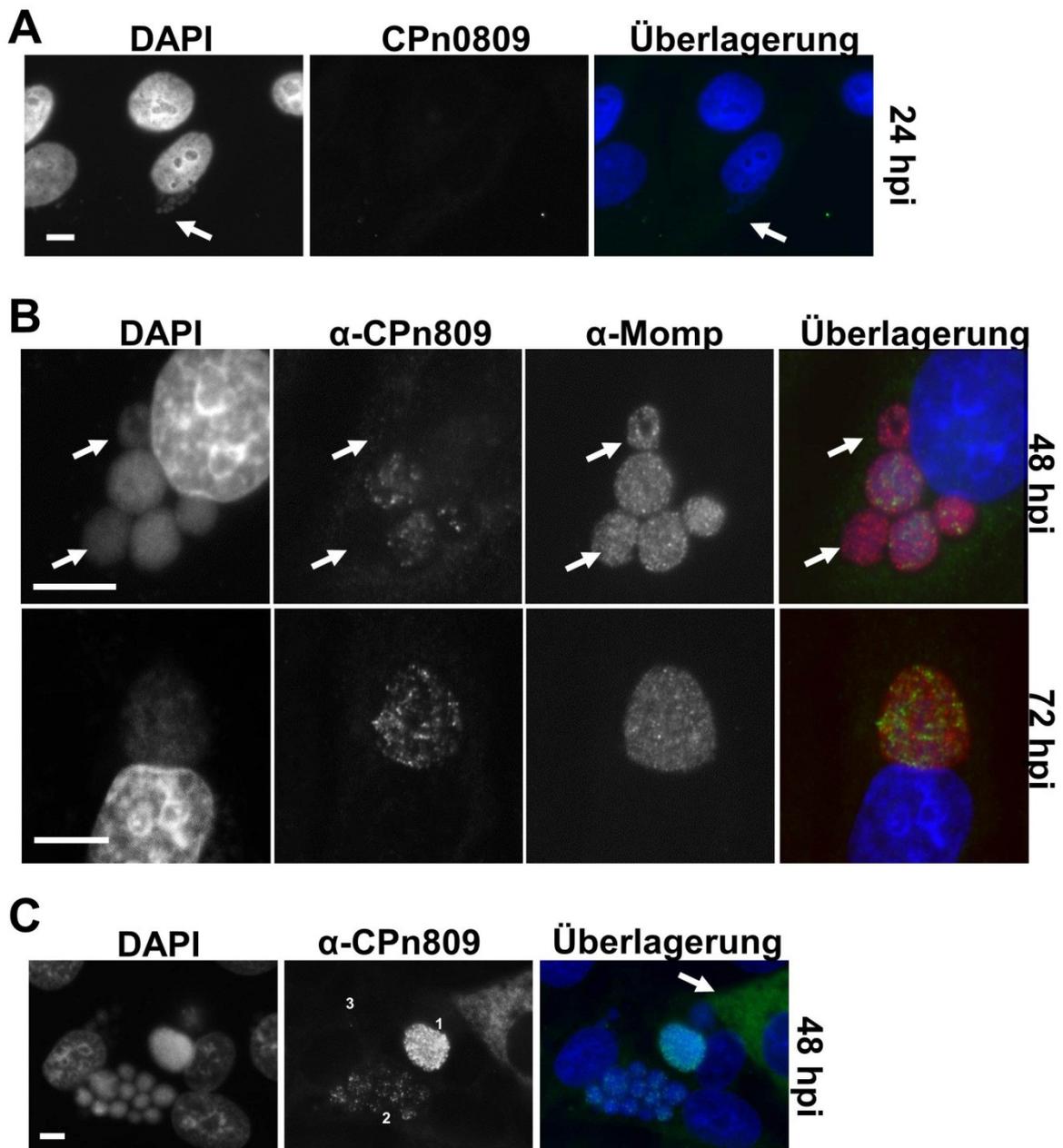
In der Western Blot-Analyse von RB- und EB-Fractionen (

Abbildung 37) zeigte die EB-Fraktion ein deutlich stärkeres Signal als die RB-Fraktion. Deutlich ist hier die unspezifische Humanzell-Bande zu erkennen, die fast auf der gleichen Höhe wie CPn0809 läuft. In der EB-Fraktion sind außerdem deutlich niedermolekulare Zusatzbanden zu erkennen, hierbei könnte es sich um Degradationsprodukte handeln. Die Analysen deuten also auf eine verstärkte Expression in EBs hin.

#### 4.2.5.3 Die Immunfluoreszenz bestätigt die EB-Abundanz von CPn0809

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie sollte die Lokalisierung von CPn0809 in der Infektion analysiert werden. Hierzu wurden infizierte Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion untersucht. CPn0809 konnte in der Immunfluoreszenz zu frühen Zeitpunkten der Infektion (24 hpi) nicht detektiert werden (Abbildung 38 A). Nach 48 stündiger Infektion konnten einige punktförmige Signale für CPn0809 in den Inklusionen beobachtet werden (Abbildung 38 B oben). Interessant ist, dass zwei Inklusionen nahezu kein Signal für CPn0809 zeigten (markiert mit Pfeilen), während mit dem Momp-Antikörper alle Inklusionen gefärbt werden konnten. In Zellen, die für 72 Stunden infiziert wurden, waren deutlich mehr

Signale pro Inklusion zu sehen und es waren nahezu alle Inklusionen gefärbt (Abbildung 38 B unten). In einer großen Inklusion zeigen sich viele punktförmige CPn0809-Signale, aber auch hier sind es weniger CPn0809-Signale als Momp-Signale. Die chlamydiale Infektion verläuft asynchron, so dass nicht immer alle Inklusionen gleich weit im Entwicklungszyklus sind. In Abbildung 38 C sind mehrere infizierte Zellen zu sehen, die 48 hpi fixiert wurden. Eine Zelle zeigt eine sehr große Inklusion mit sehr vielen CPn0809-Signalen (1). Inklusionen dieser Größe sieht man typischerweise erst nach einer 72 stündigen Infektion. Die Zelle darunter weist viele kleine, noch nicht fusionierte Inklusionen auf, die nur wenige CPn0809-Signale zeigen (2). Dies konnte häufig bei Zellen beobachtet werden, die nach 48 Stunden dauernder Infektion fixiert wurden. Bei der Zelle ganz links sind die noch viel kleineren Inklusionen nur in der DAPI-Färbung zu erkennen und werden gar nicht von dem CPn0809-Antikörper detektiert (3). Inklusionen dieser Größe sieht man üblicherweise nach 24 -36 stündiger Infektion. Die Immunfluoreszenz legt also die Vermutung nahe, dass es sich bei CPn0809 um ein verstärkt in EBs produziertes Protein handelt. 24 hpi sind keine EBs in den Inklusionen zu finden, die Bakterien haben gerade mit der Replikation begonnen und es kommen nur RBs vor, daher ist mit dem CPn0809-Antikörper keine Detektion der Bakterien möglich. In Zellen, die 48 Stunden infiziert wurden, liegen die Bakterien sowohl als RBs als auch als EBs vor, daher können hier erste Signale für CPn0809 detektiert werden, zudem zeigten die Western Blot Analysen, dass das Protein in geringerer Menge auch in RBs zu detektieren ist. In der späten Infektion (72 hpi) haben die Bakterien sich fast alle zu EBs redifferenziert, es können zahlreiche Signale für CPn0809 detektiert werden. In Abbildung 38 C (weißer Pfeil) ist außerdem eine nicht-infizierte Humanzelle zu erkennen, die eine starke Färbung des Zytoplasmas aufweist. Diese Färbung einiger Humanzellen konnte immer wieder beobachtet werden. Eine Sekretion ins Zytoplasma der Wirtszelle konnte nicht beobachtet werden. Auch in weiterführenden biochemischen Analysen mit Fraktionen infizierter Zellen konnte für CPn0809 keine Sekretion nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.3.2.3.1). Das Protein scheint also mit einer Subpopulation der Bakterien, wahrscheinlich EBs und reifen RBs, zu kolokalisieren.



**Abbildung 38: Lokalisierung von CPn0809 in infizierten Zellen**

- A) HEp-2 Zellen wurden für 24 Stunden infiziert, Methanol-fixiert und mit dem unverdünnten Antigen-gereinigten Antiserum gegen CPn0809 gefärbt (grün). Die DNA wurde mit DAPI gefärbt (blau). Der weiße Pfeil zeigt mehrere Inklusionen, die mit DAPI, aber nicht mit dem CPn0809-Antikörper detektiert wurden.
- B) HEp-2 Zellen wurden für 48 bzw. 72 Stunden infiziert, Methanol-fixiert und mit dem Antigen-gereinigten Antiserum gegen CPn0809 gefärbt (grün). Die Bakterien wurden zusätzlich mit einem monoklonalen Momp-Antikörper detektiert (rot) und die DNA mit DAPI gefärbt (blau). Die Pfeile zeigen Inklusionen, die nicht mit dem CPn0809-Antikörper detektiert wurden.
- C) Infizierte HEp-2 Zellen, die nach 48 Stunden fixiert und mit dem Antigen-gereinigten Antiserum gegen CPn0809 (grün) und DAPI (blau) gefärbt wurden. Die Zahlen markieren die unterschiedlich großen Inklusionen (siehe Text), der weiße Pfeil zeigt einen Teil einer nicht-infizierten Zelle, die eine starke Hintergrundfärbung aufweist. Der Längenmarker repräsentiert 5  $\mu$ m.

#### 4.2.6 CPn1054, ein Vertreter der ppp-Familie

CPn1054 ist ein 811 AS großes Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von 93,5 kDa. Laut Phobius-Vorhersage verfügt CPn1054 über zwei Transmembrandomänen im N-Terminus des Proteins (AS 28-84), getrennt von nur 5 Aminosäuren. Nach den Kriterien von Toh handelt es sich bei CPn1054 um ein potentiell Inc-Protein (Toh, Miura et al. 2003). Von CPn1054 wurden insgesamt drei unterschiedliche Fragmente im Screening isoliert, die alle einen leichten bis mittelschweren Wachstumsdefekt in der Hefe auslösten. Zur Überprüfung des Wachstums-Phänotyps sollte auch das Volllängen-Protein in Hefe analysiert werden. Das Volllängengen konnte jedoch nicht kloniert werden, da sich kurz hinter dem Startkodon eine repetitive Sequenz von 13 Cytosinen befindet, die nicht korrekt amplifiziert werden konnte. Aus diesem Grund wurde eine am N-Terminus um 13 Aminosäuren verkürzte Variante kloniert. Die Expression dieses Konstrukts zeigte keinen negativen Einfluss auf das Wachstum der Hefe (siehe Abschnitt 4.2.1). In Abbildung 39 A sind die isolierten Fragmente zu sehen. Zwei der drei Plasmide enthielten N-terminale Bereiche von *cpn1054*, das dritte Fragment codierte einen Abschnitt des C-Terminus.

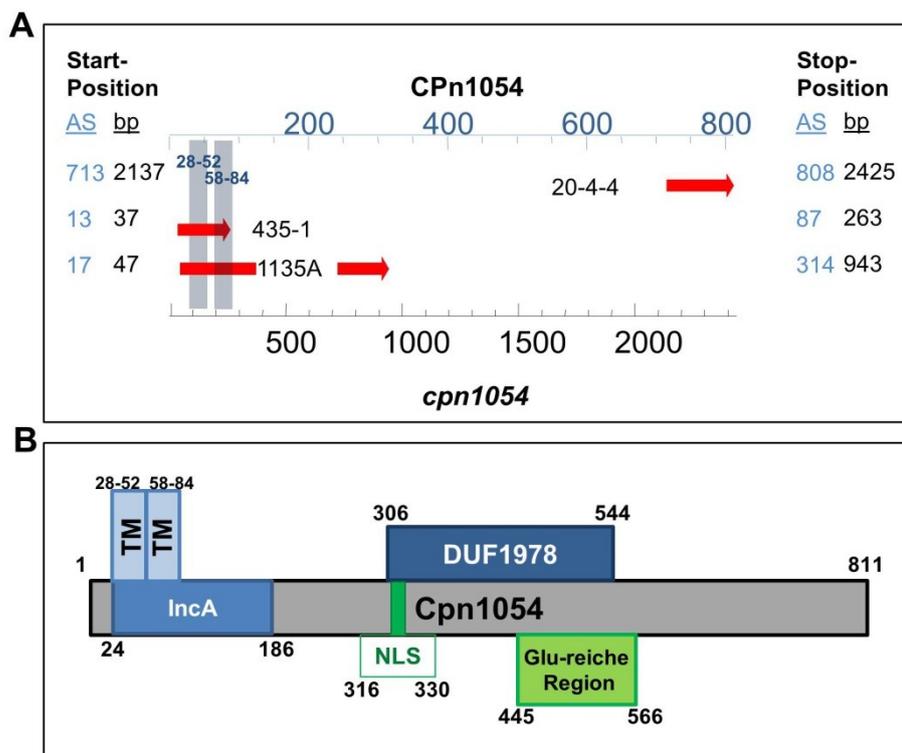
CPn1054 wird in der KEGG-Datenbank als hypothetisches Protein mit mehreren Domänen geführt (Abbildung 39 B). Im Aminosäurebereich 24 -186 befindet sich eine IncA-Domäne, die charakteristisch für Mitglieder der IncA-Proteinfamilie ist (Quelle: Pfam). CPn1054 ist in einem insgesamt 25 % des Proteins umfassenden Bereich schwach homolog zu IncA von *C. pneumoniae*. Dabei verteilen sich die homologen Bereiche über die gesamte Länge des Proteins: So befindet sich N-terminal ein 127 AS umfassender Bereich (AS 6-132), der zu 30 % identisch und zu 45 % homolog zu IncA ist, zwei weitere Bereiche befinden sich im AS-Abschnitt 447-512, hier beträgt die Homologie 55 bzw. 52 %, die Bereiche umfassen jedoch nur 41 bzw. 26 Aminosäuren.

Im Bereich von AS 306 -544 befindet sich eine Domäne unbekannter Funktion, DUF1978, die ausschließlich in hypothetischen Proteinen von *C. pneumoniae* vorkommt.

Die Aminosäuren 316 -330 zeigen ein zweiteiliges Kernlokalisierungssignal (Bipartite nuclear localization signal profile), wobei die „Spacer Region“, welche die benachbarten basischen Aminosäureabschnitte trennt, kürzer ist als üblich.

Von Aminosäure 445 bis 566 finden sich insgesamt 31 Glutaminsäure-Reste. Über diese Anreicherungen von bestimmten Aminosäuren ist nichts weiter bekannt, sie werden generell als „low complexity-regions“ bezeichnet.

Der codierende Genabschnitt für CPn1054 findet sich zweigeteilt noch einmal im Genom von *C. pneumoniae* wieder: *cpn0010* und *cpn0010.1* sind nahezu identisch zu dem entsprechenden Abschnitt von *cpn1054* (Abbildung 40)(Rocha, Pradillon et al. 2002; Viratyosin, Campbell et al. 2002).

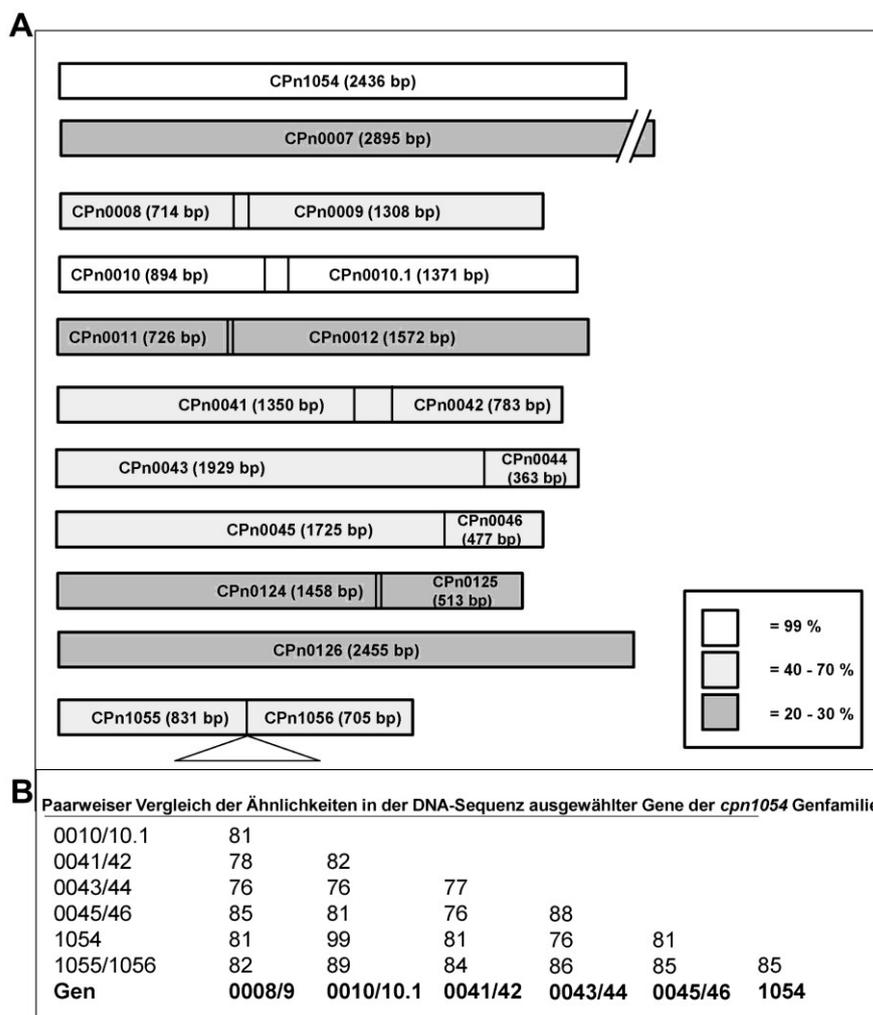


**Abbildung 39: Darstellung der isolierten Screenfragmente und Domänenvorhersage von CPn1054**

- A) Die roten Pfeile kennzeichnen die Lage und Länge der isolierten Screenfragmente, die Zahlen in den Pfeilen stehen für die intern vergebene Nummer der Fragmente. Die blauen Balken repräsentieren die Lage der Transmembrandomänen, die Zahlen geben den AS- (blau) bzw. Basenpaar- (schwarz) Abschnitt der Fragmente wieder.
- B) Bioinformatische Domänenvorhersage. Die Zahlen geben den entsprechenden Aminosäurebereich wieder, NLS= Kernlokalisierungssequenz, TM= Transmembranhelix, IncA= annotierte IncA-Domäne.

CPn1054 wurde vor allem aus einem Grund mit in die Gruppe der weiter zu analysierenden Kandidaten aufgenommen: Es handelt sich um den größten Vertreter der sogenannten ppp-Gene (ppp für *C. pneumoniae* polymorphic protein genes) bzw. der *cpn1054*-Genfamilie, die nur in *C. pneumoniae* vorkommt und durch eine hohe Rekombinationswahrscheinlichkeit charakterisiert ist (Rocha, Pradillon et al. 2002; Viratyosin, Campbell et al. 2002). Neben *cpn1054* gehören zu dieser Familie noch die codierenden Bereiche von *cpn0008/cpn0009*, *cpn0010/cpn0010.1*, *cpn0041/cpn0042*, *cpn0043/cpn0044*, *cpn0045/cpn0046* und *cpn1055/cpn1056*. Zusätzlich zu den genannten zählen nach den Kriterien von Viratyosin et al. noch folgende Gene zu dieser Gruppe: *cpn0007*, *cpn0011/cpn0012*, *cpn0124/cpn0125* und *cpn0126*. Sie weisen über die Gesamtlänge eine geringere Homologie zu den übrigen Vertretern auf (unter 20 %), werden aber aufgrund der typischen großen Homologie im 5'-Ende, welches den charakteristischen hydrophoben Abschnitt der ppp-Proteine bzw. *cpn1054*-Genfamilie codiert, zu dieser Genfamilie gezählt (Abbildung 40)(Viratyosin, Campbell et al. 2002).

Alle diese genomischen Abschnitte (mit Ausnahme von *cpn0007*, *cpn0011/cpn0012*, *cpn0124/cpn0125* und *cpn0126*) zeichnen sich dadurch aus, dass sie eine 6 – 24 Nukleotide umfassende poly-C-Wiederholung aufweisen, die teilweise in den verschiedenen Isolaten von *C. pneumoniae* variiert und sich entweder vor dem 5'-Ende oder innerhalb des 5'-Endes befindet (bei Genpaaren, wie z.B: *cpn0008/cpn0009* findet sich diese Wiederholung nur in dem ersten OLR, also im Beispiel nur in *cpn0008*). Die oben genannten Gene codieren für hypothetische Proteine und sind laut KEGG-Datenbank Paraloge von CPn1054. Es wird vermutet, dass die ppp-Mitglieder, die nur in *C. pneumoniae* vorkommen, eine Rolle im Gewebe-Tropismus spielen könnten. Als weiteres Mitglied dieser Familie wurde CPn0043 einmal im Screening identifiziert.

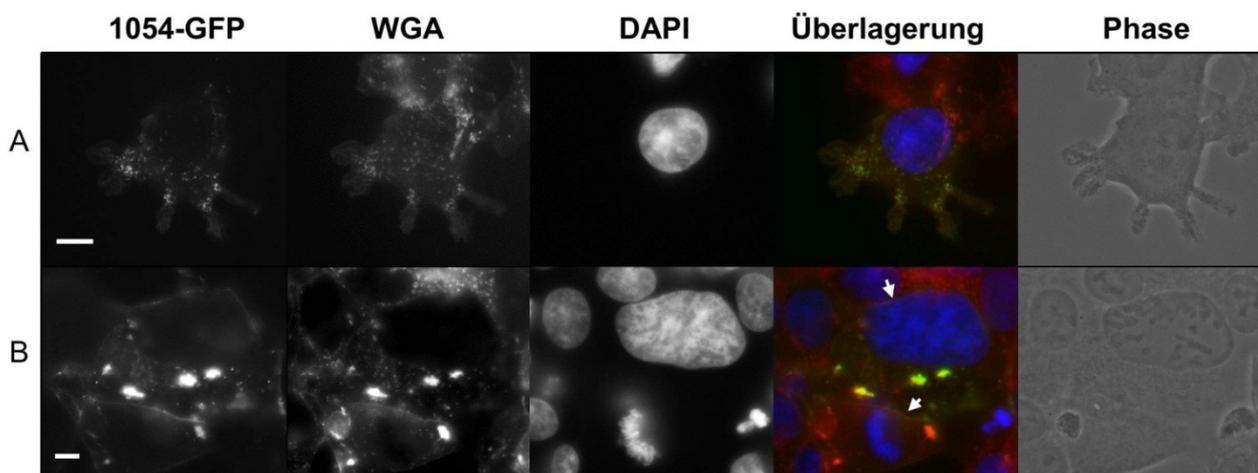


**Abbildung 40: Sequenzähnlichkeiten der paralogen Gene der *cpn1054*-Genfamilie**

- Grafik (A) und Tabelle (B) stammen aus der Publikation von Viratyosin et al. (Viratyosin, Campbell et al. 2002).
- A) Vergleich der paralogen Gene der *cpn1054*-Familie des *C. pneumoniae*-Stamms CWL029. Das 5'-Ende von *cpn1054* besitzt Ähnlichkeit zu *cpn0008*, *10*, *11*, *43*, *45* und *1055*, während das 3'-Ende Ähnlichkeiten zu *cpn0009*, *10.1*, *12*, *42*, *44*, *46* und *1056* aufweist. Die Sequenzähnlichkeit variiert von 20 -99 %, dargestellt durch die Einfärbung. Vertikale Striche geben Stoppcodons an, die das Leseraster unterbrechen.
- B) Paarweiser Vergleich der Nukleotidsequenzen mittels Blast-Analyse. Angegeben ist die Homologie in %. *Cpn0007*, *cpn0011/12*, *cpn0124/125* und *cpn0126* wurden nicht miteinbezogen, da die Gesamtähnlichkeit zu den anderen Vertretern der Genfamilie unter 20 % lag.

#### 4.2.6.1 Die subzelluläre Lokalisation von CPn1054 in Humanzellen ähnelt der in Hefe beobachteten Lokalisierung

In Hefe konnte für CPn1054-GFP (kloniert ab AS 14 nach dem Poly-C-Abschnitt) eine interessante Lokalisierung beobachtet werden, die nur zwei weitere Kandidaten zeigte: das Protein lokalisierte punktiert an der Zellperipherie (siehe Abschnitt 4.1.2 Abbildung 4). Zur Analyse der Lokalisierung in Humanzellen wurde *cpn1054* (Nkt 40-2436) als GFP-Fusion in den humanen Expressionsvektor pBYE kloniert. Das Fusionsprotein zeigte eine punktierte bis retikuläre Lokalisierung, wobei der Zellkern ausgespart wurde (Abbildung 41). Eine Kofärbung mit Alexa-633-markiertem WGA (wheat germ agglutinin) in HEK293 Zellen zeigte, dass es sich um membranöse Strukturen handelt. Auch eine Kolokalisierung an der Plasmamembran konnte beobachtet werden, hier zeigte sich eine kontinuierliche Färbung (Abbildung 41 B, Pfeile). Zudem waren teilweise sehr intensive Signale zu detektieren, die auch mit WGA angefärbt wurden. Es scheint sich also um membranöse Strukturen zu handeln, an denen CPn1054 akkumuliert. Die Expression des Fusionsproteins in humanen Zellen ähnelt somit teilweise der in Hefe beobachteten Lokalisierung, es zeigte sich jedoch eine kontinuierliche Färbung der Plasmamembran und keine stark punktierte, wie sie zuvor in Hefe beobachtet wurde. Auch waren in Hefe keine Proteinakkumulationen zu beobachten. CPn1054 zeigt in Humanzellen eine Kolokalisierung mit Membranen.



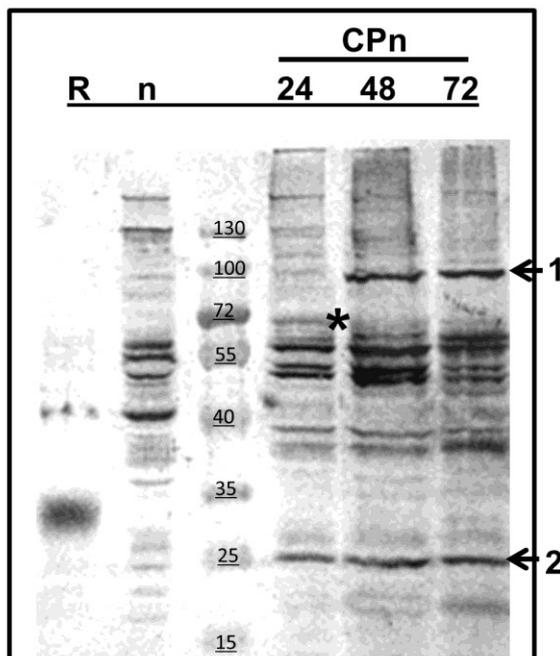
**Abbildung 41: Lokalisierung von CPn1054 bei ektopischer Expression in Humanzellen**

HEK 293 Zellen wurden mit CPn1054-GFP (Plasmid #1627) transfiziert und nach 24 Stunden fixiert und mit DAPI und Alexa-633-WGA (Wheat Germ Agglutinin) gefärbt. In der Überlagerung ist GFP in grün, WGA in rot und DAPI in blau dargestellt. Der Längenmarker repräsentiert 5  $\mu\text{m}$ . Die Pfeile zeigen CPn1054 in der Plasmamembran.

#### 4.2.6.2 Die CPn1054 zeigt unterschiedliche Expressionsmuster

Zur Analyse von CPn1054 in der Infektion wurde ebenfalls ein Antiserum generiert. Da der C-Terminus von CPn1054 homolog zu CPn0010.1 ist und der N-Terminus homolog zu

CPn0010, erkennt ein polyklonaler Antikörper potentiell alle drei Proteine. Eine hohe Wahrscheinlichkeit einer Kreuzreaktivität besteht aber auch bei den anderen Mitgliedern der ppp Familie. Für eine Kreuzreaktivität kommen nach einem Vergleich der Aminosäuresequenzen der ppp-Mitglieder mit dem C-Terminus (AS 511-811) von CPn1054 folgende Proteine in Frage, bei denen jeweils mindestens 8 aufeinanderfolgende Aminosäuren identisch zu CPn1054 sind: CPn0010.1, CPn0042, CPn0046 und CPn1065.



Es wurde zuerst GST-markiertes Vollängen-CPn1054 in *E. coli* exprimiert. Das Protein ließ sich jedoch fast gar nicht exprimieren, daher wurde eine verkürzte C-terminale Version von AS 511 – 811 mit

**Abbildung 42: Expressionsanalyse mit dem CPn1054-Antiserum**

Aufgetragen wurden das zur Immunisierung eingesetzte rekombinante 6His-Protein (R, MW 35,4 kDa) sowie Extrakte nicht-infizierter Zellen und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntete, durch Differentialzentrifugation angereicherte Bakterien aus jeweils 4 kleinen infizierten Flaschen. Zur Detektion wurde das generierte Serum gegen CPn1054 (1:100 in PBS) verwendet. Die Pfeile zeigen distinkte Banden, die nur in den Bakterienproben zu detektieren waren. Der Stern kennzeichnet eine Bande, die nur in der Probe nach 24 stündiger Infektion zu detektieren war.

einem 6His-Tag kloniert. Die Proteinausbeute bei Expression des C-terminalen Fragments war auch sehr gering und es traten viele Nebenbanden auf, so dass aus dem Gel ausgeschnittenes Protein für alle Immunisierungen verwendet wurde.

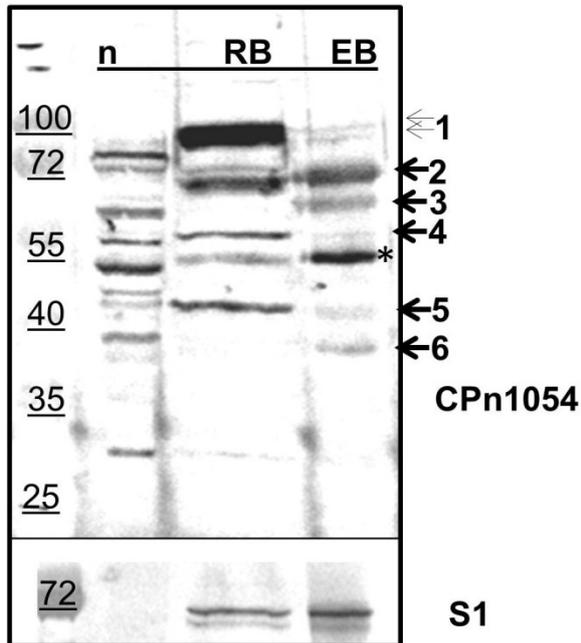
In einer Western Blot-Analyse detektierte das generierte Antiserum das rekombinante 6His-Protein (Abbildung 42). In dem Extrakt nicht infizierter Zellen wurden zahlreiche Banden detektiert, die stärksten Signale waren im Bereich zwischen 40 und 60 kDa zu sehen. Im Vergleich hierzu fallen aber einige distinkte Banden in den Bakterienproben auf. Zum einen ist in der 48- und 72-Stunden-Probe eine auffällige Bande bei ca. 100 kDa zu sehen (Pfeil 1). Dabei handelt es sich sehr wahrscheinlich um das Vollängenprotein CPn1054, da es von allen Proteinen, die von dem generierten Antiserum potentiell erkannt werden, das größte berechnete Molekulargewicht besitzt (93,5 kDa). Die anderen Proteine variieren im Bereich von 18 bis 55 kDa. Die zweite auffällige Proteinbande läuft ca. auf einer Höhe von 25 kDa und ist zu allen untersuchten Zeitpunkten etwa gleich deutlich vorhanden (Pfeil 2). Hierbei könnte es sich um ein C-terminales Fragment von CPn1054 handeln. In der 72 Stunden-Probe ist außerdem eine noch kleinere und sehr schwache Bande von ca. 20 kDa deutlich zu sehen. Auffällig ist auch, dass in der Probe der nach 24 stündiger Infektion geernteten

Bakterien eine Bande auf der Höhe von 70 kDa auftaucht, die zu späteren Zeitpunkten nicht mehr zu sehen ist (markiert mit \*). Hierbei könnte es sich um eine verkürzte Version von CPn1054 handeln, allerdings ist das Vollängenprotein zu diesem Zeitpunkt noch nicht zu detektieren. Möglich wäre bei einigen der Banden, dass es sich um CPn0010.1 handelt, dass von allen ppp-Proteinen mit 94 % Homologie und 69 % Identität die größte Ähnlichkeit zum C-Terminus von CPn1054 aufweist und ein berechnetes Molekulargewicht von 54,3 kDa besitzt. Die zahlreichen Banden im Bereich von 40 bis 60 kDa sind schlecht von den Hintergrundsignalen zu unterscheiden. Hier bleibt fraglich, ob es sich um spezifische Signale handelt.

Für eine weitere Analyse wurden RB- und EB-Fraktionen in einem Western Blot untersucht. Zur Detektion wurde das Antiserum zuvor durch Inkubation mit geblotteten Extrakten humaner Zellen abgereichert, um unspezifische Hintergrundfärbungen zu minimieren. Deutlich ist in der RB-Fraktion eine intensive Bande bei ca. 90- 100 kDa zu sehen, bei der es sich wahrscheinlich um eine Doppelbande und um Vollängen-CPn1054 handelt (Abbildung 43 Pfeile 1). In der EB-Fraktion ist diese Doppelbande sehr schwach zu erkennen. Hinzu kommt eine Bande von ca. 70 kDa, die in beiden Fraktionen vorhanden ist (2). Zuvor war eine Bande dieser Höhe nur nach 24 stündiger Infektion detektiert worden. Es handelt sich vermutlich um ein C-terminales Fragment von CPn1054 oder möglicherweise um CPn0010.1. Das diese Bande nun stärker und in beiden Proteinfractionen zu detektieren ist, könnte vielleicht an der Probenaufarbeitung liegen, da für die RB- und EB-Fraktionsblots die Proben zusätzlich mit SDS versetzt wurden, um möglichst viele chlamydiale Proteine in Lösung zu bringen. Zwei Banden von ca. 60 kDa (4) und 45 kDa (5) sind nur in der RB-Fraktion zu detektieren. In der EB-Fraktion ist dagegen eine Bande von ca. 65 kDa zu detektieren (3), bei der es sich möglicherweise auch um eine unspezifische Hintergrundbande handeln könnte, da auch in den Extrakten nicht-infizierter Zellen eine Bande dieser Höhe detektiert wurde. Allerdings ist sie nicht in der RB-Fraktion zu sehen. Dasselbe gilt für die relativ schwache Bande von ca. 38 kDa (6), die wiederum nur in der EB-Fraktion und möglicherweise auch in den Humanzellextrakten zu detektieren ist.

Die zuvor beobachtete Bande bei ca. 25 kDa war nun nicht mehr zu sehen, in einem Kontrollblot tauchte die Bande jedoch auf, war aber auch deutlich in der Fraktion der nicht-infizierten Zellen zu detektieren. Es handelt sich somit um eine unspezifische Hintergrundbande. Warum sich das Muster der Hintergrundsignale in beiden Blots unterschied, konnte nicht geklärt werden. Möglicherweise ist es auf die unterschiedliche Probenaufarbeitung zurückzuführen (Zusatz von SDS), um selbst schwer lösliche Proteine detektieren zu können. Dies könnte auch der Grund für die zusätzlich zu detektierenden Banden im RB / EB-Blot sein. Insgesamt ist erkennbar, dass sich das Expressionsmuster von CPn1054 in den RB- und EB-Fractionen deutlich unterscheidet. Die Blots zeigen

außerdem, dass der Antikörper sehr wahrscheinlich nur CPn1054 und möglicherweise CPn0010.1 erkennt, da für die anderen möglichen kreuzreaktiven ppp-Proteine im niedermolekularen Bereich (<30 kDa) keine Banden detektiert wurden. Scheinbar ist zumindest das Volllängen-Protein CPn1054 hauptsächlich in RBs vorhanden.

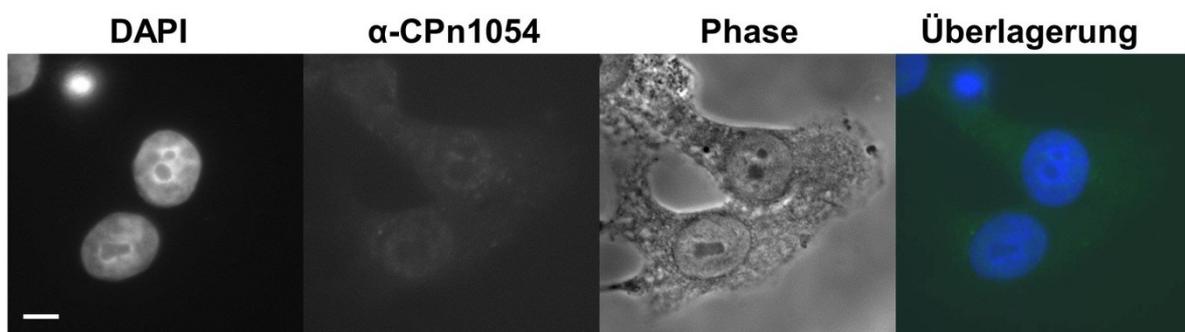


**Abbildung 43: Western Blot-Analyse von RB- und EB-Fraktionen mit  $\alpha$ -CPn1054**

Analysiert wurden Proteinextrakte nicht infizierter HEp-2 Zellen (n) sowie RB- und EB-Fraktionen. Die Bakterien wurden 40 (RB) bzw. 84 (EB) Std nach der Infektion über einen Gradienten gereinigt. Die Proben wurden zusätzlich mit 2 % SDS versetzt und mit Hilfe des S1-Antikörpers auf einen möglichst gleichen bakteriellen Proteingehalt eingestellt. Zur Detektion wurde über Humanzell-Extrakte abgereichertes Antiserum gegen CPn1054 verwendet. Die Pfeile markieren die distinkten Banden,\* ein unspezifisches Signal.

#### 4.2.6.3 CPn1054 zeigt eine bakterienassoziierte Lokalisierung in der Infektion

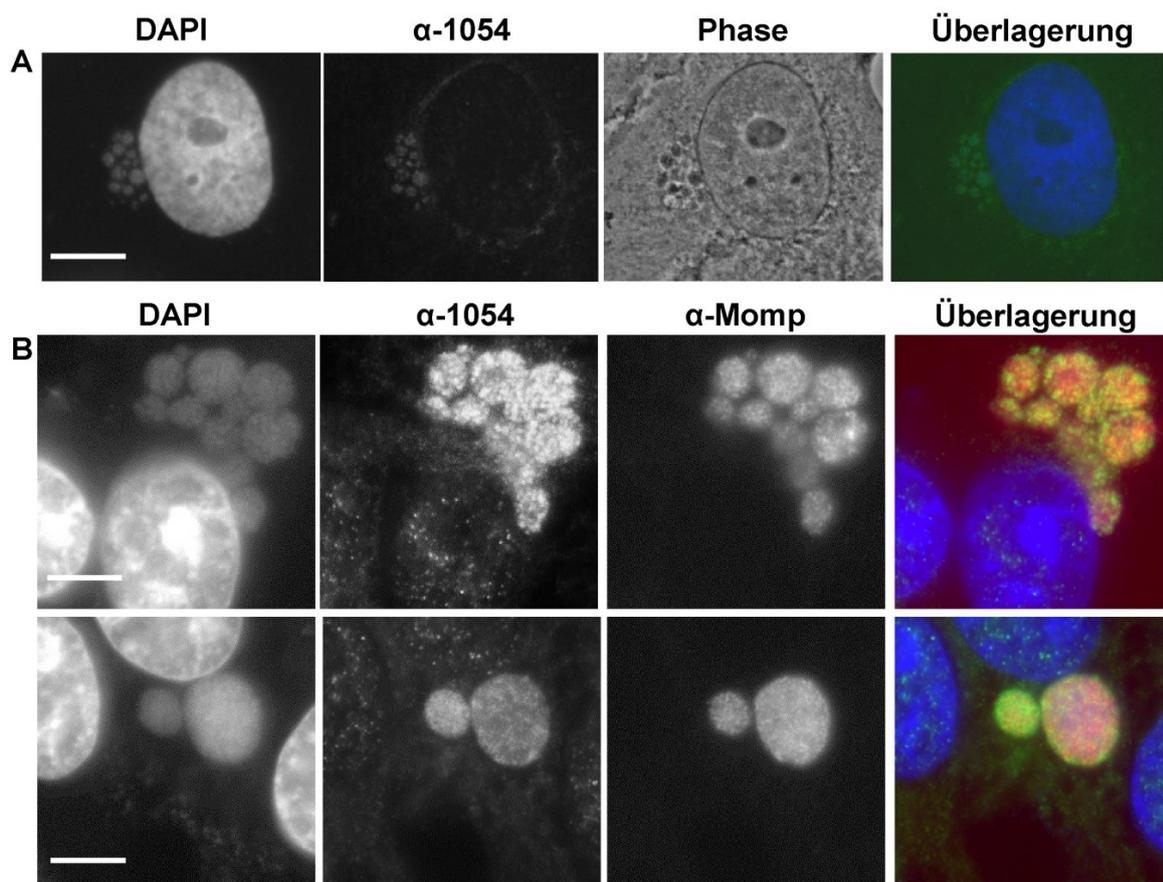
Das Antiserum, das gegen den C-Terminus von CPn1054 generiert wurde, färbte auch nicht-infizierte Humanzellen (Abbildung 44). Neben einer allgemeinen Färbung des Zytoplasmas detektierte der Antikörper auch den Zellkern und Strukturen in der Nähe des Kerns. In der Infektion konnte schon 24 Stunden nach der Infektion eine Färbung der Inklusionen beobachtet werden, allerdings war das Signal durchweg relativ schwach und aufgrund der unspezifischen Hintergrundfärbung konnte keine genauere Aussage über die Lokalisierung von CPn1054 (und möglicherweise CPn0010.1) in der Infektion gemacht werden (Abbildung



**Abbildung 44: CPn1054-Hintergrundfärbung nicht-infizierter Humanzellen**

HEp-2 Zellen wurden mit Methanol fixiert und anschließend mit dem 1:50 verdünnten Antiserum gegen CPn1054 (grün) und DAPI gefärbt. Der Längenmarker repräsentiert 5  $\mu$ m.

45 A). Die Antigenreinigung führte zu einer sehr starken Abschwächung des ohnehin schon relativ schwachen Signals, so dass der eluierte Antikörper nachträglich wieder aufkonzentriert werden musste. Dies verbesserte das Signal, verstärkte aber auch die unspezifische Hintergrundfärbung (Abbildung 45 B). Der Antikörper zeigte punktierte Signale innerhalb der Inklusion und es konnte teilweise eine Kolo­kalisierung mit Momp und der Bakterien-DNA beobachtet werden. Eine spezifischere Lokalisierungsangabe für CPn1054 kann nicht gemacht werden, zum einen aufgrund des generell schwachen Signals, zum anderen da das Signal für CPn1054 von dem möglicherweise auch zu detektierenden Signal für CPn0010.1 und möglicher weiterer ppp-Proteine überlagert werden könnte. Eine Sekretion konnte aufgrund der unspezifischen Hintergrundfärbung weder bestätigt noch ausgeschlossen werden, da zwischen einem möglichen sehr schwachen Signal für CPn1054 außerhalb der Inklusion und der starken Hintergrundfärbung keine Unterscheidung gemacht werden kann. CPn1054 scheint also mit den Bakterien zu kolo­kalisieren. Möglich wäre aber auch eine Sekretion in die Inklusion, da das generelle Signal von CPn1054 nicht immer eindeutig mit den Bakterien kolo­kalisierte.



**Abbildung 45: Lokalisierung von CPn1054 in der Infektion**

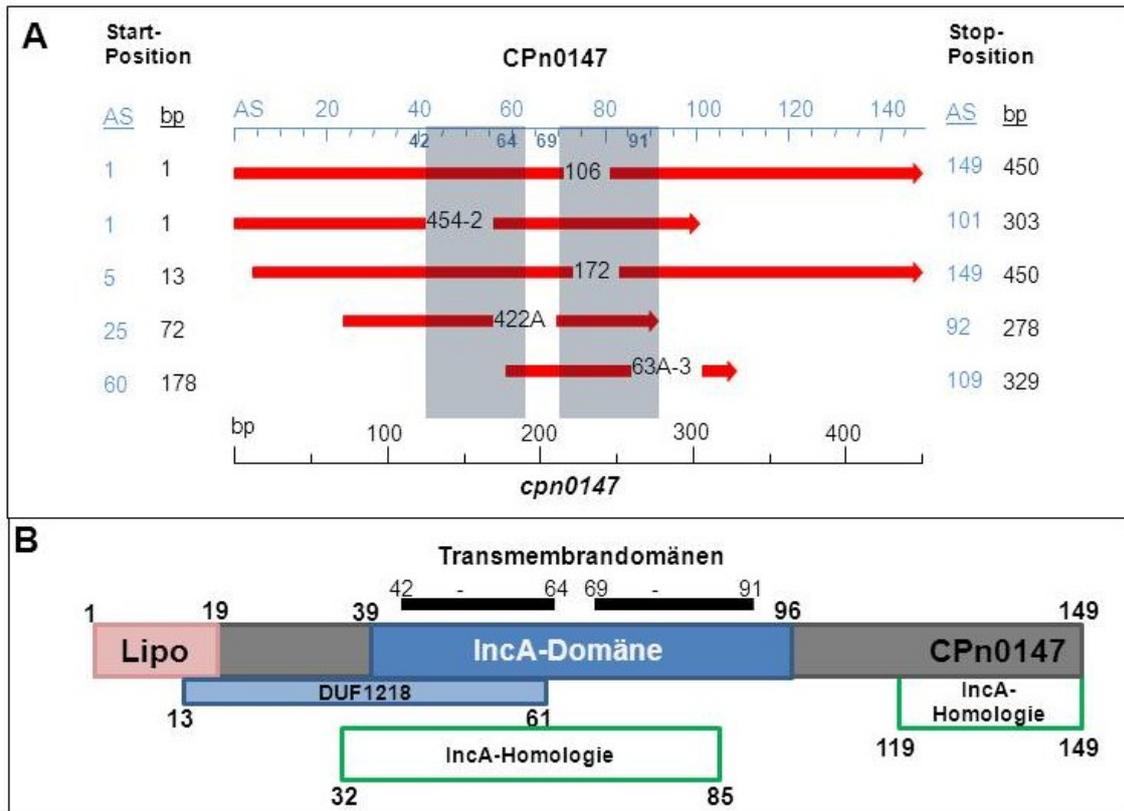
- A) HEp-2 Zellen wurden für 24 Std mit *C. pneumoniae* infiziert (MOI 5) und mit Methanol fixiert. Die Zellen wurden mit dem polyklonalen 1:50 verdünnten CPn1054-Antiserum (grün) und DAPI (blau) gefärbt.
- B) Mit einer MOI von 3 infizierte HEp-2 Zellen wurden 48 hpi mit Methanol fixiert und mit dem Antigen-reinigten, eingengten CPn1054-Antiserum (grün), DAPI (blau) und  $\alpha$ -Momp (rot) gefärbt.
- Der Längenmarker repräsentiert 5  $\mu$ m.

#### 4.2.7 CPn0147 ist ein Vertreter der chlamydialen Inc-Proteine

CPn0147 wurde in dem zuvor beschriebenen Screening insgesamt fünf Mal in Fragmenten verschiedener Länge isoliert (siehe Abbildung 46 A). In der KEGG-Datenbank ist CPn0147 als hypothetisches Protein gelistet. Es sind 3 funktionelle Domänen annotiert (Abbildung 46 B). Zum einen, wie schon für CPn1054, eine IncA-Domäne, die sich im Bereich der Transmembrandomänen befindet und charakteristisch für viele Inc-Proteine ist. In diesem Bereich besteht eine Homologie zu IncA aus *C. trachomatis* (32 % Identität und 55 % Homologie) und zu IncA aus *C. pneumoniae* (30 % Identität und 52 % Homologie), wobei allerdings hauptsächlich nur einzelne Aminosäuren und keine längeren Abschnitte homolog sind. Dies spricht dafür, dass die gesamte Domäne homolog funktionell sein könnte. Im C-terminalen Bereich des Proteins befindet sich ein weiterer Abschnitt, der Homologie zu IncA aus *C. pneumoniae* aufweist. Hier beträgt die Homologie 51 % und die Identität 34 %.

Des Weiteren gibt es eine Domäne unbekannter Funktion, DUF1218. Diese Domäne ist allerdings mit einem Erwartungswert von 0,52 angegeben und somit höchstwahrscheinlich zufällig. DUF1218 kommt bei hypothetischen Pflanzenproteinen vor. Die Mitglieder dieser Proteine besitzen konservierte Cysteinreste, aber über die Funktion der Proteine ist nichts bekannt (Quelle: Pfam).

N-Terminal befindet sich ein „Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site“ Profil (Lipo). In Prokaryoten werden Membran-Lipoproteine mit einem Vorstufen-Signalpeptid synthetisiert, welches von einer spezifischen Lipoprotein-Signalpeptidase (Signalpeptidase II) abgespalten wird. Diese Peptidase erkennt eine konservierte Sequenz und schneidet an einem Cysteinrest, an den dann eine Glycerin-Fettsäure angehängt wird.



**Abbildung 46: Darstellung der isolierten Screenfragmente und vorhergesagten Domänen von CPn0147**

- A) Die roten Pfeile kennzeichnen die Lage und Länge der Screenfragmente, die Zahlen in den Pfeilen stehen für die intern vergebene Nummer der Fragmente. Die blauen Balken repräsentieren die Lage der Transmembrandomänen, die Zahlen geben den AS- (blau) bzw. Basenpaar- (bp, schwarz) Abschnitt der Fragmente wieder.
- B) Die Zahlen repräsentieren die Aminosäurebereiche der laut KEGG-Datenbank vorhergesagten Domänen, zusätzlich ist die Lage der Transmembranhelices eingezeichnet und die C-terminalen Bereiche, die Homologie zu IncaA zeigen. Lipo = „Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site“.

#### 4.2.7.1 Der Transmembranbereich ist für den letalen Phänotyp in Hefe verantwortlich

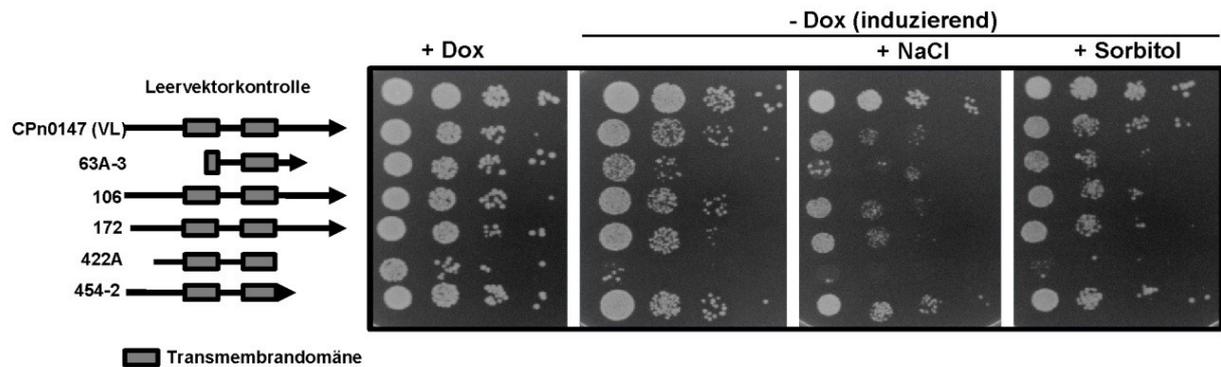
In einem seriellen Verdünnungstropftest wurde das Wachstumsverhalten der CPn0147-Screenfragmente mit dem Volllängen-OLR von CPn0147 verglichen (Abbildung 47). Die Reihe unter der Leervektorkontrolle zeigt Hefen, die das Volllängen-Protein CPn0147 exprimieren, darauf folgen die isolierten Screenplasmide, die Zahlen repräsentieren die intern vergebenen Nummern der Konstrukte (SK). Die Proteinexpression wurde für insgesamt 20 Stunden induziert bevor die Hefen auf die Platten getropft wurden. Die Platten wurden für weitere 48 Stunden bei 30 °C inkubiert. Neben induzierendem Medium wurde zusätzlich auf Medium mit 0,5 M NaCl und 0,8 M Sorbitol getropft, um die Auswirkungen osmotischen Stresses (NaCl) zu analysieren, da dies ein Hinweis auf Defekte in MAPK-Signalwegen, im Kerntransport, RNA-Transkription und Translation oder endosomaler Funktion sein kann (Warringer, Ericson et al. 2003). Dagegen können manche Phänotypen

durch osmotische Stabilisierung (z.B. durch Sorbitol) vermindert werden, wobei es sich dann um Defekte der Zellwand, im Protein-Kinase C-abhängigen MAKP-Signalweg oder um ER/Golgi-Funktionsdefekte handeln könnte (Verna, Lodder et al. 1997; Machi, Azuma et al. 2004; Levin 2005). Bereits auf nicht-induzierendem Medium (+ Dox) wiesen Hefezellen, die SK #422A exprimierten, eine erhöhte Letalität auf (Abbildung 47). Die Kolonien waren nicht kleiner als Kolonien der Kontrolle, allerdings deutlich weniger. Dies deutet darauf hin, dass die Proteinexpression in Flüssigmedium (Vorkultur) bereits zum Absterben der Zellen führte, aber durch das Abschalten der Proteinexpression die überlebenden Zellen wieder ein normales Wachstum zeigten. Die anderen Kandidaten sowie das Volllängen-Gen zeigten nur eine leichte Verminderung der Kolonienanzahl.

Auf induzierendem Medium ohne Zusätze zeigte auch wieder Kandidat #422A den stärksten Phänotyp, aber auch der zweite Kandidat, der nur ein kleines Teilstück von CPn0147 repräsentiert, SK #63A-3, induzierte hier einen starken Defekt. Hier führte also die andauernde Proteinexpression ebenfalls zu erhöhter Letalität. Das Volllängen-Gen sowie die anderen, größeren Kandidaten verursachten einen schwächeren Wachstumsdefekt. Alle Kandidaten zeigten auf induzierendem Medium zusätzlich zu der erhöhten Letalität kleinere Kolonien als die Kontrollzellen, was auf ein verlangsamtes Wachstum schließen lässt.

Keiner der induzierten Wachstumsdefekte konnte durch NaCl als zusätzlichen osmotischen Stress verstärkt werden; lediglich das generelle Wachstum aller Konstrukte verschlechterte sich auf diesem Medium. Auch eine Abmilderung der Phänotypen auf Medium mit Sorbitol wurde nicht beobachtet.

Alle im Screening isolierten Plasmide beinhalten die Transmembrandomänen. Eine Verkürzung sowohl N- als auch C-terminal verstärkt anscheinend den induzierten Phänotyp, selbst wenn ein Teil der vorderen Transmembrandomäne, wie bei #63A-3, fehlt. Der mittlere Bereich des Proteins scheint also für den letalen Phänotyp verantwortlich zu sein, während der N- und der C-Terminus die Letalität abmildern.



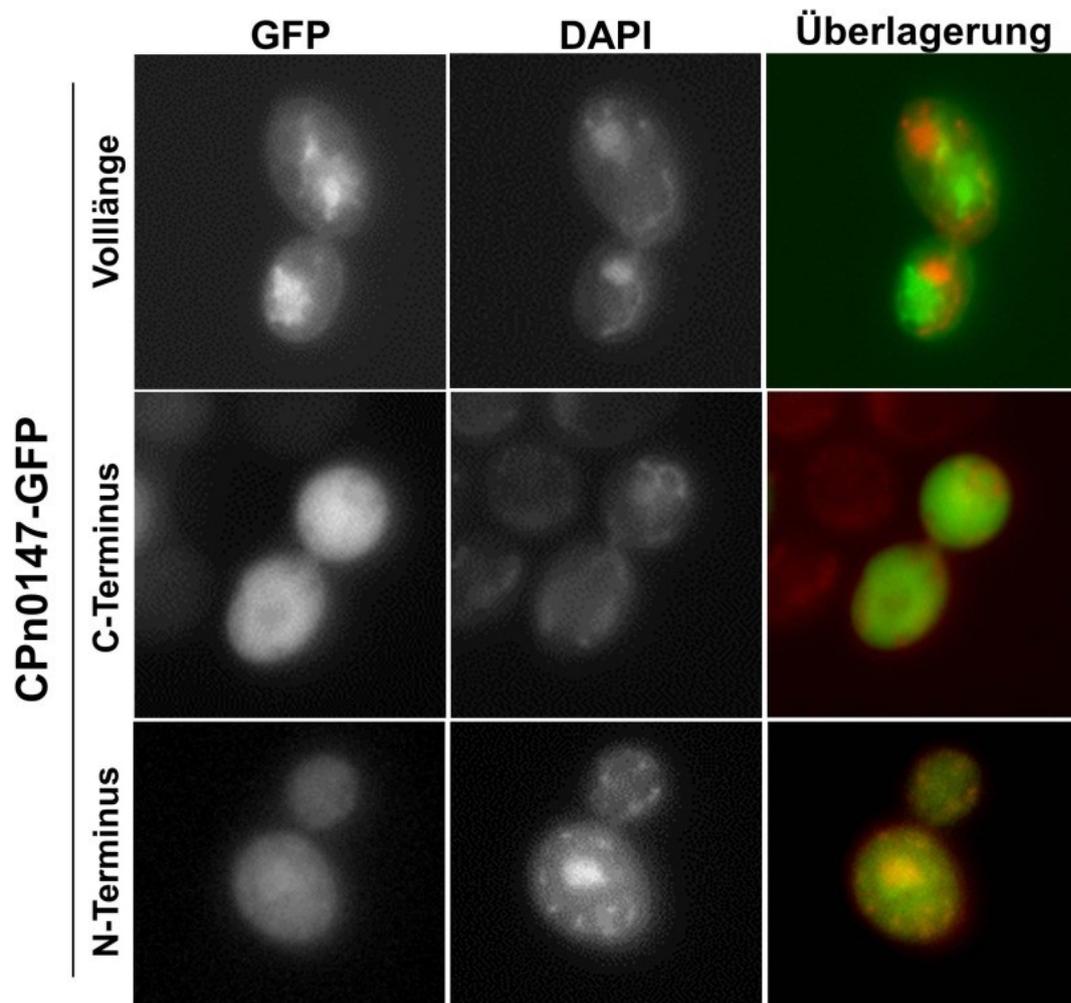
**Abbildung 47: Serieller Verdünnungstropftest der für CPn0147 codierenden Screenplasmide**

Auf der linken Seite sind schematisch die exprimierten Proteine dargestellt, die graue Box symbolisiert eine Transmembrandomäne. Daneben befinden sich die Fotos der Tropftestplatten. Die oberste Reihe zeigt Kontrollzellen, die den leeren Vektor exprimieren (Plasmid #1362), darunter befinden sich die Hefezellen, die das Vollängen-Gen CPn0147 exprimieren (Plasmid #1440) gefolgt von den aufgelisteten Screenplasmiden. Das erste Bild zeigt das Wachstum auf nicht-induzierendem Medium (+Dox), die weiteren Bilder zeigen induzierende Platten mit den angegebenen Medienzusätzen. Von jedem Konstrukt wurden zwei unabhängige Klone analysiert, exemplarisch wird hier nur jeweils ein Klon gezeigt.

#### 4.2.7.2 CPn0147-GFP lokalisiert im ER der Hefe

Die subzelluläre Lokalisierung von CPn0147-GFP in Hefezellen deutete für das Vollängenprotein CPn0147 auf eine Lokalisierung im ER der Hefe hin, welches um den Zellkern und zusätzlich am Zellkortex und in tubulären und retikulären Strukturen im Zellinneren lokalisiert (Abbildung 48). Wird nur der C-Terminus ab der zweiten Transmembrandomäne mit GFP fusioniert und in Hefe exprimiert (siehe mittlere Bildreihe), so zeigte sich eine zytoplasmatische Lokalisierung, wobei jedoch der Bereich der Mitochondrien, die bei einer DAPI-Lebendfärbung in Hefe mit angefärbt werden, ausgespart wird. Dies ist bei Expression von GFP allein nicht der Fall (Daten nicht gezeigt).

Der N-Terminus bis zum Beginn der ersten Transmembrandomäne fluoreszierte nur sehr schwach, deutete aber auf eine zytoplasmatische Lokalisierung hin.



**Abbildung 48: Lokalisierung von CPn0147-GFP in Hefezellen**

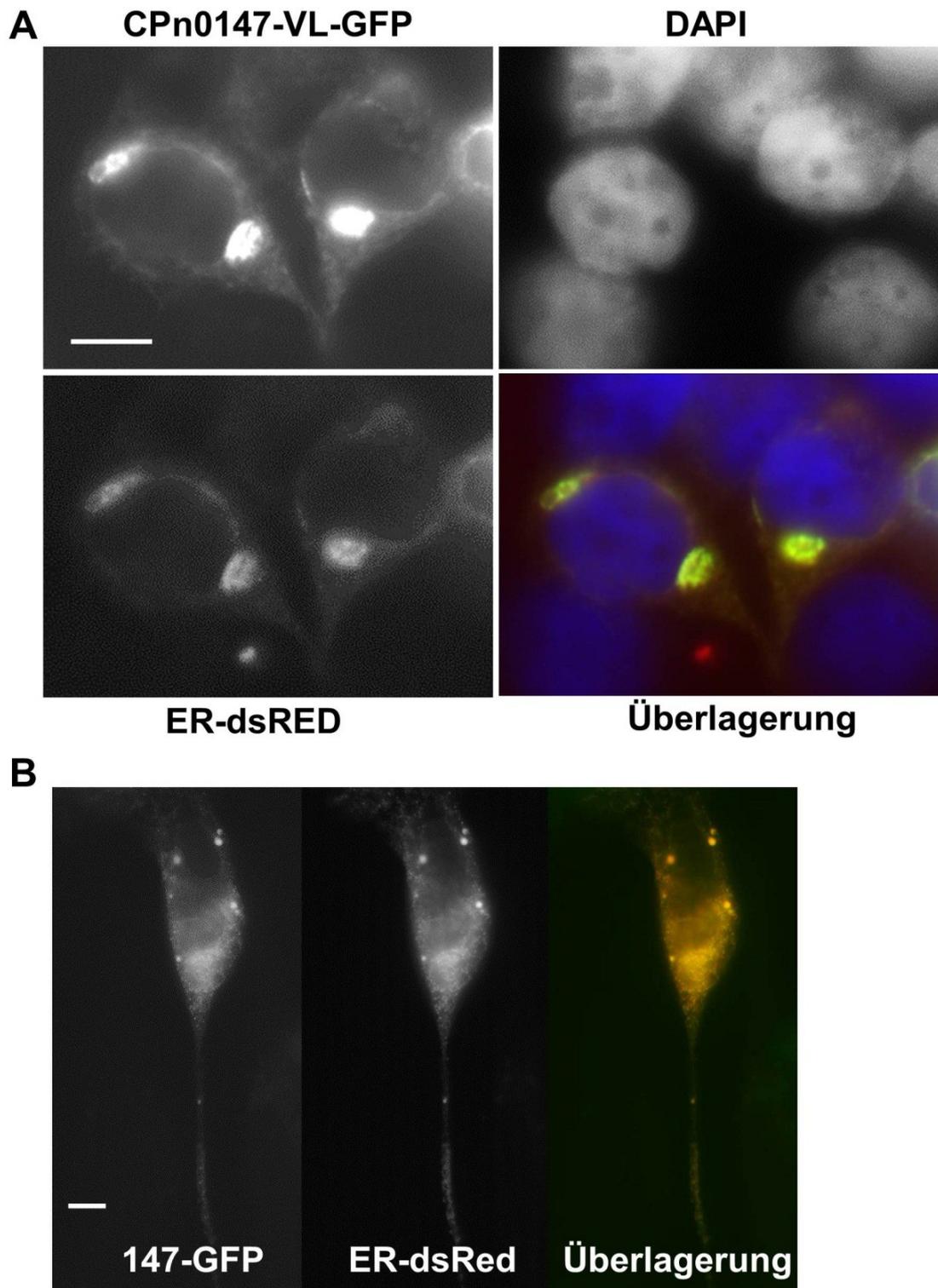
Die Bilder zeigen Hefezellen, die CPn0147 in Volllänge oder als N- bzw. C-terminal verkürzte Version ohne Transmembranbereich fusioniert an GFP exprimieren (Plasmide #1447, 1658 und 1679, N-Term= AS 1-41, C-Term= AS 92-149). Die Proteinexpression erfolgte in logarithmischen Kulturen für 20 Std. Die DNA wurde in lebenden Zellen mit DAPI gefärbt und die Zellen wurden anschließend mit pFA fixiert. In der Überlagerung sind die GFP-Varianten in grün und DAPI in rot dargestellt.

#### 4.2.7.3 In transfizierten Humanzellen lokalisiert CPn0147-GFP im ER

Für die Analyse der subzellulären Lokalisierung von CPn0147-GFP in Humanzellen wurde CPn0147 in den Vektor pBYE kloniert. Zum einen wurde eine Volllängen-Variante, zum anderen eine Version des Proteins, bei der der Transmembranbereich in der Mitte deletiert wurde, kloniert. Zusätzlich wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Subtil (Institut Pasteur, Paris) GFP-Fusionsproteine in Tap-Tag-Gateway-Vektoren kloniert. Diese sollten von einer weiteren Arbeitsgruppe (Dr. Christoph Baumann, Salzburg) zur Identifizierung von humanen Interaktionspartnern verwendet werden. Mit diesen Vektoren zeigte sich bei Expression in humanen Zellen eine weitaus hellere Fluoreszenz, so dass nur die Daten der Gateway-Vektoren gezeigt werden.

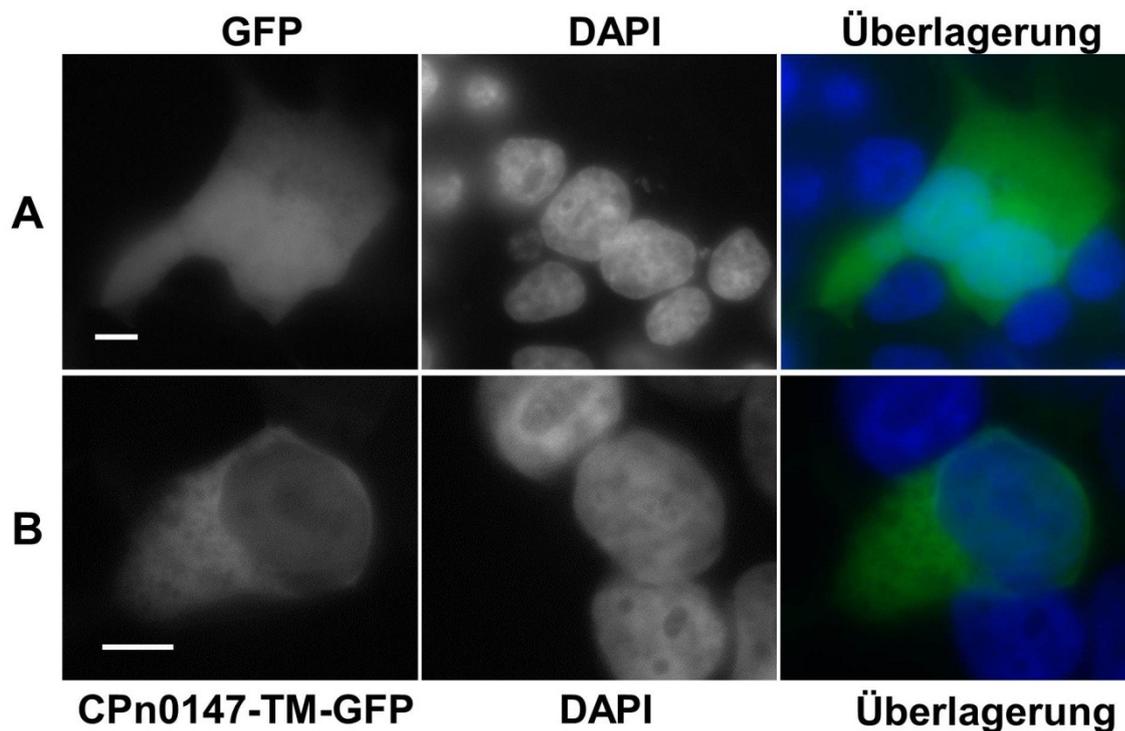
Sowohl in HEK293 Zellen als auch in HeLa 229 Zellen konnte für CPn0147 in Volllänge eine retikuläre Lokalisierung um den Kern herum und im gesamten Zytoplasma beobachtet werden (Abbildung 49). Teilweise konnten Strukturen am Kern beobachtet werden, an denen das Signal verstärkt vorlag, zudem zeigte sich ein begrenzendes Signal um den Zellkern herum (Abbildung 49 A). Bei der Kotransfektion von Volllängen-CPn0147-GFP mit dsRed-markiertem Calreticulin, einem Protein, welches im Lumen des ER lokalisiert, konnte die gleiche Lokalisierung beobachtet werden, auch hier waren teilweise verstärkt Strukturen in Kernnähe gefärbt. Zudem konnte eine Kolo-kalisierung beobachtet werden (Abbildung 49). Transient exprimiertes CPn0147 lokalisiert demnach im ER der Humanzelle. Vergleicht man das Volllängen-Konstrukt mit der Variante ohne Transmembranbereich und GFP alleine, so zeigen sich Unterschiede (Abbildung 50). GFP alleine zeigt eine diffuse Verteilung in der gesamten Zelle (Abbildung 50 A), während die CPn0147-Variante ohne Transmembranbereich im Bereich des Zellkerns eine schwächere Fluoreszenz und eine strukturierte, netzartige Verteilung im Zytoplasma zeigt (Abbildung 50 B).

Die Ergebnisse zeigen zusammen mit den Hefedaten, dass die Transmembrandomänen für die Lokalisierung im ER verantwortlich sind.



**Abbildung 49: Lokalisierung von CPn0147-GFP in Humanzellen**

Gezeigt werden HEK293 Zellen (A) und HeLa 229 Zellen (B), die Vollängen-CPn0147-GFP (#1988) mit dem ER- Marker Calreticulin-dsRed koexprimieren. Die Expression erfolgte für 24 Stunden. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt. In der Überlagerung ist CPn0147 in grün, DAPI in blau und ER-dsRed in rot dargestellt. Der Längenmarker repräsentiert 5  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 50: Lokalisierung von CPn0147 ohne Transmembranbereich in Humanzellen**

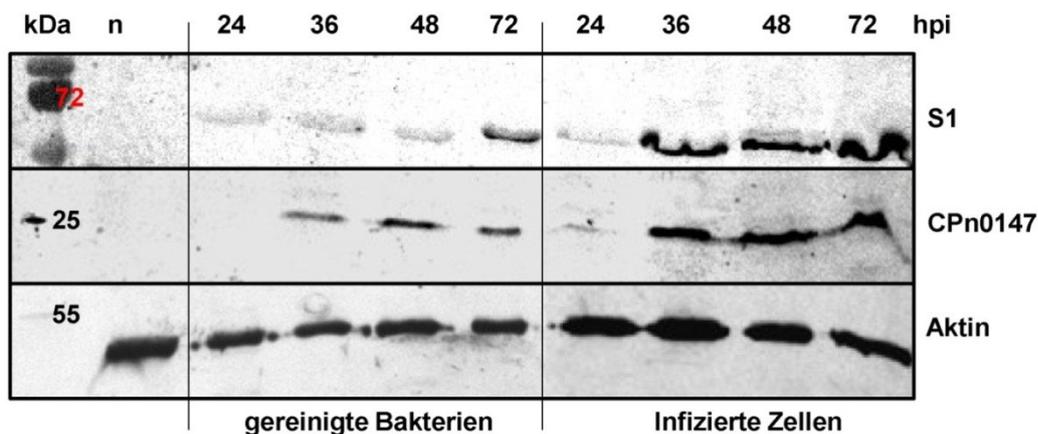
Gezeigt werden HEK 293 Zellen, die GFP (A) oder CPn0147 ohne Transmembranbereich ( $\Delta$ AS 42-91, Plasmid # 1989, B) fusioniert an GFP exprimieren. Die Expression erfolgte für 24 Stunden. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt. In der Überlagerung ist GFP in grün und DAPI in blau dargestellt. Der Längensmarker repräsentiert 5  $\mu$ m.

#### 4.2.7.4 CPn0147 kann nach 24 Stunden in infizierten Zellen detektiert werden

Zur weiteren Analyse von CPn0147 wurde ein Antiserum generiert. Hierzu wurde zum einen denaturiertes GST-markiertes Volllängen-Fusionsprotein aus dem SDS-Gel verwendet (1. und 2. Immunisierung der zwei Kaninchen), zum anderen wurde natives 6His-markiertes Protein verwendet (3. und 4. Immunisierung der beiden Kaninchen). Für die Expression des 6His-markierten Proteins wurden die Transmembrandomänen deletiert, um die Expression in *E. coli* zu erleichtern. Schon das so genannte „small bleed“ (Entnahme nach der dritten Immunisierung) zeigte in ersten Immunfluoreszenz-Untersuchungen eine sehr distinkte Färbung der Inklusionsmembran und kaum unspezifische Hintergrundfärbung. Das Präimmenserum zeigte nur unspezifische schwache Signale in infizierten und nicht-infizierten Zellen (Daten nicht gezeigt).

Wie schon für CPn0472 und CPn0809 wurde eine Western Blot-Expressionsanalyse mit zu unterschiedlichen Zeitpunkten geernteten Bakterien Gesamtproteinextrakten infizierter Zellen durchgeführt (Abbildung 51). CPn0147 hat ein berechnetes Molekulargewicht von 14,7 kDa und einen pI von 4,8. CPn0147 wurde in infizierten Zellen immer auf einer Höhe etwas über der 25 kDa-Markerbande detektiert. Auch das rekombinante Protein zeigte ein langsames Laufverhalten (Daten nicht gezeigt). CPn0147 kann in den Proben der über

Differentialzentrifugation angereicherten Bakterien (im Folgenden immer „gereinigte“ Bakterien genannt) frühestens nach 36 Stunden detektiert werden und das Signal hier ist etwas stärker als das Signal für die ribosomale S1-Kontrolle, vor allem bei der Bakterienprobe, die nach 48 Stunden Infektion geerntet wurde (Abbildung 51). In den Gesamtproteinproben infizierter Zellen ist CPn0147 schon nach 24 Stunden zu detektieren und die Bandenintensität ist in etwa genauso wie die der S1-Kontrolle. Generell kann eine starke Zunahme der Proteinmenge von CPn0147 nach 36 Stunden beobachtet werden, was sich durch die Zunahme an Bakterien aufgrund der stattfindenden Replikation erklären lässt. In den Proben der infizierten Zellen ist wiederum in der Gesamtheit mehr chlamydiales Protein vorhanden als in den Proben der gereinigten Bakterien. Es konnte durch diese Analyse also kein Hinweis auf eine Sekretion des Proteins gefunden werden, da in den Proben infizierter Zellen im Vergleich zu den Proben der gereinigten Bakterien sogar weniger CPn0147-Protein vorhanden ist (relativ zum Verhältnis zu S1).

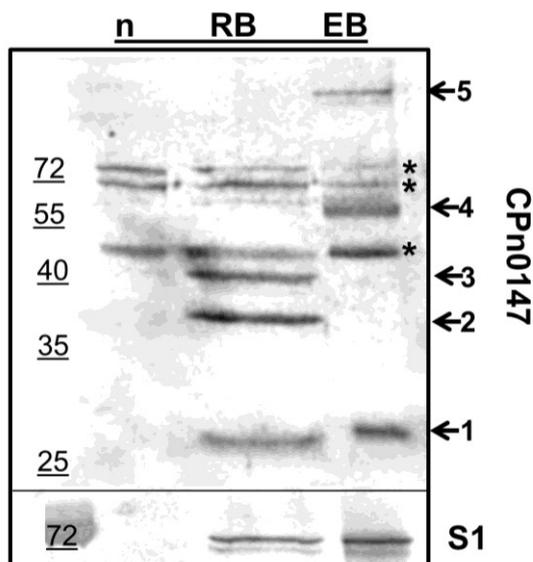


**Abbildung 51: Expressionsanalyse von CPn0147**

Aufgetragen wurden nicht-infizierte HEp-2 Zellen (N) sowie zu den angegebenen Zeitpunkten geerntete Bakterien, die über Differentialzentrifugation aus infizierten HEp-2 Zellen angereichert wurden („gereinigte Bakterien“) und Extrakte aus gesamten infizierten Zellen („infizierte Zellen“). Die Detektion erfolgte mit dem Antigen-gereinigten Serum gegen CPn0147 (1:100 verdünnt) sowie einem monoklonalen Antikörper gegen humanes  $\beta$ -Aktin und chlamydiales S1. Die Proben wurden mit Hilfe des humanen  $\beta$ -Aktin-Antikörpers auf einen etwa gleichen Gesamtproteingehalt eingestellt. Für den Aktin-Blot wurde die Hälfte (gereinigte Bakterien) bzw. 1/20 (infizierte Zellen) der Proteinmenge geladen.

Der Nachweis von CPn0147 in RB- und EB-Fractionen in einem Western Blot bestätigte etwa gleiche Proteinmengen in beiden Fraktionen. In der Kontrollprobe nicht-infizierter Zellen (n) wurden drei unspezifische Banden sichtbar, die auch in den RB- und EB-Proben zu sehen waren (Abbildung 52, markiert mit \*) Neben der CPn0147-Bande bei ca. 25 kDa (Pfeil 1) konnten außerdem noch weitere distinkte Banden detektiert werden (Abbildung 52 markiert mit Pfeilen). Zudem lief die 25 kDa-Bande in der EB-Fraktion etwas langsamer als in der RB-Fraktion, es ist also möglich, dass das Protein im Laufe der Infektion prozessiert oder modifiziert wird. In der RB-Fraktion detektierte das Antiserum zusätzliche Banden bei ca. 40 kDa (3) und 37 kDa (2). Diese waren nicht in der EB-Fraktion zu sehen, dafür wurden hier

zwei höhermolekulare Banden bei ca. 60 kDa (4) und weit oberhalb von 72 kDa (5) detektiert. Eine mögliche Erklärung für das Auftreten der zusätzlichen Banden ist, dass durch die Zugabe von SDS zu den Proben nun auch schwer lösliche Proteine zu detektieren sind. Da keine *C. pneumoniae*-Proteine ausreichende Homologie zu CPn0147 aufweisen, um diese zusätzlichen Banden zu erklären und auch die eingangs erwähnte IncA-Homologie nicht für eine Kreuzreaktivität ausreicht, da maximal drei benachbarte Aminosäuren identisch sind, bleibt die Natur dieser höhermolekularen Banden unklar. In Hinblick auf die weiteren Analysen, in denen CPn0147 in der Immunfluoreszenz nicht mit Bakterien assoziiert detektiert werden konnte, handelt es sich bei den im RB-/EB-Blot detektierten Banden wahrscheinlich um frisch synthetisiertes Protein. Der Großteil des Proteins liegt, wie weitere Analysen später zeigen, membrangebunden vor.

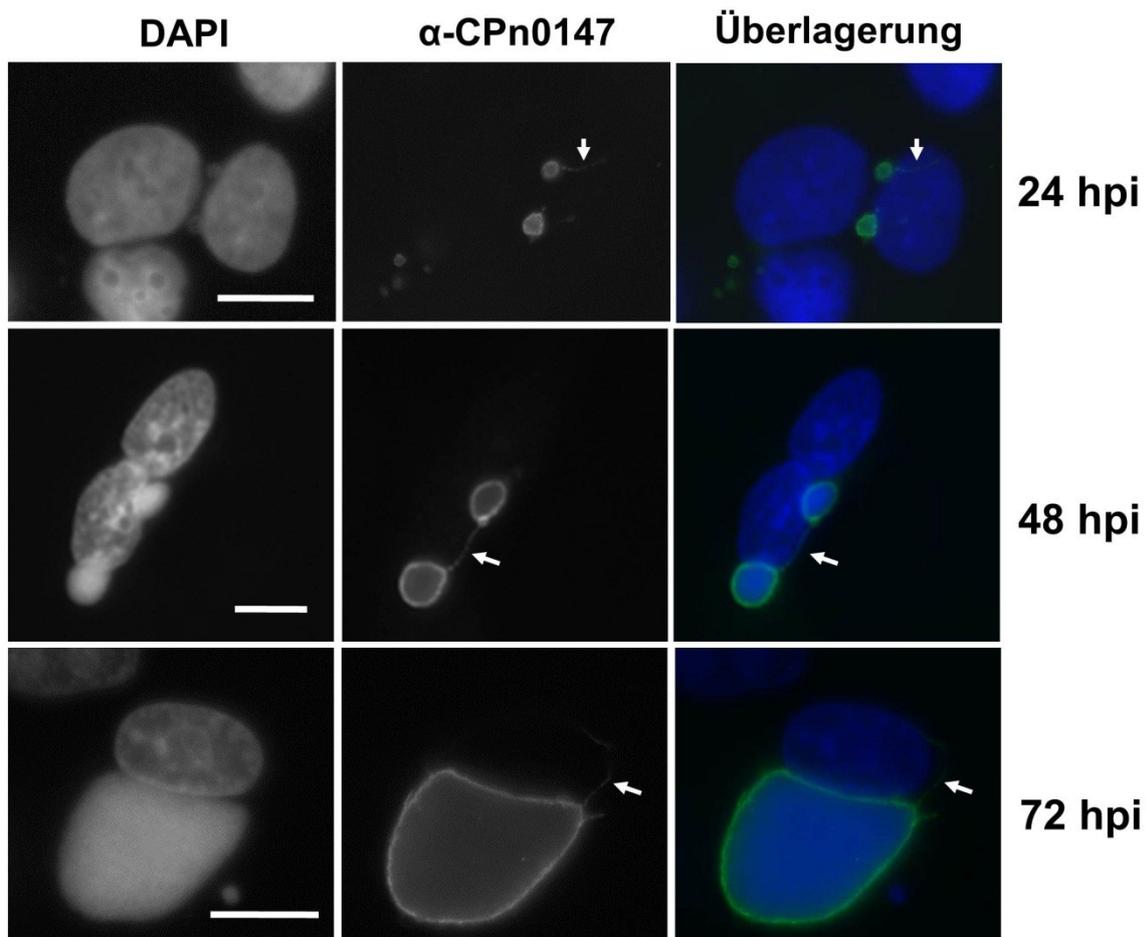


**Abbildung 52: Western Blot-Analyse von RB- und EB-Fractionen**

Analysiert wurden Proteinextrakte nicht infizierter HEp-2 Zellen (n) sowie RB- und EB-Fractionen. Die Bakterien wurden 40 (RB) bzw. 84 (EB) Std nach der Infektion über einen Gradienten gereinigt. Die Proben wurden zusätzlich mit 2 % SDS versetzt und mit Hilfe des S1-Antikörpers auf einen möglichst gleichen bakteriellen Proteingehalt eingestellt. Die Detektion erfolgte mit Antigen-gereinigtem Serum gegen CPn0147 (1:100). Die Pfeile markieren distinkte Banden, unspezifische Banden sind mit einem \* markiert.

#### 4.2.7.5 CPn0147 zeigt eine Lokalisierung in der Inklusionsmembran

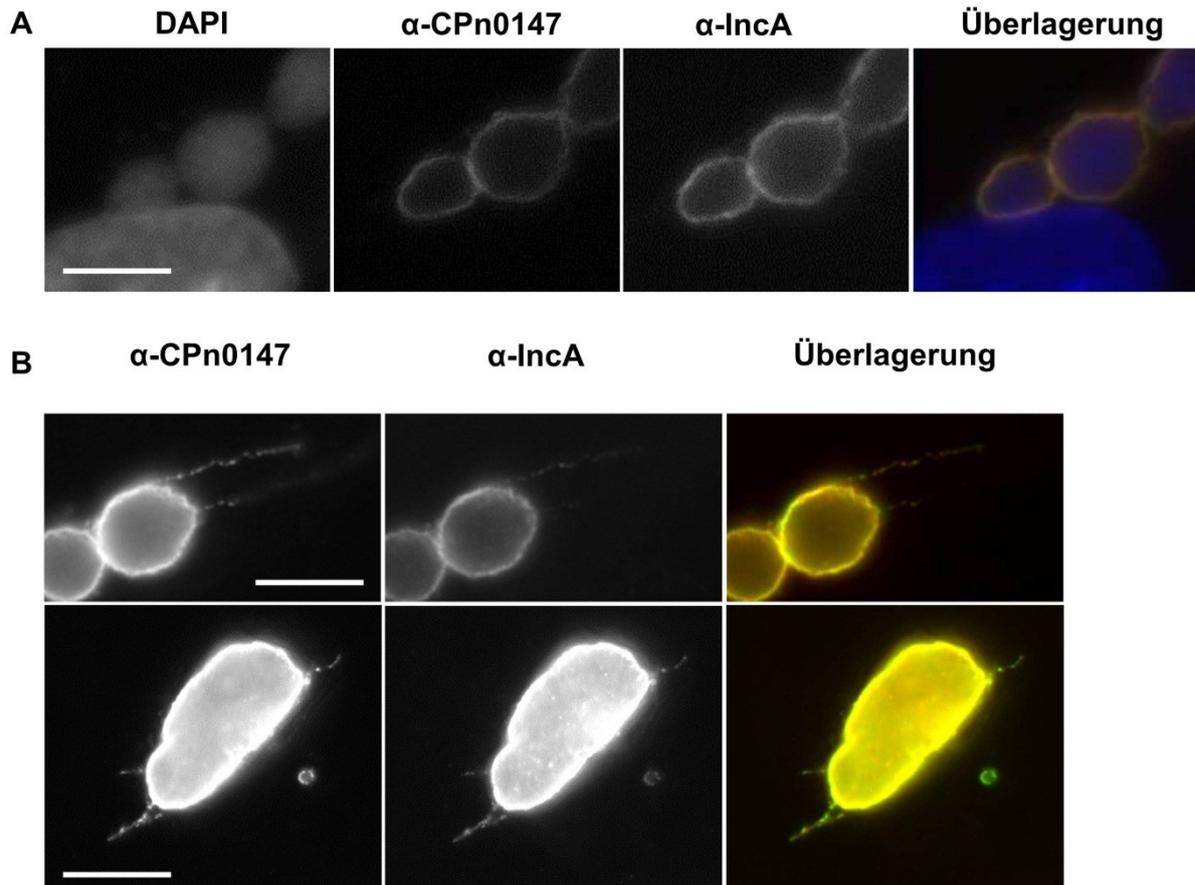
Um die Lokalisierung von CPn0147 in der Infektion zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt. Es wurde bereits als chlamydiales Protein, das in der Inklusionsmembran lokalisiert, beschrieben, über seine Funktion war aber bisher nichts weiter bekannt (Luo, Liu et al. 2007). CPn0147 zeigte eine deutliche Färbung der Inklusionsmembran von 24 bis 72 Stunden nach Beginn der Infektion (Abbildung 53). Das CPn0147-Signal umgibt die Inklusion zu allen Zeitpunkten und das Lumen der Inklusionen bleibt nahezu ausgespart, was auf CPn0147 als Inc-Protein hinweist. Zu allen Zeitpunkten waren außerdem bei vielen Inklusionen fadenartige Gebilde zu sehen, die von der Inklusion ausgehend häufig in Richtung des Kerns ragten (Abbildung 53, weiße Pfeile). Diese Fäden waren in der Literatur bisher nur für das Inklusionsmembranprotein IncA beschrieben (Brown, Skeiky et al. 2002; Suchland, Rockey et al. 2005). IncA ist das bisher am besten charakterisierte Inc-Protein. Um zu überprüfen, ob es sich bei der für CPn0147 beobachteten Lokalisierung tatsächlich um die eines Inc-Proteins handelt, wurde eine Kofärbung mit einem



**Abbildung 53: Lokalisierung von CPn0147 zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion**

HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* infiziert (MOI 2) und zu den angegebenen Zeitpunkten mit Methanol fixiert. Die Zellen wurden mit dem 1:3 verdünnten Antigen-gereinigten Serum gegen CPn0147 gefärbt (grün) und die DNA wurde mit DAPI angefärbt (blau). Der Längenmarker repräsentiert 10  $\mu$ m. Pfeile markieren CPn0147-positive Fäden.

IncA-Antikörper durchgeführt. Auf diese Weise sollte auch überprüft werden, ob die durch den anti-CPn0147-Antikörper markierten Fäden auch IncA tragen. IncA lokalisierte wie zu erwarten in der Inklusionsmembran und in der Überlagerung zeigte sich eine deckungsgleiche Gelbfärbung, somit kolokalisieren IncA und CPn0147 an der Inklusionsmembran (Abbildung 54 A). Auf den zu beobachtenden Fäden ist in der Überlagerung zu sehen, dass beide chlamydialen Proteine auf den Fäden zu detektieren sind. Bei den für IncA beschriebenen Fäden handelt es sich somit höchstwahrscheinlich um die gleichen Fäden, die auch in der Immunfluoreszenz von CPn0147 zu sehen sind. Die Fäden scheinen jedoch nicht kontinuierlich gefärbt zu sein, denn sowohl die IncA- als auch die CPn0147-Signale sind auf den Fäden eher punktiert, während die Inklusionsmembran kontinuierlich gefärbt erscheint.



**Abbildung 54: Kolokalisierung von CPn0147 und IncA**

HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* für 48 Stunden mit einer MOI von 2 infiziert und mit Methanol fixiert. Die Zellen wurden mit dem 1:3 verdünnten, Antigen-gereinigten Serum gegen CPn0147 (grün) und dem IncA-Antikörper (1:10 verdünnt) (rot) gefärbt, Sekundärantikörper Alexa-488-anti-Kaninchen und Alexa-594-Anti-Maus.. Der Längenmarker repräsentiert 5  $\mu\text{m}$ . Der Antikörper wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Subtil, Paris zur Verfügung gestellt mit Genehmigung der Arbeitsgruppe Zhong, Texas, die den Antikörper gegen das *C. pneumoniae* IncA generiert hatte (Luo, Jia et al. 2007).

- A) Die DNA wurde zusätzlich mit DAPI gefärbt (blau). CPn0147 und IncA kolokalisieren in der Inklusionsmembran.  
 B) Kolokalisierung von IncA und CPn0147 in der Inklusionsmembran und auf den zu beobachtenden Fäden.

### 4.3 Weiterführende Analysen zu CPn0147

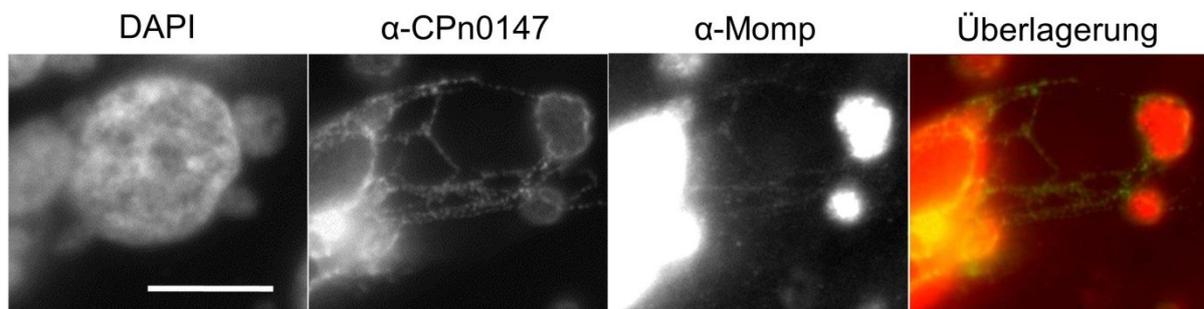
Aufgrund der interessanten Lokalisierung und der Isolierungs-Häufigkeit im Screen wurde von CPn0147 ausgewählt, um in weiterführenden Analysen die Rolle in der Infektion zu untersuchen.

#### 4.3.1. Immunfluoreszenz-Analysen der CPn0147-Fäden

##### 4.3.1.1 Momp ist teilweise auf den CPn0147-Fäden zu detektieren

Es war bereits bekannt, dass auf den IncA-Fäden von *C. trachomatis* als auch von *C. psittaci* Signale für das cOMC (chlamydial outer membrane complex)-Protein Momp detektiert werden konnten (Brown, Skeiky et al. 2002). Für *C. pneumoniae* wurde dies bisher nicht

beschrieben. Zuerst sollte also festgestellt werden, ob chlamydiale Antigene wie zum Beispiel Momp auch auf den CPn0147-Fäden zu detektieren sind. Hierzu wurden HEp-2 Zellen für 72 Stunden mit einer relativen hohen MOI von 5 infiziert, um viele chlamydiale Einschlüsse und somit auch viele Inklusionen mit Fäden zu erhalten. Tatsächlich konnte teilweise ein Signal für Momp auf den Fäden detektiert werden, allerdings war dieses Signal deutlich schwächer als das CPn0147-Signal (Abbildung 55). Das Momp-Signal war außerdem nur in einigen Fällen auf den Fäden einer infizierten Zelle zu sehen. Die meisten Bilder, die Inklusionen mit Fäden aufwiesen, zeigten kein Momp-Signal auf den Fäden. Falls jedoch Momp-Signale auf den Fäden zu detektieren waren, dann waren, soweit es aufgrund des äußerst schwachen Signals ersichtlich war, alle Fäden in einer infizierten Zelle Momp-positiv.

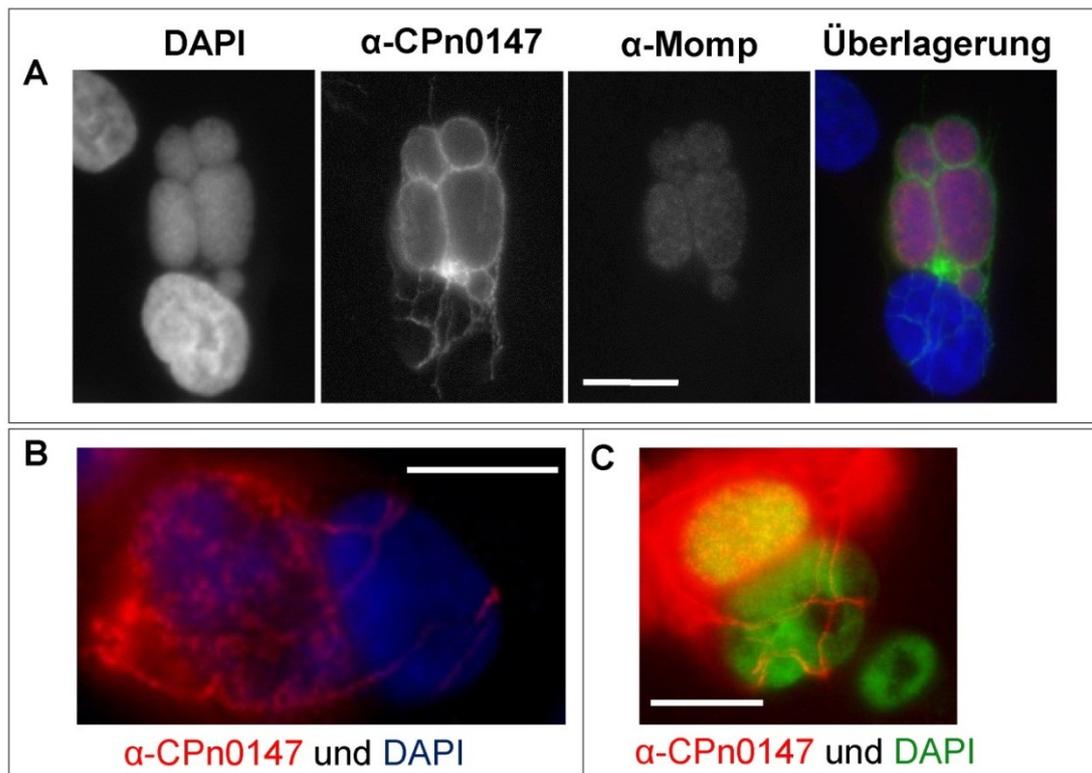


**Abbildung 55: Kolokalisierung von Momp mit den CPn0147-Fäden**

HEp-2 Zellen wurden nach 72 stündiger Infektion mit Methanol fixiert und mit dem gereinigten Antiserum gegen CPn0147,  $\alpha$ -Momp und DAPI gefärbt. In der Überlagerung ist das Signal von CPn0147 in grün und Momp in rot dargestellt. Der Längensmarker repräsentiert 10  $\mu\text{m}$ . Für die DAPI- und CPn0147-Aufnahmen wurde jeweils für 0,4 sek belichtet, um Momp auf den Fäden zu detektieren, wurde für 3 sek belichtet.

#### 4.3.1.2 Die CPn0147-Fäden umspannen den Zellkern

Die Fäden, die in infizierten Zellen mit dem Antiserum gegen CPn0147 beobachtet werden konnten, schienen meistens in Richtung des Zellkerns zu ragen und diesen teilweise sogar netzartig zu umspannen, falls mehr als ein Faden vorlag (Abbildung 56 A). Die abgebildete infizierte Zelle weist mehrere Inklusionen auf, deren Fäden zum größten Teil in Richtung des Kerns reichen, während einige Fäden in die entgegengesetzte Richtung ragen. Da die Inklusionen rechts und links von der Plasmamembran begrenzt werden, könnte dies eine Erklärung dafür sein, dass seitlich keine Fäden ausgebildet sind. Die anderen Bilder zeigen infizierte Zellen, die eine einzige große Inklusion aufweisen, deren Fäden in Richtung des Zellkerns ragen und diesen zu umspannen und im letzten Fall (Abbildung 56 C) sogar zu deformieren scheinen.



**Abbildung 56: Lokalisierung der Fäden in Kernnähe**

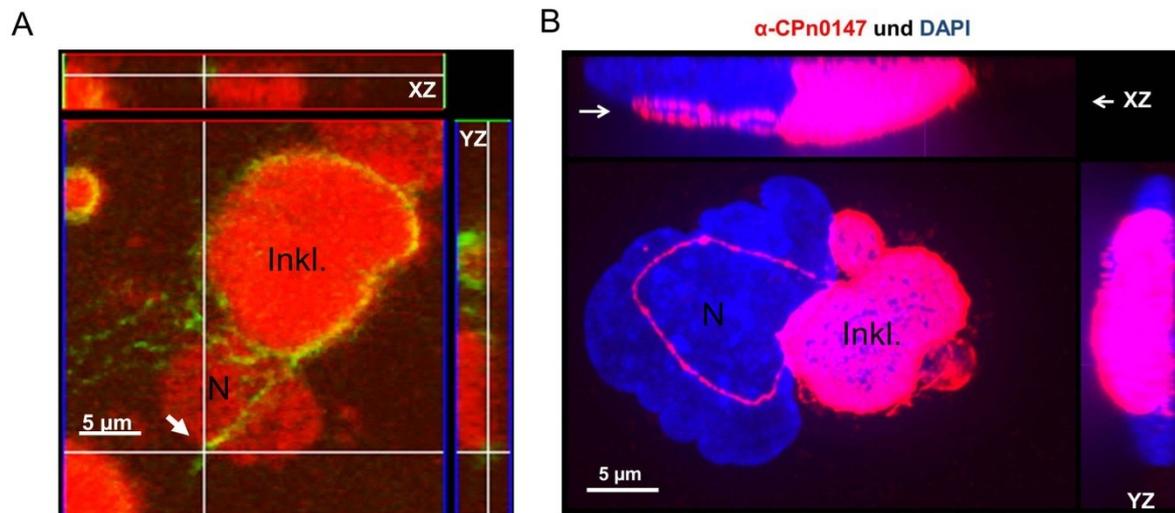
Gezeigt sind mit einer MOI von 5 infizierte HEP-2 Zellen, die nach 72 Stunden mit Methanol fixiert und mit dem Antigen-gereinigten CPn0147-Antiserum (Sekundärantikörper Alexa-488-anti-Kaninchen) gefärbt wurden. Längensmarker = 10 µm

- A) Zusätzlich wurden die Bakterien mit einem α-Momp-Antikörper gefärbt. CPn0147 ist in der Überlagerung grün, Momp rot, DAPI blau dargestellt.
- B) CPn0147 in rot und DAPI in blau, nur die Überlagerung wird gezeigt.
- C) CPn0147 in rot und DAPI in grün, nur die Überlagerung wird gezeigt.

Für eine detaillierte Untersuchung wurden konfokale Aufnahmen gemacht, um die Lage der Fäden an oder im Zellkern genauer zu analysieren.

In der ersten Konfokal-Mikroskopie ist eine infizierte Zelle mit einer sehr großen Inklusion zu sehen (Abbildung 57 A). In der YZ-Schnittebene ist ein kleiner Bereich der Inklusion angeschnitten, wodurch zu erkennen ist, dass CPn0147 tatsächlich die Bakterien umgibt und es sich somit um ein Inc-Protein handelt. Des Weiteren ist in dieser Ebene ein Faden zu erkennen, der direkt am Kern anliegt (Pfeil). In der XZ-Ebene ist ebenfalls zu erkennen, dass der Faden direkt am Kern anliegt, es ist jedoch keine Überlagerung (Gelbfärbung) zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass die Fäden nicht in den Kern hineinragen, sondern diesen tatsächlich umspannen.

Die zweite Konfokalaufnahme zeigt eine große Inklusion, von der ein Faden zum Zellkern reicht und in einem Bogen zurück zur Inklusion führt (Abbildung 57 B). In der XZ-Ebene ist zu sehen, dass der Faden auf dem Kern aufliegt und diesen nicht durchdringt. Die Fäden



**Abbildung 57: Konfokale Mikroskopie infizierter Zellen mit CPn0147-Fäden**

- A) HEp-2 Zellen wurden nach 72 stündiger Infektion (MOI 5) mit Methanol fixiert und mit dem gereinigten unverdünnten Antiserum gegen CPn0147, Alexa-488-anti-Kaninchen und DAPI gefärbt. In der Überlagerung ist das Signal von CPn0147 in grün und DAPI in rot dargestellt. Gezeigt ist eine Schnittansicht.
- B) Mit einer MOI von 2 infizierte HeLa 229 Zellen wurden nach 72 Stunden mit Methanol fixiert. Die Zellen wurden mit gereinigtem, unverdünntem Antiserum gegen CPn0147 (rot), Alexa-594-anti-Kaninchen und DAPI (blau) gefärbt. Gezeigt ist die MIP-Darstellung (Maximum intensity projection).
- Inkl. = Inklusion, N = Nukleus

scheinen also tatsächlich den Zellkern direkt zu umgeben. Auf diese Weise könnte zum Beispiel der Kontakt zum ER oder zur Kernmembran hergestellt werden.

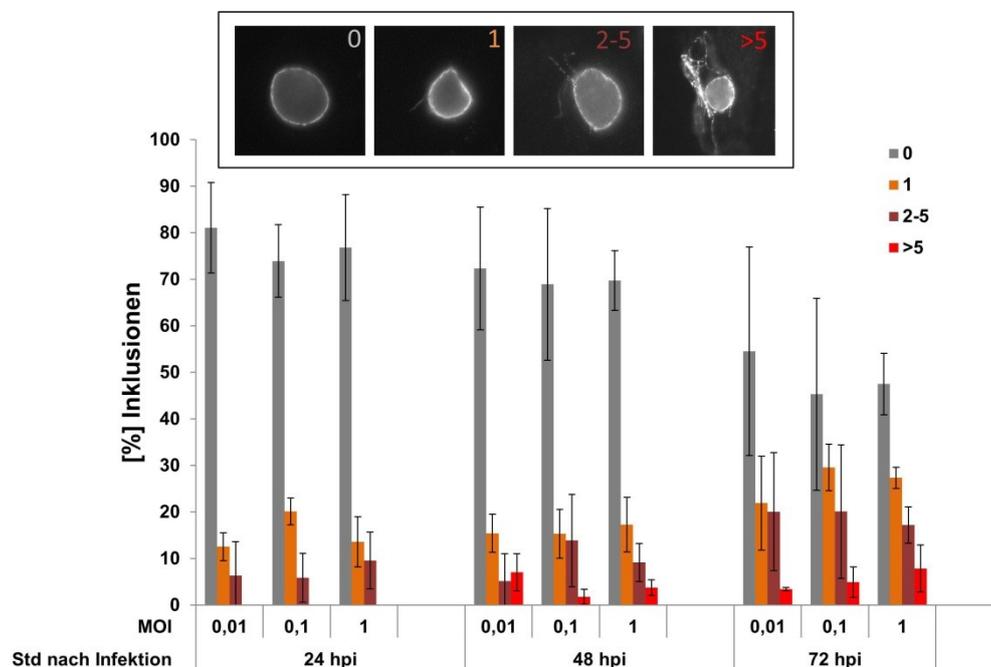
#### 4.3.1.3 Die Häufigkeit von Faden-assoziierten Inklusionen nimmt in der späten Infektionsphase zu

Um zu überprüfen, wie häufig die CPn0147-Fäden auftreten, wurde ihre Frequenz in Abhängigkeit von der MOI und dem Zeitpunkt in der Infektion analysiert. Hierzu wurden jeweils drei unabhängige Datensätze pro Zeitpunkt und pro MOI ausgewertet. Die Zellen wurden mit einer MOI von 0,01, 0,1 oder 1 infiziert und nach 24, 48 oder 72 Stunden mit Methanol fixiert. Gezählt wurden alle Inklusionen, bei denen kein Faden sichtbar war (0), die einen sichtbaren Faden aufwiesen (1), zwei bis fünf Fäden aufwiesen (2-5) oder Inklusionen mit sehr starker Fadenbildung (>5). Beispiele für diese Kategorisierungen sind in den Mikroskopiebildern zu sehen (Abbildung 58).

In der frühen Infektion (24 hpi) zeigen unabhängig von der verwendeten MOI 77 % der Inklusionen keinen Faden. Wenn eine Inklusion Fäden zeigte, so war es durchschnittlich zu 16 % nur ein Faden, seltener (durchschnittlich zu 7 %) zeigten die Inklusionen mehrere Fäden. Inklusionen mit mehr als fünf Fäden waren zu diesem Zeitpunkt nicht zu beobachten. Dieses gehäufte Auftreten von Fäden pro Zelle konnte erst in Zellen, die nach 48 Stunden oder 72 Stunden fixiert wurden, beobachtet werden. Durchschnittlich lag die Anzahl der Inklusionen mit mehr als 5 Fäden bei den nach 48 Stunden fixierten Zellen bei 4,2 % und

scheint unabhängig von der eingesetzten MOI zu sein. Insgesamt waren zu diesem Zeitpunkt ca. 30 % der Inklusionen mit Fäden assoziiert, wobei ca. 16 % der Inklusionen mit einem Faden assoziiert waren und fast 10 % mehr als einen Faden zeigten. In der späten Phase der Infektion (72 hpi) stieg die Zahl der Inklusionen, die Fäden zeigten, auf fast 50 % an. Die Anzahl der Inklusionen, die einen Faden zeigten, erhöhte sich gegenüber dem 48 Stunden-Wert von 16 % auf 26 %. Auch die Zahl der Inklusionen mit mehr als einem Faden verdoppelte sich von 9 % auf 19 %. Die eingesetzte Anzahl an infektiösen Partikeln pro Zelle (MOI) schien jedoch keinen Einfluss auf die Anzahl der CPn0147-Fäden zu haben, da keine Zu- oder Abnahme der Fadenanzahl in Abhängigkeit von der MOI zu beobachten war. Lediglich die Anzahl der Inklusionen, die mehr als 5 Fäden aufwiesen, zeigt bei den 72 Stunden-Werten MOI-abhängig eine Zunahme: Bei einer MOI von 0,01 zeigten 3,5 % der Inklusionen mehr als 5 Fäden, bei einer MOI von 1 waren es mit 7,9 % der Inklusionen mehr als das Doppelte. Bei der Betrachtung der Standardabweichung könnte es sich hierbei aber um Zufall handeln. Durchschnittlich zeigen nach 72 stündiger Infektion 5 % der Inklusionen mehr als 5 Fäden.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass in der frühen Infektion deutlich weniger Inklusionen mit Fäden assoziiert sind und die Anzahl der CPn0147-Fäden im Laufe der Infektion zunimmt. Inklusionen mit sehr vielen Fäden konnten 48 hpi als auch 72 hpi gleich häufig beobachtet werden.



**Abbildung 58: Quantifizierung der Fadenanzahl in Abhängigkeit von MOI und Infektionsdauer**

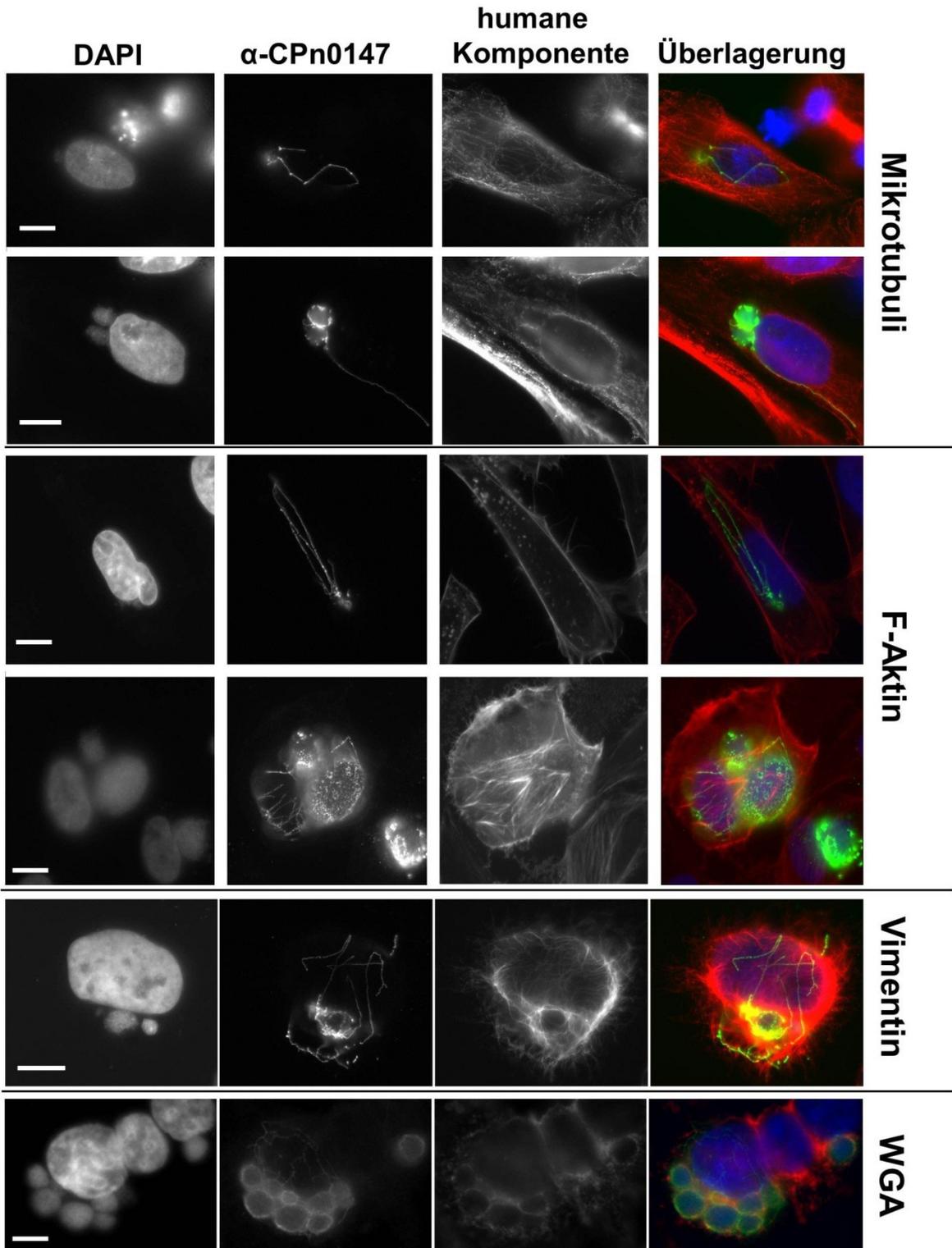
HEp-2 Zellen wurden für 24, 48 und 72 Stunden mit einer MOI von 0,01; 0,1 oder 1 infiziert. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert und mit DAPI und dem 1:3 verdünnten anti-CPn0147 Antiserum (gereinigt) gefärbt. Die Zahl der Inklusionen ohne sichtbaren Faden oder mit einem, wenigen oder sehr vielen Fäden mikroskopisch ermittelt. Die Beispielbilder zeigen Immunfluoreszenzaufnahmen von infizierten Zellen, die mit anti-CPn0147 gefärbt wurden. Die abgebildeten Inklusionen zeigen keinen Faden (0) bis sehr viele Fäden (>5).

#### 4.3.1.4 Es konnte keine Wirtszell-Struktur mit den CPn0147-Fäden assoziiert werden

Um Hinweise auf die Funktion der CPn0147-Fäden während der Infektion zu erhalten, sollte mit verschiedenen Markern eine mögliche Kolokalisierung mit Humanzellstrukturen überprüft werden. Die mit dem anti-CPn0147-Antikörper detektierten Fäden schienen nicht kontinuierlich gefärbt zu sein, wenn die Zellen mit para-Formaldehyd und anschließender Triton X-100-Permeabilisierung (oder auch mit Methanol) fixiert wurden. Vielmehr erschien das CPn0147-Signal auf den Fäden punktiert vorzuliegen (vergl. Abbildung 54 B). Zum Vergleich wurden die Zellen mit para-Formaldehyd fixiert und anschließend in der Anwesenheit von 0,02 % Saponin permeabilisiert. Unter diesen milderen Bedingungen zeigten die Fäden ein kontinuierliches CPn0147-Signal. Dies spricht dafür, dass CPn0147, zumindest auf den Fäden, Detergenzien-sensitiv ist und die schonendere Saponin-Permeabilisierung die Struktur der Fäden besser erhält. Die Färbung der Inklusionsmembran zeigte keine Unterschiede. Unter diesen Bedingungen wurde nun analysiert, ob die Fäden mit Komponenten des Zytoskeletts kolokalisieren. Tubulin zeigte teilweise Signale um die Inklusion herum und kolokalisierte hier mit der Inklusionsmembran und somit auch mit CPn0147. Die Tubulinstrukturen, die den Zellkern umgeben oder das Zytoplasma durchziehen, zeigten jedoch keine Kolokalisierung mit den CPn0147-positiven Fäden (Abbildung 59). Auch das Aktin-Zytoskelett, das teilweise ebenfalls fadenartige Gebilde zeigte, kolokalisierte nicht mit den CPn0147-Fäden. Die mit dem anti-Vimentin-Antikörper detektierten Intermediärfilamente zeigten, genau wie Tubulin, eine Akkumulation um die Inklusion herum und bildeten ein fadenartiges Netzwerk um den Zellkern. Allerdings zeigte sich auch hier keine Kolokalisierung mit den CPn0147-Fäden.

Durch eine Färbung mit WGA wurde eine Kolokalisierung mit Membranen analysiert. WGA kolokalisierte mit der Inklusionsmembran, so dass zumindest die Inklusionsmembran die Strukturen, die von WGA erkannt werden (N-Acetylneuraminsäure und N-Acetylglucosaminy-Zuckereste), aufweist. Die Fäden scheinen diese WGA-Zielstrukturen nicht zu besitzen, denn sie wurden nicht angefärbt. Zusätzlich zu den hier gezeigten Strukturen wurde eine Cholesterin-Färbung mit Filipin und CPn0147-gefärbten Zellen angefertigt. Cholesterin befindet sich verstärkt in Plasmamembranen. Auch hier konnte ebenfalls keine Kolokalisierung mit den Fäden beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

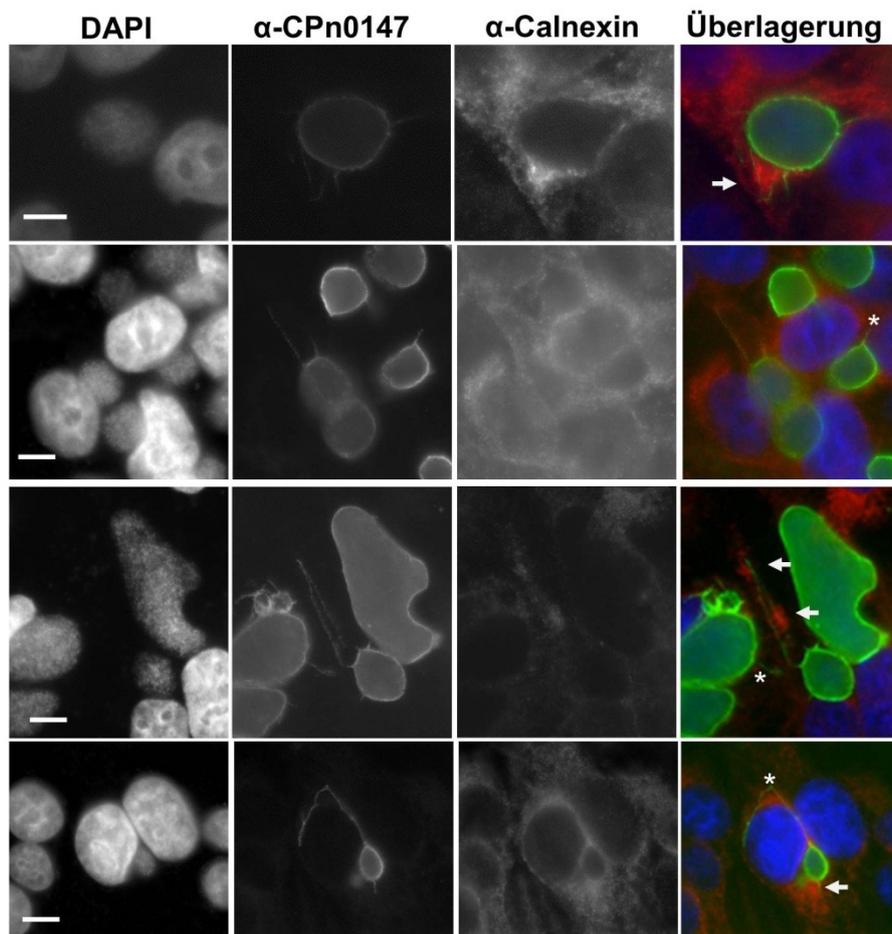
Sowohl Zytoskelett-Strukturen als auch mit WGA-anfärbbare oder cholesterinreiche Membranen scheinen demnach nicht mit den CPn0147-Fäden zu kolokalisieren.



**Abbildung 59: Kolokalisierungsanalysen von Wirtszell-Strukturen mit den CPn0147-Fäden**

Infizierte HeLa 229 Zellen (MOI 2) wurden 48 hpi fixiert und mit dem CPn0147-Antiserum (grün) und DAPI (blau) gefärbt. Zusätzlich wurden Komponenten des Zytoskeletts mit Antikörpern oder Farbstoffen gefärbt (rot, wie rechts angegeben). Verwendet wurde Rhodamin-Phalloidin (F-Aktin), monoklonale Antikörper gegen alpha-Tubulin (Mikrotubuli) und Vimentin (Intermediärfilamente) und Alexa 633-konjugiertes Weizenkeim-Agglutinin (WGA, färbt Zuckerstrukturen in Membranen). Längenmarker = 5  $\mu$ m. Da auf die Fäden fokussiert wurde, sind die Inklusionen teilweise unscharf.

Des Weiteren wurde bereits beschrieben, dass chlamydiale Antigene, wie zum Beispiel Momp, im ER von infizierten Zellen detektiert werden konnten (Giles and Wyrick 2008). Da Momp auch auf den CPn0147-Fäden detektiert werden konnte und die Fäden häufig in der direkten Umgebung des Zellkerns zu beobachten waren, sollte auch eine Assoziation der Fäden mit dem ER der Humanzelle analysiert werden. Hierzu wurden Kofärbungen mit einem Calnexin-Antikörper durchgeführt. Teilweise waren die CPn0147-Fäden an ER-reichen Strukturen zu finden (Abbildung 60, Pfeile). Dies traf aber nicht immer zu, manchmal waren die Fäden auch in Bereichen zu sehen, die keine starke Calnexin-Färbung aufwiesen (markiert mit \*). Im unteren Bild scheint der oberhalb des Kerns verlaufende Faden den ER-Bereich zu umgeben oder auszusparen (markiert mit \*), während die anderen Fäden genau in den ER-Bereich hineinragen (Pfeil). Eine vollständige Kolo-kalisierung konnte also nicht bestätigt werden, es deutet aber darauf hin, dass die Fäden durchaus Kontakt zum ER haben.



**Abbildung 60: CPn0147 und das ER**

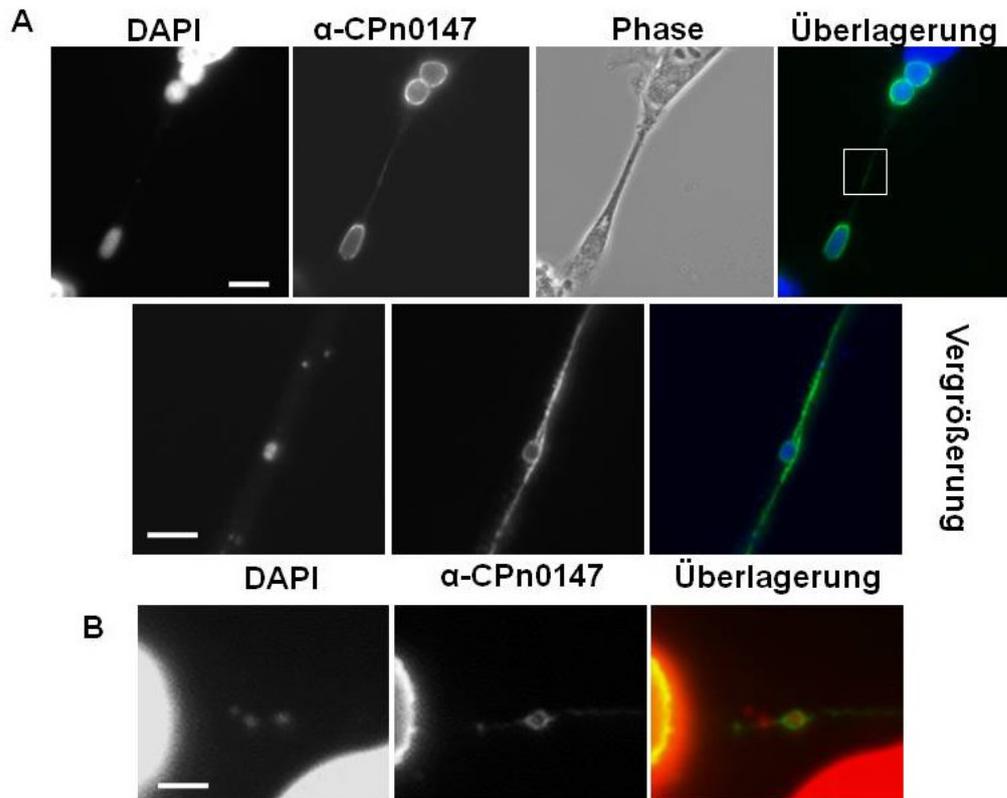
Infizierte HeLa 229 Zellen (MOI 2) wurden mit dem CPn0147-Antiserum (grün) und DAPI (blau) gefärbt. Zusätzlich wurde das ER mit einem monoklonalen Antikörper gegen Calnexin, einer membrangebundenen Komponente des ER, angefärbt. Längenmarker = 5  $\mu\text{m}$ . Pfeile markieren ER-reiche Areale mit Fäden, \* markieren Fäden ohne ER-reiche Areale.

#### 4.3.1.4 Sind die Fäden an der Bildung von Sekundärinklusionen beteiligt?

Die CPn0147-Fäden konnten häufig als Verbindung zwischen zwei Inklusionen einer Zelle beobachtet werden, bei denen die Inklusionen an den gegenüberliegenden Seiten des Zellkerns lagen. Eine der zwei Publikationen, die bisher zu den IncA-Fäden erschienen ist, beschreibt, dass die Fäden in *C. trachomatis* eine Rolle in der Bildung von Sekundärinklusionen spielen (Suchland, Rockey et al. 2005). So konnten in infizierten Zellen neben den üblichen Inklusionen auch leere Inklusionen oder kaum mit Bakterien gefüllte Inklusionen beobachtet werden, die durch einen IncA-positiven Faden mit der normal aussehenden Inklusion verbunden sind. Einige der untersuchten *C. trachomatis*-Stämme bildeten vermehrt diese so genannten Sekundärinklusionen. Für diese Stämme konnte bei Verzicht auf Cycloheximid im Kulturmedium eine deutliche Zunahme an Inklusionen beobachtet werden, während bei anderen Stämmen die Anzahl der Inklusionen mit und ohne Cycloheximid im Medium gleich blieb. Außerdem konnten auf den IncA-positiven Fäden in einigen Fällen kreisförmige Momp-Signale detektiert werden, die auf den Transport von ganzen Bakterien schließen lassen (Suchland, Rockey et al. 2005).

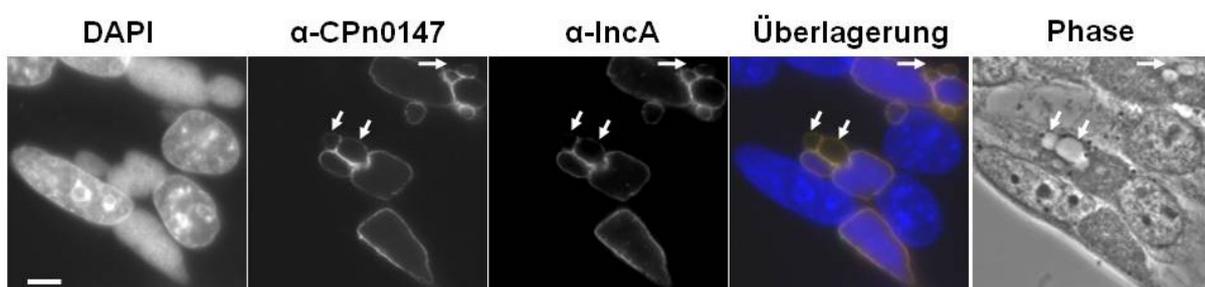
In den in dieser Arbeit durchgeführten Kofärbungen mit anti-Momp und anti-CPn0147 konnten keine kreisförmigen Momp-Signale auf den Fäden detektiert werden (siehe Abbildung 55). Es konnten aber vereinzelt DAPI-Signale auf den Fäden beobachtet werden (Abbildung 62). In beiden Fällen sind die DAPI-Signale von einem CPn0147-Signal umgeben, was eher für eine kleine Inklusion als nur ein Bakterium spricht. Da die Fäden meist in der Nähe der Zellkerne vorliegen, ist es sehr schwer, herauszufinden, ob dort möglicherweise ein schwaches DAPI-Signal einer Inklusion vorliegt. Eine Quantifizierung war aufgrund dessen nicht möglich. Zudem konnten in den mikroskopischen Analysen insgesamt nur fünf Mal DAPI-Signale auf den Fäden beobachtet werden, was darauf hin deutet, dass es sich um ein sehr seltenes Ereignis handelt.

Die in der Publikation von Suchland et al. beschriebenen Sekundärinklusionen von *C. trachomatis* wurden als Sekundärinklusionen identifiziert und von den Primärinklusionen unterschieden, da sie häufig keine oder nur wenige Bakterien beinhalteten (Suchland, Rockey et al. 2005). Tatsächlich konnten in der *C. pneumoniae*-Infektion ebenfalls leere Strukturen beobachtet werden, die sowohl von einem Signal für CPn0147 als auch IncA umgeben waren (Abbildung 61). Es handelt sich um Vakuolen-ähnliche Strukturen, die zwar anscheinend von einer Inklusionsmembran umgeben sind, aber keinerlei DAPI-Signal zeigen. Im Phasenkontrastbild sind diese Strukturen komplett leer. Unklar ist, ob es sich hierbei um Sekundärinklusionen handelt, die erst noch gefüllt werden, oder ob es sich um entleerte Inklusionen handelt oder etwas gänzlich anderes.



**Abbildung 62: Detektion von DAPI-Signalen auf den CPn0147-Fäden**

Gezeigt sind infizierte HEp-2 Zellen (MOI 2), die mit Methanol fixiert wurden und mit dem gereinigten Antiserum gegen CPn0147 und DAPI gefärbt wurden. CPn0147 ist in der Überlagerung in grün dargestellt. In A) ist DAPI in blau dargestellt. In der unteren Reihe ist eine Vergrößerung des weiß markierten Ausschnitts gezeigt. Längenskalen oben = 5  $\mu\text{m}$ , in der Vergrößerung = 2  $\mu\text{m}$ . In B) ist DAPI in rot dargestellt, links ist ein Stück einer Inklusion zu sehen, rechts unten ein Stück eines Zellkerns. Längenskalen = 2  $\mu\text{m}$ . Für die Vergrößerungen wurde jeweils 5mal länger belichtet.

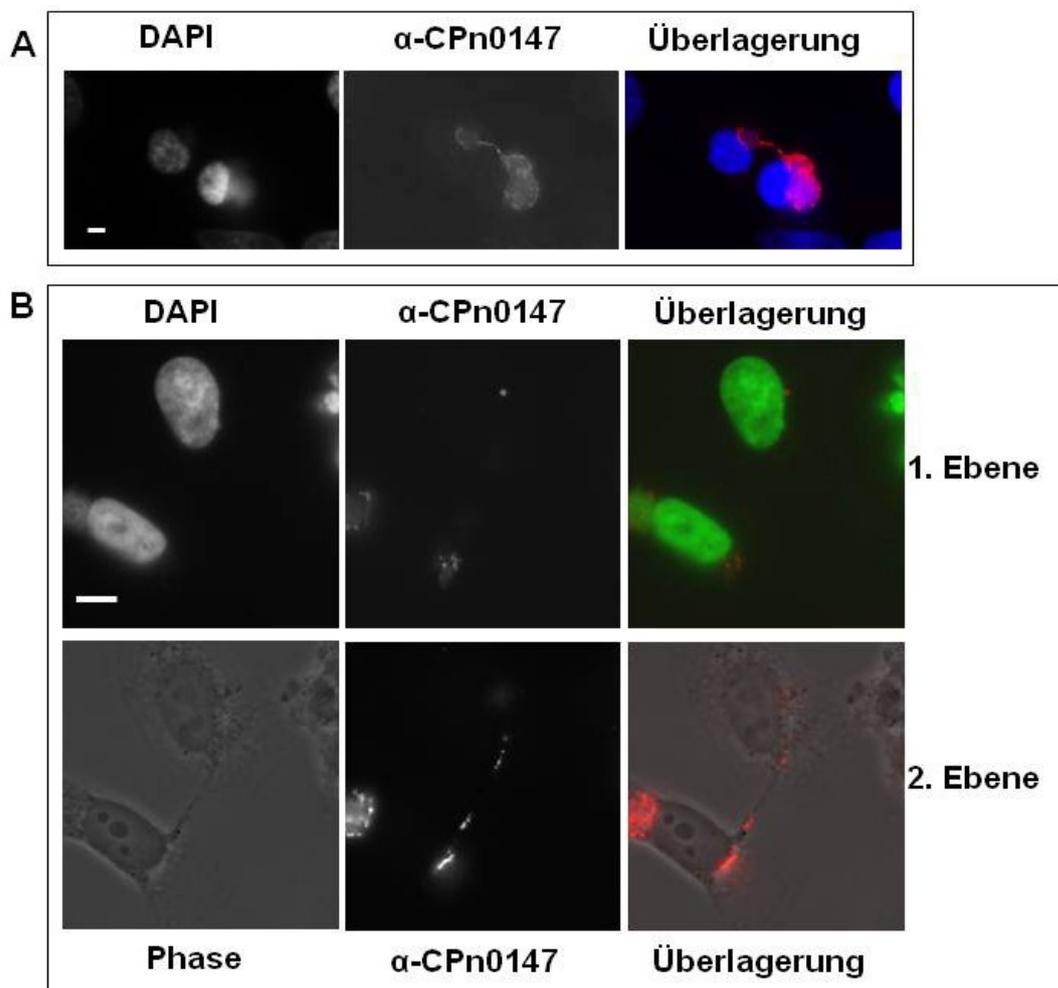


**Abbildung 61: Vakuolen-ähnliche Strukturen, die von einer Inklusionsmembran umgeben sind.**

Abgebildet sind HEp 2 Zellen, die 72 Stunden nach der Infektion (MOI 2) mit Methanol fixiert und anschließend mit dem Antigen-gereinigten CPn0147-Antikörper und anti-IncA-Antikörper gefärbt wurden (Sekundärantikörper Alexa-488-anti-Kaninchen und Alexa-594-anti-Maus). Die Pfeile zeigen die „leeren“ Inklusionen. Der Längenskalenmarker repräsentiert 5  $\mu\text{m}$

In *C. trachomatis* konnte außerdem beobachtet werden, dass in infizierten Zellen in der Abwesenheit von Cycloheximid die IncA-positiven Fäden zwischen benachbarten Zellen vorkommen und die Inklusionen dieser Zellen miteinander verbinden. Suchland et al. schlossen daraus, dass Sekundärinklusionen gebildet werden, um im Falle einer Zellteilung die Inklusionen auf beide Tochterzellen zu verteilen und somit nach einer erfolgreichen

Zellteilung die Fadenverbindung weiter besteht (Suchland, Rockey et al. 2005). Die in dieser Arbeit analysierten CPn0147-Fäden wurden in der Anwesenheit von Cycloheximid detektiert, also in Zellen, die sich nicht teilen, da ihre Proteinbiosynthese inhibiert ist. Auch unter diesen Bedingungen konnte für *C. pneumoniae* die Verbindung zwischen zwei Zellen durch einen CPn0147-Faden beobachtet werden (Abbildung 63) Gezeigt sind zwei benachbarte Zellen, deren Inklusionen mit einem Faden verbunden sind (Abbildung 63 A) Im zweiten Bild ist in der Überlagerung mit DAPI die sehr kleine Inklusion in der oberen Zelle zu erkennen, in der anderen fokalen Ebene ist deutlich ein Faden zu erkennen, der von der unteren in die obere Zelle ragt und in dem dünnen Zellfortsatz lokalisiert (Abbildung 63 B). Eine solche Verbindung war jedoch nur in sehr seltenen Fällen zu beobachten und trat auch in Infektionen ohne Cycloheximid nicht häufiger auf.



**Abbildung 63: CPn0147-Fäden verbinden benachbarte Zellen**

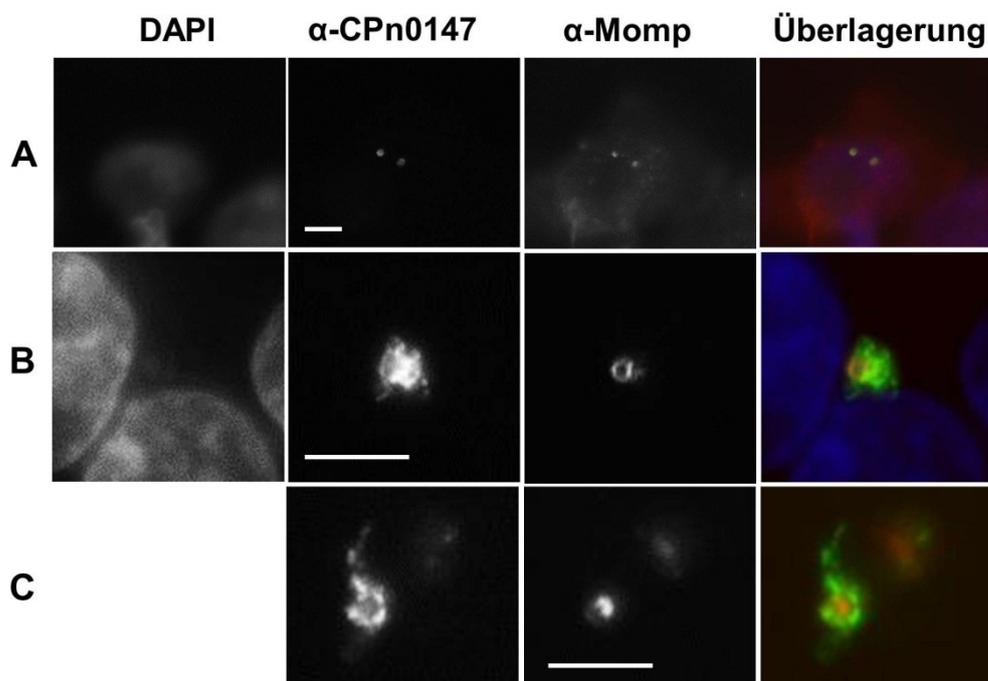
A) Abgebildet sind infizierte HEp-2 Zellen, die mit einem anti-CPn0147-Antikörper (rot) und DAPI (blau) gefärbt wurden. B) Infizierte HEp-2 Zellen, die mit einem anti-CPn0147-Antikörper (rot) und DAPI (grün) gefärbt wurden. Gezeigt sind dieselben Zellen, aufgenommen in zwei unterschiedlichen fokalen Ebenen.

Längenmarker = 5 $\mu$ m, MOI = 2, Infektion mit Cycloheximid.

### 4.3.2 Die Sekretion von CPn0147

#### 4.3.2.1 CPn0147 wird früh in die Inklusionsmembran sekretiert

Um zu analysieren, wann CPn0147 sekretiert wird, wurde zunächst die Expression von CPn0147 in der frühen Phase der Infektion untersucht. In Immunfluoreszenz-Analysen konnte CPn0147 ab 15 hpi in infizierten Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 64). Die Inklusionen sind zu diesem Zeitpunkt sehr klein und enthalten meist nur ein einziges Bakterium. Aus der Beobachtung, dass das CPn0147-Signal größer als das Momp-Signal ist, kann geschlossen werden, dass CPn0147 bereits in die Inklusionsmembran sekretiert wurde (Abbildung 64 A und B). Die Inklusionen befanden sich außerdem manchmal noch nicht in der Nähe des Zellkerns (Abbildung 64 C). Es ist bereits ein fadenähnlicher Fortsatz zu erkennen. Die beobachteten CPn0147-Fäden könnten also schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der Infektion auftreten. Dies ist ein Hinweis auf eine frühe Sekretion dieses Inc Proteins. Zu einem früheren Zeitpunkt war in der hier durchgeführten Arbeit eine sichere Aussage über die Lokalisierung von CPn0147 in der Inklusionsmembran nicht möglich, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass CPn0147 noch früher produziert und sekretiert wird.

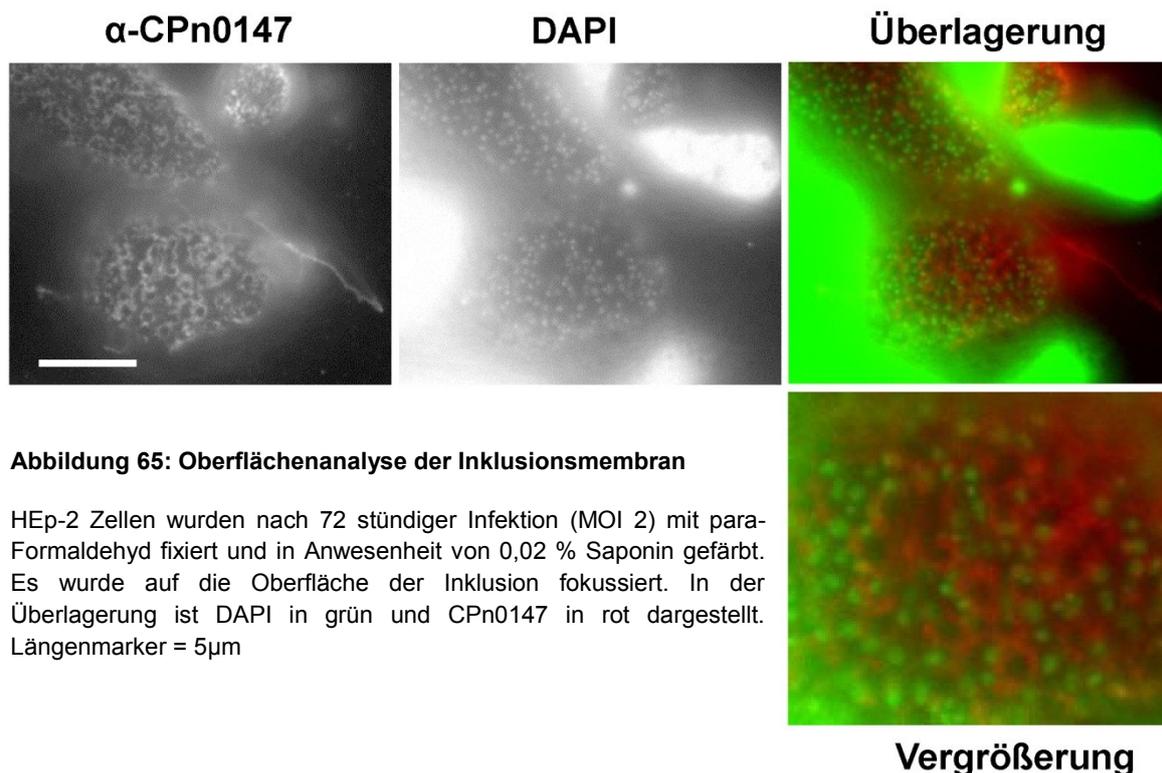


**Abbildung 64: Immunfluoreszenz-Aufnahmen von CPn0147 15 hpi**

HEp-2 Zellen wurden mit einer MOI von 5 infiziert, nach 15 stündiger Infektion mit Methanol fixiert und mit Antikörpern gegen CPn0147 (grün) und Momp (rot) gefärbt. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt (blau). Der Längsmarker repräsentiert 5  $\mu$ m. Bei C befindet sich die Inklusion nicht in Kernnähe, daher wurde auf das DAPI-Bild verzichtet.

#### 4.3.2.2 Die Inklusionsmembran zeigt ringförmige CPn0147-Signale

Eine genauere Analyse der Oberfläche der Inklusionsmembran zeigte, dass das Signal für CPn0147 nicht gleichmäßig die ganze Inklusionsmembran bedeckte, sondern eine diskontinuierliche Färbung zu sehen war. In infizierten Zellen, die mit para-Formaldehyd fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert wurden, war das Signal für CPn0147 in der Inklusionsmembran deutlich schwächer als in Methanol-fixierten Zellen und zeigte des Weiteren auch eine eher punktierte Färbung. Für eine genaue Analyse wurden die Zellen daher mit para-Formaldehyd fixiert und in der Gegenwart von Saponin permeabilisiert. Auch hier zeigte sich deutlich die ringförmige Anfärbung der Inklusionsmembran, die auch schon in Methanol-fixierten Zellen beobachtet werden konnte (Abbildung 65). Deutlich sind in der Vergrößerung ringförmige Strukturen zu erkennen, die teilweise die bakteriellen Partikel umgeben, häufig aber keine Assoziation mit den Bakterien zeigen. Es handelt sich also um Strukturen in der Inklusionsmembran, die nicht unmittelbar mit den Bakterien assoziiert sind.



**Abbildung 65: Oberflächenanalyse der Inklusionsmembran**

HEp-2 Zellen wurden nach 72 stündiger Infektion (MOI 2) mit para-Formaldehyd fixiert und in Anwesenheit von 0,02 % Saponin gefärbt. Es wurde auf die Oberfläche der Inklusion fokussiert. In der Überlagerung ist DAPI in grün und CPn0147 in rot dargestellt. Längenmarker = 5µm

#### 4.3.2.3 CPn0147 in der Inklusionsmembran ist von der zytosolischen Seite aus zugänglich

Die bisher gewonnenen Daten legten die Frage nahe, wie CPn0147 in die Membran eingebaut wird. Das Protein hat laut Vorhersage die für Inc-Proteine typische Transmembranstruktur und könnte somit theoretisch sowohl mit dem N- als auch mit dem C-

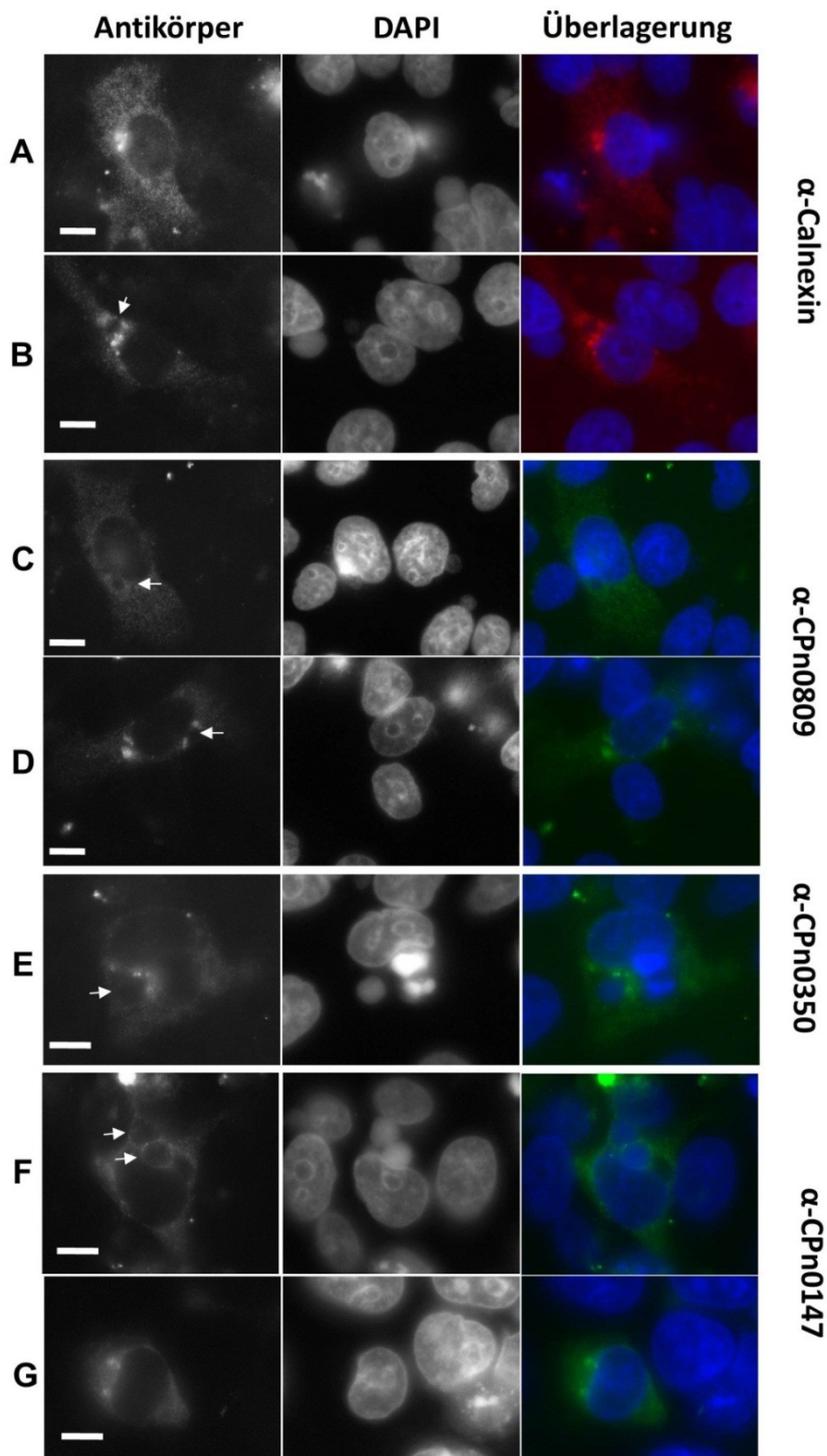
Terminus in das Zytoplasma der Wirtszelle ragen. Es kann früh (mind. 24 hpi, wahrscheinlich auch früher) in der Inklusionsmembran detektiert werden und zu späteren Zeitpunkten zeigen sich gehäuft die beschriebenen CPn0147-positiven Fäden. Außerdem sind Strukturen für CPn0147 auf der Inklusionsmembran sichtbar. Laut Phobius-Vorhersage liegen sowohl der N- als auch der C-Terminus von CPn0147 zytosolisch vor, nur der 5 Aminosäuren umfassende Bereich zwischen den Transmembranhelices soll sich „außen“ befinden. Solch eine Vorhersage ist jedoch bei Inklusionsmembran-Proteinen generell weniger aussagekräftig, da diese Vorhersagen sich aufgrund der Ladung des Proteins auf seine wahrscheinliche Lokalisierung in Plasmamembranen in Relation zum Zytoplasma beziehen. Um zu überprüfen, ob CPn0147 tatsächlich von der zytoplasmatischen Seite aus zugänglich ist, wurde das spezifische Antiserum gegen CPn0147 in infizierte Zellen transfiziert. Als Kontrollen wurden Antikörper gegen humanes Calnexin und gegen zwei chlamydiale Proteine (CPn0809 und CPn0350) ebenfalls transfiziert. Die Zellen wurden zuerst für 24 Stunden infiziert, dann erfolgte die Antikörpertransfektion und die Zellen wurden für weitere 24 Stunden inkubiert.

Der Calnexin-Antikörper zeigte eine zytosolische Verteilung und eine Akkumulation in der Nähe des Zellkerns, bei der es sich demnach um ER-Strukturen handeln könnte (Abbildung 66 A und B). Diese Lokalisierung ähnelt der normalen Antikörperfärbung (vergl. Abbildung 60). Allerdings waren auch bei den Transfektionen der chlamydialen Antikörper solche Akkumulationen zu beobachten, so dass es sich auch um unspezifische Aggregate der Antikörper handeln könnte (Abbildung 66 D, E und G).

Die Antikörper gegen die wahrscheinlich bakterienassoziierten Proteine CPn0809 und CPn0350 zeigten eine diffuse zytosolische Verteilung und sparten dabei die Inklusionen (Pfeile) aus (Abbildung 66 C, D und E). Die Transfektion schleust die Antikörper zwar durch die Plasmamembran der Wirtszelle, ein Durchdringen der Inklusionsmembran ist aber nicht möglich. In infizierten Zellen war mit dem transfizierten CPn0147-Antiserum eine deutliche ringförmige Färbung um die Inklusion herum zu beobachten (siehe Abbildung 66 F, Pfeile). Dies spricht dafür, dass zumindest ein Teil von CPn0147 auf der zytosolischen Seite der Inklusionsmembran lokalisiert und so dem Antikörper zugänglich ist. In nicht-infizierten Zellen zeigte sich eine zytosolische Verteilung, wie sie auch schon für die anderen Antikörper beobachtet werden konnte (Abbildung 66 G). Eine negative Beeinflussung der Infektion durch die Transfektion des CPn0147-Antikörpers konnte nicht beobachtet werden, die Inklusionen transfizierter und nicht-transfizierter Zellen waren durchschnittlich gleich groß und es waren auch nicht weniger Einschlüsse in transfizierten Zellen zu beobachten.

Da der Antikörper gegen das Vollängenprotein generiert wurde, kann nicht eingegrenzt werden, welcher Teil des Proteins Kontakt zum Zytoplasma hat. Aufgrund der Tatsache, dass der Bereich zwischen den Transmembranhelices jedoch nur fünf Aminosäuren umfasst,

ist es sehr wahrscheinlich, dass die beobachtete Anfärbung durch den transfizierten Antikörper auf eine zytosolische Präsentation von N- und/oder C-Terminus zurückzuführen ist.



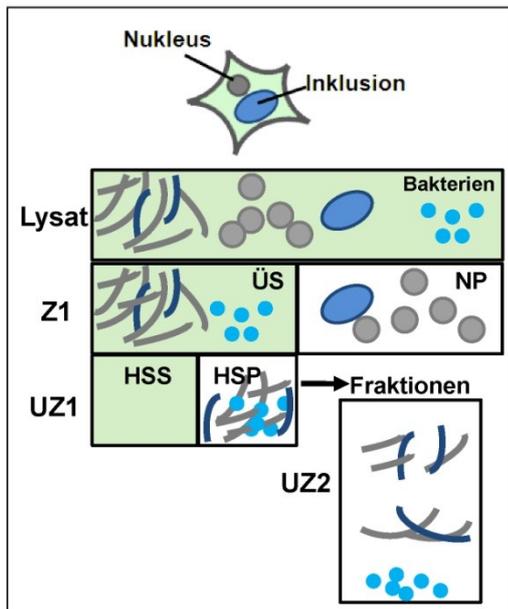
**Abbildung 66: Antikörper-Transfektionen in infizierte Zellen**

Die rechts angegebenen Antikörper wurden in infizierte HeLa 229 Zellen transfiziert (24 hpi), die Transfektion erfolgte mit dem TurboFect™ Protein Transfection Reagent von Fermentas. Verwendet wurden die Antigen-gereinigten Seren (CPn0809, CPn0350 und CPn0147) bzw. ein kommerzieller monoklonaler Antikörper gegen Calnexin (jeweils 1 µg). Die Zellen wurden 48 hpi mit Methanol fixiert und mit einem Alexa 488- bzw. Alexa 594-konjugierten Sekundärantikörper und DAPI gefärbt. DAPI ist jeweils in blau dargestellt. Längenmarker = 5 µm. Weiße Pfeile markieren Inklusionen.

#### 4.3.2.3 In fraktionierten Zellen kann CPn0147 in Membranfraktionen nachgewiesen werden

Die bisherigen Analysen zeigten eine klare Lokalisierung von CPn0147 in der Inklusionsmembran und auf den Fäden. Um zu überprüfen, ob CPn0147 eventuell auch löslich in infizierten Zellen vorliegt und um die Membranlokalisierung zu untermauern, wurde ein biochemischer Ansatz gewählt um CPn0147 mittels Western Blot-Analyse in Fraktionen von infizierten Zellen nachzuweisen. Die Fraktionierung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der Arbeitsgruppe Valdivia (Jorgensen and Valdivia 2008).

Infizierte Zellen aus 32 kleinen Flaschen wurden 48 hpi mit einem Optiprep-Gradienten wie



**Abbildung 67: Schema der Fraktionierung infizierter Zellen:**

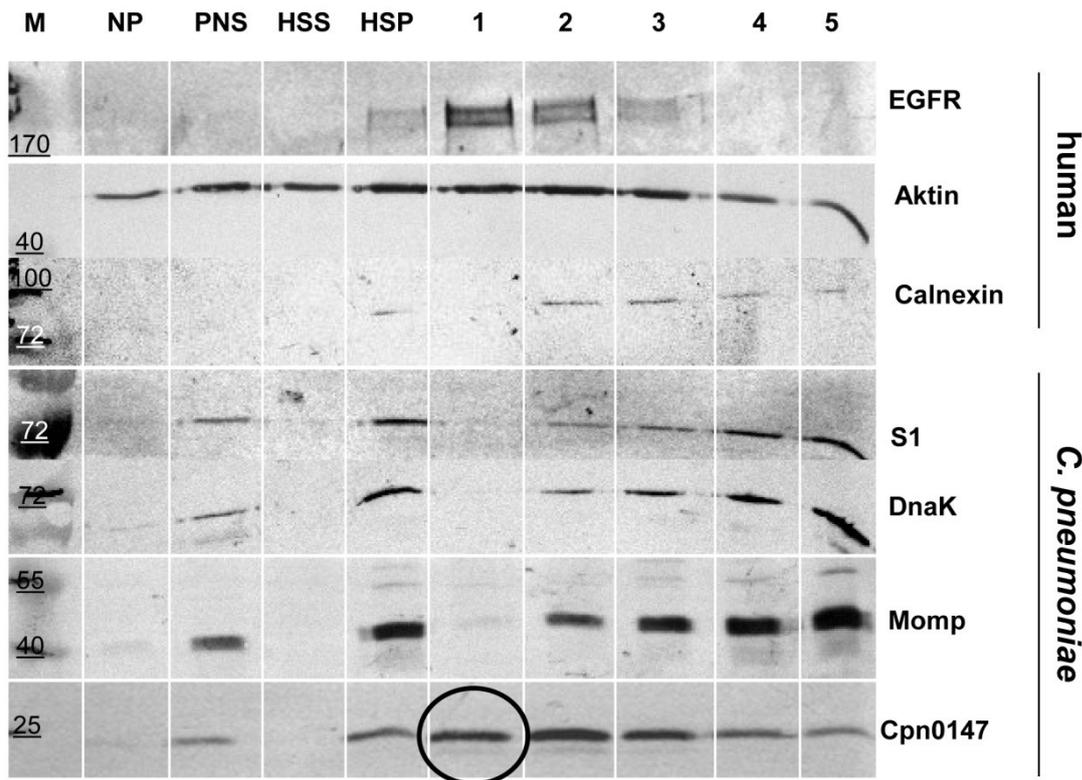
Z1= erste Zentrifugation, UZ1= erste Ultrazentrifugation, UZ2= zweite Ultrazentrifugation. ÜS= Überstand, NP= nuclear pellet (Kernpellet), HSS= high speed supernatant (ÜS nach der UZ1), HSP=high speed Pellet (Pellet nach der UZ1). Das HSP wird über einen Optiprep-Gradienten in seine unterschiedlichen Bestandteile getrennt. Grün hinterlegte Fraktionen beinhalten das Zytoplasma, grau dargestellt sind Wirtszell-Strukturen, blau bakterielle Bestandteile.

unter 3.3.12.1 beschrieben fraktioniert (Abbildung 67). Anschließend wurden die erhaltenen Fraktionen mit verschiedenen Antikörpern in Western Blot-Analysen untersucht (Abbildung 68).

Die humanen und bakteriellen Kontrollproteine zeigen die erwarteten Verteilungsmuster. So fand sich EGFR, ein humanes Membranprotein, hauptsächlich in den Schichten der geringsten Dichte (Abbildung 68 1 und 2) und markierte die Membranfraktionen. Die membrangebundene ER-Komponente Calnexin hingegen war in den Schichten 2-5 zu detektieren und nicht in der

Haupt-EGFR-Membranfraktion 1. Aktin war, wie zu erwarten, in allen Schichten zu finden. Die Bakterien-assoziierten Proteine S1, DnaK und Momp konnten ebenfalls in den Schichten 2-5 detektiert werden und zeigten hier eine Zunahme der Proteinmenge mit Zunahme der Dichte. Für diese drei bakteriellen Proteine konnte kein Signal in der obersten Fraktion (1) detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte CPn0147 in großen Mengen bereits in der Haupt-Membranfraktion (1)

detektiert werden (Abbildung 68, Kreis), während in der zytosolischen Fraktion (HSS) nichts detektiert werden konnte. Bei CPn0147 handelt es sich demzufolge um ein membrangebundenes Protein. Auch die CPn0147-Fäden scheinen sich demnach nicht in der zytosolischen Fraktion zu befinden. CPn0147 liegt demnach sehr wahrscheinlich nicht löslich, sondern nur membrangebunden vor.



**Abbildung 68: Western Blot-Analyse der Zellfraktionierung 48 hpi**

Von jeder Fraktion wurde die gleiche Gesamtproteinmenge geladen. Rechts sind die mit den Antikörpern detektierten Proteine gelistet. NP= Kernpellet, PNS= Postnukleärer Überstand, HSS = Zytosolische Fraktion (high speed supernatant), HSP = erstes Ultrazentrifugenpellet (high speed pellet), 1-5= Fraktionen des HSP von oben (geringe Dichte) nach unten (hohe Dichte). Verwendet wurden monoklonale Antikörper gegen humanes EGFR, Calnexin und Aktin sowie chlamydiales S1, DnaK und Momp und das generierte polyklonale Serum gegen CPn0147 (1:100 verdünnt).

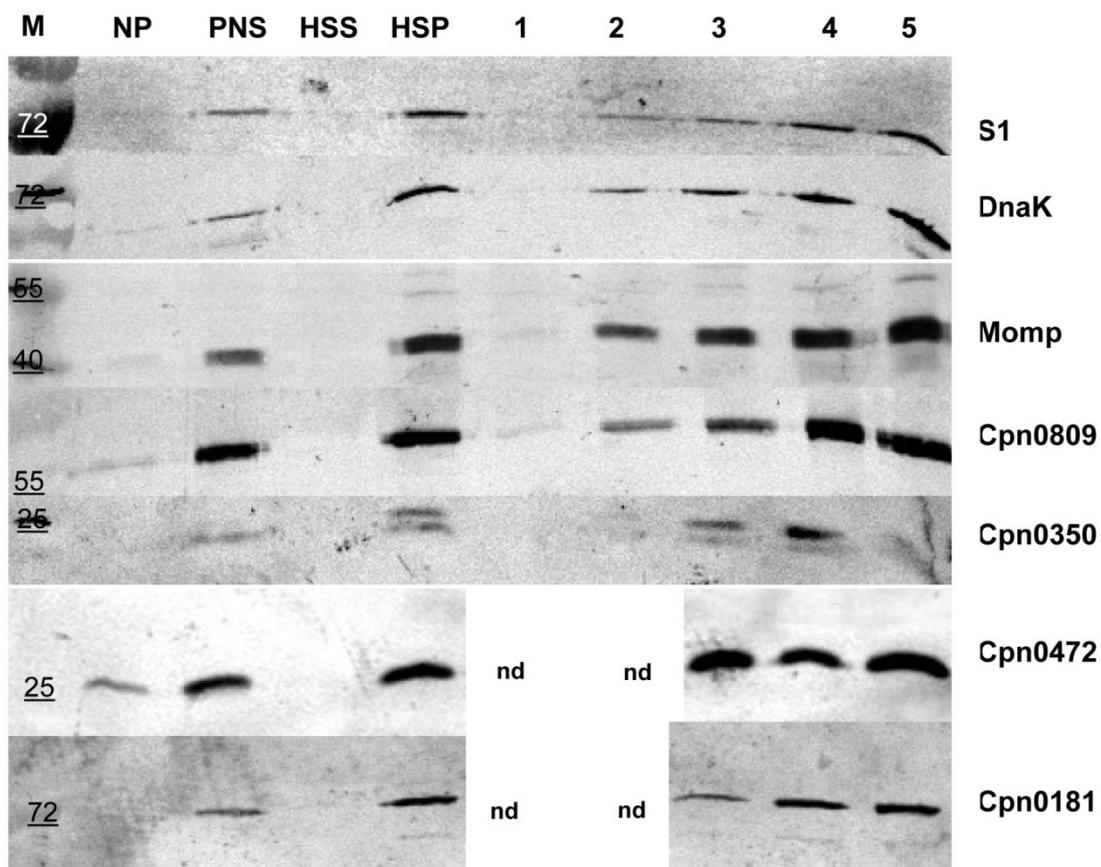
#### 4.3.2.3.1 Analyse der anderen Kandidaten in fraktionierten Zellen

Die generierten Zellfraktionen wurden neben den oben genannten chlamydialen Markern zusätzlich mit den in dieser Arbeit generierten Seren gegen einige weitere chlamydiale Proteine getestet, um zu überprüfen, ob biochemisch eine Sekretion eines dieser Kandidaten festgestellt werden kann.

Sowohl CPn0809 als auch CPn0472, CPn0350 und CPn0181 zeigten eine Verteilung, wie sie auch für die bakterienassoziierten Markerproteine Momp, DnaK und S1 zu beobachten ist. Die Proteine konnten in steigender Konzentration in den Schichten 2-5 detektiert werden. In der zytoplasmatischen Fraktion konnte keines der vier Proteine detektiert werden. Dies bedeutet, dass zumindest zu dem untersuchten Zeitpunkt, also 48 hpi, keine Sekretion in Zytoplasma nachweisbar ist.

Interessanterweise konnte von CPn0472 nur das C-terminale kleine Fragment detektiert werden und nicht das Volllängenprotein. In der Kernpellet-Fraktion sind bei fast allen

analysierten bakteriellen Proteinen schwache Banden zu erkennen, da das Kernpellet nicht komplett von den Bakterien gereinigt werden kann. CPn0472 zeigte hier jedoch das stärkste Signal. Möglicherweise wird also ein Teil von CPn0472 in den Kern sekretiert. CPn0181 und CPn0350, die bei einer Transfektion im Zellkern lokalisierten, konnten in der Fraktionierung nicht in der Kernfraktion detektiert werden. Mit dem Antiserum gegen CPn0181, das ein berechnetes Molekulargewicht von ca. 16 kDa hat, konnte außerdem nur eine Bande von ca. 72 kDa detektiert werden, die auch schon in den vorherigen Analysen zu beobachten war. Zudem war eine schwächere Bande unterhalb dieser Bande zu detektieren. Bei CPn0350 war, wie schon in den vorherigen Analysen, eine Doppelbande zu detektieren, die jedoch erst im HSP zu detektieren ist. In Schicht 5 ist nur ein schwaches Signal zu detektieren, weshalb der Blot hier wiederholt wurde (nur 4 und 5). Es zeigte sich bei der Wiederholung ebenfalls eine Doppelbande, die etwas intensiver war als die Bande in Schicht 4.

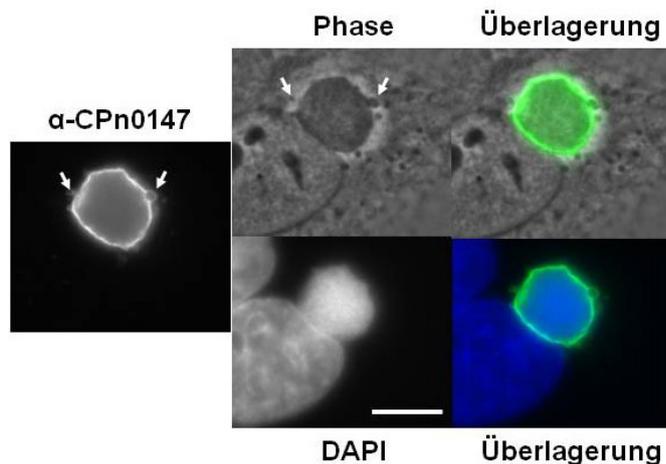


**Abbildung 69: Western Blot-Analyse fraktionierter infizierter Zellen mit den anderen Kandidaten**

Von jeder Fraktion wurde die gleiche Gesamtproteinmenge geladen. Rechts sind die mit den Antikörpern detektierten Proteine gelistet. NP= Kernpellet, PNS= Postnukleärer Überstand, HSS = Zytosolische Fraktion (high speed supernatant), HSP = erstes Ultrazentrifugenpellet (high speed pellet), 1-5= Fraktionen von oben (geringe Dichte) nach unten (hohe Dichte). Verwendet wurden monoklonale Antikörper gegen chlamydiales S1, DnaK und Momp und die generierten polyklonalen Seren gegen CPn0350, CPn0809, CPn0472 und CPn0181 (je 1:100 verdünnt). nd= nicht analysiert, da für die Western Blot-Analysen mit den Antiseren gegen CPn0472 und CPn0181 keine Proben mehr von den beiden obersten Schichten (1 und 2) vorhanden waren.

### 4.3.3 CPn0147 lokalisiert auf der Oberfläche von Lipidtröpfchen

In den Immunfluoreszenz-Untersuchungen mit dem CPn0147-Antikörper konnten in einigen Fällen Vesikel-ähnliche Strukturen in Inklusionsnähe beobachtet werden, die ein ringförmiges CPn0147-Signal, aber kein DAPI-Signal zeigten. Häufig fanden sich diese Strukturen direkt an der Inklusionsmembran (Abbildung 71). In der Phasenkontrastaufnahme sind sie als dunkle Punkte zu erkennen, wodurch sie sich von den hellen Vakuolen-artigen

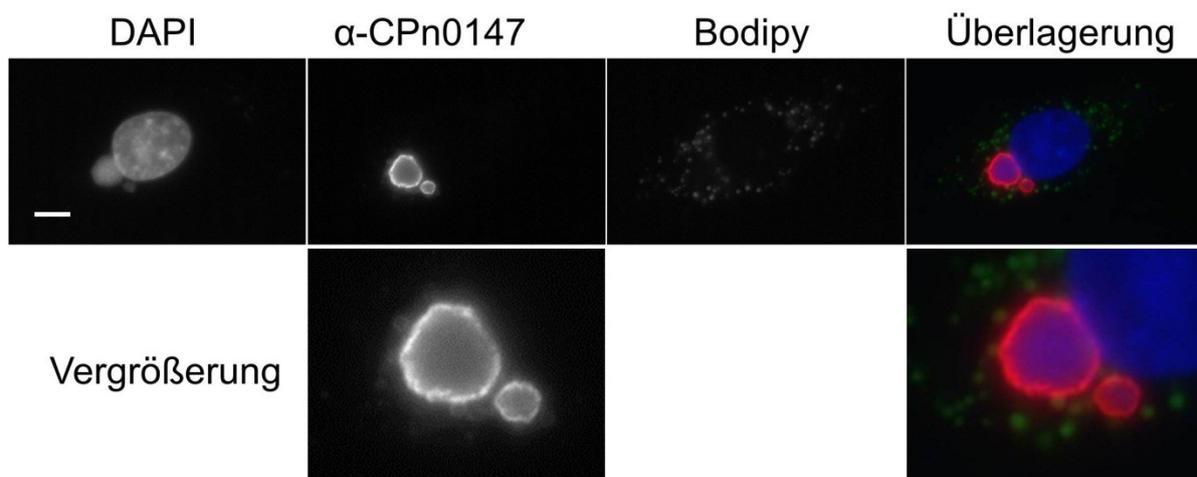


**Abbildung 71: Immunfluoreszenz der vesikulären CPn0147-Signale in infizierten Zellen**

HEp-2 Zellen wurden mit einer MOI von 1 infiziert und mit Antigen-gereinigtem CPn0147-Antikörper (grün) und DAPI (blau) gefärbt. Sie zeigen Vesikel-ähnliche Strukturen an der Inklusionsmembran. Längensmarker = 5 µm.

Strukturen unterscheiden, die in Kapitel 4.3.1.4 beschrieben wurden. Sie zeigten nicht immer eine direkte Verbindung mit der Inklusionsmembran, sondern waren oft auch in der näheren Umgebung der Inklusion zu detektieren. Da bekannt ist, dass Chlamydien Lipidtröpfchen in die Inklusion einschleusen, wurden infizierte Zellen mit dem Antiserum gegen CPn0147 und Bodipy 493/503 gefärbt, einem Farbstoff, der neutrale Fette in Zellen färbt und sehr spezifisch für Lipidtröpfchen ist. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass es sich bei den

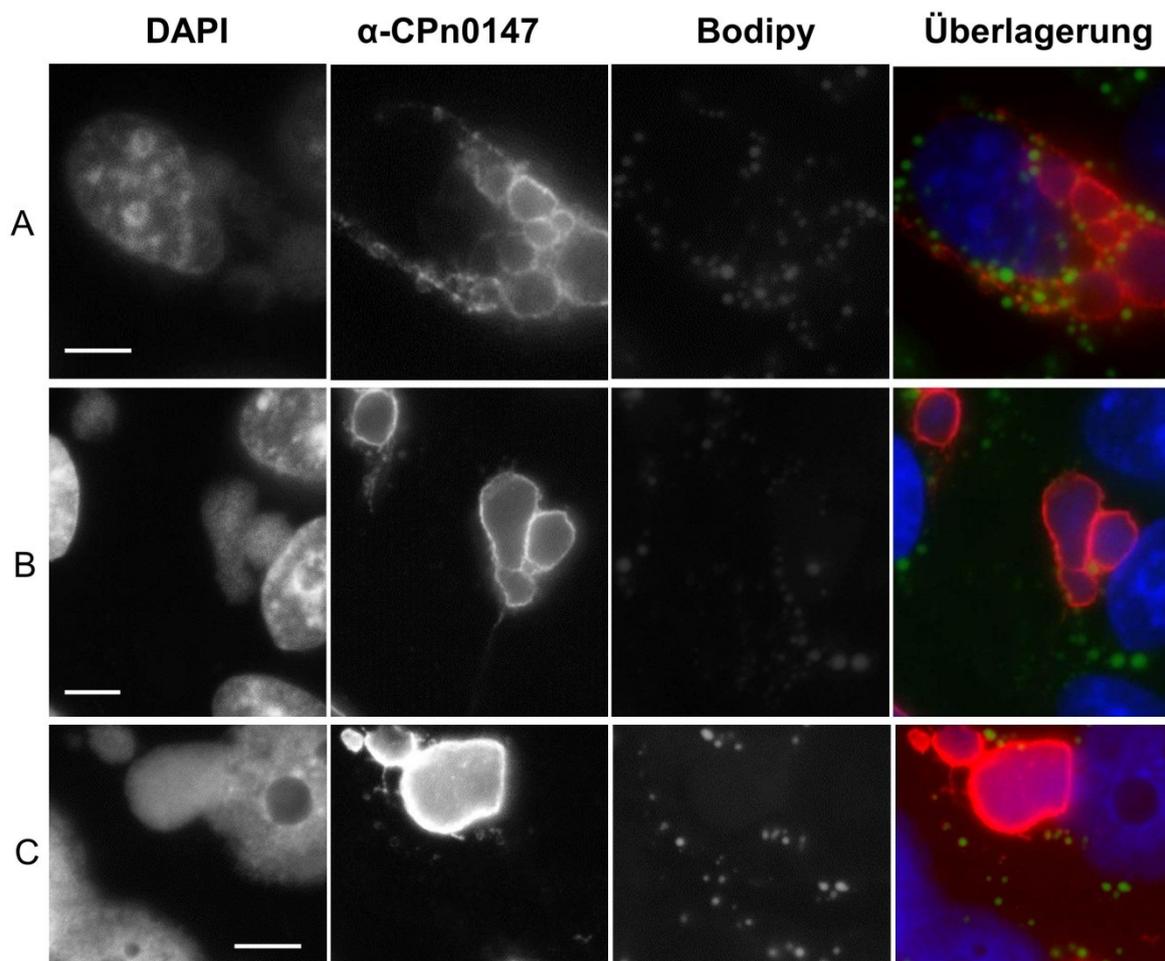
vesikulären CPn0147-Strukturen um Lipidtröpfchen handelt (Abbildung 70) Gezeigt ist eine infizierte Zelle mit zahlreichen Lipidtröpfchen. In der Vergrößerung kann deutlich das



**Abbildung 70: Kolokalisierung von CPn0147 und Lipidtröpfchen**

Mit einer MOI von 1 infizierte, Methanol-fixierte Zellen, die mit Antigen-gereinigtem CPn0147-Antikörper (rot), DAPI (blau) und Bodipy 493/503 (grün, 1:1000) gefärbt wurden, zeigen eine Kolokalisierung von CPn0147 mit inklusionsnahen Lipidtröpfchen. Längensmarker = 5 µm.

ringförmige CPn0147-Signal um einige Lipidtröpfchen in der Nähe der Inklusion beobachtet werden. Für weitere Analysen wurden die humanen Zellen 1 Std nach der Infektion mit 100  $\mu\text{M}$  Ölsäure behandelt, um die Bildung von Lipidtröpfchen zu stimulieren. Ölsäure wird als freie Fettsäure in Triacylglyceride eingebaut und stimuliert auf diese Weise die Bildung von Lipidtröpfchen in den Zellen (Suzuki, Sakata et al. 1991). Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien weisen normalerweise nur eine geringe Zahl an Lipidtröpfchen auf und diese sind üblicherweise sehr klein. Die Kolo-kalisierung mit den Lipidtröpfchen konnte auch erst beobachtet werden, nachdem eine neue Charge fetalen Kälberserums zur Kultivierung der humanen Zellen verwendet wurde. Diese hatte eventuell einen höheren Fettanteil, so dass die Zellen mehr Lipidtröpfchen aufwiesen als zuvor. Des Weiteren verbrauchen die Chlamydien während ihrer intrazellulären Replikation Wirtszell-Lipide, so dass in Zellen, die für 72 Stunden infiziert wurden, ohne Ölsäure-Stimulation nur noch sehr vereinzelt Lipidtröpfchen detektiert werden konnten. Auch nach einer Ölsäure-Zugabe waren zu diesem



**Abbildung 72: Lipidtröpfchen in infizierten und Ölsäure-behandelten Zellen**

Die Bildung von Lipidtröpfchen wurde durch Gabe von 100  $\mu\text{M}$  Ölsäure ins Zellkulturmedium 1hpi stimuliert. Die infizierten, Methanol-fixierten Zellen wurden 72 hpi fixiert und mit anti-CPn0147 (rot), DAPI (blau) und Bodipy 493/503 (1:1000 verdünnt, grün) gefärbt und zeigen eine Kolo-kalisierung von CPn0147 mit inklusionsnahen Lipidtröpfchen. Längenmarker = 5  $\mu\text{m}$ .

Zeitpunkt deutlich weniger Lipidtröpfchen zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Ölsäure-behandelte Zellen weisen nach 48 stündiger Infektion jedoch zahlreiche Lipidtröpfchen auf (Abbildung 72). Viele Lipidtröpfchen sind umgeben von einem CPn0147-Signal. Die Zelle in Bild A weist mehrere Inklusionen auf, die (noch) nicht fusioniert sind und durch einige Fäden verbunden sind. Es schien, als ob generell mehr Inklusionen mit vielen Fäden nach einer Ölsäure-Stimulation zu sehen waren als in unbehandelten Zellen. Die kleine Inklusion in der linken oberen Ecke von (Abbildung 72 B) zeigt außerdem einen Faden, auf dem CPn0147-positive Lipidtröpfchen lokalisieren.

#### **4.3.4 Suche nach Interaktionspartnern von CPn0147**

##### **4.3.4.1 Screening nach humanen Interaktionspartner mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse**

Das Screening zur Identifizierung humaner Interaktionspartner von CPn0147 mit Hilfe der Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse wurde wie unter 3.1.3.6 beschrieben durchgeführt. Es wurde eine humane testis-cDNA-Bibliothek der Firma Clontech im Hefestamm Y187 verwendet. Als Köder diente CPn0147 ohne Transmembranbereich ( $\Delta$  AS 42-91) im Vektor pEB2 transformiert in den Hefestamm AH109.

Es wurden insgesamt 114 Kandidaten isoliert, die zusammen mit CPn0147 Wachstum auf den hochstringenten Platten zeigten. Allerdings wuchsen sie auch genauso zusammen mit dem leeren Vektor. Es handelte sich also scheinbar bei allen Kandidaten um autoaktivierende Proteine. Aus diesem Grund wurde nicht weiter mit diesen Klonen gearbeitet.

##### **4.3.4.2 Screening nach chlamydialen Interaktionspartner mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse**

Für die Suche nach chlamydialen Interaktionspartnern von CPn0147 wurde eine genomische Shotgun-Expressionsbibliothek von *C. pneumoniae* (Stamm: GiD) verwendet. Die Expressionsbibliothek wurde von Frau Dr. Kerres in Zusammenarbeit mit der Firma AGOWA (jetzt Igc genomics) hergestellt und beinhaltet chlamydiale Fragmente fusioniert an die Gal4-Aktivierungsdomäne. Als Köder diente wieder CPn0147 fusioniert an die Bindedomäne (ohne Transmembranbereich) im Vektor pEB2 transformiert in AH109. Die Bank-DNA musste zuerst in ausreichender Menge in den Hefestamm Y187 transformiert werden (beschrieben unter 3.1.3.6). Die Hefezellen mit der transformierten Expressionsbibliothek wurden dann mit Hefezellen, die den Köder enthielten, gepaart und die resultierenden diploiden Zellen auf Medium hoher Stringenz plattiert (genauer Ablauf unter 3.1.3.6). Es wurde jedoch festgestellt, dass die verwendete DNA-Bibliothek eine Vektorkontamination mit dem Plasmid pCL1 aufwies. Dieses Plasmid ist ein Kontrollplasmid des Matchmaker-Kits von

Clontech und beinhaltet den kompletten OLR von GAL4. Daher ermöglicht es den Hefezellen Wachstum auf hochstringentem Medium. Aufgrund dieser Kontamination war es nicht möglich, chlamydiale Interaktionspartner mit dieser DNA-Bibliothek zu identifizieren. Auch eine enzymatische Reinigung der Bank schlug fehl.

Es wurden daher biochemische Ansätze zur Identifizierung von möglichen Interaktionspartnern gewählt.

#### **4.3.4.3 Suche nach Interaktionspartnern mit biochemischen Ansätzen**

Für die biochemische Suche nach Interaktionspartnern wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. Zum einen wurde versucht, CPn0147 mittels Immunpräzipitation zusammen mit eventuellen Interaktionspartnern direkt aus infizierten Zellen zu isolieren. Zum anderen wurde versucht, humane Interaktionspartner mit dem rekombinanten Protein mittels Pulldown aus Zelllysaten zu isolieren. Die angewandten Methoden sind in Abschnitt 3.3.9 beschrieben.

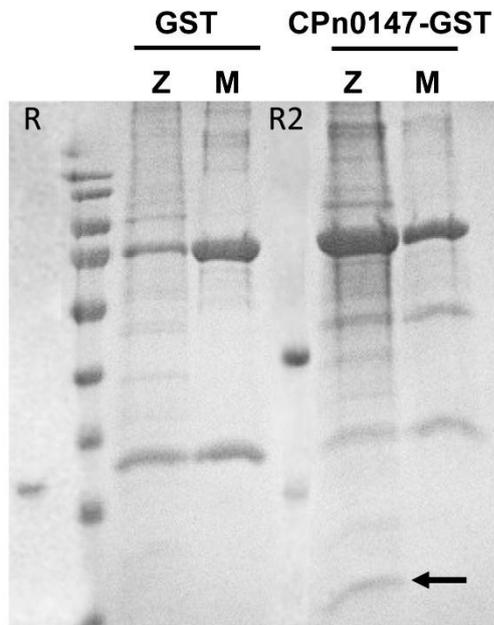
##### **4.3.4.3.1 Immunpräzipitation aus infizierten Zellen**

Zellen wurden für 48 bis 72 Stunden infiziert und mit den unter 3.3.9 aufgelisteten Puffern lysiert. Die Ansätze erfolgten einmal mit und einmal ohne *in vivo* Crosslinking. Das Antiserum gegen CPn0147 wurde entweder an das AminoLink-Resin (Pierce) oder Protein G Sepharose (Invitrogen) gekoppelt und mit den unterschiedlichen Lysaten inkubiert. Als Kontrolle dienten Lysate aus nicht-infizierten Zellen. Nicht gebundene Proteine wurden dann durch Waschen der Säulen entfernt und anschließend erfolgte die Elution der gebundenen Proteine. Im Falle der AminoLink-Kopplung wurde der gebundene Antikörper nicht eluiert. Die Elutionsproben wurden dann auf einem Coomassie-Gel und einem Western Blot analysiert. Bei keinem der getesteten Lysispuffer konnte jedoch eine distinkte Bande detektiert werden, die nicht in der Kontrolle auftauchte. Nicht einmal CPn0147 allein konnte in ausreichend detektierbarer Menge aus den infizierten Zellen isoliert werden.

##### **4.3.4.3.2 Pulldown-Experimente mit rekombinantem Protein**

Für die Pulldown-Experimente wurde GST-markiertes Volllängenprotein CPn0147 eingesetzt. Das GST-Fusionsprotein wurde an Glutathion-Agarose oder NHS-Sepharose gebunden und mit den verschiedenen Humanzell-Lysaten inkubiert. Als Kontrolle für unspezifische Bindung und GST-vermittelte Interaktion wurde rekombinantes GST-Protein eingesetzt. Mit dem NHS-Pulldown konnten wieder keine distinkten Banden detektiert werden. Mit dem GST-Pulldown, der mit Membran- und Zytosol-Lysaten durchgeführt wurde, konnte eine Bande auf einer Höhe von ca. 15 kDa detektiert, die nicht in der GST-Kontrolle zu sehen war (siehe Abbildung 73, Pfeil). Diese Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten

und massenspektrometrisch analysiert. Die Massenspektrometrie lieferte mehrere Treffer. Bei dem ersten in Frage kommenden Protein handelte es sich um Transthyretin. Transthyretin ist ein 15,7 kDa großes Protein, das hauptsächlich im Serum und in der Cerebrospinalflüssigkeit detektiert werden kann und im Plexus choroideus, einem



**Abbildung 73: Coomassie-Gel des GST-Pulldowns mit Zytosol- und Membran-Lysaten**

Aufgetragen wurde rekombinantes GST (R) und CPn0147-GST (R2), sowie die Elutionen der Zytosol- und Membran-Lysate (Z und M) nach dem Pulldown. Der Pfeil zeigt die isolierte Bande, die zur MS-Analyse geschickt wurde.

Adergeflecht im Ventrikel des Gehirns, hoch exprimiert ist. Es spielt eine Rolle im Transport von Schilddrüsenhormonen. Eine Verbindung zur chlamydialen Infektion ist nicht bekannt. Das zweite Kandidatenprotein ist ein Vorstufenprotein von Serum Albumin, dieses Protein scheidet aber schon anhand seiner Größe aus, da es sich um ein Protein von ca. 70 kDa handelt. Die folgenden Treffer waren die 40S und 60S ribosomalen Untereinheiten. Diese kommen aufgrund ihrer Größe in Frage, waren aber häufig als Treffer auch in anderen Massenspektrometrie-Untersuchungen zu finden und könnten daher

auch Kontaminationen sein. Es konnte daher auf diese Weise kein Protein eindeutig der isolierten Proteinbande zugeordnet werden.

#### **4.3.4.3 Tandem-Affinitäts-Reinigung**

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Subtil, Paris (Klonierung der Konstrukte) und Dr. Christoph Baumann, Wien, (Durchführung des Assays) wurden das GFP-CPn0147-Konstrukt ohne Transmembranbereich ( $\Delta$ AS 42-91) mittels Tandem-Affinitäts-Reinigung (tandem affinity purification, TAP) aus humanen HEK293 Zellen isoliert und zusammen mit möglichen Interaktionspartner mittels Massenspektrometrie identifiziert. Als mögliche Interaktionspartner konnten TRIP6 und Myosin identifiziert werden. Es wurden mehrere Myosin-Untereinheiten gefunden, allerdings kommt Myosin häufig als Kontamination vor, da es durch unspezifisch mit-aufgereinigte Aktin-Filamente gebunden wird. TRIP6 (Thyroid receptor-interacting protein 6) konnte in zwei von vier durchgeführten Analysen identifiziert werden und ist ein Protein, welches Signale von der Zelloberfläche an den Kern weiterleitet, um unter anderem Adhärenzkontakte über Aktin-Filamente benachbarter Zellen zu lockern

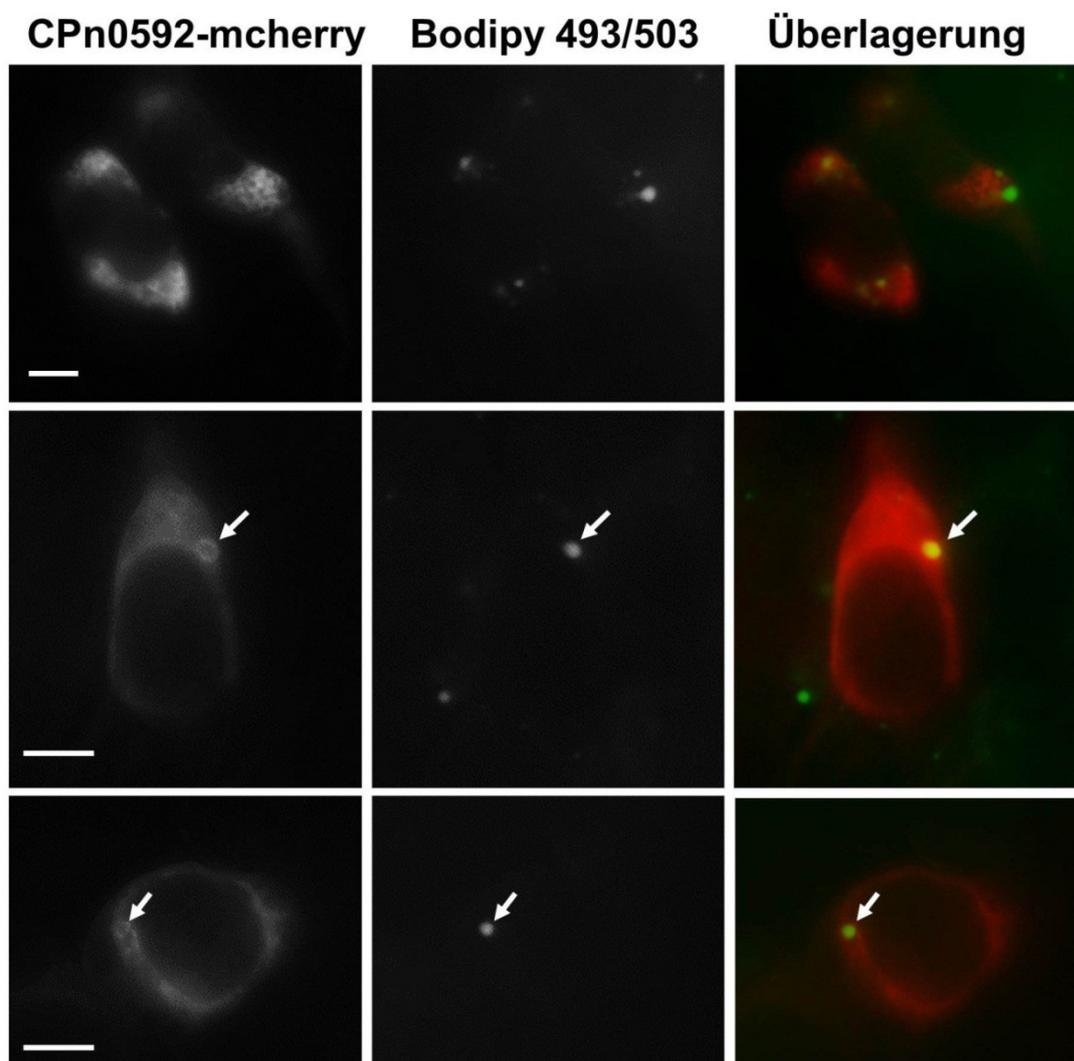
und Aktin-Zytoskelett-Umformungen zu unterstützen (Quelle: Uniprot). Eine Validierung dieser Kandidaten war aus zeitlichen Gründen leider nicht mehr möglich.

#### 4.3.4.4 Transfektionsanalysen mit CPn0147

Um einen Anhaltspunkt auf der Suche nach möglichen Interaktionspartnern zu erhalten, wurden Transfektionsversuche mit CPn0147 durchgeführt. Die Lokalisierung sollte Aufschluss über mögliche Interaktionspartner geben, da alle zuvor beschriebenen Methoden kein Ergebnis lieferten.

CPn0147 wurde als Volllängenprotein oder als Version ohne Transmembranbereich an GFP fusioniert in infizierte Zellen transfiziert. Außerdem wurde CPn0147 zusammen mit dem *C. pneumoniae*-Homolog von Lda3 aus *C. trachomatis* analysiert.

CPn0592 lokalisiert auf der Oberfläche von Lipidtröpfchen, wie es auch für das homologe

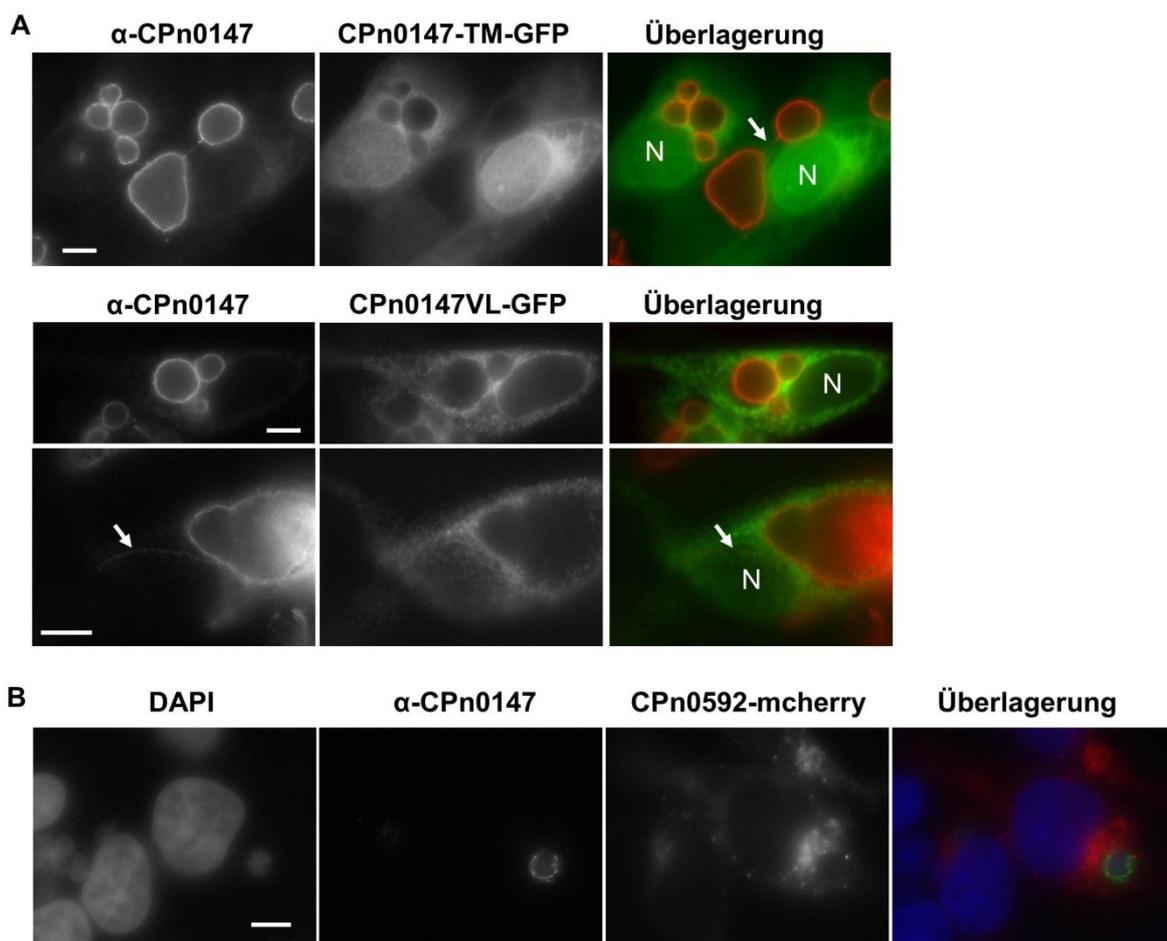


**Abbildung 74: Lokalisierung von CPn0592 bei Expression in Humanzellen**

HeLa 229-Zellen wurden mit 100mM Ölsäure für 24 Stunden inkubiert und anschließend mit dem Lda3-Homolog CPn0592 (fusioniert an mcherry, Plasmid # 1910) transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit Methanol fixiert und mit Bodipy 493/503 gefärbt und mikroskopiert. Der Längenmarker repräsentiert 5 µm. Die Pfeile markieren CPn0592-positive Lipidtröpfchen.

Protein aus *C. trachomatis* beschrieben ist (Abbildung 74). Zusätzlich zeigten sich jedoch auch weitere strukturierte teils retikuläre und teils runde, vesikelartige Signale im Zytoplasma an Stellen, die keine Lipidtröpfchen zeigten. Hierbei handelt es sich möglicherweise um ER-Strukturen.

Es konnte gezeigt werden, dass weder die Vollängenversion von CPn0147 noch das verkürzte Protein ohne Transmembranbereich bei transientser Expression als GFP-Fusion mit der Inklusionsmembran direkt kolokalisierte (Abbildung 75). Es zeigte sich jedoch eine Akkumulation des Signals in der Umgebung der Inklusionsmembran sowohl für die Version ohne Transmembranbereich als auch für das Vollängen-Konstrukt (Abbildung 75 A). Bei der Vollängen-Variante handelt es sich hierbei wahrscheinlich um das ER, das sich häufig um die Inklusion herum in Kernnähe befindet. Bei der Proteinvariante ohne Transmembranbereich könnte es sich jedoch um eine Interaktion handeln, das Protein



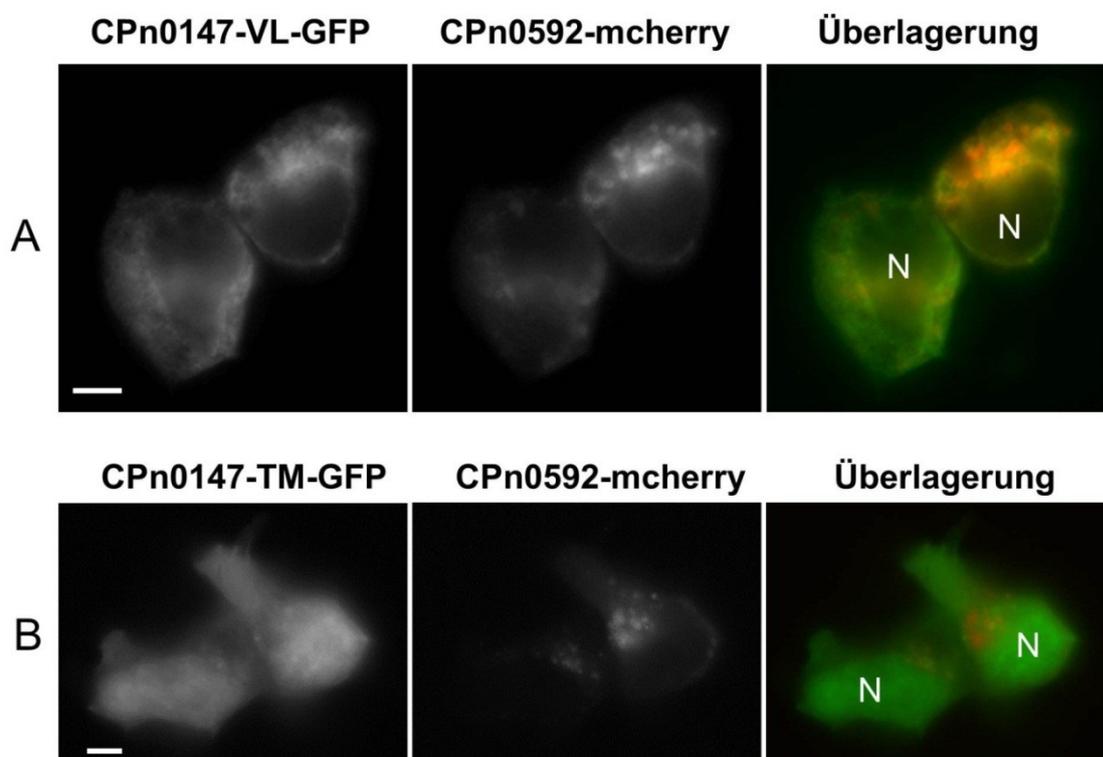
**Abbildung 75: Transfektion infizierter Zellen**

HeLa 229 Zellen wurden infiziert und 24 hpi mit CPn0147 (A) oder CPn0592 (B) transfiziert. 48 hpi wurden die Zellen mit Methanol fixiert und gefärbt. A) CPn0147 ohne Transmembranbereich (oben, Plasmid # 1989) oder als Volllänge (unten, #1988) an GFP fusioniert ist in der Überlagerung in grün dargestellt, CPn0147 wurde mit dem generierten Antiserum und mit einem Alexa-549-gekoppelten Sekundärantikörper (rot) detektiert. Fäden sind mit einem weißen Pfeil markiert, Kerne mit einem N. B) Die Zellen wurden mit DAPI gefärbt, CPn0147 wurde mit dem generierten Antiserum und mit einem Alexa-488-gekoppelten Sekundärantikörper (grün) detektiert, CPn0592 (#1910) ist in der Überlagerung rot dargestellt. Längensmarker 5  $\mu$ m.

scheint in größerer Menge auf der Inklusionsmembran zu lokalisieren. An den CPn0147-Fäden (markiert mit einem weißen Pfeil) war keine Verstärkung des CPn0147-GFP-Signals zu sehen. Ohne den Transmembranbereich zeigte das Protein außerdem eine deutliche Lokalisierung im Zellkern, während dieser bei Expression des Vollängenkonstrukts, welches eine ER-Kolokalisierung zeigt, den Zellkern komplett aussparte (wie bereits in 4.2.7.3 in nicht-infizierten Zellen beschrieben).

CPn0592 wurde als Vollängen-Konstrukt in einen mcherry-Expressionsvektor kloniert und zusammen mit den CPn0147-Varianten kotransfiziert oder in infizierte Zellen transfiziert.

CPn0592 zeigte bei der Transfektion in infizierten Zellen eine punktierte Lokalisierung und eine Akkumulierung in der Nähe des Zellkerns (Abbildung 75 B). Auch CPn0592 zeigte in infizierten Zellen keine Kolokalisierung mit dem CPn0147-Signal an der Inklusionsmembran. Vielmehr schien das transfizierte Protein die Inklusionen immer auszusparen. CPn0592 wurde auch zusammen mit den CPn0147-Varianten in nicht-infizierte Zellen transfiziert, da die ektopische Expression beider Proteine eventuell eine Interaktion erleichtern könnte. CPn0147 kann als Vollängenprotein in der Nähe der ringförmigen CPn0592-Signale detektiert werden (Abbildung 76). Unklar bleibt, ob es sich bei einigen dieser ringförmigen Signale um Lipidtröpfchen handelt. Es könnte sich auch um ER-Strukturen oder andere Strukturen handeln, da CPn0592 nicht ausschließlich auf Lipidtröpfchen lokalisiert. Ohne den



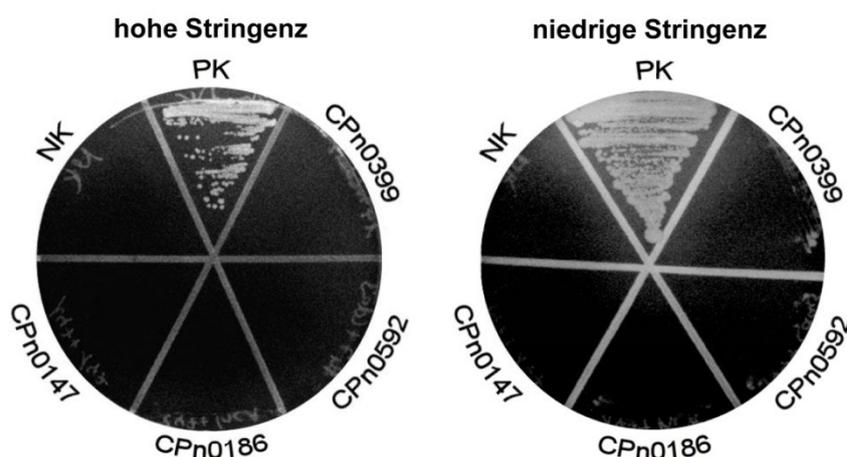
**Abbildung 76: Kotransfektion von CPn0147 und Cpn0592 in nicht-infizierten Zellen**

HeLa 229 Zellen wurden parallel mit CPn0147-Volllänge-GFP (A) oder CPn0147 ohne Transmembranbereich-GFP (B) und CPn0592-mcherry transfiziert und nach 12 Stunden fixiert. Längensmarker 5 µm

Transmembranbereich zeigte sich keine Kolo­kalisierung von CPn0147 und CPn0592. Eine mögliche Interaktion von CPn0147 und CPn0592 aufgrund einer Kolo­kalisierung konnte nicht gezeigt werden, kann aber zumindest für das Voll­längenkonstrukt von CPn0147 auch nicht ausgeschlossen werden.

#### 4.3.4.5 Gezielte Suche nach Interaktionspartner mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse

Da alle Ansätze zur Identifizierung potentieller Interaktionspartner keine Resultate gebracht hatten, wurden gezielt einige mögliche Interaktionspartner im Hefe-Zwei-Hybrid untersucht. Zur Überprüfung einer Interaktion wurde wieder die Variante von CPn0147 ohne Transmembranbereich im Vektor pEB2 verwendet. Die möglichen Interaktionspartner (CPn0147, IncA, CPn0592 (Lda3-Homolog) und CPn0399 (Lda1-Homolog)) wurden in den Vektor pGADT7 kloniert, wobei bei CPn0147 und IncA der Transmembranbereich deletiert wurde. CPn0399 verfügt über keine vorhergesagte Transmembranhelix, bei CPn0592 ist unklar, ob sich im N-terminalen Bereich eine Transmembranhelix befindet (siehe Einleitung). Beide Proteine wurden daher in Voll­länge kloniert. Die Konstrukte wurden zusammen in den Hefestamm AH109 transformiert. Die Kontrollen des Matchmaker-Kits von Clontech wurden ebenfalls in AH109 transformiert. Keines der untersuchten Proteine zeigte eine Autoaktivierung der Hefe-Zwei-Hybrid-Reporterproteine (Daten nicht gezeigt). Keiner der untersuchten Kandidaten zeigte eine Interaktion mit CPn0147 im Hefe-Zwei-Hybrid (Abbildung 77). Lediglich die Positivkontrolle konnte auf Medium mit hoher oder niedriger Stringenz wachsen. Zumindes­te im Hefe-Zwei-Hybrid-Assay interagiert CPn0147 weder mit sich selbst, noch mit IncA (CPn0186) oder mit den homologen Proteinen zu Lda3 (CPn0592)



**Abbildung 77: Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse ausgesuchter Kandidaten mit CPn0147**

Die Transformanten wurden auf Medium mit hoher (links) und niedriger (rechts) Stringenz ausgestrichen. Gezeigt ist jeweils nur ein Klon. PK = Positivkontrolle (murines p53 in pGBKT7 zusammen mit large T-Antigen in pGADT7), NK=Negativkontrolle (Laminin in pGBKT7 zusammen mit large T-Antigen in pGADT7).

oder Lda1 (Cpn0399). Eine Interaktion von CPn0147 und IncA wurde auch mit einer Far Western Analyse überprüft und auch hier zeigte sich keine beobachtbare Interaktion (Daten nicht gezeigt). Es

konnte also auch mittels Hefe-Zwei-Hybrid kein Interaktionspartner von CPn0147 identifiziert werden.

### 4.3.5 Weiterführende Analysen zur Interaktion von CPn0147 mit Lipidtröpfchen

#### 4.3.5.1 Durch Ölsäure-Stimulation bilden mehr Inklusionen die CPn0147-Fäden aus

Die Immunfluoreszenz-Analysen von Ölsäure-behandelten, infizierten Zellen erweckten den Anschein, dass mehr Inklusionen mit vielen Fäden zu sehen waren, als in nicht behandelten Zellen. Um dies zu überprüfen, wurde die Anzahl der Inklusionen mit mehr als zwei Fäden in nicht-behandelten und Ölsäure-behandelten Zellen quantifiziert. Zusätzlich wurde auch hier untersucht, ob die MOI einen Einfluss hat (Abbildung 78). Die Daten zeigen, dass die MOI scheinbar keinen Einfluss auf die Anzahl der gebildeten CPn0147-Fäden hat. Allerdings ist deutlich eine Zunahme der Fadenanzahl nach Behandlung mit Ölsäure zu sehen. Schon 48 hpi zeigt sich eine Verdopplung der Anzahl der Inklusionen mit mehr als zwei Fäden von 5 % auf 10 %. Am stärksten ist dieser Effekt in der späten Infektionsphase. Zellen, die für 72 Stunden infiziert wurden und während dieser Zeit mit Ölsäure behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu unbehandelten Zellen bei einer MOI von 0,1 eine Zunahme der Inklusionen mit mehr als zwei Fäden um mehr als 250 %. Bei einer MOI von 1 fiel der Unterschied etwas geringer aus, lag aber immer noch bei über 180 %. Bei den beiden anderen untersuchten

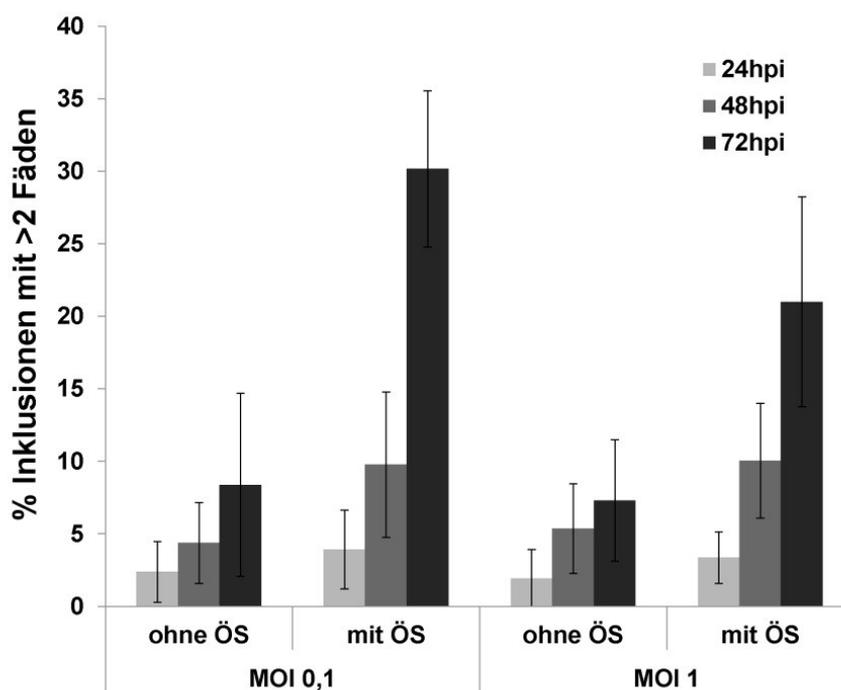


Abbildung 78: Quantifizierung der Fadenanzahl nach Ölsäurebehandlung

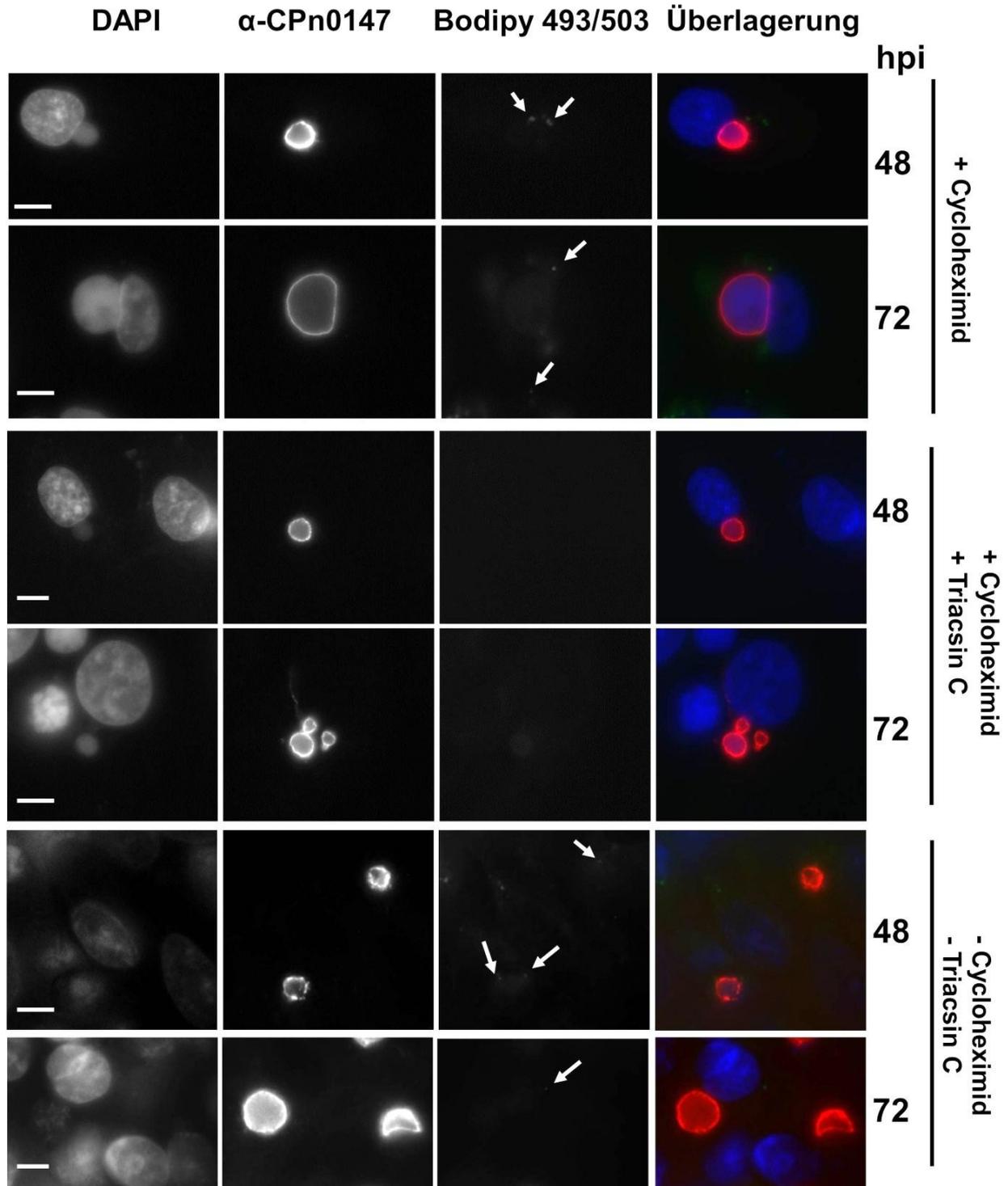
HeLa 229 Zellen wurden mit einer MOI von 0,1 oder 1 infiziert und nach 24, 48 und 72 Stunden mit Methanol fixiert und die Anzahl der Inklusionen insgesamt gezählt und mit der Anzahl der Inklusionen, die mehr als zwei sichtbare Fäden aufwiesen, verglichen. Von jedem Ansatz wurden mindestens drei Mal 100 Inklusionen auf drei unterschiedlichen Deckgläschen pro Zeitpunkt und MOI gezählt (n=3). Dargestellt ist die Prozentzahl der Inklusionen, die mehr als zwei sichtbare CPn0147-Fäden aufwiesen in Abhängigkeit von der MOI und dem Zeitpunkt der Infektion. ÖS=Ölsäure

Zeitpunkten zeigte sich eine leichtere Erhöhung der Inklusionen mit mehreren Fäden nach Ölsäure-Stimulation. Bei den Proben der behandelten Zellen nach 24 Stunden zeigte sich eine Zunahme von 65-75 %, bei den 48 Stunden-Werten verdoppelte sich die Anzahl der Inklusionen mit mehr als zwei Fäden bei einer MOI von 0,1, bei einer MOI von 1 zeigte sich immerhin noch eine Zunahme um 87 %. Zusammenfassend bedeutet dies, dass durch eine Stimulation der Lipidtröpfchen-Formation mit Ölsäure die Anzahl von CPn0147-positiven Fäden vor allem spät in der Infektion signifikant zunimmt.

#### **4.3.5.2 Eine Inhibierung der Lipidtröpfchen-reduziert die Anzahl der CPn0147-Fäden und die Größe der Inklusionen**

Der verstärkende Effekt der Ölsäure-Behandlung auf die Bildung von CPn0147-Fäden legte die Überlegung nahe, dass in Zellen ohne Lipidtröpfchen evtl. keine Fäden an den Inklusionen mehr zu beobachten wären oder aber, dass durch das Fehlen der für die chlamydiale Entwicklung wichtigen Lipidtröpfchen massiv Fäden gebildet würden. Um dies zu überprüfen, wurden infizierte Zellen mit einem Inhibitor der Lipidsynthese behandelt. Dieser Inhibitor, Triacsin C, stammt aus *Streptomyces aureofaciens* und inhibiert die Coenzym-A-Synthase. Auf diesem Weg wird die *de novo* Synthese von Triacylglyceriden, Diacylglyceriden, Cholesterin und Phospholipiden inhibiert, aus denen die Lipidtröpfchen bestehen (Igal, Wang et al. 1997). Mit diesem Inhibitor konnte bereits gezeigt werden, dass Lipidtröpfchen für die chlamydiale Entwicklung benötigt werden, da die Blockierung der Lipidsynthese zu einer Reduktion der chlamydialen Proliferation führte (Kumar, Cocchiario et al. 2006). Zusätzlich wurde untersucht, ob der Verzicht auf Cycloheximid im Medium eine Veränderung in der Fadenanzahl bewirkt, da den Chlamydien ohne die unterstützende Wirkung des Cycloheximids weniger Nährstoffe zur Verfügung stehen.

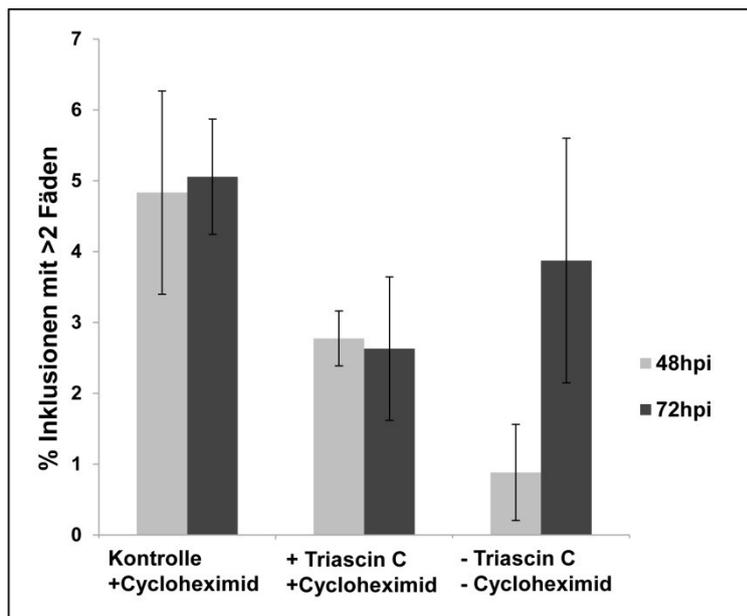
Da in den vorherigen Analysen in der frühen Infektion nur wenige Fäden beobachtet wurden, wurde auf die Analyse der 24 Stunden-Werte verzichtet. In den Kontrollzellen mit Cycloheximid konnten nach 48 stündiger Infektion und, wenn auch in geringerem Ausmaß, nach 72 stündiger Infektion vereinzelte Lipidtröpfchen detektiert werden (Abbildung 79). Dasselbe galt für Zellen, die in Cycloheximid-freiem Medium kultiviert wurden. Zellen, die während der Infektion (ab dem Mediumwechsel eine Stunde nach Zugabe der Bakterien) mit dem Inhibitor Triacsin C behandelt wurden, wiesen im Gegensatz zu den Zellen mit und ohne Cycloheximid im Zellkulturmedium keine sichtbaren Lipidtröpfchen auf (Abbildung 79). Es handelt sich bei Triacsin C somit um einen potenten Inhibitor.



**Abbildung 79: Immunfluoreszenz-Analyse der unterschiedlich behandelten infizierten Zellen**

HeLa229 Zellen wurden mit einer MOI von 2 infiziert und 1 hpi mit Chlamydienkulturmedium mit Cycloheximid, mit Cycloheximid und  $5\mu\text{m}$  Triacsin C und ohne Cycloheximid inkubiert (rechts angegeben) und zu den rechts angegebenen Zeitpunkten mit Methanol fixiert und mit Bodipy 493/503, DAPI und anti-CPn0147 gefärbt. Der Längenmarker repräsentiert  $5\mu\text{m}$ . Die Zellen wurden nicht mit Ölsäure behandelt. Lipidtröpfchen sind mit Pfeilen markiert.

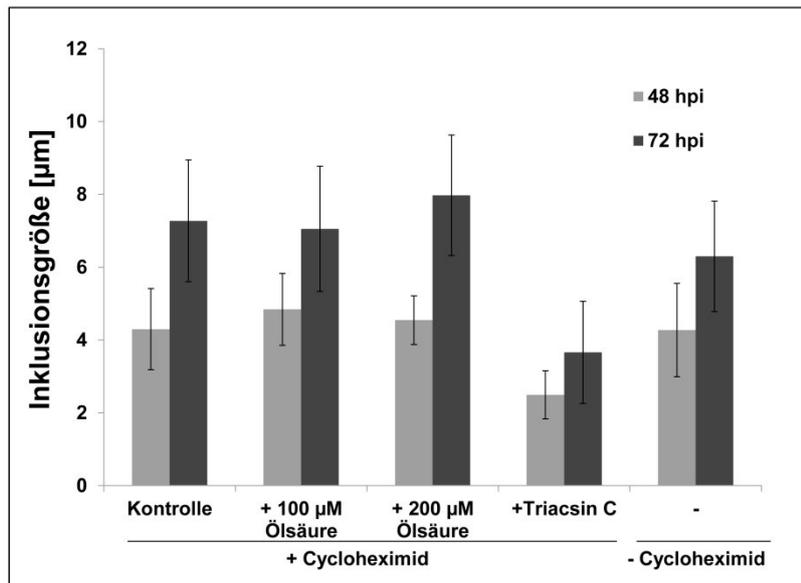
In den Kontrollzellen mit Cycloheximid waren nach 48 bzw. 72 Stunden ca. 5 % der Inklusionen mit mehr als zwei Fäden assoziiert (Abbildung 80). Nach Behandlung der infizierten Zellen mit Triacsin C waren mit durchschnittlich knapp 3 % sowohl nach 48 Std als auch nach 72 Std etwas weniger Inklusionen mit mehr als zwei Fäden zu beobachten. Bei Verzicht auf Cycloheximid im Medium sind in der späten Infektion nur geringfügig weniger Fäden zu beobachten, als in den Kontrollzellen. Ein deutlicher Effekt ist aber 48 hpi zu beobachten, hier wurden mit nur ca. 1 % fünfmal weniger Faden-assoziierte Inklusionen detektiert werden, als in den Kontrollzellen. Da in der Mikroskopie zu diesem Zeitpunkt



**Abbildung 80: Quantifizierung der Fadenanzahl pro Inklusion**

Dargestellt ist die Prozentzahl der Inklusionen, die in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Infektion mehr als zwei sichtbare CPn0147-Fäden aufwiesen. Kontrolle = normale Infektion mit Cycloheximid. Triacsin C wurde in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  1 hpi eingesetzt. Das Experiment wurde in Doppelbestimmung einmal mit einer MOI von 1 durchgeführt.

Lipidtröpfchen detektiert werden konnten, ist die verminderte Anzahl an Fäden wahrscheinlich nicht mit einer verminderten Lipidtröpfchen-Anzahl in Zusammenhang zu bringen (Abbildung 79). Interessanterweise waren die Inklusionen in den Triacsin C-behandelten Zellen kleiner als die Inklusionen der Kontrollzellen. Die Größe der Inklusionen wurde mikroskopisch bestimmt (siehe 3.1.2.12). Eine Anreicherung der Zellen mit Lipidtröpfchen durch die Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Ölsäure hatte keinen Effekt auf die Größe der Inklusion, bei Zugabe von 200  $\mu\text{M}$  Ölsäure zeigten die Inklusionen nach 72 Stunden eine leichte Vergrößerung (Abbildung 81). Den stärksten Effekt zeigte die Behandlung der infizierten Zellen mit Triacsin C, hier waren die Inklusionen sowohl 48 hpi als auch 72 hpi ca. 40 % kleiner als in den Kontrollzellen. Der Verzicht auf Cycloheximid führte zu einer Verkleinerung der Inklusionen in den Proben nach 72 stündiger Infektion von 25 % gegenüber den Kontrollzellen.



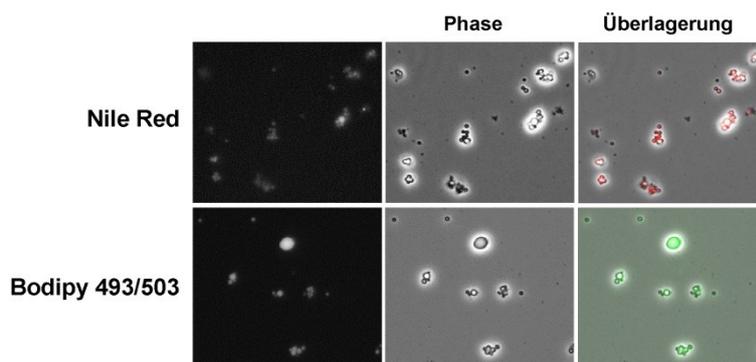
**Abbildung 81: Bestimmung der Inklusionsgröße**

Dargestellt ist die Inklusionsgröße in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Infektion. Kontrolle = normale Infektion mit Cycloheximid. Triacsin C wurde in einer Konzentration von 5 µM eingesetzt. Gezählt wurden mindestens 25 Inklusionen (bei Triacsin) bis maximal 160 Inklusionen (Kontrolle). Es wurde jeweils der Median gebildet.

Zur weiteren Analyse des scheinbar leicht positiven Effektes der Ölsäure-Behandlung auf die chlamydiale Entwicklung wurde überprüft, ob nach einer Lipidtröpfchen-Stimulation die Infektiosität der zweiten Generation erhöht war. Hierzu wurden Zellen mit oder ohne Ölsäure infiziert und nach 48 bzw. 96 Stunden geerntet und für einen neuen Infektionszyklus verwendet. Es zeigte sich aber kein Unterschied in der Infektiosität (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass die Anreicherung mit Lipiden allein nicht ausreicht, um eine erhöhte Replikation zu erreichen.

#### 4.3.5.3 CPn0147 kann in der Lipidtröpfchen-Fraktion von infizierten Zellen nachgewiesen werden

Das Ergebnis aus der Immunfluoreszenz, dass CPn0147 auf Lipidtröpfchen detektiert werden konnte, sollte auch biochemisch überprüft werden. Hierzu wurde eine Fraktionierung von Lipidtröpfchen wie unter 3.3.12.2 nach einem modifizierten Protokoll von Cocchiario mit infizierten und nicht-infizierten Zellen durchgeführt (Cocchiario, Kumar et al. 2008). Die Lipidtröpfchen-Fractionen sowie das Pellet der infizierten und nicht-infizierten Zellen wurden anschließend in einer Western Blot-Analyse untersucht. Ein Teil dieser Proben wurde mit Bodipy 493/503 oder Nile Red (ebenfalls ein Fluoreszenz-Farbstoff für Lipidtröpfchen)



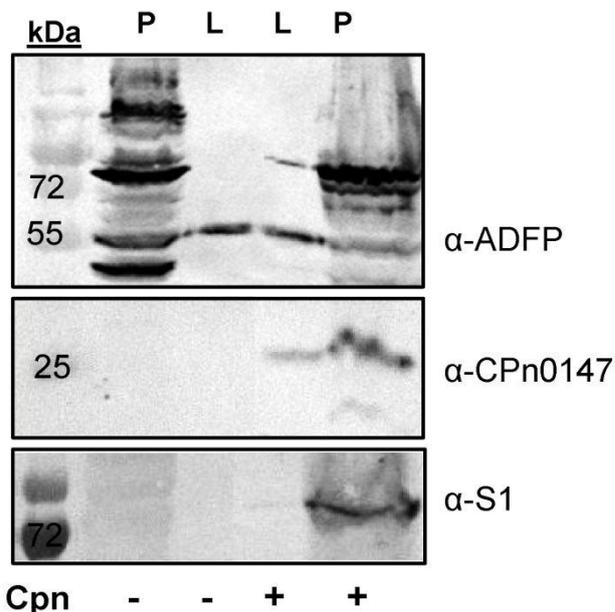
**Abbildung 82: Mikroskopie der Lipidtröpfchen-Fractionen aus infizierten Zellen**

Gezeigt sind Aufnahmen der Lipidtröpfchen-Fraktion aus infizierten Zellen, die mit Nile Red (rot, obere Bildreihe) oder Bodipy 493/503 (grün, untere Reihe) gefärbt wurden.

gefärbt, um Lipidtröpfchen in den Fraktionen mikroskopisch nachzuweisen (Abbildung 82). Es zeigten sich viele Nile Red oder Bodipy-positive runde Partikel, bei denen es sich demnach um Lipidtröpfchen handelt.

Die Lipidtröpfchen wurden im Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen das humane ADFP-Protein detektiert. ADFP ist auch als Adipophilin, Perilipin-2 oder ADRP (Adipose differentiation-related protein) bekannt und gehört zu den sogenannten PAT-Proteinen, die auf der Oberfläche von Lipidtröpfchen lokalisieren. Freies, nicht mit Lipidtröpfchen assoziiertes ADFP wird relativ schnell abgebaut.

ADFP ist sowohl in der Pellet-Fraktion als auch in der Lipidtröpfchen-Fraktion zu detektieren (Abbildung 83). In der Pellet-Fraktion, die generell einen viel höheren Proteingehalt als die Lipidtröpfchen-Fraktion hat, zeigen sich sehr viele Banden mit dem ADFP-Antikörper. ADFP hat ein Molekulargewicht von 50 kDa. Bei den niedermolekularen Banden könnte es sich



**Abbildung 83: Western Blot-Analyse der Lipidtröpfchen-Fraktionierung**

geblottet wurden die Pellet (P) und die Lipidtröpfchen-Fraktion (L) aus infizierten (+) und nicht-infizierten (-) Zellen. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen humanes ADFP als Lipidtröpfchen-Marker bzw. chlamydiales S1 und CPn0147.

der Inklusionsmembran gebunden ist. Dieser Befund bestätigt die Beobachtungen der Immunfluoreszenz, das CPn0147 auf den Lipidtröpfchen lokalisiert.

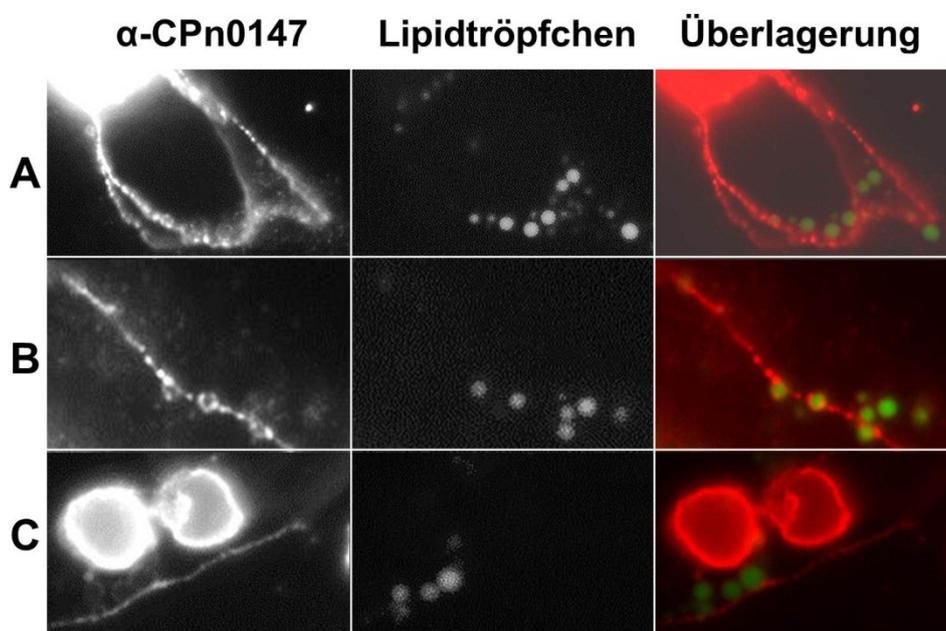
#### 4.3.5.4 Die CPn0147-Fäden scheinen eine Rolle in der Rekrutierung der Lipidtröpfchen zur Inklusion zu spielen

Der in den vorherigen Experimenten beobachtete Zusammenhang zwischen einer Lipidtröpfchen-Anreicherung und einer vermehrten Fadenbildung der Inklusionen legte die

also um Degradationsprodukte von ADFP handeln. Die Natur der höhermolekularen Banden blieb ungeklärt. Eine sehr schwache Bande des S1-Proteins konnte in der Lipidtröpfchen-Fraktion detektiert werden, was auf eine leichte bakterielle Kontamination in der Lipidfraktion hinweist. CPn0147 konnte in der Lipidtröpfchen-Fraktion und der Pellet-Fraktion infizierter Zellen detektiert werden, wobei die Menge in der Lipidtröpfchenfraktion

mit 20 % der Intensität im Vergleich zur Pelletfraktion erwartungsgemäß geringer war, da ja auch nur ein Teil des Proteins mit Lipidtröpfchen assoziiert vorliegt und der Großteil in

Überlegung nahe, dass die CPn0147-Fäden eine Rolle in der Rekrutierung der Lipidtröpfchen zur Inklusion spielen könnten. Infizierte und mit Ölsäure behandelte Zellen wurden daher einer genaueren Analyse in der Immunfluoreszenz unterzogen, unter anderem mittels Spinning Disc-Mikroskopie. Es konnten häufig CPn0147-positive Lipidtröpfchen in der Nähe der Inklusion detektiert werden, die anscheinend frei vorlagen und nicht über einen Faden mit der Inklusion verbunden waren. Da die Dynamik der Fäden nur mittels Lebend-Zell-Mikroskopie zu klären wäre, dies aber technisch noch nicht möglich war, ist unklar, ob sich evtl. zuvor ein Faden an dieser Stelle befunden hatte. Da CPn0147 nicht in der löslichen Fraktion in infizierten Zellen nachgewiesen werden konnte und es sich um ein integrales Membranprotein handelt, ist eine zytosolische Lokalisierung dieses Proteins eher



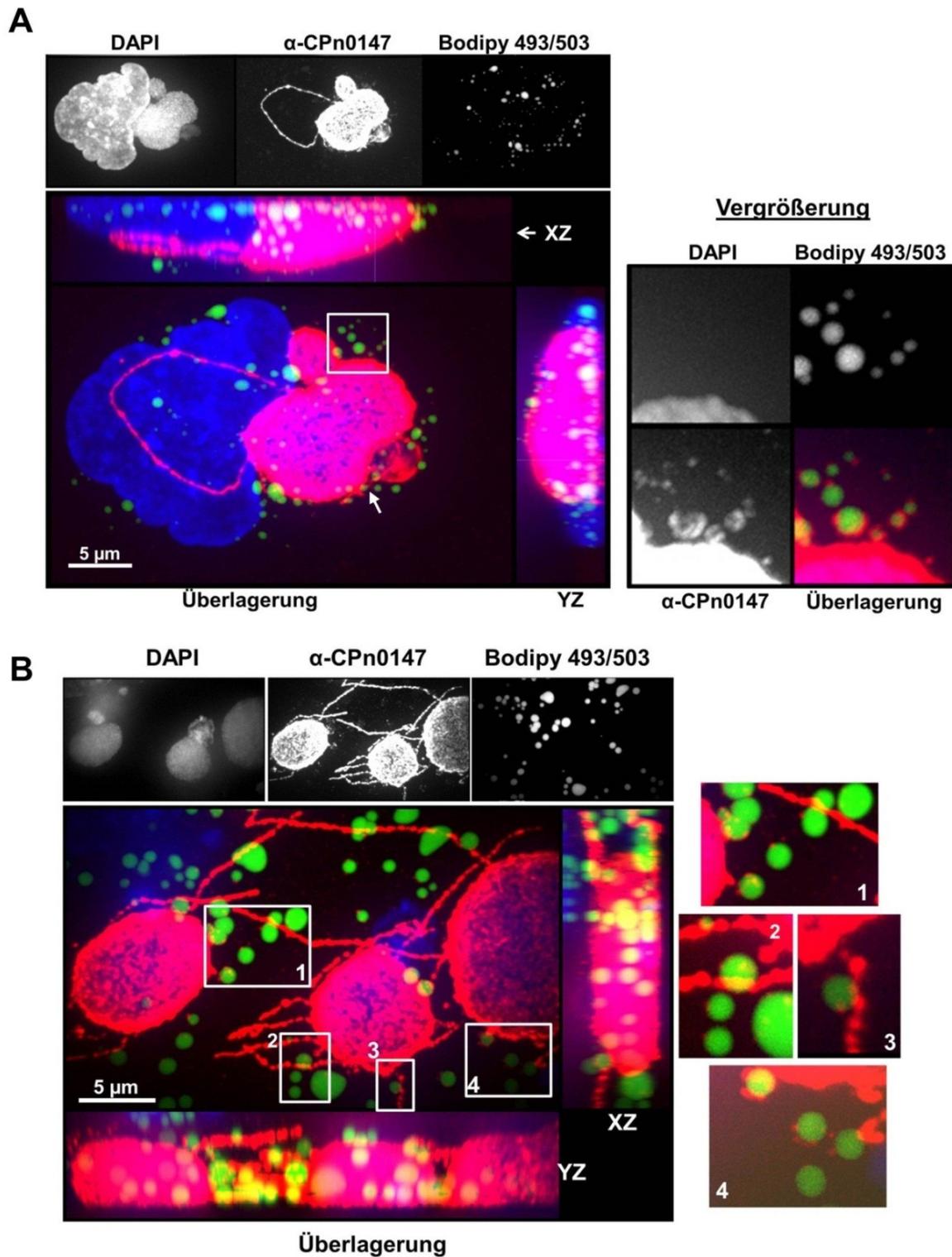
**Abbildung 84: Kolokalisierung von CPn0147-positiven Lipidtröpfchen und CPn0147-Fäden**

Ölsäure-behandelte infizierte HeLa-Zellen wurden 48 hpi mit Methanol fixiert und mit CPn0147-Antiserum (rot) und Bodipy 493/503 (grün) gefärbt.

unwahrscheinlich. Des Weiteren konnten auch häufig Fäden beobachtet werden, die Lipidtröpfchen assoziiert zu sein schienen oder sogar mit CPn0147-positiven Lipidtröpfchen kolokalisierten (siehe Abbildung 84). In Abbildung 84 A sind die CPn0147-positiven Lipidtröpfchen relativ weit von der Inklusion entfernt, haben dafür aber Kontakt zu einem CPn0147-positiven Faden. CPn0147-positive Lipidtröpfchen, die nicht in unmittelbarer Umgebung der Inklusion zu finden waren, lagen eigentlich immer in der Nähe von Fäden oder möglichen Fadenüberresten vor (Abbildung 84 B). Die Lipidtröpfchen in Bild C scheinen Kontakt zu dem sichtbaren Faden zu haben und nicht direkt mit der Inklusionsmembran verbunden zu sein, obwohl sich diese in der Nähe befindet.

Für eine genauere Analyse wurden diese infizierten Zellen in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Katja Mölleken am Spinning Disc Konfokal-Mikroskop (Zeiss Cell Observer) untersucht. Hier konnte beobachtet werden, dass häufig Lipidtröpfchen, die scheinbar keine Verbindung zu einem CPn0147-Faden zeigten, in der Nähe von CPn0147-Signalen, die Faden-Überreste repräsentieren könnten, lokalisierten. Oder es war in der Nähe ein Faden zu finden, der evtl. zuvor eine Verbindung zu diesen Lipidtröpfchen hatte. In Abbildung 85 A ist eine infizierte und Ölsäure-behandelte Zelle zu sehen, die 72 hpi fixiert und gefärbt wurde. Die Zelle zeigt einige Lipidtröpfchen und einen langen Faden, der von der Inklusion an der Oberfläche des Zellkerns entlang in einem Bogen wieder zurück zur Inklusion reicht. Die Vergrößerung zeigt einige Lipidtröpfchen, die sich in der Nähe der Inklusion befinden und teilweise von einem ringförmigen CPn0147-Signal umgeben sind. Einige Lipidtröpfchen zeigen nur an einer Seite ein CPn0147-Signal. An der großen Inklusion liegt noch eine kleinere Inklusion, zwischen beiden befindet sich ein Faden, an dem mehrere Lipidtröpfchen zu sehen sind (Pfeil).

Abbildung 85 B zeigt mehrere Inklusionen mit zahlreichen Fäden. Es handelt sich hier um mit Ölsäure stimulierte Zellen, die nach 48 Stunden fixiert wurden. Es sind zahlreiche und auch recht große Lipidtröpfchen zu sehen. In der Ausschnittsvergrößerung 1 ist zu sehen, dass inklusionsnahe Lipidtröpfchen mit einem CPn0147-Signal umgeben sind und sich an der Inklusion eine Art Ausstülpung befindet, die eventuell ein beginnender Faden oder ein Rest von einem Faden sein könnte. Des Weiteren sind Lipidtröpfchen in der Nähe von Fäden zu sehen, die ein kaum zu detektierendes CPn0147-Signal zeigen (Vergrößerungen 2, 3 und 4), hier könnte es sich um ein frühes Stadium der Rekrutierung von Lipidtröpfchen mittels CPn0147 handeln.



**Abbildung 85: Konfokale Mikroskopie von infizierten Zellen nach Ölsäure-Stimulation**

Gezeigt sind infizierte und Ölsäure-behandelte Zellen, die nach 72 (A) bzw. 48 (B) Stunden mit Methanol fixiert wurden. Die Zellen wurden mit gereinigtem Antiserum gegen CPn0147 (rot), Bodipy 493/ 503 (grün) und DAPI (blau) gefärbt. Die weißen Rechtecke zeigen die Bereiche, die in den Vergrößerungen (rechts) gezeigt sind. Die Bilder zeigen jeweils die MIP-Darstellung (maximum intensity projection), also die Gesamtfluoreszenz aller Ebenen.

## 5 Diskussion

Das in dieser Arbeit durchgeführte Screening zur Identifizierung neuer Effektorproteine von *Chlamydia pneumoniae* lieferte zahlreiche Kandidaten. Sie lösten alle einen Wachstumsdefekt in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* aus und kommen somit potentiell als Effektoren in Frage, die konservierte Strukturen in der Wirtszelle modulieren. Aufgrund der Fülle der Kandidaten wurden einige Repräsentanten ausgewählt und genauer analysiert. Ein Kandidat, CPn0147, zeigte die klassische Lokalisierung eines Inc-Proteins und lokalisierte zusätzlich auf Lipidtröpfchen und in zytoplasmatischen Fäden, über deren Funktion bisher nur wenig bekannt war.

### 5.1. Der Hefescreen und die potentiellen Kandidaten

Von den ursprünglich isolierten 1136 Hefeklonen zeigten nach mehrmaliger Verifikation des Phänotyps nur 176 stabil einen Phänotyp in Hefe. 960 Klone wurden aussortiert. Es ist dabei gut möglich, dass die induzierten Phänotypen zu schwach ausgeprägt waren und somit auch potentielle Kandidaten aussortiert wurden. Des Weiteren war trotz vorheriger Bestimmung der Transformationseffizienz die tatsächliche Transformationseffizienz fast doppelt so hoch wie erwartet, so dass statt der gewünschten 200 000 Klone ca. 350 000 Klone analysiert wurden. Dies bedeutete, dass die Screening-Platten dichter bewachsen waren, wodurch die Kolonien weniger Platz hatten und evtl. einige potentielle Kandidaten nicht isoliert werden konnten, da sie nicht zu einer ausreichend großen Kolonie heranwachsen konnten. Die Suche nach Kolonien, die eine geringere Größe aufwiesen, gestaltete sich auch deshalb schwierig, da die Zellmenge, die bei der Replika-Plattierung übertragen wurde, stark variierte, so dass letztendlich nur nach Kolonien gesucht wurde, die eine Phloxin B-Färbung aufwiesen. Auf diese Weise konnten Kandidaten, die lediglich das Wachstum verzögerten und keinen Zelltod oder anderweitigen Verlust der Plasmamembranintegrität auslösten, in diesem Screening nicht identifiziert werden.

Trotz der hohen genomischen Abdeckung (33 fach), die sich auch daran festmachen lässt, dass viele Kandidaten mehr als einmal isoliert wurden, wurde zum Beispiel der bereits beschriebene Effektor CPn0572 nur ein einziges Mal in dem durchgeführten Screening isoliert. Dieses Protein verursacht einen sehr starken Wachstumsdefekt in Hefe, es ist also möglich, dass Kandidaten, die sehr letal sind, in diesem Screening gar nicht isoliert wurden oder nur, wenn das entsprechende genomische Fragment einen schwächeren Phänotyp induzierte. Einige weitere bereits beschriebene Effektoren, wie zum Beispiel CPAF, wurden gar nicht identifiziert. CPAF wurde allerdings auch nie in Hefe analysiert, es ist daher unklar, ob das Protein in Hefe einen Wachstumsdefekt auslöst. Ein weiterer Effektor, CopN, wurde hingegen bereits in Hefe analysiert und zeigte einen sehr starken Wachstumsdefekt (Huang,

Lesser et al. 2008; Dehoux, Flores et al. 2011). Dies könnte wiederum der Grund sein, warum CopN nicht in diesem Screening identifiziert wurde.

Aufgrund des großen Arbeitsaufwands und der Kostenintensität konnten nicht gegen alle vielversprechenden Kandidaten Antiseren generiert werden, um ihre Rolle in der Infektion zu studieren. Vor allem die als hypothetisch eingestuften Proteine, über deren mögliche Funktion nichts bekannt ist, sind interessante Kandidaten. Für einige dieser Proteine konnte ein starker Phänotyp (Wachstumsdefekt in Hefe) gezeigt werden, außerdem eine positive Sekretionsvorhersage durch die Arbeitsgruppen Subtil und Rattei. Diese Kandidaten kommen durchaus als potentielle Effektoren in Frage und eine weitere Analyse wäre sinnvoll. Hierzu zählen die in Tabelle 16 aufgelisteten Kandidaten. Hervorzuheben ist hier CPn0648, da das *C. trachomatis*-Homolog Cap1 bereits als Protein beschrieben ist, das in der Inklusionsmembran lokalisiert und von CD8+T-Zellen erkannt wird (Fling, Sutherland et al. 2001; Balsara, Roan et al. 2006). Eine Funktion wurde jedoch noch nicht ermittelt. Frau Dr. Kerres konnte zeigen, dass das CPn0648-Protein in Hefe als GFP-Fusion eine Verteilung wie GFP allein aufweist, das die Expression aber teilweise zu veränderten aussehenden Mitochondrien führte. In Hinblick auf die Rolle von CPn0648 /Cap1 als potentieller Effektor ist diese Beobachtung durchaus interessant und sollte weiter verfolgt werden. Insgesamt brachten die Lokalisierungsstudien in Hefe wenig Aufschluss über die Funktion der potentiellen Effektorproteine. Es wird beschrieben, dass Proteine mit großen Transmembranbereichen, wie sie zum Beispiel für Inc-Proteine charakteristisch sind, bei transienter Expression häufig auf dem Syntheseweg falsch gefaltet werden und in der ER-Membran zurückgehalten werden (Sisko, Spaeth et al. 2006; Luo, Liu et al. 2007) und somit auch in Hefe eine Kolokalisierung mit dem ER zeigen könnten. Etwa die Hälfte aller als Inc-Protein vorhergesagten Kandidaten zeigte eine Lokalisierung im ER der Hefezellen. Es bleibt also aufzuklären, bei welchen der vorhergesagten Inc-Proteine es sich tatsächlich um Inc-Proteine handelt und ob die ER-Lokalisierung eine geeignete Methode zur Vorauswahl darstellt.

Punktierte Lokalisierungsmuster können verschiedene Organellen, wie z.B. den Golgi oder Vesikel repräsentieren oder auch für eine Aggregatbildung sprechen. Somit konnte für die 14 Kandidaten, die eine punktierte Lokalisierung zeigten, nicht genauer eingegrenzt werden, wo sie lokalisierten. Das Aktin-Zytoskelett der Hefe zeichnet sich durch kortikale Aktinpunkte und lange Aktinkabel aus, die von der Mutter- in die Tochterzelle reichen. Für keinen der Kandidaten konnte eine Aktin-Kolokalisierung beobachtet werden.

CPn0850 lokalisierte punktiert an der Zellperipherie. Diese Lokalisierung war zudem bei zwei weiteren, als hypothetisch eingestuften Proteinen zu beobachten (CPn0266 und CPn1054). Bei CPn0850 handelt es sich jedoch wahrscheinlich (laut KEGG-Analyse) um ein MreB-Protein. MreB gilt als evolutionäre Vorstufe von Aktin (Jockusch and Graumann 2011). Somit

könnten auch die anderen beiden Proteine eine Aktin-ähnliche Funktion erfüllen und deshalb eine ähnliche Lokalisierung zeigen.

Von einigen Kandidaten waren die Homologe in *C. trachomatis* in Hefe analysiert und teilweise auch als wahrscheinlich sekretiert gefunden (Sisko, Spaeth et al. 2006). Hierzu gehören die in Tabelle 15 aufgeführten Kandidaten. Die Sekretionsvorhersage beruht auf der Generierung von Antiseren gegen aufgereinigte Inklusionsmembranen (IM) aus infizierten Humanzellen. Zeigt ein rekombinantes Protein Immunreaktivität mit diesen Antiseren, so wird es sehr wahrscheinlich sekretiert, da die Antiseren nicht gegen intrachlamydiale bzw. bakterienassoziierte Proteine gerichtet sind. Von den durch die Arbeitsgruppe um Valdivia untersuchten *C. trachomatis*-homologen Proteinen zeigten nur CT365, CT456 (Tarp), CT529 und CT578 einen Wachstumsdefekt in Hefe, während die in dem in dieser Arbeit durchgeführten Screening gefundenen *C. pneumoniae*-homologen Proteine alle eine Phloxin B-Einstufung von mindestens 2 aufwiesen. Für CT456 (Tarp), CT529, CT632 und CT768 konnte außerdem eine wahrscheinliche Sekretion gezeigt werden (Sisko, Spaeth et al. 2006). Interessanterweise konnte dies nicht für CT578 gezeigt werden, obwohl für das homologe Protein CPn0809 bereits eine Sekretion publiziert war (Lugert, Kuhns et al. 2004) und auch für CT578 eine Lokalisierung auf oder in der Inklusionsmembran beobachtet

CPn OLR	CT- Homolog	Homologie	Hefe- Wachstumsdefekt bei Sisko et al.	Phloxin B- Einstufung	Immun- Reaktivität
<i>cpn0072</i>	CT324	61 %	nein	2	nein
<i>cpn0188</i>	CT132	75 %	nein	2-3	nein
<i>cpn0293</i>	CT234	72 %	nein	2	nein
<i>cpn0369</i>	CT058	47 % max.	nein	3	nein
<i>cpn0474</i>	CT365	61 %	ja	3	nein
<i>cpn0572</i>	CT456	60 % max.	ja	2-3	ja
<i>cpn0648</i>	CT529	54 %	ja	2	ja
<i>cpn0746</i>	CT632	84 %	nein	2	ja
<i>cpn0809</i>	CT578	69 %	ja	4	nein
<i>cpn0912</i>	CT768	70 %	nein	2-3	ja
<i>cpn1019</i>	CT860	66 %	nein	3	nein

**Tabelle 15: Liste der bereits in Hefe analysierten *C. trachomatis*-Homologe**

Aufgelistet sind die Kandidaten, deren CT-Homologe von der Arbeitsgruppe um Valdivia (Sisko, Spaeth et al. 2006) in Hefe analysiert worden waren. Die Spalte „Phloxin B-Einstufung“ gibt die im Screening in dieser Arbeit vergebene Stärke des Phänotyps mittels der Phloxin B-Einteilung wider. Die Spalte „Immunreaktivität“ zeigt die Ergebnisse der Analyse der IM-Antiseren mit den rekombinant in Hefe exprimierten *C. trachomatis*-Proteinen. Homologie zeigt die Aminosäureähnlichkeit in % über die gesamte Proteinlänge oder den Bereich größter

werden konnte (Fields, Fischer et al. 2005).

Das *C. trachomatis*-Homolog von CPn0912, CT768, welches eine 70 %ige Homologie aufweist, zeigte in den Analysen von Sisko eine Immunreaktivität mit den Inklusionsmembran-Antiseren und wird somit wahrscheinlich sekretiert. Dies ist der einzige Kandidat, bei dem die Daten von Sisko den Sekretionsvorhersagen von Subtil widersprechen. Die *C. pneumoniae*-Homologe der anderen Proteine, die laut Sisko wahrscheinlich sekretiert sind, CPn0572, CPn0648 und CPn0746, sind entweder auch von Subtil als sekretiert beschrieben oder im Falle von CPn0572 nicht analysiert.

CPn0043 ist, genau wie CPn1054, ein Mitglied der ppp-Familie aus *C. pneumoniae* (Rocha, Pradillon et al. 2002). Beide Proteine werden in unserem Labor von Frau Sandra Vergin weiter untersucht. Sie analysiert auch CPn0072 näher, gegen das von Frau Dr. Kerres bereits ein Antiserum generiert wurde, welches in der Immunfluoreszenz auf eine Lokalisierung in der Inklusionsmembran schließen lässt (bisher nicht veröffentlicht). CPn1019, das wie CPn0809 eine Funktion als porenbildendes Protein im Typ III-Sekretionsapparat haben könnte, wird von Frau Astrid Engel aus unserer Arbeitsgruppe zusammen mit CPn0809 näher analysiert (bisher nicht veröffentlicht). CPn1070 wird von Frau Dr. Miriam Essid aus der Arbeitsgruppe Subtil, Paris, näher studiert (bisher nicht veröffentlicht). Auch die Kandidaten, die im LatB-Assay einen Phänotyp zeigten (CPn0965, CPn0267, CPn0419, CPn0439, CPn473, CPn0554, CPn0598, CPn0850 und CPn0942), sollten noch einmal genauer analysiert werden, da es sich, um Aktin-modulierende Proteine handeln könnte.

Der Hefe-Apoptose/Nekrose-Assay lieferte einige Kandidaten, die hier deutliche Phänotypen zeigten. Die schwächeren Phänotypen wurden aufgrund der Varianz der Populationszahlen allein bei den Kontrollzellen nicht gewertet. Die Definition eines apoptotischen Phänotyps in Hefe unterscheidet sich außerdem von der Definition in Humanzellen. So gilt in Hefe eine Zelle als früh-apoptotisch, die nur Annexin V positiv ist und als spät-apoptotisch oder sekundär-nekrotisch, wenn die Zellen sowohl Annexin V- als auch Propidiumiodid-positiv sind (Buttner, Ruli et al. 2011). In Humanzell-Assays gelten doppelt-positive Zellen immer als nekrotisch.

Einige Formen des programmierten Zelltods scheinen von Hefe bis zum Mensch konserviert zu sein, jedoch sind nicht alle Signalwege in Hefe vorhanden, die in humanen Zellen die Apoptose auslösen. So wurde bisher in Hefe nur eine einzige Caspase (Yca1p) identifiziert, die im Apoptose-Signalweg eine Rolle spielt, der Caspase-unabhängige Signalweg über AIF ist jedoch auch in Hefe vorhanden (Carmona-Gutierrez, Eisenberg et al. 2010). Alle auffälligen Kandidaten sollten folglich in Humanzellen analysiert werden. Aufgrund der schlechten Transfektionseffizienzen konnten jedoch für die beiden interessantesten

Kandidaten aus dem hier durchgeführten Screening, CPn0181 und CPn0809, keine Apoptose-Assays in Humanzellen durchgeführt werden.

Kandidat	CT-Homologe	vorherges. Inc	Lokalisierung in Hefe	Phänotyp im Apoptose-Assay
<i>cpn0043</i>	-	ja	unbekannt	-
<i>cpn0072</i>	<i>ct324</i>	ja	ER	-
<i>cpn0211</i>	-	ja	Zellperipherie	-
<i>cpn0277</i>	-	ja	punktiert im Zytoplasma	-
<i>cpn0369</i>	<i>ct058</i>	ja	ER	-
<i>cpn0474</i>	<i>ct365</i>	ja	punktiert im Zytoplasma	tot
<i>cpn0648</i>	<i>ct529 (Cap1)</i>	nein	wie leerer Vektor	tot
<i>cpn0746</i>	<i>ct632</i>	nein	in den Mitochondrien	-
<i>cpn1019</i>	<i>ct860</i>	nein	wie leerer Vektor	tot
<i>cpn1070</i>	-	nein	punktiert im Zytoplasma	nekrotisch

**Tabelle 16: Liste der Kandidaten mit positiver Sekretionsvorhersage und starkem Hefe-Phänotyp**

Aufgelistet sind alle Kandidaten mit positiver Sekretionsvorhersage nach Subtil und/oder Rattei, die im Hefe-Screen einen starken Wachstumsdefekt verursachten. Zusätzlich ist die ermittelte Lokalisierung in Hefe, der Phänotyp im Hefe-Apoptose-Assay und die Vorhersage als Inc-Protein angegeben (Bannantine, Griffiths et al. 2000; Toh, Miura et al. 2003; Dehoux, Flores et al. 2011). CT= *C. trachomatis*, - im Apoptose-Assay= Phänotyp unterhalb des festgelegten Grenzwerts.

## 5.2. CPn0181 – ein Inc-Protein?

Das hypothetische Protein CPn0181 lokalisierte bei transienter Expression im Zellkern und punktiert im Zytoplasma von Hefe- und Humanzellen. Interessant ist, dass das Protein über eine vorhergesagte zweiteilige Kernlokalisierungssequenz verfügt, dies scheint für eine Funktion als sekretiertes Effektorprotein zu sprechen. Die Expression von CPn0181 führte in Hefezellen zu einem schwachen Wachstumsdefekt, allerdings konnte ein apoptotischer Phänotyp beobachtet werden. In der Infektion konnte dieses Protein nicht eindeutig lokalisiert werden, da der generierte Antikörper zu unspezifisch war. Die Lokalisierung in der Infektion deutet jedoch auf eine Sekretion hin, bei der das Protein an der Inklusionsmembran akkumuliert, allerdings war eine ausgeprägte unspezifische Hintergrundfärbung zu beobachten. Auch die Western Blot-Analysen lieferten keine detaillierten Ergebnisse, zumal für dieses Protein in den RB-Fraktionen (siehe Abschnitt 4.2.3.2) mehrere Banden mit einem höheren Molekulargewicht als dem berechneten Gewicht von 16 kDa zu detektieren waren. In den generierten Fraktionen infizierter Zellen 48 hpi, also zu einem Zeitpunkt, zu dem teilweise schon EBs vorliegen, eine Vielzahl der Bakterien aber noch im RB-Stadium sind, konnte für CPn0181 nur eine Bande von ca. 72 kDa detektiert werden, die auch schon in dem RB-Blot zu detektieren war (siehe Abschnitt 4.3.2.3). Ausreichende Homologie zu

einem chlamydialen Protein dieser Größe konnte nicht ermittelt werden, so dass es sich wahrscheinlich um eine CPn0181-Variante handelt. Es könnte sich also bei der höhermolekularen Bande um eine oligomerisierte Form des Proteins handeln, zum Beispiel um ein Tetramer. In diesem Fall würde das Protein in der Infektion hauptsächlich als Tetramer eine Rolle spielen, da diese Form ausschließlich in der Fraktionierung infizierter Zellen detektiert wurde.

CPn0181 zeigte bei einer gezielten Homologiesuche schwache Homologie zum humanen SRRT-Protein, genauer zu den Isoformen E, C, D und A des „serrate RNA effector molecule homolog“, das alternativ auch Arsenite-resistance protein 2 genannt wird. Dieses Protein weist eine hauptsächlich Kernlokalisierung auf und spielt eine Rolle in der RNA-vermittelten Gen-Stillelegung durch miRNAs (Quelle: Uniprot). Bei der starken Hintergrundfärbung in der Immunfluoreszenz, die vor allem an der Kernperipherie auftrat, könnte es sich also um diese Protein-Isoformen handeln, wenngleich die Homologie nur sehr schwach ist und keine größeren übereinstimmenden Bereiche gefunden werden, was ebenfalls gegen eine Kreuzreaktivität spricht.

CPn0181 sollte noch einmal mittels einer Zellfraktionierung untersucht werden, da die generierten Proben leider nicht für eine Detektion in der Membranfraktion ausreichten. Eine Fraktionierung könnte somit zur Überprüfung dienen, ob es sich bei CPn0181 um ein Inc-Protein handelt, da für CPn0147, bei dem es sich erwiesenermaßen um ein Inc-Protein handelt, eindeutig ein Signal in der Membranfraktion infizierter Zellen detektiert wurde. Außerdem sollte ein neuer Antikörper generiert werden, in Frage käme hier ein Peptidantikörper. So könnte die Immunfluoreszenz eventuell besser gelingen und eine eindeutigere Aussage über die Lokalisierung von CPn0181 getroffen werden. Es wird also aufzuklären sein, ob es sich tatsächlich um ein Inc-Protein handelt, um ein sekretiertes Effektorprotein, das in den Zellkern transloziert wird, um dort eventuell eine Rolle in der Modulation der Apoptose zu spielen oder ob es eine gänzlich andere Funktion hat. Denkbar wäre auch eine duale Funktion: so ist nicht ausgeschlossen, dass das Protein in der Inklusionsmembran lokalisieren könnte und ein Teil oder das ganze Protein ebenfalls in die Wirtszelle sekretiert wird. Da sich die Kernlokalisierungssequenz allerdings im Bereich der Transmembrandomänen befindet, ist diese Variante eher unwahrscheinlich.

### **5.3 Cpn0350 scheint ein intrachlamydiales Protein zu sein**

Cpn0350 lokalisierte als GFP-Fusionsprotein sowohl in Hefe als auch in Humanzellen im Zellkern. In Hefe löste es einen starken Wachstumsdefekt aus, in Humanzellen und auch in *E. coli* war jedoch keine Beeinträchtigung des Wachstums in den Transfektionsexperimenten zu beobachten. Die Western Blot-Analysen zeigten, dass es sich um ein Protein handelt, welches in EBs und RBs gleich stark exprimiert wird. In der Immunfluoreszenz zeigte sich,

dass CPn0350 wahrscheinlich mit der DNA der Bakterien kolokalisierte. Weder in der Immunfluoreszenz noch in den Western Blot-Analysen von fraktionierten infizierten Zellen konnte eine Sekretion von CPn0350 detektiert werden (siehe Abschnitt 4.3.2.3). Effektorproteine werden meistens zu bestimmten Zeitpunkten im Entwicklungszyklus besonders stark exprimiert. Die chlamydiale Genexpression wird in drei Stufen eingeteilt (früh, mittel und spät exprimierte Proteine). So werden zum Beispiel Proteine, die bei der Adhäsion und Internalisierung benötigt werden, spät im Entwicklungszyklus hochreguliert, um sie für die neue Infektion im EB zu speichern (Belland, Zhong et al. 2003; Maurer, Mehlitz et al. 2007). CPn0350 ähnelte im Western Blot von RB- und EB-Fractionen eher der S1-Ladekontrolle oder der Expression des Chaperons DnaK (Daten nicht gezeigt). Dies deutet, zusammen mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenz-Analysen auf eine Rolle als intrachlamydiales Protein hin. In den Western Blot Analysen konnte außerdem für CPn0350 eine Doppelbande detektiert werden, was auf eine Prozessierung hindeutet. Für CPn0350 gibt es keine Sekretionsvorhersage der Arbeitsgruppen Subtil und Rattei.

Das *C. trachomatis*-Homolog von CPn0350, CT066, zeigte in den Studien von Sisko et al. keinen generellen Wachstumsdefekt in Hefe, lediglich unter Salzstress-Bedingungen konnte eine Beeinträchtigung des Wachstums gezeigt werden (Sisko, Spaeth et al. 2006). Eine solche Osmosensitivität kann Defekte in verschiedenen MAPK-Signalwegen, im Kerntransport, in der RNA-Transkription und –Translation oder in endosomalen Funktionen zur Ursache haben (Warringer, Ericson et al. 2003). Fraglich bleibt, warum sich der Hefe-Phänotyp trotz der Homologie von 84 % bei den beiden Proteinen unterscheidet. CT066 zeigte aber, genau wie CPn0350 in den hier durchgeführten Analysen, eine Lokalisierung im Zellkern von Hefe- und Humanzellen (Sisko, Spaeth et al. 2006). Beide Proteine besitzen eine einfache Kernlokalisierungssequenz (basisches Motiv), keine Transmembrandomänen und eine geringe Größe. Es ist also möglich, dass die Proteine allein aufgrund der geringen Größe (MW von CPn0350= 19,1 kDa) passiv in den Zellkern gelangen. Da beide Proteine stark basisch sind (pI CPn0350= 10,4), könnte eine Bindung an die DNA auch aufgrund der Ladung möglich sein.

Natürlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich trotzdem um ein sekretiertes Effektorprotein handeln könnte, dass aber die Menge an sekretiertem Protein nicht ausreichte, um es zu detektieren. Möglich wäre zum Beispiel eine Immunpräzipitation mit Lysaten aus infizierten Zellen durchzuführen, wobei Bedingungen gewählt werden sollten, bei denen die Bakterien intakt bleiben und so nur extrachlamydiales CPn0350 isoliert werden sollte. Auch eine gezielte Immunpräzipitation mit lysierten Zellkernen infizierter Zellen könnte Aufschluss geben, ob eine kleine Menge CPn0350 vielleicht doch in den Zellkern sekretiert wird. Die gesammelten Daten und auch die Bioinformatik sprechen allerdings gegen eine Sekretion. Eine Rolle als Effektorprotein ist aufgrund der gewonnenen Daten eher

unwahrscheinlich. Der zu beobachtende starke Wachstumsdefekt, der bei Expression des Proteins in Hefe auftritt, kommt wahrscheinlich dadurch zustande, dass das Protein in irgendeiner Weise in der Hefe in Prozesse interferiert, die es auch in der Bakterienzelle moduliert. Favorisiert wird für diesen Kandidaten eine DNA-assoziierte Funktion innerhalb des Bakteriums, da CPn0350 sowohl bei Expression in Hefe als auch in Humanzellen wahrscheinlich direkt an DNA bindet. Um diese Theorie zu überprüfen, könnte eine Crosslinking-Immunpräzipitation mit CPn0350 und chlamydialer DNA durchgeführt werden. Ein analoger Ansatz führte zur Identifizierung der DNA-Bindestellen des chlamydialen Histon-ähnlichen Proteins Hc1 (Kaul, Allen et al. 1996).

#### 5.4 CPn0472 – ein mögliches Adhäsion?

CPn0472 wurde zusammen mit CPn0809 mit der höchsten Frequenz in dem in dieser Arbeit durchgeführten Screening isoliert. Es zeigte einen sehr starken Wachstumsdefekt und lokalisierte als GFP-Fusion in Humanzellen in membranösen Strukturen im Zellinneren. Um welche Struktur es sich dabei handelt, konnte nicht ermittelt werden. Das generierte Antiserum zeigte überraschenderweise, dass CPn0472 hauptsächlich zu späten Zeitpunkten der Infektion als Volllängenprotein detektiert werden konnte und ansonsten ein C-terminales Fragment zu detektieren war. Allerdings zeigte das Protein ein sehr ungewöhnliches Laufverhalten, da es bei ca. der doppelten Laufhöhe detektiert wurde. Dies ist ungewöhnlich, da es sich um ein saures Protein mit einem errechneten isoelektrischen Punkt von 4,4 handelt und ein solches Laufverhalten sonst eher bei basischen Proteinen beobachtet werden kann. Es könnte sich somit um ein Dimer handeln.

In den Zellfraktionen infizierter Zellen war nur das C-terminale Fragment zu detektieren. In der Fraktionierung war keine Bande in der Zytoplasma-Fraktion zu detektieren, so dass eine Sekretion ins Zytoplasma unwahrscheinlich ist. In gereinigten EB-Extrakten (siehe Abschnitt 4.2.4.2) wurden zahlreiche Banden mit dem CPn0472-Antiserum detektiert, es sieht aus, als würde es sich um das Volllängenprotein und zahlreiche Degradationsbanden handeln, während in der RB-Fraktion nur fünf distinkte Banden zu erkennen sind, das Volllängenprotein, das kleine C-Terminale Fragment von ca. 25 kDa und drei Banden intermediärer Größe. Es sieht so aus, als würde das Protein prozessiert. In den EBs dagegen ist viel mehr Protein vorhanden. So könnte das Protein in den EBs gespeichert werden, da es möglicherweise eine Funktion in der frühen Infektion oder in den EBs hat.

Aufgrund der bioinformatisch vorhergesagten DUF1542-Domäne könnte es sich bei CPn0472 um ein Adhäsion handeln. Diese Domäne kommt in Zelloberflächenproteinen von Bakterien vor, die eine Rolle in der Adhäsion und/oder Antibiotika-Resistenz haben (Clarke, Harris et al. 2002)(Pfam). *Cpn0472* scheint nicht in einem Operon vorzuliegen (Vorhersage mit <http://www.microbesonline.org/>), es befindet sich allerdings im Genom direkt neben

einigen OLR, die Pmp-Proteine kodieren. Für die Pmps wurde teilweise schon eine Rolle in der Adhäsion gefunden oder wird zurzeit noch untersucht (Molleken, Schmidt et al. 2010)(Elisabeth Becker, unveröffentlicht). Auch das neben *cpn0472* kodierte CPn0473 wird in unserer Arbeitsgruppe zurzeit auf seine Eigenschaften als potentielles Adhäsion hin untersucht (Tim Fechtner, unveröffentlicht). Für das Oberflächenprotein OmcB konnte neben seiner Funktion als Zellwandprotein auch eine Bindung an Glykosaminoglykan-Strukturen von Humanzellen gezeigt werden (Moelleken and Hegemann 2008). Außerdem wurde kürzlich herausgefunden, dass ein C-terminales Fragment von OmcB in die Wirtszelle sekretiert wird (Qi, Gong et al. 2011). Es ist also möglich, dass CPn0472 in ähnlicher Weise zum einen eine Bindung an die Humanzelle vermittelt und andererseits ein Fragment in die Zelle sekretiert wird. Allerdings konnte durch die bisherigen Experimente ein solches Verhalten nicht bestätigt werden. Die Lokalisierung in der Infektion deutet auf eine Bakterienassoziation hin, eine Sekretion konnte nicht beobachtet werden, ist aber aufgrund des mangelhaften Antikörpers auch nicht auszuschließen. Mit rekombinantem CPn0472 könnte eine Bindefähigkeit an Humanzellen überprüft werden, dies kann zum Beispiel über Protein-beschichtete Latexkugeln erfolgen. Außerdem könnte untersucht werden, ob eine Vorinkubation der infektiösen EBs mit dem CPn0472-Antikörper eine reduzierte Infektiosität zur Folge hat. Dies würde bedeuten, dass CPn0472 auf der Bakterienoberfläche lokalisiert und eine Funktion in der Adhäsion und/oder Internalisierung besitzt.

Außerdem wäre es interessant herauszufinden, was mit dem N-Terminus des Proteins geschieht. Es sollte also auch ein Antiserum gegen den N-Terminus generiert werden, um zu überprüfen, ob der N-Terminus analog zum C-Terminus ebenfalls während der gesamten Infektion detektiert werden kann, oder ob er relativ schnell abgebaut wird. Auch könnte so eine unterschiedliche Lokalisierung von C- und N-Terminus mittels Immunfluoreszenz überprüft werden.

## **5.5 Ist CPn0809 ein sekretiertes Effektorprotein oder ein Translokon-Protein?**

CPn0809 wurde zusammen mit CPn0472 am häufigsten in dem durchgeführten Screening zur Identifizierung potentieller Effektorproteine isoliert und zeigte unter anderem den stärksten Phänotyp in Hefezellen. Auch die Expression in Humanzellen wirkte sich negativ auf die Zellen aus, was sich in einer verminderten Transfektionseffizienz und einem Ablösen der Zellen äußerte. Dies wurde auch für das *C. trachomatis*-Homolog CT578 alias CopB beobachtet (Chellas-Gery, Wolf et al. 2011). Die transiente Expression zeigte, dass CPn0809 als GFP-Fusion in Volllänge punktiert in Zytoplasma vorlag und in der Nähe des Zellkerns akkumulierte. Die bereits beschriebene Kolo-kalisierung mit Calnexin, einem ER-Marker, konnte nicht bestätigt werden (Muller, Sattelmacher et al. 2008).

Der generierte Antikörper zeigte in der Immunfluoreszenz häufig eine sehr starke Hintergrundfärbung und auch im Western Blot wurde immer eine Bande bei Proben nicht-infizierter Zellen detektiert, die fast auf der gleichen Höhe lag wie das Signal für CPn0809. Auch eine Antigenreinigung konnte diese anscheinend sehr spezifische Reaktion mit einem humanen Protein nicht beseitigen. Ein Homologievergleich des N-Terminus von CPn0809 mit der humanen Proteindatenbank mittels NCBI Blast ergab eine leichte Homologie zu dem 55,8 kDa großen Histamin H1-Rezeptor. Dieser zeigt eine zytoplasmatische Lokalisierung in HeLa 229 Zellen und die Immunfluoreszenz-Aufnahmen mit einem kommerziellen monoklonalen Antikörper gegen dieses humane Protein ähneln sehr dem Signal, welches das CPn0809-Antiserum in nicht-infizierten Humanzellen zeigt (Quelle: Santa Cruz biotechnologies Inc., Produktkatalog).

Für CPn0809 wurden bereits in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Screening mit einer humanen Testis-Expressionsbibliothek potentielle Interaktionspartner identifiziert (Engel 2010). Zwei dieser möglichen Interaktionspartner wurden dabei mehrmals isoliert. Bei dem ersten Kandidaten handelte es sich um NCAPH2 (non-SMC condensing II complex, subunit H2), auch bekannt als Kleisin- $\beta$ . Dieses Protein ist an der Kondensation von Chromosomen während der Zellteilung beteiligt (Ono, Losada et al. 2003). Der zweite Kandidat, der von Frau Engel identifiziert werden konnte, war MIF4GD (Protein mit MIF4G-Domäne), auch bekannt als SLIP1, einem Interaktionspartner des „stem-loop binding-Proteins SLBP und des 3'-Endes von Histon mRNA. Durch diese Interaktion soll die Translation der Histon mRNA aktiviert werden (Quelle: Uniprot). Es handelt sich also um Nukleus- bzw. Zytoplasmalokalisierte Kandidaten. Eine Interaktion kann also nur bei Sekretion von CPn0809 in die Wirtszelle zustande kommen.

Für CPn0809 wurde bereits eine Sekretion beschrieben, das Protein zeigte 55 hpi neben einer Lokalisierung in der Inklusion auch ein Signal im die Inklusion umgebenden Zytoplasma (siehe Abbildung 86 B) (Lugert, Kuhns et al. 2004). Mit dem in dieser Arbeit generierten Antikörper, der gegen denselben Teil des Proteins gerichtet ist wie der von Lugert et al. verwendete Antikörper, konnte jedoch keine Sekretion beobachtet werden (Abbildung 86 A). Vielmehr deuten die Immunfluoreszenz-Analysen auf eine Kolokalisierung von CPn0809 und EBs hin, da in der frühen Infektion kein Signal in der Inklusion detektiert werden kann. Mit Fortschreiten der Infektion können jedoch immer mehr Signale für CPn0809 detektiert werden, die mit der DNA der Bakterien kolokalisieren. Hierzu passen auch die Ergebnisse der Western Blot-Analysen. Es handelt sich um ein Protein, welches in der späten Infektionsphase verstärkt exprimiert wird. Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse für CPn0809 unterstützen eher die These, dass es sich bei diesem Protein tatsächlich um eine Komponente der Translokationspore handeln könnte, wie es auch für

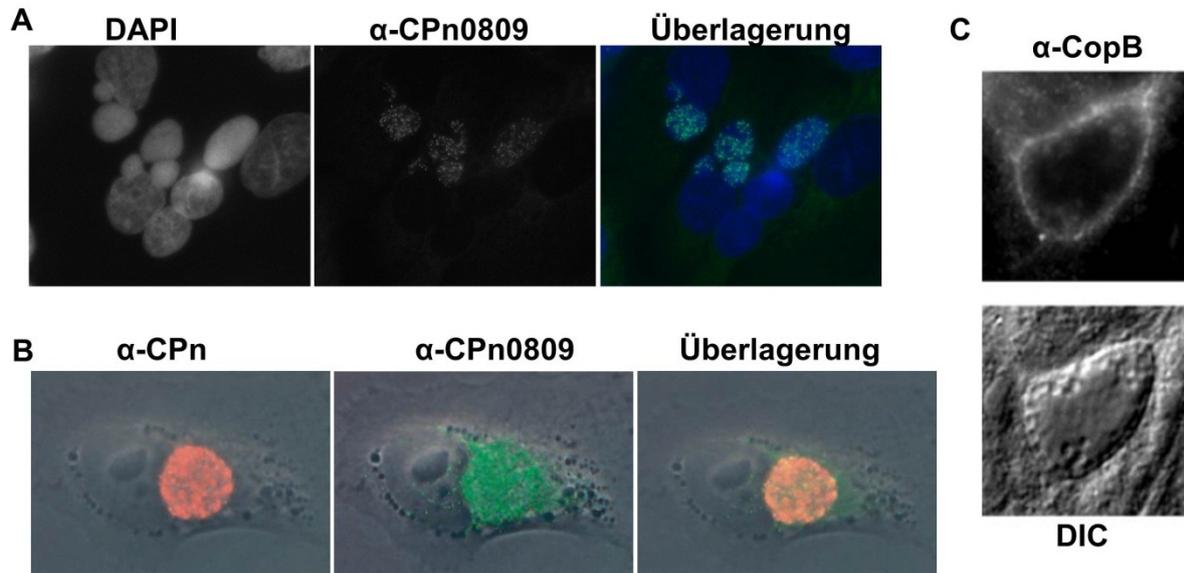
das homologe Protein CT578 aus *C. trachomatis* angenommen wird (Subtil, Blocker et al. 2000; Fields, Fischer et al. 2005; Chellas-Gery, Wolf et al. 2011).

Beide Proteine verfügen laut KEGG-Analyse über eine SseC-Domäne, die in den Translokon-Proteinen verschiedener gramnegativer Bakterien vorkommt. Aufgrund dieser Domänenvorhersage und seiner Lage im Genom (siehe Einleitung) wurde schon CT578 alias CopB, auf seine Funktion als porenbildendes Effektorprotein hin analysiert (Fields, Fischer et al. 2005; Chellas-Gery, Wolf et al. 2011).

Interessanterweise wurde CPn1019, für das ebenfalls eine Rolle als Translokon-Protein in dem zweiten chlamydialen Operon postuliert wird, in dem in dieser Arbeit durchgeführten Screening drei Mal identifiziert (siehe Abschnitt 4.1).

Die chlamydialen Proteine weisen kaum Sequenzähnlichkeiten zu den porenbildenden Proteinen anderer Spezies aus, die Vermutung, dass es sich um Translokon-Proteine handelt, ist vor allem damit begründet, dass die Proteine neben den homologen Chaperonen codiert sind und über eine vergleichbare Größe und ein ähnliches Hydrophobizitätsprofil verfügen (Subtil, Blocker et al. 2000).

Lokalisierungsstudien in infizierten Zellen zeigten, dass CopB in der Inklusionsmembran lokalisiert und bei ektopischer Expression eine punktierte Lokalisierung im Zytoplasma der transfizierten Zelle aufwies, die wahrscheinlich Proteinaggregate darstellt (Fields, Fischer et



**Abbildung 86: Immunfluoreszenz von CPn0809 und CopB**

- A) punktierte Lokalisierung innerhalb der Inklusion mit dem in dieser Arbeit generierten Cpn0809-Antiserum 48 hpi.
- B) Lokalisierung von CPn0809 55 hpi nach Lugert et al. in und um die Inklusion, die Bakterien wurden mit einem monoklonalen  $\alpha$ -CPn-Antikörper gefärbt, CPn0809 mit polyklonalem Serum, ein Phasenkontrastbild ist unterlegt, Lugert et al., 2004.
- C) CopB-Lokalisierung 20 hpi an der Inklusionsmembran mittels polyklonalem Serum, ein Differentialinterferenzkontrast-Bild (DIC) zeigt die Inklusion (unten), Fields et al., 2005.

al. 2005; Chellas-Gery, Wolf et al. 2011). CopB konnte in der Mitte des Infektionszyklus in der Inklusionsmembran detektiert werden (Abbildung 86 C)(Fields, Fischer et al. 2005). Dies ist eine andere Lokalisierung, als die, die für CPn0809 beobachtet wurde. Es wird vermutet, dass es sich bei CopB neben seiner Funktion als Translokon auch um ein sekretiertes Effektorprotein handelt, das eine Funktion in oder an der Inklusionsmembran erfüllt (Fields, Fischer et al. 2005). CPn0809 aber zeigt in der Infektion ein punktiertes Signal. Die Punkte zeigen in diesem Fall wahrscheinlich EBs.

Es ist nicht ausgeschlossen, dass CPn0809 ebenfalls eine duale Funktion besitzt und zum einen als EB-assoziiertes Protein in der frühen Infektion die Pore in der Wirtszell-Membran bildet und schließlich auch selbst in die Wirtszelle sekretiert wird. Analog hierzu wurde gezeigt, dass CopB2 aus dem zweiten Translokon-Operon aus *C. trachomatis* auch im Zytoplasma der Wirtszelle detektiert werden konnte (Fields, Fischer et al. 2005).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen lieferten jedoch keinen Hinweis auf eine Sekretion. Auch in der Fraktionierung infizierter Zellen nach 48 Stunden war kein Signal in der zytosolischen Fraktion für CPn0809 zu detektieren. Sollte es sich tatsächlich um ein Translokon-Protein handeln, so könnte die Anwesenheit von Antikörpern gegen CPn0809 während des Adhäsions- und Internalisierungsprozesses die Infektion beeinträchtigen. Erschwert wird dies aber dadurch, dass CPn0809 als Translokon wahrscheinlich erst bei Kontakt mit der Wirtszellmembran an die Nadelspitze sekretiert wird. Der Antikörper müsste also eventuell in die Humanzelle injiziert werden. Eine andere Möglichkeit wäre, das Protein auf seine Fähigkeit hin zu untersuchen, eine Pore in einer Membran zu bilden. Hierzu wurden bei den Translokon-Proteinen anderer bakterieller Spezies unter anderem Erythrozyten verwendet, die mit den Bakterien inkubiert wurden. Es konnte dann eine Hämolyse beobachtet werden, die nach einer Deletion eines der Translokon-Proteine nicht mehr auftrat(Goure, Pastor et al. 2004). Da Chlamydien nicht genetisch manipulierbar sind, ist dieser Ansatz jedoch nicht möglich. Rekombinantes Protein könnte jedoch mit künstlichen Liposomen inkubiert werden: sollte das Protein in der Lage sein, in die Membran zu inserieren, so könnte es anschließend mittels einer Immunpräzipitation aus den gereinigten Liposomen isoliert werden (Schoehn, Di Guilmi et al. 2003). Hierzu müssen allerdings auch die anderen beteiligten Proteine rekombinant hergestellt werden, zusammen mit ihren Chaperonen (Goure, Pastor et al. 2004). Im Falle von CPn0809 müsste also auch CPn0808 und LcrH-1 rekombinant hergestellt werden. Zuerst sollte aber eine Interaktion dieser Proteine mit CPn0809 überprüft werden.

## 5.6 CPn1054 und die ppp-Proteinfamilie

CPn1054 ist der größte Vertreter der so genannten ppp-Proteine (*C. pneumoniae* polymorphic protein genes) bzw. der CPn1054 Proteinfamilie, von der angenommen wird, dass die anderen Vertreter durch Genduplikationen aus CPn1054 entstanden sind (Rocha, Pradillon et al. 2002; Viratyosin, Campbell et al. 2002). Deutlich wird dies vor allem an den zwei OLR *cpn0010* und *cpn0010.1*, die beide nahezu identisch zum N- bzw. C-terminalen Bereich des OLR von *cpn1054* sind. Aber auch die anderen Vertreter weisen große Homologie zu CPn1054 auf (Viratyosin, Campbell et al. 2002). Es wird spekuliert, dass diese paraloge Proteinfamilie, die ausschließlich in *C. pneumoniae* vorkommt, eine Rolle in der genetischen Varianz und somit der Anpassung an veränderte Umgebungen oder Wirtszell-Immunantworten spielt (Rocha, Pradillon et al. 2002). Über die Lokalisierung und Funktion der ppp-Proteine ist nichts bekannt.

Da jeder Bereich von CPn1054 Homologie zu anderen Proteinen aus *C. pneumoniae* aufweist, konnte kein Antikörper generiert werden, der nicht gleichzeitig auch potentiell andere Vertreter der ppp-Familie detektiert. Nach den Western Blot-Analysen, die mit dem generierten Serum durchgeführt wurden, kann zumindest eine Kreuzreaktivität mit CPn0010.1 nicht ausgeschlossen werden. Die Untersuchungen zu diesem Kandidaten lassen also keine Rückschlüsse auf CPn1054 allein zu, es muss zumindest auch CPn0010.1 berücksichtigt werden. Lediglich die Lokalisierungsstudien in Hefe und Humanzellen und die Hefe-Analysen beziehen sich nur auf CPn1054. Hier konnte gezeigt werden, dass sich die Lokalisierung in Hefe von der in Humanzellen leicht unterschied. In Hefe zeigte sich eine stark punktierte Lokalisierung an der Zellperipherie, in Humanzellen zeigte sich für CPn1054-GFP eine kontinuierliche Plasmamembran-Lokalisierung und evtl eine Kolokalisierung mit anderen, intrazellulären Membranen.

Das CPn1054-Vollängenprotein verursachte in Hefe keinen Wachstumsdefekt, die isolierten Screenfragmente jedoch schon. Interessant wäre hier eine Überprüfung der Lokalisierung der Screenfragmente. Die Membran-Lokalisierung in Humanzellen könnte einen negativen Einfluss auf die Zellen haben, was die schlechte Transfektionseffizienz erklären würde. Im LatB-Assay zeigte das untersuchte Screenfragment von CPn1054 ein ambivalentes Verhalten. So war der Halo in der ersten Analyse kleiner und in der zweiten Analyse größer als der Halo der Kontrolle. Dieser Assay sollte daher mit dem Vollängen-Konstrukt und mit allen isolierten Screenfragmenten wiederholt werden, um eine mögliche Auswirkung auf das Aktin-Zytoskelett zu überprüfen. In diesem Zusammenhang könnte auch überprüft werden, ob eventuell die Screenfragmente als GFP-Fusionen mit dem Aktin-Zytoskelett der Hefe kolokalisieren. Frau Dr. Kerres überprüfte das Vollängenkonstrukt und konnte keine Kolokalisierung mit Aktin feststellen, die Teilfragmente könnten aber ein anderes Verhalten zeigen.

Die Analysen zur Lokalisierung von CPn1054 während der Infektion mit dem generierten Antikörper gestalteten sich schwierig, da der Antikörper eine starke Hintergrundfärbung aufwies. Außerdem kann eine spezifische Aussage über die Lokalisierung von CPn1054 allein aufgrund der bereits beschriebenen Homologie nicht gemacht werden. Die Immunfluoreszenz-Analysen deuten auf eine Lokalisierung in oder an den Bakterien hin. Eine Sekretion kann aber nicht ausgeschlossen werden, da der Antikörper generell nicht sehr spezifisch ist. So könnte ein relativ schwaches Signal eines sekretierten Proteins aufgrund der starken Hintergrundfärbung nicht zu detektieren sein.

Frau Sandra Vergin analysiert in ihrer Doktorarbeit zurzeit CPn1054. Sie konnte in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Assay mögliche Interaktionspartner identifizieren. Die interessantesten Kandidaten waren hier COPS4 und COPS6, die beide mehrfach gefunden wurden. Beide Proteine sind Teil des COP9 Signalosoms (CSN). Das CSN ist von Hefe bis zum Mensch hoch konserviert und mit der Zellzyklus-Kontrolle, Signaltransduktion und Entwicklung verknüpft. Es kontrolliert die Protein-Stabilität über das Ubiquitin-Proteasom-System durch die Regulierung der Ubiquitin-Ligase-Aktivität von Cullin-RING-E3 mittels Deneddylierung (Abspaltung von Nedd8 von Cul1) oder durch das Verhindern einer Ubiquitin-vermittelten Degradation durch ein CSN-assoziiertes deubiquitinierendes Enzym. Außerdem wird vermutet, dass das CSN zusätzlich die Transkription direkt durch Assoziation mit dem Chromatin reguliert wird (Kato and Yoneda-Kato 2009). Kürzlich konnte des Weiteren gezeigt werden, dass das COP9 Signalosom auch in der Regulierung von NF- $\kappa$ B eine Rolle spielt (Schweitzer and Naumann 2010).

Interessanterweise kommen in allen chlamydialen Spezies außer in *C. pneumoniae* die beiden deubiquitinierenden und deneddylierenden Proteasen ChlaDub1 und ChlaDub2 vor, von denen angenommen wird, dass sie ins Zytoplasma sekretiert werden (Misaghi, Balsara et al. 2006). Für ChlaDub1 konnte weiterhin gezeigt werden, dass es die Aktivierung von NF- $\kappa$ B unterdrückt und die Ubiquitinierung und Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  verhindert (Le Negrate, Krieg et al. 2008). I $\kappa$ B $\alpha$  ist ein Inhibitor von NF- $\kappa$ B. Der NF- $\kappa$ B-Signalweg spielt eine große Rolle in der Immunantwort und die Fähigkeit der Chlamydien, dies zu unterdrücken, ist von großem Vorteil. So konnte bereits für andere pathogene Bakterien, wie Salmonellen und EPEC eine Interferenz mit der Neddylierung von Cul1 nachgewiesen werden, wodurch Cul1 inaktiviert und NF- $\kappa$ B inhibiert wird (Collier-Hyams, Sloane et al. 2005). Die *C. pneumoniae*-spezifischen ppp-Proteine könnten somit die ChlaDub-Proteine funktionell ersetzen.

Voraussetzung für eine Interaktion von CPn1054 mit dem COP9 Signalosom ist allerdings, dass das CSN für das Protein zugänglich ist. Hierzu müsste CPn1054 also sekretiert werden.

Sinnvoll wäre für die weitere Analyse von CPn1054 die Generierung eines Peptidantikörpers mit einem Bereich des Proteins, der möglichst keine oder wenig Homologie zu den anderen

ppp-Proteinen aufweist. Außerdem sollten mit diesem Antikörper dann auch für CPn1054 Western Blot-Analysen fraktionierter infizierter Zellen durchgeführt werden. Es wäre zum Beispiel denkbar, dass eine kleine Portion von CPn1054 in den Kern der Wirtszelle sekretiert wird, da das Protein über eine Kernlokalisierungssequenz verfügt. Denkbar wäre auch, dass das Protein prozessiert wird und nur ein Teil in den Kern gelangt, da die N-terminal gelegenen Transmembrandomänen eventuell stören würden. In den Western Blot-Analysen waren neben dem Vollängenprotein CPn1054 einige niedermolekulare Banden zu detektieren, bei denen es sich um andere ppp-Proteine oder um C-terminale Varianten von CPn1054 handeln könnte. Auch hier könnten Lokalisierungsstudien in Hefe helfen. Zum Beispiel könnte überprüft werden, ob verkürzte Varianten eine veränderte Lokalisierung zeigen und eventuell sogar in den Zellkern transportiert werden. Dies würde dann unter Umständen auch die durch die Teilfragmente des Screens ausgelöste Letalität erklären, die bei Expression des Vollängenproteins nicht zu beobachten ist.

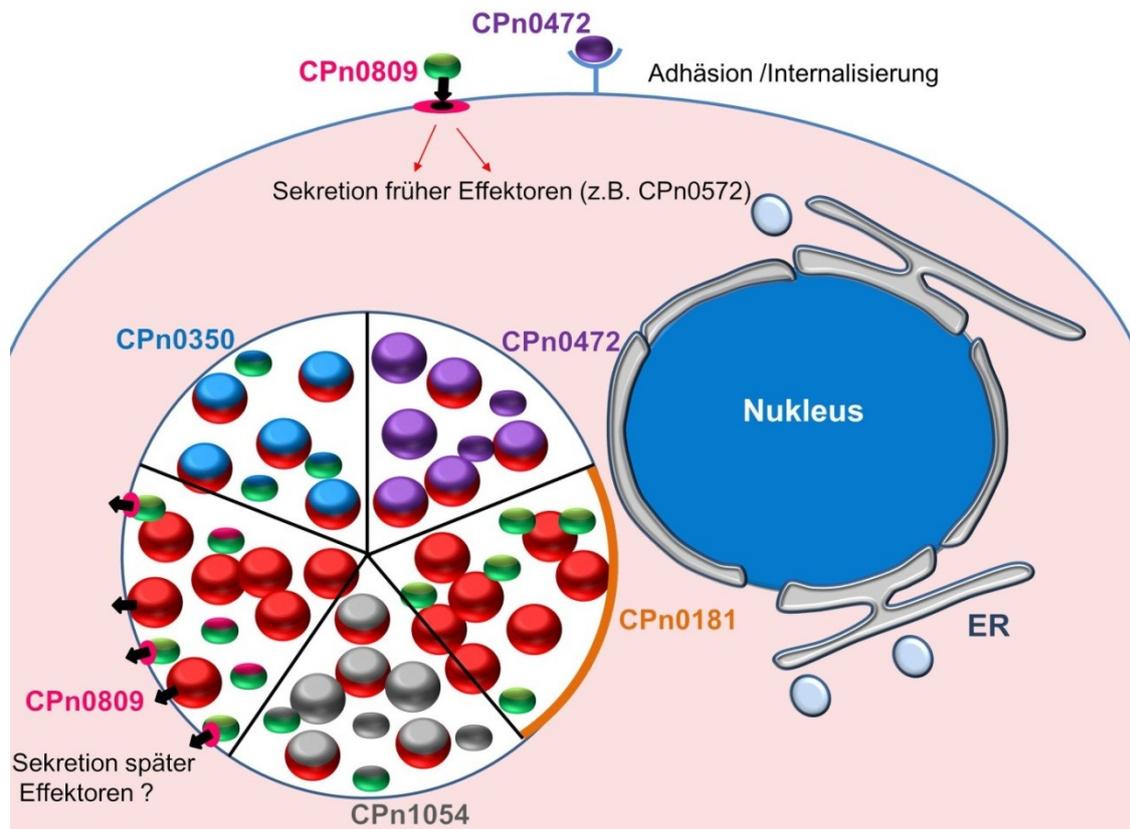
## **5.7 Modell der Funktionen der untersuchten Kandidaten**

Für die in der Inklusion detektierten Kandidaten konnte keine klare Lokalisierung und Funktion ermittelt werden. Die gefundenen Daten legen für CPn0181 eine Lokalisierung an oder in der Inklusionsmembran nahe und damit eine potentielle Funktion als Inc-Protein. CPn0350 scheint eine DNA-bindende Funktion innerhalb der Bakterien zu besitzen, die sich nicht auf einen bestimmten Zeitpunkt in der Infektion beschränkt.

CPn1054 liegt vermutlich ebenfalls mit den Bakterien assoziiert vor, wobei unklar bleibt, ob es sich um eine intrachlamydale oder Oberflächenlokalisierung handelt.

CPn0472 zeigte in den Analysen ebenfalls eine wahrscheinliche Bakterienassoziation und könnte eine Funktion in der Adhäsion oder Internalisierung besitzen. In der Infektion liegt CPn0472 als C-terminales Fragment vor, dieses Fragment könnte daher eine Funktion innerhalb der Wirtszelle erfüllen.

Die Ergebnisse zu CPn0809 unterstützen die Theorie, dass es sich um ein Translokon-Protein handelt, dass in der frühen und möglicherweise auch in der späten Infektionsphase die Pore des Typ III-Sekretionsapparates in der Wirtszell-Zytoplasmamembran bzw. in der Inklusionsmembran bildet.



**Abbildung 87: Modell der favorisierten potentiellen Funktionen der Kandidaten**

Dargestellt ist die wahrscheinliche Lokalisierung der untersuchten Kandidaten während der Infektion. Schwarze Pfeile symbolisieren Typ III-Sekretionsapparate, RBs sind rot, EBs grün dargestellt, die Plasmamembran der Wirtszelle ist als blaue Linie oben angedeutet. Für CPn0350 wird eine intrachlamydiale DNA-assoziierte Lokalisierung und Funktion sowohl in RBs als auch in EBs vermutet (blau). Bei CPn0181 handelt es sich vermutlich um ein Inc-Protein (orange). Für CPn1054 konnte lediglich eine Bakterienassoziation gezeigt werden, es könnte sich sowohl um ein intrachlamydiales als auch um ein oberflächenlokalisierendes Protein handeln (grau). CPn0472 scheint während der Infektion als prozessiertes Fragment eine Funktion zu besitzen, während das Vollängenprotein eine Rolle im Adhäsions-/oder Internalisierungsprozess spielen könnte. Für CPn0809 wird eine Funktion als porenbildendes Translokonprotein in der späten und sehr frühen Infektionsphase favorisiert, bei Kontakt mit Membranen wird das Protein an die Nadelspitze sekretiert, während es in frei vorliegenden EBs gespeichert wird.

## 5.8 Das Inc-Protein CPn0147 kolokalisiert mit Lipidtröpfchen

### 5.8.1 CPn0147 lokalisiert in der Inklusionsmembran und auf zytoplasmatischen Fäden

CPn0147 wurde insgesamt fünf Mal in dem in dieser Arbeit durchgeführten Screening in Hefe isoliert und zeigte sowohl in Hefezellen als auch in Humanzellen eine Lokalisierung im ER. In seriellen Verdünnungstropftest konnte ermittelt werden, dass der Transmembranbereich in der Mitte des Proteins die beobachtete Letalität in Hefe auslöste. Des Weiteren ist dieser Bereich ausschlaggebend für die Lokalisierung im ER nach transientser Expression.

In infizierten Zellen konnte CPn0147 mikroskopisch bereits 15 hpi nachgewiesen werden, in Western-Blot-Analysen war eine Detektion frühestens 24 hpi möglich. Das Protein zeigte in geblotteten EB-Proben ein leicht verlangsamtes Laufverhalten gegenüber RB-Proben, es könnte also sein, dass das Protein im Laufe des Entwicklungszyklus modifiziert wird.

CPn0147 wurde bereits 2007 als Inc-Protein beschrieben, allerdings war nichts über seine Funktion bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass CPn0147 in der Inklusionsmembran lokalisiert, hier zeigte sich eine Kollokalisierung mit dem IncA-Protein CPn0186 von *C. pneumoniae* (Luo, Liu et al. 2007).

CPn0147 wurde zudem zusammen mit zwei weiteren Inc-Proteinen als potentielles Antigen zur Serodiagnose von *C. pneumoniae*-Infektionen vorgeschlagen, da es signifikant mit Patientenseren reagierte (Hongliang, Zhou et al. 2010).

Neben der bereits beschriebenen Lokalisierung in der Inklusionsmembran zeigten sich in den in dieser Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenz-Analysen fadenartige Fortsätze, die ausgehend von der Inklusionsmembran in das Zytoplasma der Wirtszelle ragten und auf denen sowohl Signale für IncA als auch für CPn0147 detektiert werden konnten. Die Fäden konnten nicht mit Wirtszell-Strukturen assoziiert werden, allerdings wurde nachgewiesen, dass sie häufig den Zellkern umgeben und in der Nähe des ER lokalisieren. Interessanterweise konnten sowohl auf den Fäden als auch in der Nähe der Inklusionsmembran Lipidtröpfchen detektiert werden, die von einem CPn0147-Signal umgeben waren. Die Anreicherung der Wirtszelle mit Lipidtröpfchen hatte eine vermehrte Bildung der CPn0147-positiven Fäden zur Folge, was einen direkten Zusammenhang zwischen der Ausbildung der Fäden und der Rekrutierung der Lipidtröpfchen nahelegt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass CPn0147 in der Inklusionsmembran nicht gleichmäßig verteilt vorliegt, sondern ringförmige oder löchrige Strukturen in der Inklusionsmembran bildet. Eine solche strukturierte Lokalisierung konnte auch für andere Inc-Proteine gezeigt werden (Alzhanov, Weeks et al. 2009; Mital, Miller et al. 2010). Sie könnte zum Beispiel auf eine Fusion mit exozytischen Vesikeln zurückzuführen sein, deren CPn0147-freie Membranen mit der Inklusionsmembran verschmelzen und so „CPn0147-freie“ Stellen in der Inklusionsmembran bilden. Möglich wäre aber auch ein strukturierter Einbau in die Inklusionsmembran aufgrund eines bisher unbekanntes Interaktionspartners oder einer unbekanntes Struktur direkt nach der Sekretion von CPn0147 über die Typ III-Sekretionsnadel.

#### **5.7.1.1 Die mögliche Entstehung der Fäden als Ausstülpungen der Inklusionsmembran**

Auf den CPn0147-Fäden konnte teilweise und in geringer Menge das chlamydiale Momp-Protein, eine Hauptkomponente des cOMC (chlamydial outer membrane complex), detektiert werden. Des Weiteren scheint es sich bei CPn0147 aufgrund der gewonnenen Daten um ein

unlösliches, membranassoziiertes Protein zu handeln. Aufgrund dieser Beobachtungen kann spekuliert werden, dass die Fäden möglicherweise als Abschnürung der Inklusionsmembran gebildet werden, auch wenn kein direkter Nachweis von membranösen Strukturen in den Fäden gelang. Das normalerweise in der äußeren Membran der Bakterien fest verankerte Momp-Protein könnte durch die Ausbildung von Vesikeln der äußeren Membran von den Bakterien freigesetzt werden. Diese Vesikel würden dann in die Inklusionsmembran eingebaut und von dort zusammen mit einem Teil der Inklusionsmembran als wachsender Faden abgeschnürt. Die Sekretion unlöslicher Proteine über Vesikel der äußeren Membran (OMV=outer membrane vesicle) ist mittlerweile für viele gramnegative Bakterien beschrieben und ist vermutlich für die Nährstoffversorgung, Biofilm-Entwicklung und Pathogenese wichtig (Kulp and Kuehn 2010; Choi, Kim et al. 2011; Yonezawa, Osaki et al. 2011; Yoon, Ansong et al. 2011). Auch für Chlamydien wird die Bildung von OMV vermutet, da eine Abschnürung von vesikulären Strukturen der äußeren Membran von RBs beobachtet werden konnte und sowohl innerhalb als auch außerhalb der Inklusion chlamydiale Vesikel gefunden wurden, die keine Bakterien enthielten (Matsumoto and Manire 1970; Giles, Whittimore et al. 2006; Jorgensen and Valdivia 2008; Zhong 2011).

Die OMV entstehen durch Ausstülpungen der äußeren Membran, die anschließend abgeschnürt werden. Sie enthalten neben den Komponenten der äußeren Membran auch einige periplasmatische Proteine und können auch lösliche Proteine enthalten (Kulp and Kuehn 2010). OMV enthalten demnach auch bakterielles LPS. In Immunfluoreszenz-Analysen mit einem monoklonalen Antikörper gegen chlamydiales LPS und dem Antiserum gegen CPn0147 sollte überprüft werden, ob LPS ebenfalls auf den Fäden zu detektieren ist. Dabei wurde jedoch festgestellt, dass der verwendete LPS-Antikörper Lipidtröpfchen in infizierten, aber auch in nicht-infizierten Zellen anfärbte. Eine Literaturrecherche ergab, dass eine Kreuzreaktivität eines monoklonalen LPS-Antikörpers von *C. trachomatis* mit humanem ApoB-Protein beschrieben ist, was nahelegt, dass gleiche Epitope vorhanden sind (Petyaev, Zigangirova et al. 2011). Für weitere Analysen sollte also ein anderer monoklonaler LPS-Antikörper verwendet werden.

Es wurden bereits Analysen zu den IncA-Fäden durchgeführt, in denen herausgefunden wurde, dass auf den Fäden in *C. psittaci*-infizierten Zellen geringe Mengen von LPS detektiert werden konnten, während in *C. trachomatis*-infizierten Zellen kein LPS, dafür aber Cap1 auf den IncA-Fäden gefunden wurde. In *C. pneumoniae*-infizierten Zellen konnte kein LPS auf den Fäden detektiert werden, die anderen Antigene wurden nicht getestet (Brown, Skeiky et al. 2002). Die Fäden wurden außerdem unter normalen Wachstumsbedingungen und bei Zugabe von Ampicillin ins Medium quantifiziert. Ampicillin induziert eine Persistenz und vermehrte Bildung von OMV der Chlamydien (Wang, Frohlich et al. 2011) Es wurde bereits beschrieben dass in Situationen, in denen die Bakterienzellen Stressfaktoren

ausgesetzt sind, die die Zellhülle schädigen (wie z.B. Ampicillin) vermehrt OMV gebildet werden (Kulp and Kuehn 2010). Während für *C. psittaci* und *C. trachomatis* eine erhöhte Anzahl an fadenassoziierten Inklusionen und eine erhöhte Präsenz von chlamydialen Antigenen auf den Fäden nach Behandlung mit Ampicillin ermittelt wurde, zeigte diese Behandlung keinen Einfluss auf die Anzahl der Fäden in der *C. pneumoniae*-Infektion. Hier zeigte sich jedoch, dass nun LPS auf den Fäden detektiert werden konnte (Brown, Skeiky et al. 2002). Dies deutet entweder auf unterschiedliche Funktionen der Fäden in den verschiedenen Organismen hin oder auf eine eher untergeordnete Rolle der Antigene auf den Fäden, die nicht mit der Hauptfunktion der Fäden verknüpft ist. Es unterstreicht aber die Theorie, dass die Antigene durch OMV in die Inklusionsmembran und so letztendlich in die Fäden gelangen, da die vermehrte Bildung von OMV die Ursache für die erhöhte Präsenz chlamydialer Antigene auf diesen Fäden sein könnte. Somit wäre die Antigenpräsenz eher ein Nebenprodukt und würde vor allem bei vermehrter Bildung von OMV auftreten.

In den durchgeführten Analysen konnte keine Wirtszell-Komponente mit den Fäden assoziiert gefunden werden. Weder die untersuchten Bestandteile des Zytoskeletts (Aktin, Mikrotubuli, Intermediärfilamente) noch ER-Marker oder Plasmamembran-Marker koloalisiert mit den Fäden. Es bleibt also weiter unklar, aus welchen anderen Bestandteilen die Fäden bestehen und ob sie durch Wirtszell-Strukturen gelenkt oder stabilisiert werden. In der Inklusionsmembran, obwohl ursprünglich von der humanen Zytoplasmamembran stammend, befinden sich hauptsächlich chlamydiale Proteine (Dehoux, Flores et al. 2011), was die Theorie stützt, dass die Fäden Derivate der Inklusionsmembran sind.

Mit Hilfe der Lebendzell-Mikroskopie könnte die Dynamik der Fäden untersucht werden. In den durchgeführten Experimenten wurde gezeigt, dass mit der Dauer der Infektion auch die Anzahl der gebildeten Fäden zunimmt. So sind in der frühen Infektion (24 hpi) nur wenige der recht kleinen Inklusionen mit einem oder wenigen Fäden assoziiert, während 72 hpi, also gegen Ende des Infektionszyklus, fast die Hälfte der Inklusionen einen oder mehrere Fäden aufweisen und manche der Inklusionen sogar ein netzähnliches Fadengebilde zeigen. Interessant wäre zu sehen, wie schnell ein solcher Faden gebildet wird und ob die geringe Fadenanzahl in der frühen Infektion auf die langsame Entstehung der Fäden zurückzuführen ist, oder ob die Fäden sehr schnell gebildet werden, aber erst in der späten Infektion eine wichtige Funktion besitzen.

Einen Hinweis auf die Dynamik und Entstehung der Fäden liefern die Analysen von Kumar et al. mit *C. trachomatis*-infizierten Zellen. Bei Disruption des Aktin-Zytoskeletts mittels Latrunculin A oder Cytochalasin D nahm die Anzahl der Inklusionen mit mehr als zwei Fäden deutlich zu, woraus die Autoren folgerten, dass der Verlust der Stabilität der Inklusion für die Fadenbildung verantwortlich ist (Kumar and Valdivia 2008). Es konnte des Weiteren

beobachtet werden, dass in Vimentin-defizienten Zellen, also Zellen, denen eine Komponente der Intermediärfilamente fehlt, ebenfalls vermehrt Inklusionen mit mehr als zwei IncA-Fäden vorhanden waren (Kumar and Valdivia 2008). In der Lebendzell-Mikroskopie konnte die Entstehung eines solchen Fadens beobachtet werden. Hierzu wurde das Lda3-Protein aus *C. trachomatis* als GFP-Fusion in infizierte Zellen transfiziert, um so die Inklusionsmembran zu färben. Anschließend wurde das Aktin-Zytoskelett mit Latrunculin A disruptiert. Auf diese Weise konnte beobachtet werden, dass sich nach der LatA-Behandlung innerhalb von wenigen Minuten Inklusionsmembran-Fäden bildeten (Kumar and Valdivia 2008).

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine Akkumulation von Vimentin an der Inklusion beobachtet werden, jedoch wurde Aktin nicht in der Nähe der Inklusion detektiert. Des Weiteren waren die Fäden auch ohne den Verlust der protektiven Zytoskelett-Hülle in der normalen Infektion zu beobachten, daher müssen weitere Mechanismen und Ursachen eine übergeordnete Rolle spielen. Interessant ist jedoch die Möglichkeit, mittels der Transfektion von Lda3-GFP die Inklusionsmembran und möglicherweise auch die CPn0147-haltigen Fäden in lebenden Zellen anzufärben. In den in dieser Arbeit durchgeführten Transfektionsexperimenten mit dem Lda3-Homolog CPn0592 konnte jedoch keine Kolokalisierung mit der Inklusionsmembran oder den Fäden beobachtet werden. Es ist aber theoretisch durchaus möglich, dass eines der anderen Lda-homologen Proteine hierfür genutzt werden könnte.

#### **5.7.1.2 Die Bildung von Sekundärinklusionen mit Hilfe der CPn0147-Fäden scheint unwahrscheinlich**

Die Fäden wurden bisher nur in Zusammenhang mit dem IncA-Protein untersucht, die meisten Analysen erfolgten außerdem mit *C. trachomatis*. Hier konnten auf den IncA-Fäden kreisförmige Momp-Signale detektiert werden und es wird spekuliert, dass leere Inklusionen aufgebaut und durch die Fäden mit Bakterien gefüllt werden, um nach einer Teilung der Wirtszelle in beiden gebildeten Zellen eine Infektion aufrecht zu erhalten (Suchland, Rockey et al. 2005). Dies wurde auch aus der Beobachtung geschlossen, dass manche Serovare von *C. trachomatis* viele Sekundärinklusionen bilden, also bei gleicher MOI mehr infizierte Zellen sichtbar sind, wenn den Wirtszellen durch Verzicht auf Cycloheximid die Teilung ermöglicht wird. Andere untersuchte Serovare zeigten hingegen keinerlei Zunahme an infizierten Zellen (Suchland, Rockey et al. 2005). In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten war bei Verzicht auf Cycloheximid im Medium ebenfalls keine offensichtliche Erhöhung der Anzahl infizierter Zellen sichtbar (Daten nicht gezeigt). Es konnte jedoch in sehr seltenen Fällen ein DAPI-Signal auf den Fäden detektiert werden, dass von einem CPn0147-Signal umgeben war. Dies könnte also eine kleine Inklusion sein, die ein

Bakterium enthält und auf dem Faden transportiert wird. Auch Strukturen, die den von Suchland et al. beschriebenen leeren Inklusionen ähnelten und deren Membranen sowohl für CPn0147 als auch für IncA positiv waren, konnten sehr häufig beobachtet werden. Diese waren jedoch sehr groß und enthielten niemals Bakterien. Bei den bereits beschriebenen Sekundärinklusionen von *C. trachomatis* kamen häufig Zwischenformen vor, also Inklusionen die keine bis nur sehr wenige Bakterien enthielten bis hin zu beinahe komplett gefüllten Inklusionen, die kaum von den Primärinklusionen unterscheidbar waren (Suchland, Rockey et al. 2005). Ob es sich also bei den in dieser Arbeit beobachteten „leeren Inklusionen“ tatsächlich um Sekundärinklusionen handelt, bleibt fraglich. Hierzu wäre Lebendzell-Mikroskopie von großem Vorteil. Allerdings müsste dann mangels einer humanen und somit markierbaren Komponente ein Antikörper gegen CPn0147 oder IncA in die Zelle injiziert werden, der zuvor mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wird. In den lebenden Zellen könnte dann die Infektion über einen längeren Zeitraum beobachtet werden, um so die Entstehung und das Schicksal dieser leeren Inklusionen aufzuklären.

Ein weiteres Indiz, welches für die Bildung von Sekundärinklusionen sprechen könnte, ist die Beobachtung, dass zwei benachbarte infizierte Zellen über einen Faden verbunden sind. Auch dies wurde nur sehr selten beobachtet und war auch in Cycloheximid-freien Infektionen nicht häufiger zu beobachten. Diese Verbindungen, die auch schon in den *C. trachomatis*-Studien beschrieben wurden, könnten auch ohne die Entstehung einer Sekundärinklusion zustande kommen. In vielen multipel infizierten Zellen konnten Inklusionen an gegenüberliegenden Seiten des Zellkerns beobachtet werden, die manchmal durch einen Faden verbunden waren. Bei einer Zellteilung, die auch in Cycloheximid-behandelten Zellen nicht zu 100 % unterbunden wird, könnte dieser Faden als Überrest sichtbar bleiben, auch wenn nicht zwingend eine Verbindung der Inklusionen aufrechterhalten wird. Auch könnte es zu Defekten in der Zytokinese gekommen sein (verursacht durch die Infektion oder das Cycloheximid), so dass tatsächlich eine Verbindung besteht. Da diese Verbindungen aber nur sehr selten zu beobachten waren, scheinen sie eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Auch mit der Lebendzell-Mikroskopie wird es aufgrund der Seltenheit dieses Phänomens wahrscheinlich äußerst schwierig, genaueren Aufschluss zu erlangen.

#### **5.8.1.1 Die CPn0147-Fäden umgeben den Zellkern**

Die Fäden liegen sehr häufig in der direkten Umgebung des Zellkerns. Häufig umspannen sie diesen sogar netzartig. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich um den Kern herum das ER befindet. Eine Verbindung mit dem ER über die Fäden könnte somit eine Rolle in der Nährstoffversorgung der Bakterien spielen. So könnten exozytische Vesikel, die am ER abgeschnürt werden und zum Beispiel Lipide oder Proteine enthalten, direkt über die

Fäden zur Inklusion umgeleitet werden. Unterstützt wird diese Theorie dadurch, dass die Fäden häufig in der Nähe des ER detektiert wurden.

Auch die Beobachtung aus *C. trachomatis*-infizierten Zellen, dass die chlamydialen Antigene Momp und LPS zusammen mit IncA in Fraktionen des ER detektiert wurden, könnte damit erklärt werden, dass sich diese Antigene (zum Beispiel Momp) auf den Fäden befanden und so in die Fraktionsproben gelangten (Giles and Wyrick 2008). In dieser Studie wurde allerdings die Rolle der Fäden nicht diskutiert, vielmehr wurde die Lokalisierung dieser Antigene im ER auf extrainklusionale Vesikel zurückgeführt, die in *C. trachomatis*-infizierten Zellen beobachtet wurden und möglicherweise zur Antigen-Präsentation und –Prozessierung zum ER transportiert werden (Giles, Whittimore et al. 2006; Giles and Wyrick 2008). Diese Vesikel waren deutlich größer als einzelne Bakterien und somit auch deutlich umfangreicher als die CPn0147 / IncA-Fäden, so dass es sich um andere Strukturen handeln muss.

Auch könnte die Lage der Inklusion in Kernnähe über die Fäden stabilisiert werden. Gegen diese These spricht aber, dass nur ein kleiner Teil der Inklusionen diese netzartige Umspannung des Zellkerns aufweist, daher ist für die Position der Inklusion wahrscheinlich ein anderer Mechanismus verantwortlich.

### 5.8.2 Rekrutiert CPn0147 Lipidtröpfchen zur Inklusion?

CPn0147 ist das erste chlamydiale Protein, das in infizierten Zellen auf der Oberfläche von Lipidtröpfchen detektiert werden konnte. Viele der CPn0147-positiven Lipidtröpfchen befanden sich in der Umgebung der Inklusion oder direkt an der Inklusionsmembran, manche befanden sich aber auch am entgegengesetzten Ende der Zelle. Häufig konnte ein Faden in der Nähe der Lipidtröpfchen beobachtet werden. Auch konnten CPn0147-positive Lipidtröpfchen direkt mit einem Faden assoziiert gezeigt werden. Biochemisch konnte CPn0147 in Lipidtröpfchen-Fractionen infizierter Zellen nachgewiesen werden. Nur IncA und Lda2 aus *C. trachomatis* wurden bisher als chlamydiale Proteine in Lipidtröpfchen-Fractionen infizierter Zellen detektiert (Kumar, Cocchiario et al. 2006; Cocchiario, Kumar et al. 2008).

Dies alles deutet darauf hin, dass CPn0147 und die gebildeten CPn0147-Fäden eine Rolle in der Rekrutierung der Lipidtröpfchen zur Inklusion spielen könnten.

Unterstützt wird diese Theorie dadurch, dass die Stimulation der Lipidtröpfchen-Bildung mit Ölsäure auch eine vermehrte Fadenbildung zur Folge hat. Auch hier sind wieder gegen Ende des Infektionszyklus mehr Fäden zu beobachten als in der frühen Infektion, was dafür spricht, dass die eigentliche Regulation der Fadenbildung erhalten bleibt, aber verstärkt wird. Interessanterweise führte eine Inhibierung der Lipidtröpfchenbildung mittels Triacsin C auch zu einer verminderten Fadenbildung. Hier waren jedoch auch die Inklusionen deutlich kleiner, so dass die verringerte Fadenanzahl auch darauf zurückzuführen sein kann, dass die Entwicklung verlangsamt ist bzw. weniger Bakterien gebildet werden. Es konnte für

*C. trachomatis* bereits gezeigt werden, dass Triacsin C durch die Reduktion der Lipidsynthese die Proliferation der Bakterien vermindert (Kumar, Cocchiario et al. 2006). Da besonders viele Fäden erst gegen Ende des Infektionszyklus auftreten, könnte die verminderte Fadenanzahl nach Triacsin C-Behandlung also auch auf die Beeinflussung der Reifung der Inklusion zurückgehen.

Im Jahr 2006 wurde zum ersten Mal beschrieben, dass Lipidtröpfchen an der Inklusion akkumulieren und für die chlamydiale Replikation benötigt werden (Kumar, Cocchiario et al. 2006). Über Kolokalisierungsstudien in Hefe wurden Kandidaten-Proteine (Lda1-4) identifiziert, die mit dem Hefe-Lipidtröpfchen-Marker Erg6p kolokalisierten (Sisko, Spaeth et al. 2006). Bei transienter Expression in Humanzellen lokalisierten Lda1 und Lda3 auf der Oberfläche von Lipidtröpfchen, in der Infektion allerdings zeigten Lda1 und Lda3 eine Lokalisierung auf der Oberfläche der Inklusionsmembran und dort teilweise mit lipidreichen Strukturen (Kumar, Cocchiario et al. 2006). Es konnte außerdem beobachtet werden, dass die Lipidtröpfchen als komplettes Organell in die Inklusion aufgenommen werden und dass Lda3 vermutlich eine Rolle in diesem Aufnahme-Prozess spielt (Cocchiario, Kumar et al. 2008). Allerdings ist unklar, wie die Lipidtröpfchen zur Inklusion rekrutiert werden. Die Beobachtung, dass CPn0147 teilweise auch weit entfernt von der Inklusion auf der Oberfläche der Lipidtröpfchen lokalisierte, ist deshalb sehr interessant.

Zur Aufklärung der Rolle von CPn0147 in der Rekrutierung der Lipidtröpfchen wäre die Lebendzell-Mikroskopie eine geeignete Methode. Der Weg eines Lipidtröpfchen auf dem Faden könnte so verfolgt werden. Außerdem könnte aufgeklärt werden, ob sich eventuell ein Faden bildet und das Lipidtröpfchen „einfängt“ und sich dann wieder zurückbildet, nachdem das Lipidtröpfchen mit CPn0147 markiert ist. Es konnten sehr viele Lipidtröpfchen in der Umgebung der Inklusion beobachtet werden, die zwar CPn0147-positiv waren, die aber nicht mit einem Faden verknüpft waren. CPn0147 verfügt über zwei Transmembrandomänen und ist daher wahrscheinlich unlöslich. Auch in den Fraktionierungsexperimenten konnte CPn0147 nicht in der löslichen Fraktion detektiert werden. Fraglich ist also, wie das Protein auf die Oberfläche der Lipidtröpfchen gelangt. Eine mögliche Erklärung wäre demnach, dass die Fäden sehr dynamisch sind, und nach der Abgabe von CPn0147 an ein Lipidtröpfchen zurückgebildet werden könnten. Möglich ist aber auch, dass das Lipidtröpfchen von einer kompletten CPn0147-haltigen Membran umgeben wird und nicht nur das Protein auf der Oberfläche lokalisiert. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass CPn0147 (und auch die Lda-homologen Proteine CPn0399 und CPn0592, jedoch keines der Lda-Proteine aus *C. trachomatis*) über ein so genanntes „Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site“-Profil verfügen. Über eine solche N-terminale Verknüpfung mit einem Lipid könnte CPn0147 in der Membran verbleiben und N-terminal mit dem Lipidtröpfchen assoziiert vorliegen. Möglicherweise ist das beobachtete leicht veränderte Laufverhalten von CPn0147

in EB-Fraktion im Vergleich zu RB-Fraktionen mit einer solchen Lipidverknüpfung zu erklären.

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse deuten auf eine wichtige Funktion von CPn0147 in der Rekrutierung von Lipidtröpfchen hin. Dies konnte bisher für kein anderes chlamydiales Protein in dieser Weise gezeigt werden, da die Lda-Proteine von *C. trachomatis* wahrscheinlich erst an der Inklusion in Kontakt mit dem Lipidtröpfchen treten. Für Lda2, das schwache Homologie zu CPn0415 aufweist, konnte allerdings, vergleichbar zu CPn0147, in Fraktionierungsexperimenten eine Anreicherung in der Lipidtröpfchen-Fraktion gezeigt werden. Dieses Protein lokalisiert außerdem an der Peripherie der Inklusion (Kumar, Cocchiaro et al. 2006). Interessant wäre herauszufinden, ob Lda2, das über eine vorhergesagte Transmembrandomäne verfügt, auf IncA-Fäden in *C. trachomatis* infizierten Zellen lokalisiert und hier eventuell die Funktion von CPn0147 einnimmt.

### 5.8.3 Die Suche nach Interaktionspartnern von CPn0147

Die Suche nach einem Interaktionspartner von CPn0147 gestaltete sich aus verschiedenen Gründen sehr schwierig. Zuerst wurde versucht, mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse mögliche humane Interaktionspartner zu identifizieren. Der Hefe-Zwei-Hybrid-Screen wurde mit niedriger Stringenz durchgeführt und es wurden 114 mögliche Interaktionspartner gefunden. Diese isolierten Klone zeigten allerdings alle eine Autoaktivierung der Reportergene, es konnte kein Interaktionspartner identifiziert werden. Das Screening mit der humanen Testis-cDNA-Bibliothek sollte also noch einmal mit Medium hoher Stringenz und 3-AT (3-Amino-1,2,4-triazole, einem Inhibitor des HIS3-Genprodukts) wiederholt werden, so könnte die Zahl der falsch positiven Klone minimiert werden. Es wäre eventuell möglich, auf diese Weise doch noch humane Interaktionspartner zu finden. Da es sich bei CPn0147 um ein Membranprotein handelt, wäre es jedoch sinnvoller, mit einem membranständigen Hefe-Zwei-Hybrid-System zu arbeiten, da für die durchgeführte Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse der Transmembranbereich des Proteins deletiert wurde. Hierzu könnte das Split-Ubiquitin-System verwendet werden, mit dem die Interaktion integraler Membranproteine mit anderen Membranproteinen und auch mit löslichen Proteinen untersucht werden kann. Bei einer Interaktion der zu analysierenden Proteine kommen die beiden Hälften des Ubiquitins, an die jeweils eines der Proteine fusioniert ist, in räumliche Nähe, wodurch ein Transkriptionsfaktor freigesetzt wird, der die Transkription eines oder mehrerer Reporterproteine ermöglicht (Stagljar, Korostensky et al. 1998).

Die Suche nach chlamydialen Interaktionspartnern wurde ebenfalls mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System durchgeführt. Hier wurde allerdings festgestellt, dass die verwendete, von einer Firma hergestellte, chlamydiale DNA-Bibliothek eine Vektorkontamination aufwies. Bei dem Kontaminationsvektor handelte es sich um das Plasmid pCL1, welches im Matchmaker-

Kit von Clontech als Positivkontrolle Verwendung findet, da es das Volllänge des Gal4-Transkriptionsfaktors trägt. Diese Kontamination war zwar sehr gering und nur durch eine PCR nachweisbar, allerdings war sie insofern fatal, als dass alle Hefezellen, die mit diesem Vektor transformiert wurden, auf dem hochstringenten Selektionsmedium wachsen konnten. Woher diese Kontamination stammte, konnte rückwirkend nicht geklärt werden. Bei einer Test-Sequenzierung von 46 Klonen der Bank-DNA wurde der pCL1-Vektor nicht gefunden, so dass er scheinbar nur in sehr geringer Konzentration vorhanden ist. Eine Reinigung der Bank schlug bisher fehl, allerdings sollte die Reinigung mittels enzymatischer Spaltung noch einmal modifiziert, evtl mit anderen Enzymen, wiederholt werden. Sollte die Reinigung erfolgreich sein, könnte der Hefe-Zwei-Hybrid-Screen noch einmal wiederholt werden. Es ist durchaus wahrscheinlich, dass CPn0147 mit anderen chlamydialen Proteinen, zum Beispiel anderen Inc-Proteinen, interagiert. Auch hier wäre aber eine Untersuchung mit dem Split-Ubiquitin-System eine mögliche Alternative.

Leider konnte auch biochemisch bisher kein Interaktionspartner identifiziert werden. Die Isolierung von CPn0147 aus infizierten Zellen konnte mit unterschiedlichen Lysis-Puffern nicht erfolgreich durchgeführt werden. Da es sich sehr wahrscheinlich um ein Membranprotein handelt, ist es äußerst schwierig, das Protein zum einen aus der Membran zu lösen aber andererseits gebundene Interaktionspartner nicht zu verlieren. Daher scheint der GST-Pulldown die vielversprechendste Methode zu sein. Der Vorteil des GST-Pulldowns ist, dass das unlösliche CPn0147 nicht erst aus den Zellen isoliert werden muss, sondern rekombinant hergestellt wird und zu dem Humanzell-Lysat gegeben wird. Hier konnte zumindest eine Bande detektiert werden, bei der allerdings in der Massenspektrometrie kein Protein eindeutig ermittelt werden konnte. Schließlich könnten auch chlamydiale Interaktionspartner ermittelt werden, wenn hierzu Lysat infizierter Zellen verwendet würde. Ein großer Nachteil des ansonsten vielversprechenden GST-Pulldowns ist, dass das Protein rekombinant hergestellt eventuell nicht seine richtige Konformation aufweist. Außerdem zeigte auch das GST-Protein allein Interaktionen mit Proteinen aus dem Humanzell-Lysat.

Eine interessante Beobachtung ist, dass CPn0147 Detergenzien-sensitiv ist. So wurde in Immunfluoreszenz-Analysen festgestellt, dass bei einer Permeabilisierung der Wirtszell-Membran mit Triton X-100 das CPn0147-Signal in der Inklusionsmembran und auf den Fäden schwächer und eher punktiert zu detektieren war, während bei einer Permeabilisierung mit dem milderem Saponin das Signal kontinuierlicher war. Für Lipidtröpfchen-assoziierte humane Proteine und auch für die analysierten Lda-Proteine aus *C. trachomatis* ist ebenfalls eine Detergenzien-Sensitivität beschrieben (Ohsaki, Maeda et al. 2005; Kumar, Cocchiaro et al. 2006; Cocchiaro, Kumar et al. 2008). Dies könnte eine Ursache für die Probleme bei der biochemischen Suche nach Interaktionspartnern sein.

Da die Hefe-Zwei-Hybrid-Screenings und die biochemischen Ansätze keine Ergebnisse lieferten, wurden gezielt einige potentielle Interaktionspartner mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse untersucht. Da von IncA, welches ja ebenfalls auf den Fäden lokalisierte, bekannt ist, dass es mit sich selbst interagiert (Delevoye, Nilges et al. 2004), wurde analysiert, ob CPn0147 ebenfalls mit sich selbst oder mit IncA (CPn0186) im Hefe-Zwei-Hybrid interagiert. Außerdem wurde eine Interaktion mit CPn0592 (Homolog zu Lda3) und CPn0399 (homolog zu Lda1) getestet. Die Lda3- bzw. Lda1-homologen Proteine CPn0592 und CPn0399 aus *C. pneumoniae* könnten zusammen mit CPn0147 eine Rolle in der Rekrutierung der Lipidtröpfchen spielen.

CPn0147 interagiert in diesem Assay weder mit sich selbst noch mit IncA oder den untersuchten Lda-homologen Proteinen aus *C. pneumoniae*.

CPn0399 ist nur schwach homolog zu Lda1, die Homologie ist deutlich geringer als die von Lda3 und CPn0592. Es finden sich insgesamt nur zwei homologe Abschnitte: der erste Abschnitt umfasst 28 Aminosäuren, hier sind beide Proteine zu 61% homolog. Der zweite Abschnitt weist eine Länge von 18 Aminosäuren und eine Homologie von 44% auf. Die beiden Proteine haben außerdem eine sehr unterschiedliche Größe, während Lda1 aus 113 AS besteht, ist CPn0399 mit 215 AS fast doppelt so groß. Es wäre also denkbar, dass das Protein aus *C. pneumoniae* keine Funktion in der Lipidtröpfchen-Aufnahme in die Inklusion besitzt.

Auch in den Transfektionsanalysen mit Volllängen-CPn0147 (Lokalisierung im ER) und CPn0147 ohne Transmembranbereich (zytoplasmatische Lokalisierung) konnte keine komplette Kolo-kalisierung mit dem Lda3-Homolog CPn0592 gezeigt werden. Für das Lda3-Homolog CPn0592 konnte jedoch, vergleichbar zu Lda3, eine Lokalisierung auf den Lipidtröpfchen nach transienter Expression gezeigt werden. CPn0592 könnte also in *C. pneumoniae* eine ähnliche Funktion erfüllen, die für Lda3 aus *C. trachomatis* vermutet wird. Allerdings lokalisierte CPn0592 als GFP-Fusion im Gegensatz zu Lda3 nicht an der Inklusionsmembran, es gibt also strukturelle Unterschiede. Die mikroskopischen Analysen zeigten, dass CPn0592 nicht ausschließlich auf Lipidtröpfchen lokalisierte, sondern zusätzlich retikuläre und vesikelartige Strukturen anfärbte. Ein Grund hierfür könnte der hydrophobe Bereich des Proteins sein, der möglicherweise eine Transmembrandomäne bildet. Dies könnte zu einer teilweisen Lokalisierung im ER der humanen Zelle führen. Diese Strukturen zeigten zudem eine Kolo-kalisierung mit transient exprimiertem Volllängen-CPn0147, welches erwiesenermaßen im ER der Humanzelle lokalisiert.

Für das IncA-Protein aus *C. trachomatis* konnte mittels Zwei-Hybrid-Analyse eine Interaktion mit sich selbst gezeigt werden, das IncA-Protein aus *C. psittaci* jedoch interagiert nicht mit sich selbst (Hackstadt, Scidmore-Carlson et al. 1999). Für *C. pneumoniae* wurde eine IncA-Interaktion mit sich selbst bisher nicht untersucht. Die IncA-Proteine sind allerdings

untereinander wenig homolog, was im Übrigen für die meisten Inc-Proteine gilt. Dies deutet darauf hin, dass auch die unterschiedlichen Funktionen der Proteine nicht unbedingt konserviert sind. So führt zum Beispiel die ektopische Expression von *C. trachomatis*- und *C. caviae*-IncA zu einer Reduktion einer nachfolgenden Infektion, für IncA aus *C. pneumoniae* und auch für CPn0147 ist dies nicht der Fall (Delevoye, Nilges et al. 2004; Luo, Liu et al. 2007). Für IncA aus *C. trachomatis* konnten bisher einige wichtige Funktionen ermittelt werden, unter anderem die Interaktion mit SNARE-Proteinen und die Fusion von Inklusionen (Suchland, Rockey et al. 2000; Delevoye, Nilges et al. 2008). Einige Serovare von *C. trachomatis* besitzen jedoch gar kein IncA und zeigen auch keine Fusion der Inklusionen bei multipler Infektion (Suchland, Rockey et al. 2000). Hier muss also ein anderes Protein wenigstens einen Teil der Funktionen von IncA übernehmen. In der Annahme, dass die IncA- bzw. CPn0147-Fäden eine wichtige Funktion besitzen, nämlich die Rekrutierung von Lipidtröpfchen, wäre es interessant herauszufinden, welche Proteine bei diesen Serovaren auf den Fäden zu finden sind oder ob diese Serovare gar keine Fäden ausbilden. Da CPn0147 ein *C. pneumoniae*-spezifisches Protein ist, müsste es sich hierbei dann um ein nicht-homologes anderes Inc-Protein handeln.

Die Transfektionsanalysen deuten darauf hin, dass zumindest bei ektopischer Expression von CPn0147 in Volllänge keine Interaktion mit Proteinen in der Inklusionsmembran stattfindet, da das Protein nicht mit der Inklusionsmembran kolokalisierte. Dies kann natürlich auch darauf zurückzuführen sein, dass bei Expression des Volllängenproteins eine falsche Lokalisierung im ER vorliegt und das Protein deshalb nicht in der Lage ist, mit Proteinen der Inklusionsmembran zu interagieren. Die Expression einer Variante ohne Transmembranbereich zeigte keine Kolokalisierung an der Inklusionsmembran, jedoch war das Signal an der Inklusionsmembran verstärkt und deutet auf eine mögliche Interaktion hin. Es könnte sein, dass diese Variante auf der Inklusionsmembran lokalisiert.

#### **5.8.3.1 Mögliche Interaktionspartner von CPn0147**

Als humane Interaktionspartner kommen für CPn0147 unter anderem Lipidtröpfchen-assoziierte Proteine in Frage. So konnte für Lda3 aus *C. trachomatis* gezeigt werden, dass die transiente Expression von Lda3 zu einer Verdrängung von ADFP auf der Oberfläche der Lipidtröpfchen führte und dass die Lda3-markierten Lipidtröpfchen dann in die Inklusion aufgenommen werden (Cocchiario, Kumar et al. 2008). Neben ADFP sind jedoch noch viele weitere Proteine auf der Oberfläche von Lipidtröpfchen zu finden. ADFP gehört aber zu den ubiquitär zu findenden Lipidtröpfchen-assoziierten Proteinen, während zum Beispiel Perilipin (PLIN1) gewebespezifisch exprimiert wird und hauptsächlich in Adipozyten, steroidogenen Zellen und wahrscheinlich in aus Makrophagen entstandenen Schaumzellen vorkommt. ADFP und Perilipin sind außerdem konstitutiv an die Lipidtröpfchen gebunden und werden

ungebunden relativ schnell abgebaut, während andere Proteine (wie zum Beispiel TIP47) auch zytosolisch stabil sind (Bickel, Tansey et al. 2009). Aufgrund dieser Daten kommt vor allem ADPR als Interaktionspartner in Frage. Perilipin ist jedoch auch ein interessanter Kandidat. Dieses Protein wird zwar nicht in den verwendeten Zelllinien, aber wahrscheinlich in den so genannten Schaumzellen exprimiert. Schaumzellen werden durch eine massive Lipidtröpfchen-Einlagerung sowohl aus Makrophagen als auch aus glatten Muskelzellen gebildet. Sie bilden einen Großteil der arteriosklerotischen Läsionen (Buers, Hofnagel et al. 2011). Da auch *C. pneumoniae* in Zusammenhang mit Arteriosklerose gebracht wird und in diesen Läsionen gefunden wurde, könnte also ein Zusammenhang bestehen.

#### 5.8.4 Ein hypothetisches Modell der Funktion von CPn0147

Die genaue Funktion von CPn0147 in der Infektion konnte nicht aufgeklärt werden. Die ermittelten Daten legen aber eine Funktion in der Rekrutierung und Aufnahme von Lipidtröpfchen in die Inklusion nahe.

Einige der gefundenen Daten unterstützen auch die bereits für die IncA-Fäden aus *C. trachomatis* ermittelte Funktion in der Bildung von Sekundärinklusionen. Allerdings scheint es sich hier, zumindest in *C. pneumoniae*, um eine untergeordnete Rolle der Fäden zu handeln, da nur sehr selten ein DAPI-Signal, also möglicherweise ein Bakterium, auf einem Faden beobachtet werden konnte. Eine Bildung von Sekundärinklusionen konnte nicht nachgewiesen werden. Es bleibt auch fraglich, in welcher Hinsicht die Lokalisierung der Fäden in der Nähe des Zellkerns wichtig ist. Da angenommen wird, dass Lipidtröpfchen am ER gebildet werden, könnte auch hier die Rekrutierung von Lipidtröpfchen ausschlaggebend sein, so dass diese direkt nach ihrer Bildung am ER angefangen und zur Inklusion umgeleitet werden. Die Lipidtröpfchen, die an der Inklusionsmembran detektiert wurden, waren fast immer CPn0147-positiv, was darauf hin deutet, dass CPn0147 neben der Rekrutierung auch eine Funktion in der Aufnahme der Lipidtröpfchen in die Inklusion haben könnte. Die Lipidtröpfchen werden innerhalb der Inklusion wahrscheinlich sehr schnell abgebaut, da in den Immunfluoreszenz-Analysen in dieser Arbeit keine Lipidtröpfchen innerhalb der Inklusion detektiert werden konnten. In den Analysen von Cocchiario et al. konnten Lipidtröpfchen in der Inklusion mittels EM-Aufnahmen detektiert werden, es war aber keine Akkumulierung zu beobachten. Die Autoren schlossen daraus, dass die Lipidtröpfchen aufgebraucht werden, wahrscheinlich über die Lipasen, die auf der Oberfläche der Lipidtröpfchen zu finden sind. Die Lipolyse könnte durch das Verdrängen von ADFP durch Lda3 von der Lipidtröpfchen-Oberfläche ermöglicht werden (Cocchiario, Kumar et al. 2008).

Die Beobachtung von Kumar et al., dass eine Disruption des Zytoskeletts eine vermehrte Fadenbildung zur Folge hat, lassen sich nicht mit der vermuteten Funktion der Fäden in dem Erwerb der Lipidtröpfchen vereinen (Kumar and Valdivia 2008). Allerdings handelt es sich

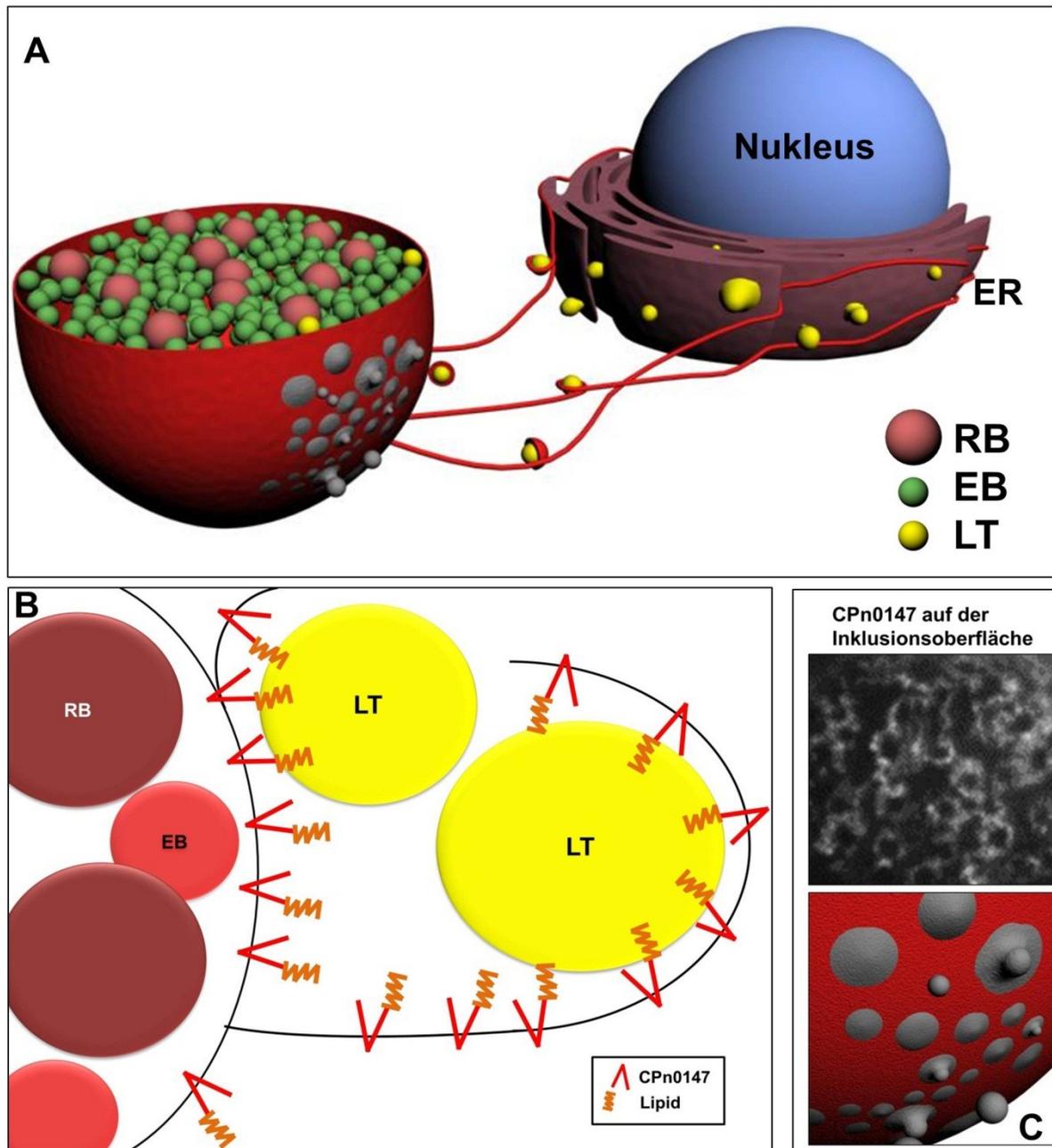
hier auch um eine artifizielle Situation, da normalerweise während der gesamten intrazellulären Entwicklung die Inklusionsmembran stabil bleibt und die Zytoskelett-Schutzhülle nicht abgebaut wird, so dass die beobachtete Fadenbildung eventuell ein Artefakt ist. Es wäre aber auch denkbar, dass gegen Ende der intrazellulären Entwicklung die Schutzhülle abgebaut wird und deshalb gegen Ende der Entwicklung mehr Fäden zu detektieren sind. Allerdings deuten die in dieser Arbeit und in der Arbeit von Kumar et al. durchgeführten Immunfluoreszenz-Analysen nicht auf einen Abbau der Zytoskelett-Hülle gegen Ende der Infektion hin.

Für die Rekrutierung der Lipidtröpfchen mittels CPn0147 sind zwei Wege vorstellbar (Abbildung 88). Zum einen könnte das Protein aus der Inklusionsmembran oder dem (vermutlich membranösen) Faden herausgelöst und dann auf das Lipidtröpfchen übertragen werden, um dieses zu markieren. CPn0147-positive Lipidtröpfchen würden dann auf den Fäden zur Inklusionsmembran transportiert oder dort direkt aufgenommen werden. Vermutlich geschieht dies unter Beteiligung eines oder mehrerer Lda-Proteine, die gleichzeitig dafür sorgen, dass das schützende ADFP von der Oberfläche der Lipidtröpfchen verdrängt wird. Diese Theorie wird von der Beobachtung von Cocchiaro et al. gestützt, dass Lipidtröpfchen innerhalb der Inklusion mit IncA-haltigen Membranen assoziiert vorlagen, was auf einen endozytotischen Vorgang an der Inklusionsmembran schließen lässt (Cocchiaro, Kumar et al. 2008).

Das Herauslösen eines membranständigen Proteins ist jedoch eher unwahrscheinlich. Daher ist der folgende Ablauf ebenfalls denkbar: Ein Lipidtröpfchen wird von einer kompletten CPn0147-haltigen Membran (entweder direkt aus der Inklusionsmembran oder von einem Faden stammend) ummantelt. CPn0147 könnte hierbei möglicherweise über ein N-terminal angehängtes Lipid in das Lipidtröpfchen inserieren (Abbildung 88 B). Die auf diese Weise das Lipidtröpfchen umgebende Membran fusioniert dann wieder mit der Inklusionsmembran. Bei längeren Distanzen könnte der Transport entlang der Fäden geschehen. Auf diese Weise gelangt das komplette Lipidtröpfchen in die Inklusion.

Eine Fusion eines Lipidtröpfchen mit der Inklusionsmembran konnte nicht beobachtet werden: in den Studien von Cocchiaro et al. wurden intakte Lipidtröpfchen innerhalb der Inklusion gefunden, die von einer Membran umgeben waren (Cocchiaro, Kumar et al. 2008). Bei einer Fusion würde das Lipidtröpfchen nur mit der äußeren Phospholipidschicht verschmelzen (ähnlich seiner Entstehung am ER) und nicht in die Inklusion gelangen. Daher ist diese Variante sehr wahrscheinlich auszuschließen.

CPn0147 lokalisiert in der Inklusionsmembran in ringförmigen Strukturen (Abbildung 88 C). Diese könnten die Eintrittsstellen für die Lipidtröpfchen markieren oder, wie zu Beginn diskutiert, die Überreste von Vesikelmembranen sein, die zuvor mit der Inklusion fusioniert sind.



**Abbildung 88: Hypothetisches Modell der Funktion von CPn0147**

CPn0147 in den Fäden oder der Inklusionsmembran ist in rot dargestellt. 3D-Darstellung mit 3D Studio Max in Zusammenarbeit mit Sven Faltus. LT= Lipidtröpfchen.

- A) Die Inklusionsmembran bildet CPn0147-haltige, membranöse Fäden aus, die zum Kern und ER der Wirtszelle reichen und dort Lipidtröpfchen (LT) abfangen. Diese werden entweder von einer kompletten Membran umgeben oder CPn0147 inseriert vom Faden aus in die Membran der LT. Vesikel vom Golgi- und ER fusionieren mit der Inklusionsmembran (grau).
- B) Modell für die Ummantelung der Lipidtröpfchen (LT) mit einer CPn0147-haltigen Membran, entweder von einem Faden stammend oder direkt von der Inklusionsmembran. CPn0147 inseriert hierbei über das angehängte Lipid in das LT.
- C) Immunfluoreszenzaufnahme der Oberfläche nach Färbung mit dem CPn0147-Antikörper (oben) und hypothetisches Modell für die Entstehung der sichtbaren „löchrigen“ Strukturen durch Fusion von CPn0147-freien Vesikeln (grau) mit der CPn0147-haltigen Inklusionsmembran (rot).

## Literaturverzeichnis

- Abromaitis, S. and R. S. Stephens (2009). "Attachment and entry of Chlamydia have distinct requirements for host protein disulfide isomerase." *PLoS Pathog* **5**(4): e1000357.
- Al-Younes, H. M., T. Rudel, et al. (2001). "Low iron availability modulates the course of Chlamydia pneumoniae infection." *Cell Microbiol* **3**(6): 427-437.
- Al-Younes, H. M., T. Rudel, et al. (1999). "Characterization and intracellular trafficking pattern of vacuoles containing Chlamydia pneumoniae in human epithelial cells." *Cell Microbiol* **1**(3): 237-247.
- Alzhanov, D. T., S. K. Weeks, et al. (2009). "Cytokinesis is blocked in mammalian cells transfected with Chlamydia trachomatis gene CT223." *BMC Microbiol* **9**: 2.
- Arnold, R., S. Brandmaier, et al. (2009). "Sequence-based prediction of type III secreted proteins." *PLoS Pathog* **5**(4): e1000376.
- Balin, B. J. and D. M. Appelt (2001). "Role of infection in Alzheimer's disease." *J Am Osteopath Assoc* **101**(12 Suppl Pt 1): S1-6.
- Balin, B. J., C. S. Little, et al. (2008). "Chlamydia pneumoniae and the etiology of late-onset Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis* **13**(4): 371-380.
- Balsara, Z. R., N. R. Roan, et al. (2006). "Developmental regulation of Chlamydia trachomatis class I accessible protein-1, a CD8+ T cell antigen." *J Infect Dis* **193**(10): 1459-1463.
- Bannantine, J. P., R. S. Griffiths, et al. (2000). "A secondary structure motif predictive of protein localization to the chlamydial inclusion membrane." *Cell Microbiol* **2**(1): 35-47.
- Bartz, R., W. H. Li, et al. (2007). "Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic." *J Lipid Res* **48**(4): 837-847.
- Beatty, W. L. (2006). "Trafficking from CD63-positive late endocytic multivesicular bodies is essential for intracellular development of Chlamydia trachomatis." *J Cell Sci* **119**(Pt 2): 350-359.
- Beeckman, D. S. and D. C. Vanrompay (2009). "Zoonotic Chlamydia psittaci infections from a clinical perspective." *Clin Microbiol Infect* **15**(1): 11-17.
- 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): 8478-8483.
- Bickel, P. E., J. T. Tansey, et al. (2009). "PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores." *Biochim Biophys Acta* **1791**(6): 419-440.
- Birkelund, S., A. G. Lundemose, et al. (1990). "The 75-kilodalton cytoplasmic Chlamydia trachomatis L2 polypeptide is a DnaK-like protein." *Infect Immun* **58**(7): 2098-2104.
- Blasi, F., P. Tarsia, et al. (2009). "Chlamydia pneumoniae." *Clin Microbiol Infect* **15**(1): 29-35.
- Bonneu, M., M. Crouzet, et al. (1991). "Direct detection of yeast mutants with reduced viability on plates by erythrosine B staining." *Anal Biochem* **193**(2): 225-230.
- Brown, W. J., Y. A. Skeiky, et al. (2002). "Chlamydial antigens colocalize within IncA-laden fibers extending from the inclusion membrane into the host cytosol." *Infect Immun* **70**(10): 5860-5864.
- Buddelmeijer, N., M. Krehenbrink, et al. (2009). "Type II secretion system secretin PulD localizes in clusters in the Escherichia coli outer membrane." *J Bacteriol* **191**(1): 161-168.
- Buers, I., O. Hofnagel, et al. (2011). "Lipid droplet associated proteins: an emerging role in atherogenesis." *Histol Histopathol* **26**(5): 631-642.
- Busch, M., R. Thoma, et al. (2000). "Occurrence of chlamydiae in the genital tracts of sows at slaughter and their possible significance for reproductive failure." *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **47**(6): 471-480.
- Buttner, S., D. Ruli, et al. (2011). "A yeast BH3-only protein mediates the mitochondrial pathway of apoptosis." *EMBO J* **30**(14): 2779-2792.
- Byrne, G. I., L. K. Lehmann, et al. (1986). "Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular Chlamydia psittaci replication in T24 cells." *Infect Immun* **53**(2): 347-351.
- Cain, R. J., R. D. Hayward, et al. (2008). "Deciphering interplay between Salmonella invasion effectors." *PLoS Pathog* **4**(4): e1000037.
- 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): 1161-1176.
- 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): 2278-2288.
- 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): 3793-3803.
- Carmona-Gutierrez, D., T. Eisenberg, et al. (2010). "Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines." *Cell Death Differ* **17**(5): 763-773.
- Carter, J. D., R. D. Inman, et al. (2011). "Chlamydia and chronic arthritis." *Ann Med*.
- Chellas-Gery, B., K. Wolf, et al. (2011). "Biochemical and Localization Analyses of Putative Type III Secretion Translocator Proteins CopB and CopB2 of Chlamydia trachomatis Reveal Significant Distinctions." *Infect Immun* **79**(8): 3036-3045.
- Chen, D., L. Lei, et al. (2010). "Secretion of the chlamydial virulence factor CPAF requires the Sec-dependent pathway." *Microbiology* **156**(Pt 10): 3031-3040.
- Choi, D. S., D. K. Kim, et al. (2011). "Proteomic analysis of outer membrane vesicles derived from Pseudomonas aeruginosa." *Proteomics* **11**(16): 3424-3429.

- Christian, J., J. Vier, et al. (2010). "Cleavage of the NF- $\kappa$ B family protein p65/RelA by the chlamydial protease-like activity factor (CPAF) impairs proinflammatory signaling in cells infected with Chlamydiae." *J Biol Chem* **285**(53): 41320-41327.
- Christian, J. G., J. Heymann, et al. (2011). "Targeting of a chlamydial protease impedes intracellular bacterial growth." *PLoS Pathog* **7**(9): e1002283.
- Clarke, S. R., L. G. Harris, et al. (2002). "Analysis of Ehb, a 1.1-megadalton cell wall-associated fibronectin-binding protein of Staphylococcus aureus." *Infect Immun* **70**(12): 6680-6687.
- 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): 441-449.
- 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): 10166-10171.
- Cocchiario, J. L., Y. Kumar, et al. (2008). "Cytoplasmic lipid droplets are translocated into the lumen of the Chlamydia trachomatis parasitophorous vacuole." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(27): 9379-9384.
- Collier-Hyams, L. S., V. Sloane, et al. (2005). "Cutting edge: bacterial modulation of epithelial signaling via changes in neddylation of cullin-1." *J Immunol* **175**(7): 4194-4198.
- Cortes, C., K. A. Rzomp, et al. (2007). "Chlamydia pneumoniae inclusion membrane protein Cpn0585 interacts with multiple Rab GTPases." *Infect Immun* **75**(12): 5586-5596.
- Dautry-Varsat, A., A. Subtil, et al. (2005). "Recent insights into the mechanisms of Chlamydia entry." *Cell Microbiol* **7**(12): 1714-1722.
- 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): 2914-2924.
- Dehoux, P., R. Flores, et al. (2011). "Multi-genome identification and characterization of chlamydiae-specific type III secretion substrates: the Inc proteins." *BMC Genomics* **12**: 109.
- Delevoye, C., M. Nilges, et al. (2004). "Conservation of the biochemical properties of IncA from Chlamydia trachomatis and Chlamydia caviae: oligomerization of IncA mediates interaction between facing membranes." *J Biol Chem* **279**(45): 46896-46906.
- Delevoye, C., M. Nilges, et al. (2008). "SNARE protein mimicry by an intracellular bacterium." *PLoS Pathog* **4**(3): e1000022.
- Derre, I., R. Swiss, et al. (2011). "The Lipid Transfer Protein CERT Interacts with the Chlamydia Inclusion Protein IncD and Participates to ER-Chlamydia Inclusion Membrane Contact Sites." *PLoS Pathog* **7**(6): e1002092.
- Dong, F., H. Su, et al. (2004). "Cleavage of host keratin 8 by a Chlamydia-secreted protease." *Infect Immun* **72**(7): 3863-3868.
- 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, A. (2010). Identifizierung von Interaktionspartnern des putativen Effektorproteins Cpn0809 von Chlamydia pneumoniae. *Lehrstuhl für Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen*. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität.
- Engel, J. (2004). "Tarp and Arp: How Chlamydia induces its own entry." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(27): 9947-9948.
- Entian, K. D., T. Schuster, et al. (1999). "Functional analysis of 150 deletion mutants in Saccharomyces cerevisiae by a systematic approach." *Mol Gen Genet* **262**(4-5): 683-702.
- 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**: 415-440.
- Everett, K. D. and T. P. Hatch (1995). "Architecture of the cell envelope of Chlamydia psittaci 6BC." *J Bacteriol* **177**(4): 877-882.
- Fields, K. A., E. R. Fischer, et al. (2005). "Analysis of putative Chlamydia trachomatis chaperones Scc2 and Scc3 and their use in the identification of type III secretion substrates." *J Bacteriol* **187**(18): 6466-6478.
- 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): 1048-1060.
- Fields, K. A. and T. Hackstadt (2002). "The chlamydial inclusion: escape from the endocytic pathway." *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 221-245.
- Fields, K. A., D. J. Mead, et al. (2003). "Chlamydia trachomatis type III secretion: evidence for a functional apparatus during early-cycle development." *Mol Microbiol* **48**(3): 671-683.
- Fink, G. R., Hicks, J.B., Sherman, F. (1983). Methods in yeast genetics, laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Fling, S. P., R. A. Sutherland, et al. (2001). "CD8+ T cells recognize an inclusion membrane-associated protein from the vacuolar pathogen Chlamydia trachomatis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(3): 1160-1165.
- Friis, R. R. (1972). "Interaction of L cells and Chlamydia psittaci: entry of the parasite and host responses to its development." *J Bacteriol* **110**(2): 706-721.
- Fryden, A., E. Kihlstrom, et al. (1989). "A clinical and epidemiological study of "ornithosis" caused by Chlamydia psittaci and Chlamydia pneumoniae (strain TWAR)." *Scand J Infect Dis* **21**(6): 681-691.
- Gerard, H. C., J. A. Whittum-Hudson, et al. (2009). "Molecular biology of infectious agents in chronic arthritis." *Rheum Dis Clin North Am* **35**(1): 1-19.

- Gietz, R. D., R. H. Schiestl, et al. (1995). "Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure." *Yeast* **11**(4): 355-360.
- Giles, D. K., J. D. Whittimore, et al. (2006). "Ultrastructural analysis of chlamydial antigen-containing vesicles everting from the Chlamydia trachomatis inclusion." *Microbes Infect* **8**(6): 1579-1591.
- Giles, D. K. and P. B. Wyrick (2008). "Trafficking of chlamydial antigens to the endoplasmic reticulum of infected epithelial cells." *Microbes Infect* **10**(14-15): 1494-1503.
- Goure, J., A. Pastor, et al. (2004). "The V antigen of Pseudomonas aeruginosa is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes." *Infect Immun* **72**(8): 4741-4750.
- Graham, F. L., J. Smiley, et al. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." *J Gen Virol* **36**(1): 59-74.
- Grayston, J. T. and L. A. Campbell (1999). "The role of Chlamydia pneumoniae in atherosclerosis." *Clin Infect Dis* **28**(5): 993-994.
- Grayston, J. T., S. P. Wang, et al. (1989). "Current knowledge on Chlamydia pneumoniae, strain TWAR, an important cause of pneumonia and other acute respiratory diseases." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **8**(3): 191-202.
- Greenberg, A. S., R. A. Coleman, et al. (2011). "The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans." *J Clin Invest* **121**(6): 2102-2110.
- Greub, G. (2010). "International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of the Chlamydiae." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**(11): 2691-2693.
- Grieshaber, S., J. A. Swanson, et al. (2002). "Determination of the physical environment within the Chlamydia trachomatis inclusion using ion-selective ratiometric probes." *Cell Microbiol* **4**(5): 273-283.
- 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): 3793-3802.
- Güldener, U. (2000). Funktionelle Genomanalyse in *Saccharomyces cerevisiae*, Justus-Liebig-Universität. **PhD**: 155.
- Gupta, R., P. Srivastava, et al. (2009). "Host immune responses to chlamydial inclusion membrane proteins B and C in Chlamydia trachomatis infected women with or without fertility disorders." *Reprod Biol Endocrinol* **7**: 38.
- Hackstadt, T., M. A. Scidmore-Carlson, et al. (1999). "The Chlamydia trachomatis IncA protein is required for homotypic vesicle fusion." *Cell Microbiol* **1**(2): 119-130.
- Hahn, D. L., R. W. Dodge, et al. (1991). "Association of Chlamydia pneumoniae (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adult-onset asthma." *JAMA* **266**(2): 225-230.
- Hammerschlag, M. R. (2000). "Chlamydia pneumoniae and the lung." *Eur Respir J* **16**(5): 1001-1007.
- Harkinezhad, T., T. Geens, et al. (2009). "Chlamydia psittaci infections in birds: a review with emphasis on zoonotic consequences." *Vet Microbiol* **135**(1-2): 68-77.
- Hatch, T. P., I. Allan, et al. (1984). "Structural and polypeptide differences between envelopes of infective and reproductive life cycle forms of Chlamydia spp." *J Bacteriol* **157**(1): 13-20.
- Hayes, C. S., S. K. Aoki, et al. (2010). "Bacterial contact-dependent delivery systems." *Annu Rev Genet* **44**: 71-90.
- 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.
- Heinzen, R. A. and T. Hackstadt (1997). "The Chlamydia trachomatis parasitophorous vacuolar membrane is not passively permeable to low-molecular-weight compounds." *Infect Immun* **65**(3): 1088-1094.
- Heinzen, R. A., M. A. Scidmore, et al. (1996). "Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of Coxiella burnetii and Chlamydia trachomatis." *Infect Immun* **64**(3): 796-809.
- Henderson, I. R. and A. C. Lam (2001). "Polymorphic proteins of Chlamydia spp.--autotransporters beyond the Proteobacteria." *Trends Microbiol* **9**(12): 573-578.
- Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia, et al. (1998). "The great escape: structure and function of the autotransporter proteins." *Trends Microbiol* **6**(9): 370-378.
- Herker, E. and M. Ott (2011). "Unique ties between hepatitis C virus replication and intracellular lipids." *Trends Endocrinol Metab* **22**(6): 241-248.
- Heuer, D., A. Rejman Lipinski, et al. (2009). "Chlamydia causes fragmentation of the Golgi compartment to ensure reproduction." *Nature* **457**(7230): 731-735.
- Hodinka, R. L. and P. B. Wyrick (1986). "Ultrastructural study of mode of entry of Chlamydia psittaci into L-929 cells." *Infect Immun* **54**(3): 855-863.
- Holden, D. W. (2002). "Trafficking of the Salmonella vacuole in macrophages." *Traffic* **3**(3): 161-169.
- Holland, I. B., L. Schmitt, et al. (2005). "Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review)." *Mol Membr Biol* **22**(1-2): 29-39.
- Hongliang, C., Z. Zhou, et al. (2010). "Serodiagnosis of Chlamydia pneumoniae infection using three inclusion membrane proteins." *J Clin Lab Anal* **24**(1): 55-61.
- Horn, M., M. Wagner, et al. (2000). "Neochlamydia hartmannellae gen. nov., sp. nov. (Parachlamydiaceae), an endoparasite of the amoeba Hartmannella vermiformis." *Microbiology* **146** ( Pt 5): 1231-1239.
- Huang, J., C. F. Lesser, et al. (2008). "The essential role of the CopN protein in Chlamydia pneumoniae intracellular growth." *Nature* **456**(7218): 112-115.
- Huh, W. K., J. V. Falvo, et al. (2003). "Global analysis of protein localization in budding yeast." *Nature* **425**(6959): 686-691.

- 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): 11430-11435.
- Igal, R. A., P. Wang, et al. (1997). "Triacsin C blocks de novo synthesis of glycerolipids and cholesterol esters but not recycling of fatty acid into phospholipid: evidence for functionally separate pools of acyl-CoA." *Biochem J* **324** ( Pt 2): 529-534.
- Jantos, C. A., S. Heck, et al. (1997). "Antigenic and molecular analyses of different Chlamydia pneumoniae strains." *J Clin Microbiol* **35**(3): 620-623.
- Jockusch, B. M. and P. L. Graumann (2011). "The Long Journey: Actin on the Road to Pro- and Eukaryotic Cells." *Rev Physiol Biochem Pharmacol*.
- Jorgensen, I., M. M. Bednar, et al. (2011). "The Chlamydia Protease CPAF Regulates Host and Bacterial Proteins to Maintain Pathogen Vacuole Integrity and Promote Virulence." *Cell Host Microbe* **10**(1): 21-32.
- Jorgensen, I. and R. H. Valdivia (2008). "Pmp-like proteins Pls1 and Pls2 are secreted into the lumen of the Chlamydia trachomatis inclusion." *Infect Immun* **76**(9): 3940-3950.
- Kalman, S., W. Mitchell, et al. (1999). "Comparative genomes of Chlamydia pneumoniae and C. trachomatis." *Nat Genet* **21**(4): 385-389.
- Kato, J. Y. and N. Yoneda-Kato (2009). "Mammalian COP9 signalosome." *Genes Cells* **14**(11): 1209-1225.
- Kaul, R., M. Allen, et al. (1996). "Sequence specific binding of chlamydial histone H1-like protein." *Nucleic Acids Res* **24**(15): 2981-2989.
- Kenny, B., R. DeVinney, et al. (1997). "Enteropathogenic E. coli (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells." *Cell* **91**(4): 511-520.
- Kerr, K., G. Entrican, et al. (2005). "Immunopathology of Chlamydia abortus infection in sheep and mice." *Res Vet Sci* **78**(1): 1-7.
- Krahmer, N., Y. Guo, et al. (2009). "SnapShot: Lipid Droplets." *Cell* **139**(5): 1024-1024 e1021.
- Kulp, A. and M. J. Kuehn (2010). "Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles." *Annu Rev Microbiol* **64**: 163-184.
- Kumar, Y., J. Cocchiaro, et al. (2006). "The obligate intracellular pathogen Chlamydia trachomatis targets host lipid droplets." *Curr Biol* **16**(16): 1646-1651.
- Kumar, Y. and R. H. Valdivia (2008). "Actin and intermediate filaments stabilize the Chlamydia trachomatis vacuole by forming dynamic structural scaffolds." *Cell Host Microbe* **4**(2): 159-169.
- Kyte, J. and R. F. Doolittle (1982). "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein." *J Mol Biol* **157**(1): 105-132.
- Le Negrate, G., A. Krieg, et al. (2008). "ChlaDub1 of Chlamydia trachomatis suppresses NF-kappaB activation and inhibits I kappa B alpha ubiquitination and degradation." *Cell Microbiol* **10**(9): 1879-1892.
- Levin, D. E. (2005). "Cell wall integrity signaling in Saccharomyces cerevisiae." *Microbiol Mol Biol Rev* **69**(2): 262-291.
- Li, Z., C. Chen, et al. (2008). "Characterization of fifty putative inclusion membrane proteins encoded in the Chlamydia trachomatis genome." *Infect Immun* **76**(6): 2746-2757.
- Lu, Q., J. Xu, et al. (2009). "Association between Chlamydia pneumoniae IgG antibodies and migraine." *J Headache Pain* **10**(2): 121-124.
- Lugert, R., M. Kuhns, et al. (2004). "Expression and localization of type III secretion-related proteins of Chlamydia pneumoniae." *Med Microbiol Immunol* **193**(4): 163-171.
- Luo, J., T. Jia, et al. (2007). "Localization of the hypothetical protein Cpn0585 in the inclusion membrane of Chlamydia pneumoniae-infected cells." *Microb Pathog* **42**(2-3): 111-116.
- Luo, J., G. Liu, et al. (2007). "Characterization of hypothetical proteins Cpn0146, 0147, 0284 & 0285 that are predicted to be in the Chlamydia pneumoniae inclusion membrane." *BMC Microbiol* **7**: 38.
- Machi, K., M. Azuma, et al. (2004). "Rot1p of Saccharomyces cerevisiae is a putative membrane protein required for normal levels of the cell wall 1,6-beta-glucan." *Microbiology* **150**(Pt 10): 3163-3173.
- Madeo, F., E. Frohlich, et al. (1997). "A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis." *J Cell Biol* **139**(3): 729-734.
- Martin, S. and R. G. Parton (2006). "Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(5): 373-378.
- Martin, S. J., C. P. Reutelingsperger, et al. (1995). "Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl." *J Exp Med* **182**(5): 1545-1556.
- Matsumoto, A. and G. P. Manire (1970). "Electron microscopic observations on the effects of penicillin on the morphology of Chlamydia psittaci." *J Bacteriol* **101**(1): 278-285.
- Matsumoto, A. and G. P. Manire (1970). "Electron Microscopic Observations on the Fine Structure of Cell Walls of Chlamydia psittaci." *J Bacteriol* **104**(3): 1332-1337.
- Mattei, P. J., E. Faudry, et al. (2011). "Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon." *FEBS J* **278**(3): 414-426.
- 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.
- McClarty, G. (1994). "Chlamydiae and the biochemistry of intracellular parasitism." *Trends Microbiol* **2**(5): 157-164.
- Misaghi, S., Z. R. Balsara, et al. (2006). "Chlamydia trachomatis-derived deubiquitinating enzymes in mammalian cells during infection." *Mol Microbiol* **61**(1): 142-150.
- Mital, J., N. J. Miller, et al. (2010). "Specific chlamydial inclusion membrane proteins associate with active Src family kinases in microdomains that interact with the host microtubule network." *Cell Microbiol* **12**(9): 1235-1249.

- 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): 403-419.
- Molleken, K., E. Schmidt, et al. (2010). "Members of the Pmp protein family of Chlamydia pneumoniae mediate adhesion to human cells via short repetitive peptide motifs." *Mol Microbiol* **78**(4): 1004-1017.
- Moore, E. R., E. R. Fischer, et al. (2008). "The chlamydial inclusion preferentially intercepts basolaterally directed sphingomyelin-containing exocytic vacuoles." *Traffic* **9**(12): 2130-2140.
- Muller, N., F. Sattelmacher, et al. (2008). "Characterization and intracellular localization of putative Chlamydia pneumoniae effector proteins." *Med Microbiol Immunol* **197**(4): 387-396.
- Murphy, D. J. (2011). "The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals." *Protoplasma*.
- Murra, G. (2005). Untersuchungen zu DNA-Microarray-Studien des genomweiten Genexpressionsprofils von Chlamydia pneumoniae. Lehrstuhl für Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität.
- Murra, G. (2010). Identifizierung und Charakterisierung von Adhäsionsproteinen des humanpathogenen Erregers Chlamydia pneumoniae. Lehrstuhl für Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. **Promotion.**
- Neyt, C. and G. R. Cornelis (1999). "Role of SycD, the chaperone of the Yersinia Yop translocators YopB and YopD." *Mol Microbiol* **31**(1): 143-156.
- Nikolaus, T., J. Deiwick, et al. (2001). "SseBCD proteins are secreted by the type III secretion system of Salmonella pathogenicity island 2 and function as a translocon." *J Bacteriol* **183**(20): 6036-6045.
- Noel, L., F. Thieme, et al. (2002). "Two novel type III-secreted proteins of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria are encoded within the hrp pathogenicity island." *J Bacteriol* **184**(5): 1340-1348.
- Ohsaki, Y., T. Maeda, et al. (2005). "Fixation and permeabilization protocol is critical for the immunolabeling of lipid droplet proteins." *Histochem Cell Biol* **124**(5): 445-452.
- Olofsson, S. O., P. Bostrom, et al. (2009). "Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids." *Biochim Biophys Acta* **1791**(6): 448-458.
- Ono, T., A. Losada, et al. (2003). "Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells." *Cell* **115**(1): 109-121.
- Ossewaarde, J. M., A. de Vries, et al. (1996). "Application of a Mycoplasma group-specific PCR for monitoring decontamination of Mycoplasma-infected Chlamydia sp. strains." *Appl Environ Microbiol* **62**(2): 328-331.
- 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): 7853-7856.
- Pantoja, L. G., R. D. Miller, et al. (2000). "Inhibition of Chlamydia pneumoniae replication in human aortic smooth muscle cells by gamma interferon-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase activity." *Infect Immun* **68**(11): 6478-6481.
- Papatheodorou, P., G. Domanska, et al. (2006). "The enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) Map effector is imported into the mitochondrial matrix by the TOM/Hsp70 system and alters organelle morphology." *Cell Microbiol* **8**(4): 677-689.
- Peeling, R. W. and R. C. Brunham (1996). "Chlamydiae as pathogens: new species and new issues." *Emerg Infect Dis* **2**(4): 307-319.
- Pennini, M. E., S. Perrinet, et al. (2010). "Histone methylation by NUP, a novel nuclear effector of the intracellular pathogen Chlamydia trachomatis." *PLoS Pathog* **6**(7): e1000995.
- Perfettini, J. L., V. Hospital, et al. (2003). "Cell death and inflammation during infection with the obligate intracellular pathogen, Chlamydia." *Biochimie* **85**(8): 763-769.
- Peters, J., D. P. Wilson, et al. (2007). "Type III secretion in Chlamydia." *Trends Microbiol* **15**(6): 241-251.
- Peterson, E. M., M. Hoshiko, et al. (1990). "Differences in susceptibilities of the lymphogranuloma venereum and trachoma biovars of Chlamydia trachomatis to neutralization by immune sera." *Infect Immun* **58**(4): 938-943.
- Petyaev, I. M., N. A. Zigangirova, et al. (2011). "Monoclonal antibodies against lipopolysaccharide of Chlamydia trachomatis with cross reactivity to human ApoB." *Hybridoma (Larchmt)* **30**(2): 131-136.
- Pirbhai, M., F. Dong, et al. (2006). "The secreted protease factor CPAF is responsible for degrading pro-apoptotic BH3-only proteins in Chlamydia trachomatis-infected cells." *J Biol Chem* **281**(42): 31495-31501.
- Pospischil, A., R. Thoma, et al. (2002). "[Abortion in humans caused by Chlamydia abortus (Chlamydia psittaci serovar 1)]." *Schweiz Arch Tierheilkd* **144**(9): 463-466.
- Qi, M., S. Gong, et al. (2011). "A Chlamydia trachomatis OmcB C-terminal fragment is released into the host cell cytoplasm and is immunogenic in humans." *Infect Immun* **79**(6): 2193-2203.
- Ramirez, J. A. (1996). "Isolation of Chlamydia pneumoniae from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis. The Chlamydia pneumoniae/Atherosclerosis Study Group." *Ann Intern Med* **125**(12): 979-982.
- Rejman Lipinski, A., J. Heymann, et al. (2009). "Rab6 and Rab11 regulate Chlamydia trachomatis development and golgin-84-dependent Golgi fragmentation." *PLoS Pathog* **5**(10): e1000615.
- Renvoise, A., V. Merhej, et al. (2011). "Intracellular Rickettsiales: Insights into manipulators of eukaryotic cells." *Trends Mol Med*.
- Rihl, M., L. Kohler, et al. (2006). "Persistent infection of Chlamydia in reactive arthritis." *Ann Rheum Dis* **65**(3): 281-284.
- Robbins, J. R., A. I. Barth, et al. (1999). "Listeria monocytogenes exploits normal host cell processes to spread from cell to cell." *J Cell Biol* **146**(6): 1333-1350.
- Rocha, E. P., O. Pradillon, et al. (2002). "A new family of highly variable proteins in the Chlamydia pneumoniae genome." *Nucleic Acids Res* **30**(20): 4351-4360.

- Rockey, D. D., D. Grosenbach, et al. (1997). "Chlamydia psittaci IncA is phosphorylated by the host cell and is exposed on the cytoplasmic face of the developing inclusion." *Mol Microbiol* **24**(1): 217-228.
- Rurangirwa, F. R., P. M. Dilbeck, et al. (1999). "Analysis of the 16S rRNA gene of micro-organism WSU 86-1044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order Chlamydiales: proposal of Waddliaceae fam. nov., Waddlia chondrophila gen. nov., sp. nov." *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 2**: 577-581.
- Russell, A. B., R. D. Hood, et al. (2011). "Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells." *Nature* **475**(7356): 343-347.
- Saka, H. A. and R. H. Valdivia (2010). "Acquisition of nutrients by Chlamydiae: unique challenges of living in an intracellular compartment." *Curr Opin Microbiol* **13**(1): 4-10.
- Salomon, D. and G. Sessa (2010). "Identification of growth inhibition phenotypes induced by expression of bacterial type III effectors in yeast." *J Vis Exp*(37).
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
- Sambrook, J., T. Maniatis, et al. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor laboratory.
- Schoehn, G., A. M. Di Guilmi, et al. (2003). "Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in Pseudomonas." *EMBO J* **22**(19): 4957-4967.
- Schwarzenbacher, R., F. Stenner-Liewen, et al. (2004). "Structure of the Chlamydia protein CADD reveals a redox enzyme that modulates host cell apoptosis." *J Biol Chem* **279**(28): 29320-29324.
- Schweitzer, K. and M. Naumann (2010). "Control of NF-kappaB activation by the COP9 signalosome." *Biochem Soc Trans* **38**(Pt 1): 156-161.
- Scidmore, M. A. and T. Hackstadt (2001). "Mammalian 14-3-3beta associates with the Chlamydia trachomatis inclusion membrane via its interaction with IncG." *Mol Microbiol* **39**(6): 1638-1650.
- 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): 913-925.
- Siggers, K. A. and C. F. Lesser (2008). "The Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a versatile model system for the identification and characterization of bacterial virulence proteins." *Cell Host Microbe* **4**(1): 8-15.
- Simeone, R., D. Bottai, et al. (2009). "ESX/type VII secretion systems and their role in host-pathogen interaction." *Curr Opin Microbiol* **12**(1): 4-10.
- Sisko, J. L., K. Spaeth, et al. (2006). "Multifunctional analysis of Chlamydia-specific genes in a yeast expression system." *Mol Microbiol* **60**(1): 51-66.
- Slepenkin, A., V. Motin, et al. (2003). "Temporal expression of type III secretion genes of Chlamydia pneumoniae." *Infect Immun* **71**(5): 2555-2562.
- Spector, I., N. R. Shochet, et al. (1983). "Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells." *Science* **219**(4584): 493-495.
- Stagljar, I., C. Korostensky, et al. (1998). "A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(9): 5187-5192.
- Stenner-Liewen, F., H. Liewen, et al. (2002). "CADD, a Chlamydia protein that interacts with death receptors." *J Biol Chem* **277**(12): 9633-9636.
- Stephens, R. S., G. Myers, et al. (2009). "Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of Chlamydia resolved." *FEMS Immunol Med Microbiol* **55**(2): 115-119.
- Stratton, C. W. and D. B. Wheldon (2006). "Multiple sclerosis: an infectious syndrome involving Chlamydophila pneumoniae." *Trends Microbiol* **14**(11): 474-479.
- Stuart, E. S., W. C. Webley, et al. (2003). "Lipid rafts, caveolae, caveolin-1, and entry by Chlamydiae into host cells." *Exp Cell Res* **287**(1): 67-78.
- Subtil, A., A. Blocker, et al. (2000). "Type III secretion system in Chlamydia species: identified members and candidates." *Microbes Infect* **2**(4): 367-369.
- 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): 1636-1647.
- 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.
- Suchland, R. J., D. D. Rockey, et al. (2000). "Isolates of Chlamydia trachomatis that occupy nonfusogenic inclusions lack IncA, a protein localized to the inclusion membrane." *Infect Immun* **68**(1): 360-367.
- Suchland, R. J., D. D. Rockey, et al. (2005). "Development of secondary inclusions in cells infected by Chlamydia trachomatis." *Infect Immun* **73**(7): 3954-3962.
- Summersgill, J. T., N. N. Sahney, et al. (1995). "Inhibition of Chlamydia pneumoniae growth in HEp-2 cells pretreated with gamma interferon and tumor necrosis factor alpha." *Infect Immun* **63**(7): 2801-2803.
- Suzuki, K., N. Sakata, et al. (1991). "Flow cytometric analysis of lipid droplet formation in cells of the human monocytic cell line, U937." *Biochem Cell Biol* **69**(8): 571-576.
- Thalmann, J., K. Janik, et al. (2010). "Actin re-organization induced by Chlamydia trachomatis serovar D--evidence for a critical role of the effector protein CT166 targeting Rac." *PLoS One* **5**(3): e9887.
- Tipples, G. and G. McClarty (1993). "The obligate intracellular bacterium Chlamydia trachomatis is auxotrophic for three of the four ribonucleoside triphosphates." *Mol Microbiol* **8**(6): 1105-1114.
- Todd, W. J. and H. D. Caldwell (1985). "The interaction of Chlamydia trachomatis with host cells: ultrastructural studies of the mechanism of release of a biovar II strain from HeLa 229 cells." *J Infect Dis* **151**(6): 1037-1044.
- 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.
- Tsukada, M. and Y. Ohsumi (1993). "Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." *FEBS Lett* **333**(1-2): 169-174.

- Tuteja, R. (2005). "Type I signal peptidase: an overview." *Arch Biochem Biophys* **441**(2): 107-111.
- Verna, J., A. Lodder, et al. (1997). "A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13804-13809.
- Viratyosin, W., L. A. Campbell, et al. (2002). "Intrastrain and interstrain genetic variation within a paralogous gene family in *Chlamydia pneumoniae*." *BMC Microbiol* **2**: 38.
- Wang, J., L. Chen, et al. (2009). "A chlamydial type III-secreted effector protein (Tarp) is predominantly recognized by antibodies from humans infected with *Chlamydia trachomatis* and induces protective immunity against upper genital tract pathologies in mice." *Vaccine* **27**(22): 2967-2980.
- Wang, J., K. M. Frohlich, et al. (2011). "Altered protein secretion of *Chlamydia trachomatis* in persistently infected human endocervical epithelial cells." *Microbiology* **157**(Pt 10): 2759-2771.
- Ward, M. E. and A. Murray (1984). "Control mechanisms governing the infectivity of *Chlamydia trachomatis* for HeLa cells: mechanisms of endocytosis." *J Gen Microbiol* **130**(7): 1765-1780.
- Warringer, J., E. Ericson, et al. (2003). "High-resolution yeast phenomics resolves different physiological features in the saline response." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26): 15724-15729.
- Watson, C. and N. J. Alp (2008). "Role of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis." *Clin Sci (Lond)* **114**(8): 509-531.
- Wehrl, W., V. Brinkmann, et al. (2004). "From the inside out--processing of the Chlamydial autotransporter PmpD and its role in bacterial adhesion and activation of human host cells." *Mol Microbiol* **51**(2): 319-334.
- WHO. (2011). "<http://www.who.int/en/>."
- Wolf, K., E. Fischer, et al. (2000). "Ultrastructural analysis of developmental events in *Chlamydia pneumoniae*-infected cells." *Infect Immun* **68**(4): 2379-2385.
- Wu, Y., Q. Li, et al. (2007). "Detecting protein-protein interactions by Far western blotting." *Nat Protoc* **2**(12): 3278-3284.
- 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): 181-187.
- Wylie, J. L., G. M. Hatch, et al. (1997). "Host cell phospholipids are trafficked to and then modified by *Chlamydia trachomatis*." *J Bacteriol* **179**(23): 7233-7242.
- Yonezawa, H., T. Osaki, et al. (2011). "Analysis of outer membrane vesicle protein involved in biofilm formation of *Helicobacter pylori*." *Anaerobe*.
- Yoon, H., C. Ansong, et al. (2011). "Discovery of *Salmonella* virulence factors translocated via outer membrane vesicles to murine macrophages." *Infect Immun* **79**(6): 2182-2192.
- Zhang, J. P. and R. S. Stephens (1992). "Mechanism of *C. trachomatis* attachment to eukaryotic host cells." *Cell* **69**(5): 861-869.
- Zhong, G. (2011). "Chlamydia trachomatis secretion of proteases for manipulating host signaling pathways." *Front Microbiol* **2**: 14.
- 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): 935-942.
- Zhong, G., L. Liu, et al. (2000). "Degradation of transcription factor RFX5 during the inhibition of both constitutive and interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class I expression in chlamydia-infected cells." *J Exp Med* **191**(9): 1525-1534.
- Zrieq, R. (2009). The Dual Function of the *Chlamydia pneumoniae* Cpn0572 Protein in Modulating the Host Actin Cytoskeleton. *Lehrstuhl für Funktionelle Genomforschung der Mikroporganismen*. Düsseldorf, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf. **Promotion**.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Genetische Verwandtschaft innerhalb der Gattung <i>Chlamydia</i> .....	15
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Typ III-Sekretionsapparates von <i>Chlamydia</i> .....	20
Abbildung 3: Schema des Entwicklungszyklus von <i>C. pneumoniae</i> .....	24
Abbildung 4: Übersicht über die Interaktionen der Chlamydien mit der Wirtszelle .....	26
Abbildung 5: A) Schematische Darstellung des Aufbaus eines Lipidtröpfchens .....	31
Abbildung 6: Schema der Durchführung des Screenings .....	81
Abbildung 7: Phloxin B-Phänotypisierung der isolierten Bankplasmide .....	82
Abbildung 8: Funktionsvorhersage der Kandidaten .....	85
Abbildung 9: Diagramm der Sekretionsvorhersage der isolierten Kandidaten .....	86
Abbildung 10: Subzelluläre Lokalisierung der Kandidaten in Hefezellen .....	90
Abbildung 11: FACS-Dotplot-Darstellungen des Hefe-Apoptose-Assays .....	92
Abbildung 12: Latrunculin B-Assay des Aktin-modulierenden Proteins CPn0572 .....	94
Abbildung 13: Latrunculin B-Assay in Hefe .....	95
Abbildung 14: Serieller Verdünnungstropftest der Kandidaten in Hefe .....	97
Abbildung 15: Sequenzvergleich von CT066 und CPn0350 .....	98
Abbildung 16: Mikroskopie der subzellulären Lokalisierung von CPn0350 in Hefe .....	99
Abbildung 17: Subzelluläre Lokalisierung von CPn0350 in Humanzellen .....	100
Abbildung 18: Immunfluoreszenz Vorversuche mit dem generierten Serum gegen CPn0350 .....	101
Abbildung 19: Western Blot-Analyse der Expression von CPn0350 .....	102
Abbildung 20: Western Blot-Analyse von RB- und EB-Fraktionen mit Antigen-gereinigtem $\alpha$ -CPn0350 .....	102
Abbildung 21: Lokalisierung von CPn0350 in infizierten Zellen .....	104
Abbildung 22: Schema von CPn0181 .....	105
Abbildung 23: Lokalisierung von CPn0181-GFP bei ektopischer Expression in Humanzellen .....	106
Abbildung 24: Western Blot-Analyse von RB- und EB-Fraktionen mit $\alpha$ -CPn0181 .....	108
Abbildung 25: Lokalisierung von CPn0181 in infizierten Zellen .....	109
Abbildung 26: Darstellung der vorhergesagten Domänen und der isolierten Screenfragmente .....	110
Abbildung 27: Subzelluläre Lokalisierung von CPn0472-GFP in Humanzellen .....	111
Abbildung 28: Expressionsanalysen von CPn0472 .....	112
Abbildung 29: Western Blot-Analyse von RB- und EB-Fraktionen mit $\alpha$ -CPn0472 .....	114
Abbildung 30: Lokalisierung von CPn0472 in infizierten Zellen .....	115
Abbildung 31: Transmembrandomänen-Vorhersage für CPn0809 .....	116
Abbildung 32: vorhergesagte Domänen von CPn0809 .....	117
Abbildung 33: Darstellung der isolierten Screenfragmente von CPn0809 und ihr Hefe-Phänotyp .....	118
Abbildung 34: Subzelluläre Lokalisierung von CPn0809 in Hefe .....	119
Abbildung 35: Subzelluläre Lokalisierung von CPn0809 und Calreticulin in Humanzellen .....	120
Abbildung 36: Expressionsanalyse von CPn0809 .....	121
Abbildung 37: Western Blot-Analyse von RB- und EB-Fraktionen mit $\alpha$ -CPn0809 .....	122
Abbildung 38: Lokalisierung von CPn0809 in infizierten Zellen .....	124
Abbildung 39: Darstellung der isolierten Screenfragmente und Domänenvorhersage von CPn1054 .....	126
Abbildung 40: Sequenzähnlichkeiten der paralogenen Gene der <i>cpn1054</i> -Genfamilie .....	127
Abbildung 41: Lokalisierung von CPn1054 bei ektopischer Expression in Humanzellen .....	128
Abbildung 42: Expressionsanalyse mit dem CPn1054-Antiserum .....	129
Abbildung 43: Western Blot-Analyse von RB- und EB-Fraktionen mit $\alpha$ -CPn1054 .....	131
Abbildung 44: CPn1054-Hintergrundfärbung nicht-infizierter Humanzellen .....	131
Abbildung 45: Lokalisierung von CPn1054 in der Infektion .....	132
Abbildung 46: Darstellung der isolierten Screenfragmente und vorhergesagten Domänen von CPn0147 .....	134
Abbildung 47: Serieller Verdünnungstropftest der für CPn0147 codierenden Screenplasmide .....	136
Abbildung 48: Lokalisierung von CPn0147-GFP in Hefezellen .....	137
Abbildung 49: Lokalisierung von CPn0147-GFP in Humanzellen .....	139
Abbildung 50: Lokalisierung von CPn0147 ohne Transmembranbereich in Humanzellen .....	140
Abbildung 51: Expressionsanalyse von CPn0147 .....	141
Abbildung 52: Western Blot-Analyse von RB- und EB-Fraktionen .....	142
Abbildung 53: Lokalisierung von CPn0147 zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion .....	143
Abbildung 54: Kolokalisierung von CPn0147 und IncA .....	144
Abbildung 55: Kolokalisierung von Momp mit den CPn0147-Fäden .....	145
Abbildung 56: Lokalisierung der Fäden in Kernnähe .....	146
Abbildung 57: Konfokale Mikroskopie infizierter Zellen mit CPn0147-Fäden .....	147
Abbildung 58: Quantifizierung der Fadenanzahl in Abhängigkeit von MOI und Infektionsdauer .....	148
Abbildung 59: Kolokalisierungsanalysen von Wirtszell-Strukturen mit den CPn0147-Fäden .....	150
Abbildung 60: CPn0147 und das ER .....	151
Abbildung 61: Vakuolen-ähnliche Strukturen, die von einer Inklusionsmembran umgeben sind .....	153
Abbildung 62: Detektion von DAPI-Signalen auf den CPn0147-Fäden .....	153
Abbildung 63: CPn0147-Fäden verbinden benachbarte Zellen .....	154
Abbildung 64: Immunfluoreszenz-Aufnahmen von CPn0147 15 hpi .....	155
Abbildung 65: Oberflächenanalyse der Inklusionsmembran .....	156
Abbildung 66: Antikörper-Transfektionen in infizierte Zellen .....	158

Abbildung 67: Schema der Fraktionierung infizierter Zellen: .....	159
Abbildung 68: Western Blot-Analyse der Zellfraktionierung 48 hpi .....	160
Abbildung 69: Western Blot-Analyse fraktionierter infizierter Zellen mit den anderen Kandidaten .....	161
Abbildung 70: Koloalysierung von CPn0147 und Lipidtröpfchen .....	162
Abbildung 71: Immunfluoreszenz der vesikulären CPn0147-Signale in infizierten Zellen .....	162
Abbildung 72: Lipidtröpfchen in infizierten und Ölsäure-behandelten Zellen .....	163
Abbildung 73: Coomassie-Gel des GST-Pulldowns mit Zytosol- und Membran-Lysaten .....	166
Abbildung 74: Lokalisierung von CPn0592 bei Expression in Humanzellen .....	167
Abbildung 75: Transfektion infizierter Zellen .....	168
Abbildung 76: Kotransfektion von CPn0147 und Cpn0592 in nicht-infizierten Zellen .....	169
Abbildung 77: Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse ausgesuchter Kandidaten mit CPn0147 .....	170
Abbildung 78: Quantifizierung der Fadenanzahl nach Ölsäurebehandlung .....	171
Abbildung 79: Immunfluoreszenz-Analyse der unterschiedlich behandelten infizierten Zellen .....	173
Abbildung 80: Quantifizierung der Fadenanzahl pro Inklusion .....	174
Abbildung 81: Bestimmung der Inklusionsgröße .....	175
Abbildung 82: Mikroskopie der Lipidtröpfchen-Fractionen aus infizierten Zellen .....	175
Abbildung 83: Western Blot-Analyse der Lipidtröpfchen-Fraktionierung .....	176
Abbildung 84: Koloalysierung von CPn0147-positiven Lipidtröpfchen und CPn0147-Fäden .....	177
Abbildung 85: Konfokale Mikroskopie von infizierten Zellen nach Ölsäure-Stimulation .....	179
Abbildung 86: Immunfluoreszenz von CPn0809 und CopB .....	190
Abbildung 87: Modell der favorisierten potentiellen Funktionen der Kandidaten .....	195
Abbildung 88: Hypothetisches Modell der Funktion von CPn0147 .....	209

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

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

Ein großes Dankeschön gilt auch Herrn Prof. Dr. H. Aberle für die bereitwillige Übernahme des Koreferats und das Interesse an meiner Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich auch bei Dr. Anne Kerres, mit der ich den gesamten Screen in teilweise sehr amüsanten Nacht- und Spätschichten durchgeführt habe und ohne die ich das sicher nicht geschafft hätte. Ein extradickes Dankeschön geht auch an Frau Dr. Katja Mölleken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und für jeden Labornotfall ein offenes Ohr und eine Lösung parat hat.

Ich habe mich in der Arbeitsgruppe immer sehr wohl gefühlt, nicht zuletzt weil jeder Einzelne auf seine Weise hilfsbereit, freundlich und humorvoll ist. Ich werde euch vermissen. Danke also an alle meine lieben (Ex-)Kollegen aus dem Hefe- und Chlamydienlabor (Katja, Boris, Astrid, Elli, Tim, Rafat, Sandra, Sonja, Sebastian, Irina und auch an die „Verflossenen“). Nicht zu vergessen natürlich unser nettes Nachbarlabor, liebe „Pombes“ (Marcus, Boris, Visnja, Steffi, Jenni, Andrea, Pascal und Eva), auch euch werde ich vermissen. Euch allen danke für die tollen Kaffeepausen, Ausflüge, Cocktailabende, Karnevalsfeiern, Radtouren, Partys und was wir sonst noch so zusammen unternommen haben.

Auch bei Steffi Hesse, Dr. Inge Krümpelbeck, Gabi Abel und Klaus Meyer möchte ich mich hiermit für die schöne Zeit bedanken.

Ein riesengroßer Dank geht an meine Familie, die mich immer unterstützt hat und für mich da war und mir das Studium und diese Doktorarbeit überhaupt erst ermöglicht hat. Zudem möchte ich mich bei meinem Freund Sven bedanken, der immer zu mir gehalten hat, auch wenn wir uns manchmal kaum gesehen haben. Danke, dass es Euch gibt!

## **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.

Frauke Herbst