

**Charakterisierung der neuen, potentiellen Adhäsine  
Yaa1, Yaa2 und Yaa3 von *Chlamydia pneumoniae***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Tim Fechtner**

aus Duisburg

Düsseldorf, Dezember 2012

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. med. Klaus D. Pfeffer

Tag der mündlichen Prüfung: 29.01.2013

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>iii</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>x</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>xii</b>
<b>Summary .....</b>	<b>xiv</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Chlamydien .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Taxonomie.....	1
1.1.2 Pathogenität.....	2
1.1.2.1 <i>C. pneumoniae</i> Infektionen.....	3
1.1.2.2 <i>C. trachomatis</i> Infektionen .....	4
1.1.3 Biologie der Chlamydien .....	5
1.1.3.1 Der chlamydiale Außenmembrankomplex (cOMC) .....	5
1.1.3.2 Der chlamydiale Entwicklungszyklus .....	6
<b>1.2 Humane Endozytose .....</b>	<b>8</b>
1.2.1 Lipid Rafts .....	8
1.2.2 Clathrin-abhängige Endozytose .....	10
1.2.3 Clathrin-unabhängige Endozytose.....	11
1.2.4 Ausnutzung der Endozytose durch Bakterien und Viren.....	12
1.2.5 Lipid Rafts und die Adhäsion und Internalisierung von Pathogenen.....	13
<b>1.3 Zelluläre Adhäsion und Invasion humanpathogener Bakterien.....</b>	<b>15</b>
1.3.1 Bakterielle Adhäsine.....	15
1.3.2 Grundlegende Invasionsmechanismen .....	18
1.3.3 Invasionsstrategien humanpathogener Bakterien.....	19
<b>1.4 Adhäsion und Internalisierung bei Chlamydien.....</b>	<b>23</b>
1.4.1 Kontaktaufnahme.....	24
1.4.2 Adhäsion .....	27
1.4.3 Internalisierung .....	30
1.4.4 Identifizierung neuer, potentieller chlamydialer Adhäsine.....	33
<b>1.5 Zielsetzung.....</b>	<b>34</b>

---

<b>2</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>35</b>
2.1	Gebrauchsartikel .....	35
2.2	Geräte und Maschinen .....	35
2.3	Chemikalien .....	36
2.4	Agarosen/Sepharosen, Latexkügelchen und Färbemittel .....	39
2.5	Enzyme .....	39
2.6	Puffer und Lösungen .....	40
2.7	Antikörper .....	41
2.8	Kits .....	42
2.9	Größenstandards .....	42
2.10	Oligonukleotide .....	42
2.11	Plasmide .....	44
2.12	Zellen und Zelllinien .....	46
2.12.1	Prokaryotische Zellen und Zelllinien .....	46
2.12.2	Eukaryotische Zellen und Zelllinien .....	46
2.13	Medien .....	47
2.13.1	Medium für adhärente Zellkulturzellen (DMEM+5) .....	47
2.13.2	Medium für Chlamydieninfektionen .....	47
2.13.3	Medien für <i>Escherichia coli</i> .....	48
2.13.4	Medien für <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	48
<b>3</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>50</b>
3.1	Kultivierung verschiedener Organismen .....	50
3.1.1	Kultivierung eukaryotischer adhärenter Zellkulturzellen .....	50
3.1.1.1	Auftauen adhärenter Zellen zur Kultivierung .....	50
3.1.1.2	Passagieren adhärenter Zellen durch Trypsinbehandlung .....	50
3.1.1.3	Einfrieren adhärenter Zellen .....	51
3.1.2	Kultivierung von Chlamydien .....	51
3.1.2.1	Auftauen von Chlamydien zur Kultivierung .....	51
3.1.2.2	Passagieren von Chlamydien in 25 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen .....	51
3.1.2.3	Herstellung eines Chlamydien-Pools .....	52
3.1.2.4	Sedimentation und Einfrieren von Chlamydien .....	53
3.1.2.5	Reinigung von Chlamydien durch Dichtegradientenzentrifugation .....	53
3.1.2.6	Titration von Chlamydien suspensionen .....	53
3.1.2.7	Stationäre Chlamydieninfektion .....	54
3.1.3	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	54

3.1.3.1	Herstellung chemisch kompetenter Zellen.....	55
3.1.3.2	Herstellung elektrokompeter Zellen.....	55
3.1.4	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	56
<b>3.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>56</b>
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	56
3.2.1.1	Berechnung der optimalen Annealingtemperatur für Oligonukleotide.....	56
3.2.1.2	Ansatz der PCR-Reaktion.....	56
3.2.1.3	Bedingungen der PCR-Reaktion.....	57
3.2.1.4	PCR auf Hefezellen .....	57
3.2.2	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese.....	58
3.2.2.1	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	58
3.2.3	Transformation von Zellen.....	58
3.2.3.1	Transformation in <i>E. coli</i> .....	58
3.2.3.1.1	Ein-Minuten-Transformation.....	58
3.2.3.1.2	Transformation durch Elektroporation .....	58
3.2.3.2	Transformation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	59
3.2.3.2.1	Integration von DNA-Fragmenten über homologe <i>in vivo</i> Rekombination .....	60
3.2.4	DNA-Isolation .....	60
3.2.4.1	DNA Isolation aus Chlamydien-infizierten HEp-2 Zellen .....	60
3.2.4.2	Gewinnung chlamydialer genomischer DNA .....	61
3.2.4.3	Gewinnung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	61
3.2.4.3.1	Plasmid MIDI-Präparation .....	61
3.2.4.3.2	Plasmid MINI-Präparation .....	62
3.2.4.4	Gewinnung von Plasmid-DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	62
3.2.5	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen .....	63
3.2.6	DNA-Konzentrationsbestimmung durch photometrische Messung .....	63
3.2.7	Sequenzierung .....	63
3.2.8	Quantitative Real-Time-PCR zum Vergleich der DNA-Kopienzahl.....	63
3.2.9	Hefe-2-Hybrid-Screening .....	64
<b>3.3</b>	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>65</b>
3.3.1	Generierung von rekombinanten Proteinen .....	65
3.3.1.1	Induktion der Genexpression in <i>E. coli</i> .....	65
3.3.1.1.1	Koexpression von Chaperonen zur Faltungsunterstützung.....	65
3.3.1.2	Affinitätschromatografische Aufreinigung von Proteinen .....	65
3.3.1.2.1	Lyse der <i>E. coli</i> Zellen.....	66
3.3.1.2.2	Reinigung von GST-Fusionsproteinen unter nativen Bedingungen.....	66
3.3.1.2.3	Reinigung von His-Fusionsproteinen unter nativen Bedingungen .....	67
3.3.1.2.4	Reinigung von His-Fusionsproteinen unter denaturierenden Bedingungen.....	67

---

3.3.1.2.5	Dialyse von rekombinanten Proteinen.....	68
3.3.2	Proteinmengenbestimmung mittels Bradford-Reagenz .....	68
3.3.3	Detektion von Proteinen.....	69
3.3.3.1	Proteinprobenaufarbeitung für SDS-Polyacrylamidgele.....	69
3.3.3.2	Auftrennung von Proteinproben mittels SDS-PAGE.....	69
3.3.3.2.1	Herstellung des Trenngels .....	69
3.3.3.2.2	Herstellung des Sammelgels .....	70
3.3.3.2.3	SDS-Gelelektrophorese.....	70
3.3.3.3	Färbung von Proteingelen mit Coomassie-Blau .....	70
3.3.3.3.1	Fixierung und Färbung von Proteingelen.....	70
3.3.3.4	Westernblotanalyse .....	71
3.3.3.4.1	Aufbau der Blotapparatur.....	71
3.3.3.4.2	Antikörperreaktion auf der PVDF-Membran.....	71
3.3.3.4.3	Farbentwicklung mittels Alkalischer Phosphatase.....	72
3.3.4	Massenspektrometrische Analyse von Proteinen.....	72
3.3.5	Beschichtung von Latexkügelchen mit rekombinantem Protein.....	72
3.3.5.1	Überprüfung der Beschichtungsqualität.....	73
3.3.6	Markierung von Organismen/Proteinen .....	73
3.3.6.1	Fluoreszenzmarkierung chlamydialer EBs mit CFSE.....	73
3.3.6.2	Fluoreszenzmarkierung von rekombinantem Protein mit Fluoreszein.....	74
3.3.6.3	Biotinylierung von rekombinantem Protein .....	74
3.3.7	Far Western Analyse für Protein-Protein Interaktion .....	74
3.3.8	Protein-Phospholipid-Interaktion.....	75
3.3.8.1	Liposomen Zentrifugationsexperiment.....	75
3.3.8.1.1	Generierung der Liposomen mittels „Freeze-Thaw-Sonation“-Methode.....	75
3.3.8.1.2	Bindung von Proteinen an Phospholipidmembranen .....	76
3.3.8.2	Oberflächenplasmonenresonanz (SPR).....	76
3.3.8.2.1	Beschichtung des Sensorchips mit Phospholipidmembranen .....	76
3.3.8.2.2	Bindung von Proteinen an Phospholipidmembranen .....	77
3.3.8.3	Membran-Lipid-Streifen .....	77
3.3.9	Generierung polyklonaler Antikörper.....	77
3.3.9.1	Abreicherung polyklonaler Antikörper gegen HEp-2 Zellen .....	77
3.3.9.1.1	Abreicherung gegen fixierte Zellen .....	78
3.3.9.1.2	Abreicherung gegen Zellysat .....	78
3.3.9.2	Antigenreinigung polyklonaler Antikörper .....	78
<b>3.4</b>	<b>Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>79</b>
3.4.1	Transfektion adhärenter Zellen mit TurboFect™ .....	79
3.4.2	Löslichkeitstest chlamydialer Proteine mit Detergenzien .....	80
3.4.3	Adhäsionsexperimente.....	80

---

3.4.3.1	Adhäsionsanalyse mit Protein-beschichteten Latexkügelchen .....	80
3.4.3.2	Adhäsionsanalyse mit löslichem rekombinantem Protein.....	81
3.4.3.3	Adhäsionsexperiment mit CFSE-markierten chlamydialen EBs.....	81
3.4.4	Neutralisation der chlamydialen Infektion .....	82
3.4.4.1	Neutralisation der Chlamydialen Infektion mit Antikörpern .....	82
3.4.4.2	Neutralisation der chlamydialen Infektion mit rekombinantem Protein .....	82
3.4.5	Endozytoseexperimente .....	83
3.4.5.1	Internalisierungsexperiment chlamydialer EBs .....	83
3.4.5.2	Blockierung der Endozytose mit chemischen Inhibitoren.....	84
3.4.5.3	Internalisierung Protein-beschichteter Latexkügelchen.....	84
3.4.5.4	Bestimmung der allgemeinen Endozytose humaner Zellen.....	85
3.4.5.4.1	Mikroskopische Analyse der Endozytose.....	85
3.4.5.4.2	Analyse der Endozytose mittels Westernblot .....	85
3.4.5.5	Endozytose von biotinyliertem rekombinanten Protein .....	86
3.4.6	„Pull Down“ zur Identifizierung humaner Interaktionspartner .....	87
<b>3.5</b>	<b>Durchflusszytometrie .....</b>	<b>88</b>
<b>3.6</b>	<b>Mikroskopie .....</b>	<b>88</b>
3.6.1	Fixierung humaner Zellen .....	88
3.6.2	Permeabilisierung Pfa-fixierter Zellen.....	89
3.6.3	Immunfluoreszenz .....	89
3.6.3.1	Detektion humaner und chlamydialer Proteine .....	89
3.6.3.1.1	Detektion von Lipid Rafts .....	89
3.6.3.1.2	Lokalisation von rekombinantem Protein auf adhärenen Zellen.....	90
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>91</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung des potentiellen Adhäsins Yaa3 .....</b>	<b>91</b>
4.1.1	Expression und Aufreinigung von rekombinantem Yaa3 .....	91
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung des potentiellen Adhäsins Yaa2 .....</b>	<b>94</b>
4.2.1	Expression und Aufreinigung von rekombinantem Yaa2 .....	94
4.2.2	Expression und Lokalisierung von Yaa2 in der chlamydialen Infektion.....	95
4.2.3	Yaa2-Antikörper neutralisieren die chlamydiale Infektion nicht signifikant.....	97
4.2.4	Rekombinantes Yaa2 besitzt keine adhäsiven Eigenschaften .....	98
4.2.5	Rekombinantes Yaa2 besitzt schwache neutralisierende Wirkung.....	100
<b>4.3</b>	<b>Charakterisierung des potentiellen Adhäsins Yaa1.....</b>	<b>102</b>
4.3.1	Expression und Aufreinigung von rekombinantem Yaa1 .....	102
4.3.2	Expression und Lokalisierung von Yaa1 in der chlamydialen Infektion.....	103

4.3.2.1	Yaa1 ist auf der Bakterienoberfläche exponiert .....	106
4.3.3	<i>C. pneumoniae</i> infizierte Menschen besitzen Antikörper gegen Yaa1 .....	109
4.3.4	Yaa1-Antikörper neutralisieren die chlamydiale Infektion .....	110
4.3.5	Rekombinantes Yaa1 bindet an humane Zellen .....	112
4.3.6	Die Suche nach dem humanen Interaktionspartner von Yaa1 .....	115
4.3.6.1	Yaa1 interagiert wahrscheinlich nicht mit oberflächenexponierten, humanen Proteinen .....	115
4.3.6.2	Yaa1 interagiert direkt mit Phospholipidmembranen .....	118
4.3.7	Rekombinantes Yaa1 steigert die Infektion .....	122
4.3.7.1	rYaa1 steigert die Internalisierung und nicht die Adhäsion von EBs.....	125
4.3.7.2	Yaa1 wirkt während früher Prozesse der Endozytose der EBs.....	127
4.3.8	Die Bedeutung von Lipid Raft Mikrodomänen während der Internalisierung .....	130
4.3.8.1	Yaa1 assoziiert mit Lipid Raft Mikrodomänen der humanen Zelle.....	130
4.3.8.2	Chlamydien internalisieren an Lipid Raft Mikrodomänen .....	132
4.3.9	Der Einfluss von Yaa1 auf Endozytoseprozesse .....	135
4.3.9.1	rYaa1 steigert die allgemeine Endozytose nicht.....	135
4.3.9.2	Endozytose von löslichem rYaa1 .....	137
4.3.9.3	Yaa1 gekoppelte Latexkügelchen werden nicht endozytiert .....	138
4.3.9.4	Wirkung von Yaa1 auf die <i>C. trachomatis</i> Infektion.....	140
4.3.10	Domänenanalyse von Yaa1 .....	141
4.3.10.1	Der C-Terminus vermittelt die Bindung an humane Zellen während der N-Terminus essentiell für die infektionssteigernde Wirkung ist .....	141
4.3.10.2	Bestimmung der Bindedomäne von Yaa1 .....	143
4.3.10.3	Yaa1 interagiert über den C-Terminus mit sich selbst.....	144
4.3.11	Transfiziertes Yaa1 lokalisiert an der Plasmamembran der humanen Zelle und vermindert die Infizierbarkeit durch <i>Cpn</i> .....	145
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>148</b>
<b>5.1</b>	<b>Yaa1 – Adhäsins oder Türöffner für die Infektion? .....</b>	<b>148</b>
5.1.1	Yaa1 lokalisiert auf der Oberfläche infektiöser EBs .....	149
5.1.2	Yaa1 besitzt alle nötigen Eigenschaften eines Adhäsins .....	152
5.1.2.1	Anti-Yaa1 Antikörper neutralisieren die chlamydiale Infektion.....	152
5.1.2.2	Der C-Terminus von rekombinantem Yaa1 vermittelt die Adhäsion.....	152
5.1.3	Yaa1 interagiert mit Phospholipidmembranen.....	154
5.1.4	Yaa1 ist kein „klassisches“ Adhäsins .....	159
5.1.5	Yaa1 ist an der Lipid Raft-abhängigen Aufnahme der EBs beteiligt .....	161
5.1.5.1	rYaa1 steigert die Internalisierung und nicht die Adhäsion der EBs.....	162
5.1.5.2	Die Funktion von Yaa1 ist abhängig von Lipid Rafts und Aktin .....	163

---

5.1.5.3	EBs und rYaa1 kolokalisieren mit Lipid Rafts .....	164
5.1.6	Yaa1 und Endozytose .....	167
5.1.7	Hat Yaa1 auch eine Funktion im Zytoplasma der Wirtszelle? .....	169
5.1.8	Die postulierte(n) Funktion(en) von Yaa1 .....	171
5.2	Yaa2 – eventuell nur eine strukturelle Komponente .....	174
5.3	Yaa3 – weiterhin ein potentielles Adhäsin .....	176
<b>Literaturverzeichnis .....</b>		<b>I</b>
<b>Anhang .....</b>		<b>XV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>		<b>XIX</b>
<b>Danksagung .....</b>		<b>XXI</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>		<b>XXIII</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikromolar
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
BD	Bindedomäne
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserum Albumin
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
cOMC	chlamydialer Außenmembrankomplex (chlamydia outer membrane complex)
deion.	deionisiert
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5`-Triphosphat
EB	Elementarkörperchen (elementary body)
et al.	und andere
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n) (hour)
hpi	Stunde(n) nach der Infektion (hours post infection)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
IFU	Einschluss-bildende Einheit (inclusion forming unit)
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LGV	Lymphogranuloma venereum

---

LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOI	Multiplizität der Infektion (multiplicity of infection)
M $\beta$ CD	Methyl-beta-Cyclodextrin
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
PBS	Physiologischer Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pi	nach der Infektion (post infection)
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoylphosphatidylcholin
RB	Retikularkörperchen (reticulate body)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunde
U	Einheiten (Units)
ü/N	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
x g	x-fache Erdbeschleunigung
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein (yellow fluorescent protein)

## Zusammenfassung

*Chlamydia* sind Gram-negative, obligat intrazelluläre Bakterien, die phylogenetisch sehr stark von allen anderen Eubakterien abgegrenzt sind. Zu den humanpathogenen Chlamydien gehören *C. pneumoniae* und *C. trachomatis*. *C. pneumoniae* verursacht akute Infektionen der oberen und unteren Atemwege und wird außerdem mit chronischen Erkrankungen wie Asthma und chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) in Verbindung gebracht. Praktisch jeder Mensch durchläuft in seinem Leben mindestens eine *C. pneumoniae* Infektion. Die verschiedenen *C. trachomatis* Serovare infizieren die Augen und den Urogenitaltrakt. Infektionen des Auges können zur Ausbildung eines Trachoms führen und sind der Hauptgrund vermeidbarer Blindheit, während Infektionen des Urogenitaltraktes weltweit die häufigste bakterielle Ursache sexuell übertragbarer Krankheiten sind.

Chlamydien durchlaufen einen einzigartigen biphasischen Lebenszyklus und wechseln zwischen zwei distinkten Lebensformen. Das Elementarkörperchen (EB) stellt die infektiöse, metabolisch inaktive Form dar, während das Retikularkörperchen nicht infektiös ist, jedoch metabolisch aktiv und daher die replizierende Form darstellt.

Der initiale Schritt der Infektion ist die Adhäsion der EBs an die Wirtszelle und die folgende, bakterienvermittelte Internalisierung. Die *C. pneumoniae* EBs interagieren höchstwahrscheinlich zunächst über das Adhäsin OmcB mit Glykosaminoglykanen der Wirtszelle und gelangen entlang der polymeren GAG-Strukturen auf der Oberfläche der Humanzelle zu ihrer spezifischen Eintrittspforte. Hier wird dann die Adhäsion des EBs über die Interaktion der Pmp-Proteine mit humanen Rezeptoren vermittelt. Werden beide Adhäsionswege blockiert, so ist dennoch eine Restinfektion von 40 % zu beobachten. Somit nutzt *C. pneumoniae*, ebenso wie viele andere Pathogene, ein breites Repertoire an Adhäsinen um effizient an die Wirtszelle zu binden. In einer vorausgegangenen Studie nach neuen, potentiellen Adhäsinen wurden den hypothetischen, chlamydialen Proteinen Yaa1, Yaa2 und Yaa3 (yet another adhesin) adhäsive Eigenschaften zugeordnet. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese potentiellen Adhäsine zu charakterisieren und ihre Funktion im Infektionszyklus zu beschreiben.

Für die funktionelle Analyse von Yaa1, Yaa2 und Yaa3 war die Expression und Aufreinigung von rekombinantem Protein essentiell. Da im Rahmen dieser Arbeit alle Versuche fehlschlagen Yaa3 rekombinant herzustellen, wurde dessen Funktionsanalyse nicht weiter verfolgt.

Polyklonale Antikörper gegen das Yaa2-Protein neutralisierten die chlamydiale Infektion nur schwach, während rekombinantes Yaa2 die Infektion um etwa 30 % reduzierte. Die im Hefe-System beschriebenen adhäsiven Eigenschaften von Yaa2 konnten mit rekombinantem

Protein allerdings nicht bestätigt werden. Damit ist fraglich, ob es sich bei Yaa2 um ein weiteres, chlamydiales Adhäsın handelt.

Polyklonale Antikörper gegen das Yaa1-Protein detektierten das Protein auf der Oberfläche von chlamydialen EBs. Die postulierten adhäsiven Eigenschaften von Yaa1 wurden in Adhäsionsexperimenten mit rekombinantem Protein bestätigt. Die Yaa1-Bindedomäne konnte auf den C-terminalen Bereich des Proteins (Aminosäure 305 bis 355) eingegrenzt werden. Bei der Bindung an die Humanzelle interagiert rYaa1 direkt mit der Phospholipidmembran. Zudem neutralisierten anti-Yaa1 Antikörper die Infektion signifikant. Überraschenderweise neutralisierte rYaa1 die chlamydiale Infektion nicht, sondern führte zu einer verbesserten Infektion von bis zu 300 %. Für die infektionssteigernde Wirkung von rYaa1 war sowohl die Bindung über den C-Terminus als auch der N-Terminus nötig, dessen genaue Funktion noch beschrieben werden muss. Diese stimulierende Wirkung auf die Infektion beruhte erstaunlicherweise nicht auf einer verbesserten Adhäsion, sondern einer verbesserten Internalisierung der EBs. Im Detail konnte gezeigt werden, dass rYaa1 auf frühe Prozesse der Internalisierung wirkt und hierbei von Lipid Rafts und einem intakten Aktinzytoskelett abhängig ist. Damit handelt es sich bei Yaa1 nicht um ein klassisches Adhäsın, sondern um ein Protein, das an der Internalisierung beteiligt ist. Die durch rYaa1 vermittelte, effizientere Endozytose des EBs ist ein spezifischer Prozess, denn es erhöhte die generelle Endozytose der Humanzelle nicht. Überraschenderweise hatte das *C. pneumoniae* spezifische rYaa1 auch einen verstärkenden Effekt auf die Infektion von *C. trachomatis* Serovar E, nicht jedoch auf die des L2-Serovars.

Die Bedeutung von Lipid Rafts für die *C. pneumoniae* Infektion konnte in dieser Arbeit erstmals mikroskopisch bestätigt werden. So wurde eine Akkumulation von Lipid Rafts an der EB-Eintrittsstelle nachgewiesen. Auch die frühe Einschlussmembran ist eine Stunde nach der Infektion angereichert mit Lipid Rafts, welche darüber hinaus auch eine Anreicherung des *C. pneumoniae*-spezifischen Rezeptors EGFR aufwies. Auch rYaa1 lokalisierte spezifisch an Lipid Rafts, jedoch war die Bindung von rYaa1 an die Membran der Humanzelle unabhängig von der Integrität der Lipid Rafts.

Zusammenfassend wurde mit Yaa1 ein neues, für die *C. pneumoniae* Infektion essentielles Protein identifiziert, welches neue Einblicke in die bis dato wenig verstandenen Endozytoseprozesse liefert.

## Summary

*Chlamydia* are Gram negative, obligate intracellular bacteria that are phylogenetically very well separated from all other eubacteria. *C. pneumoniae* and *C. trachomatis* are important human pathogens. *C. pneumoniae* causes acute infections of the upper and lower respiratory tract, but has also been linked to chronic diseases like the asthma and chronic obstructive pneumonia disease (COPD). During his life, nearly everybody undergoes at least one *C. pneumoniae* infection. The different *C. trachomatis* serovars infect the eyes and the urogenital tract. Infections of the eyes cause a disease called Trachom and are the leading cause of preventable blindness worldwide, whereas infections of the urogenital tract are the leading cause of sexually transmitted bacterial diseases worldwide.

*Chlamydia* undergoes a unique biphasic life cycle and changes between two distinct forms. The elementary body (EB) is the infectious but metabolically inactive form. The reticulate body (RB) is not infectious but metabolically active and thus the replicative form.

The adhesion of the EB to the host cell and the subsequent bacteria-driven internalization are the initial steps of the infection. The first interaction is mediated by the chlamydial adhesin OmcB that interacts with glycosaminoglycans on the surface of the human cell. Most likely, the EBs can surf along the surface of the host cell via the polymeric GAGs to the specific port of internalization. Here, the adhesion is enforced by the interaction of the chlamydial Pmp proteins that interact with a human protein. If both adhesion pathways are blocked, this results in a decrease of infection to 40 %, indicating that *C. pneumoniae*, like many other pathogens, uses a wide repertoire of adhesion molecules. Thus, in a previous study, we searched for new potential adhesins and found the hypothetical, chlamydial proteins Yaa1, Yaa2 and Yaa3 (yet another adhesin) having adhesive abilities. The aim of this work was to characterize the potential adhesins and describe their role in the chlamydial infection.

To functionally analyze Yaa1, Yaa2 and Yaa3 the expression and purification of recombinant protein was essential. As all attempts to generate recombinant Yaa3 protein have been not successful the functional characterization of Yaa3 was not pursued.

Polyclonal antibodies raised against Yaa2 had weak neutralizing abilities, while recombinant Yaa2 reduced the infection by 30 %. In contrast, the adhesive abilities of Yaa2, observed in the yeast display system, could not be confirmed using recombinant protein. Thus, it remains questionable if Yaa2 is a new chlamydial adhesin.

Polyclonal antibodies raised against Yaa1 could detect Yaa1 on the surface of EBs. The proposed adhesive abilities could be confirmed in different experiments using recombinant protein. The binding domain of Yaa1 was addressed to the C-terminal part (amino acids 305

to 355). The binding of rYaa1 was shown to be mediated by direct interaction with the plasma membrane of the human cell. Additionally, anti-Yaa1 antibodies neutralized the infection significantly. Surprisingly, rYaa1 did not neutralize the chlamydial infection but boosted the infection up to 300 %. This boosting effect of rYaa1 was shown to be dependent on the binding of the C-terminal domain, but also the N-terminal domain was necessary. The precise function of the N-terminal domain still needs to be elucidated. Interestingly, the boosting of the infection by rYaa1 was not due to an enhanced adhesion of the EBs but due to a more efficient internalization. In detail, it could be shown that rYaa1 acts at early steps of internalization and its function is dependent on the integrity of lipid rafts and the actin cytoskeleton. Thus, Yaa1 is not a new classical adhesin, but a protein that is involved in the internalization of the EB. The enhanced endocytosis of the EB, mediated by rYaa1, was shown to be a specific process as it did not enhance endocytosis in general. Interestingly, the *C. pneumoniae* specific rYaa1 also boosted the *C. trachomatis* serovar E infection but not the infection of the L2 serovar.

The involvement of lipid rafts in the *C. pneumoniae* infection was proven microscopically for the first time. It could be shown that lipid rafts accumulate at the entrance port of the EBs and that the early inclusion one hour post infection is enriched in lipid rafts. Additionally, an accumulation of the *C. pneumoniae* specific receptor EGFR co-localized with clustered lipid rafts. Recombinant Yaa1 also localized specifically at lipid rafts but the binding of rYaa1 to the plasma membrane of the human cell was independent of the integrity of lipid rafts.

In summary, Yaa1 was identified to be a new protein that is essential for the *C. pneumoniae* infection and provides new insights into the little-understood endocytosis of the chlamydial EB.

# 1 Einleitung

## 1.1 Chlamydien

Chlamydien sind Gram-negative, obligat-intrazelluläre Bakterien, die sich phylogenetisch stark von anderen Bakterien abgrenzen. Sie durchlaufen einen einzigartigen biphasischen Lebenszyklus (1.1.3.2, S. 6) und ihre Außenmembran, die als cOMC (chlamydia outer membrane complex) bezeichnet wird, besitzt einen speziellen Aufbau (1.1.3.1, S. 5). Die verschiedenen Mitglieder des Phylums *Chlamydiae* können ein sehr breites Spektrum an Wirtsorganismen infizieren, das von Säugetieren, Beuteltieren, Amphibien und Vögeln, über Fische, Reptilien, Insekten und Krustentieren, bis hin zu Weichtieren und sogar Protozoen (Amöben) reicht (Horn 2008). Chlamydieninfektionen verursachen in Nutztierbeständen wirtschaftliche Schäden, während Infektionen des Menschen eine hohe gesundheitliche Relevanz aufweisen (1.1.2, S. 2). Trotz intensiver Forschungsbemühungen ist derzeit noch kein Impfstoff zur Prävention von Chlamydieninfektionen erhältlich. Daher stellt die Identifikation und Funktionsanalyse chlamydialer Proteine, die am Adhäsions- und Internalisierungsprozess beteiligt sind, einen wichtigen Schritt auf dem Weg zur Entwicklung eines Vakzins dar.

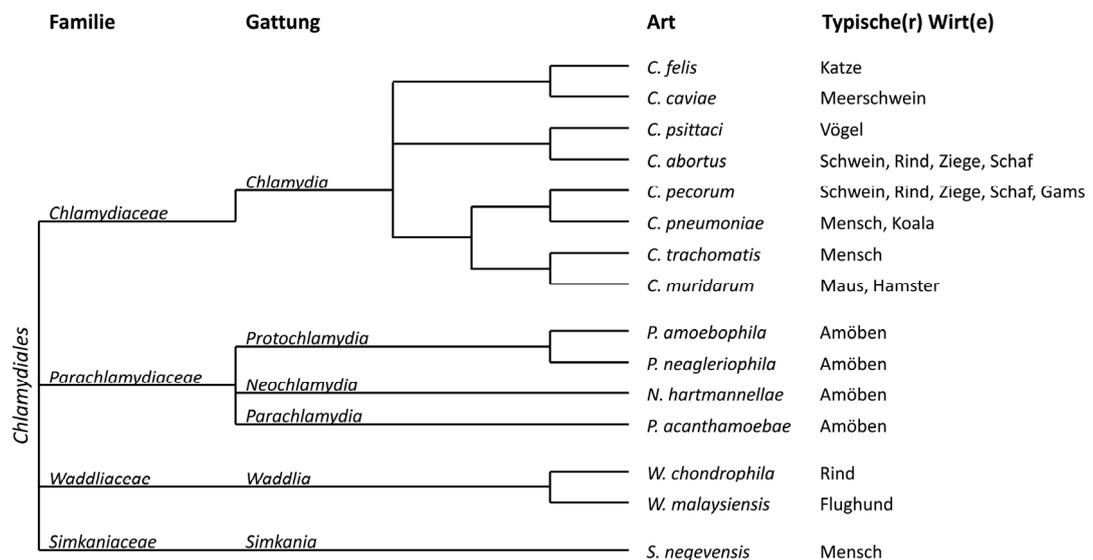
### 1.1.1 Taxonomie

Entdeckt und erstmals beschrieben wurden Chlamydien vom deutschen Radiologen Ludwig Halberstädter und dem österreichischen Zoologen Stanislaus von Prowazek im Jahre 1907 (Halberstädter and Prowazek 1907; Horn 2008). Sie bezeichneten den neu entdeckten Organismus als „*Chlamydozoa*“, abgeleitet von dem griechischen Wort „Chlamys“, was so viel wie Reise- oder Kriegsmantel bedeutet. Die Einordnung der Chlamydien zur Domäne *Bacteria* erfolgte jedoch erst in den 1960er Jahren, nachdem sie zuvor den Viren zugeordnet waren (Moulder 1966). Spätere Sequenzvergleiche der 16S rRNA und repräsentativer Proteine bestätigten den eubakteriellen Ursprung der Chlamydien und verdeutlichten gleichzeitig den entfernten Verwandtschaftsgrad zu anderen bakteriellen Spezies (Weisburg, Hatch et al. 1986; Bern and Goldberg 2005).

Aufgrund ihrer Einzigartigkeit bilden Chlamydien ein eigenes Phylum (*Chlamydiae*) mit nur einer Ordnung (*Chlamydiales*) und lediglich einer Familie (*Chlamydiaceae*) mit einer Gattung (*Chlamydia*). Im Jahr 1999 wurde, aufgrund von 16S rRNA Analysen, eine Unterteilung der Familie *Chlamydiaceae* in die bestehenden Gattung *Chlamydia* und eine neue Gattung *Chlamydophila* vorgeschlagen (Everett, Bush et al. 1999). Diese Neuerung wurde jedoch von

einer breiten Mehrheit der Wissenschaftsgemeinde abgelehnt (Schachter, Stephens et al. 2001). Zudem bestätigen neue phylogenetische Untersuchungen die enge Verwandtschaft der Spezies der Familie *Chlamydiaceae*, weshalb die ursprüngliche Einteilung in nur eine Gattung (*Chlamydia*) weiterhin Bestand hat (Stephens, Myers et al. 2009) (Abbildung 1.1).

Aufgrund von 16S rRNA Identitäten von 80 – 90 % und einheitlichen Entwicklungszyklen wurde die Ordnung *Chlamydiales* im Jahr 1999 um drei weitere Familien (*Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae* und *Waddliaceae*) erweitert (Everett, Bush et al. 1999; Rurangirwa, Dilbeck et al. 1999). Heutzutage umfasst das Phylum *Chlamydiae* acht Familien (*Chlamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Waddliaceae*, *Simkaniaceae*, *Psicichlamydiaceae*, *Clavochlamydiaceae*, *Rhabdochlamydiaceae* und *Criblamydiaceae*), deren Vertreter ein sehr breites Spektrum an Wirtsorganismen, von Säugetieren bis zu Amöben, infizieren können (Horn 2008).



**Abbildung 1.1: Taxonomie der Ordnung Chlamydiales**

Taxonomische Einordnung der Mitglieder der Ordnung *Chlamydiales* nach Everett, Bush 1999, Rurangirwa, Dilbeck et al. 1999 und Stephens, Myers et al. 2009 mit Angabe der typischen Wirte nach Horn 2008. Die Länge der Linien spiegeln hierbei nicht die phylogenetischen Abstände wieder.

### 1.1.2 Pathogenität

Chlamydien kommen weltweit sowohl als tierpathogene als auch humanpathogene Erreger vor, wobei Infektionen des Menschen mit *C. pneumoniae* oder *C. trachomatis* von großer klinischer Relevanz sind. Die tierpathogenen Erreger *C. caviae* und *C. muridarum* sind hauptsächlich in Nagetieren wie Meerschweinchen, Mäusen und Hamstern nachweisbar, während *C. felis* Katzen und *C. abortus* sowie *C. pecorum* hauptsächlich verschiedene Nutztiere wie Schweine, Rinder, Ziegen und Schafe infizieren kann (Abbildung 1.1). Sie infizieren die Epithelgewebe der Augen, des Respirationstraktes sowie des Urogenital- und Darmtraktes und

können daher respiratorische und intestinale Erkrankungen auslösen. Besonders in Tierbeständen von Schafen und Ziegen können *C. abortus* Infektionen des Urogenitaltraktes zu Infertilität und spontanen Aborten führen, was einen hohen wirtschaftlichen Schaden nach sich zieht (Kerr, Entrican et al. 2005; Runge, Binder et al. 2012; van den Brom, Lievaart-Peterson et al. 2012). *C. psittaci* hingegen ist ein weit verbreiteter Erreger respiratorischer Erkrankungen bei Vögeln und Auslöser der Psittakose oder Ornithose. Darüber hinaus können sowohl *C. psittaci* als auch *C. abortus* auf den Menschen übertragen werden und besitzen daher zoonotisches Potential. So führen Infektionen durch *C. abortus* in vereinzelten Fällen zu Fehlgeburten bei Menschen (Pospischil, Thoma et al. 2002). *C. psittaci* Infektionen hingegen können beim Menschen grippeähnliche Symptome hervorrufen, aber in seltenen Fällen auch tödlich verlaufen (Fryden, Kihlstrom et al. 1989; Peeling and Brunham 1996). In Deutschland ist die Ornithose meldepflichtig, tritt jedoch deutschlandweit nur sehr selten auf (16 bekannte Fälle in 2011) (Robert Koch Institut 2012).

Mit 600 Millionen infizierten Menschen weltweit gehören *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* zu den verbreitetsten humanpathogenen Erregern (Ojcius, Darville et al. 2006).

#### **1.1.2.1 *C. pneumoniae* Infektionen**

Durch Tröpfcheninfektion übertragen, infiziert *C. pneumoniae* die Epithelzellen der Atemwege und verursacht akute sowie chronische respiratorische Erkrankungen. Hierbei sind zum einen die oberen Atemwege betroffen, was zur Ausbildung von Pharyngitis (Rachenentzündung) und Sinusitis (Nasennebenhöhlenentzündung) führen kann. Zum anderen kann eine Infektion der unteren Atemwege die Ausbildung von Bronchitiden (Entzündung der Bronchen) oder Pneumonien (Lungenentzündung) nach sich ziehen. Dabei werden etwa 6 - 20 % aller ambulant, d.h. nicht im Krankenhaus, erworbenen Pneumonien (CAP = community-acquired pneumonia) und etwa 5 % aller ambulant erworbenen Bronchitiden auf eine *C. pneumoniae* Infektion zurückgeführt. Weltweit geht man von einer Durchseuchung von 50 % der Zwanzigjährigen aus, die sich bei den 60- bis 70-jährigen zu einer Antikörperprävalenz von 70 – 80 % ausweitet (zusammengefasst aus (Kuo, Jackson et al. 1995; Blasi, Tarsia et al. 2009). Infolgedessen durchläuft praktisch jeder Mensch in seinem Leben zumindest eine *C. pneumoniae* Infektion (Campbell, Kuo et al. 1990). In etwa 70 % der Fälle verläuft diese jedoch asymptomatisch und wird folglich nicht behandelt (Hahn, Azenabor et al. 2002).

Neben den akuten Erkrankungen wird *C. pneumoniae* auch mit einer Reihe von chronischen Erkrankungen wie Asthma, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD), Multipler Sklerose (MS), Alzheimer und Arteriosklerose in Verbindung gebracht (zusammengefasst in (Blasi, Tarsia et al. 2009)). Allerdings verwenden unterschiedliche Studien verschiedene Diagnosekriterien und Diagnoseverfahren und zudem wurde kein Verfahren standardisiert.

Desweiteren stellt sich bei allen systemischen Krankheitsbildern die Frage, ob die *C. pneumoniae* Infektion der Auslöser oder ein Risikofaktor für die jeweilige Erkrankung ist, oder ob es sich lediglich um eine sekundäre Besiedlung des geschädigten Gewebes handelt. Das eine Vielzahl von Zelltypen wie Lungenepithelzellen, arterielle glatte Muskelzellen, vaskuläre Endothelzellen, residente Makrophagen und auch Monozyten *in vitro* infiziert werden können, könnte die Verbreitung von *C. pneumoniae* im menschlichen Körper gewährleisten (Belland, Ouellette et al. 2004).

### 1.1.2.2 *C. trachomatis* Infektionen

Gegenwärtig wird *C. trachomatis* in 19 Serovare unterteilt, wobei die Serovare A - C (A, B, Ba und C) die Augen und die Serovare D - K (D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J und K) sowie die LGV Serovare (L1, L2, L2a und L3) den Urogenitaltrakt infizieren (Bebear and de Barbeyrac 2009). *C. trachomatis* Serovar A - C Infektionen sind Auslöser der Entzündung des Auges, dem sogenannten Trachom. Weltweit waren im Jahr 2001 etwa 149 Millionen Menschen, fast ausschließlich in Entwicklungsländern, an einem Trachom erkrankt, das unbehandelt zur Erblindung führt (Whitcher, Srinivasan et al. 2001). Mit weltweit 7 bis 9 Millionen durch Trachome erblindeter Menschen sind Serovar A - C Infektionen bis heute der Hauptgrund vermeidbarer Blindheit (Whitcher, Srinivasan et al. 2001; Ojcius, Darville et al. 2006). *C. trachomatis* Serovar D - K Infektionen sind mit 101 Millionen Neuinfektionen im Jahre 2005 weltweit die häufigste bakterielle Ursache sexuell übertragbarer Krankheiten (World Health Organization 2011). Bei Männern kann sich diese in einer lokalen Entzündung der Schleimhaut der Harnröhre (Urethritis) manifestieren, welche durch eine Entzündung des Nebenhodens (Epididymitis) verkompliziert werden kann. Bei Frauen kann eine *C. trachomatis* Serovar D - K Infektion zur Ausbildung verschiedener Unterleibsentzündungen (PID = pelvic inflammatory disease) wie Zervizitis (Gebärmutterhalsentzündung) und damit verbunden zu Endometritis (Entzündung der Gebärmutter Schleimhaut) und Salpingitis (Eileiterentzündung) führen. Aufgrund der einhergehenden Vernarbung des Gewebes können zwei Drittel aller Fälle eileiterbedingter Unfruchtbarkeit und ein Drittel aller Extrauterinschwangerschaften auf *C. trachomatis* Infektionen zurückgeführt werden (zusammengefasst aus (Peeling and Brunham 1996; Bebear and de Barbeyrac 2009)). Zudem scheint ein Zusammenhang zwischen *C. trachomatis* Infektionen und Fehlgeburten zu bestehen (Baud, Goy et al. 2011). In Industrieländern treten *C. trachomatis* LGV Serovare seltener auf, sind allerdings deutlich invasiver als die Serovare D - K und nutzen das Epithelgewebe nur, um von dort in tiefere Schichten vorzudringen und die Lymphknoten zu infizieren. Jedoch verläuft die Infektion der sexuell übertragenen Serovare ebenso wie die von *C. pneumoniae*, häufig asymptomatisch (in 50 % der Fälle bei Männern und 70 % bei Frauen) und wird somit

nicht behandelt (zusammengefasst aus (Bebear and de Barbeyrac 2009)). Bei Frauen ist diese persistierende Infektion der Grund für die Vernarbung des Gewebes und der damit einhergehenden, zuvor geschilderten Komplikationen.

### 1.1.3 Biologie der Chlamydien

Chlamydien besitzen als obligat intrazelluläre Organismen ein relativ kleines, zirkuläres Genom, was wahrscheinlich in Folge der Anpassung an die Wirtszelle reduziert wurde. Dabei weisen 798 Gene Orthologe in *C. pneumoniae*, *C. trachomatis*, *C. muridarum* und *C. caviae* auf und stellen damit wahrscheinlich den minimalen Satz an Genen dar, der für das intrazelluläre Überleben und den Entwicklungszyklus benötigt wird (Read, Myers et al. 2003). Das Genom von *C. pneumoniae* CWL029 ist mit  $1,23 \times 10^6$  bp und 1073 ORFs (open reading frames) um etwa 20 % größer als das von *C. trachomatis* (Serovar D) mit  $1,04 \times 10^6$  bp und 894 ORFs (Stephens, Kalman et al. 1998; Kalman, Mitchell et al. 1999; Vandahl, Birkelund et al. 2004). Hierbei weisen 80 % der kodierenden Gene von *C. pneumoniae* orthologe Gene in *C. trachomatis* auf, während 214 proteinkodierende Sequenzen nicht in *C. trachomatis* vorkommen und 154 dieser Sequenzen keine Homologie zu bisher bekannten bakteriellen Genomen besitzen (Kalman, Mitchell et al. 1999).

Chlamydien durchlaufen einen einzigartigen biphasischen Lebenszyklus (1.1.3.2, S. 6) wobei zwischen zwei distinkten Lebensformen unterschieden wird (ausführlich beschrieben in (Abdelrahman and Belland 2005)). Das etwa  $0,3 \mu\text{m}$  große Elementarkörperchen (EB = elementary body) ist die infektiöse, jedoch metabolisch inaktive Form und besitzt supramolekulare Strukturen auf der Oberfläche, die das Typ III Sekretionssystem darstellen könnten. Das Nukleoid des EBs ist aufgrund einer Kondensation der DNA stark verdichtet. Das Retikularkörperchen (RB = reticulate body) ist mit etwa  $1 \mu\text{m}$  deutlich größer als das EB und die metabolisch aktive, jedoch nicht infektiöse Form, welche sich durch binäre Teilung vermehrt. Es besitzt ebenso wie das EB supramolekulare Strukturen auf der Oberfläche, die das Typ III Sekretionssystem darstellen könnten, jedoch sind diese Strukturen deutlich dichter. Im Gegensatz zum EB ist die DNA im RB nicht verdichtet, weshalb das Zytoplasma des RBs mikroskopisch granulär mit diffuser, fimbrienartiger DNA erscheint (zusammengefasst aus (Abdelrahman and Belland 2005)).

#### 1.1.3.1 Der chlamydiale Außenmembrankomplex (cOMC)

Neben dem besonderen Lebenszyklus besitzen Chlamydien eine speziell geartete Außenmembran, die als cOMC (chlamydia outer membrane complex) bezeichnet wird und welche die Gram-negativen Chlamydien deutlich von anderen Gram-negativen Bakterien

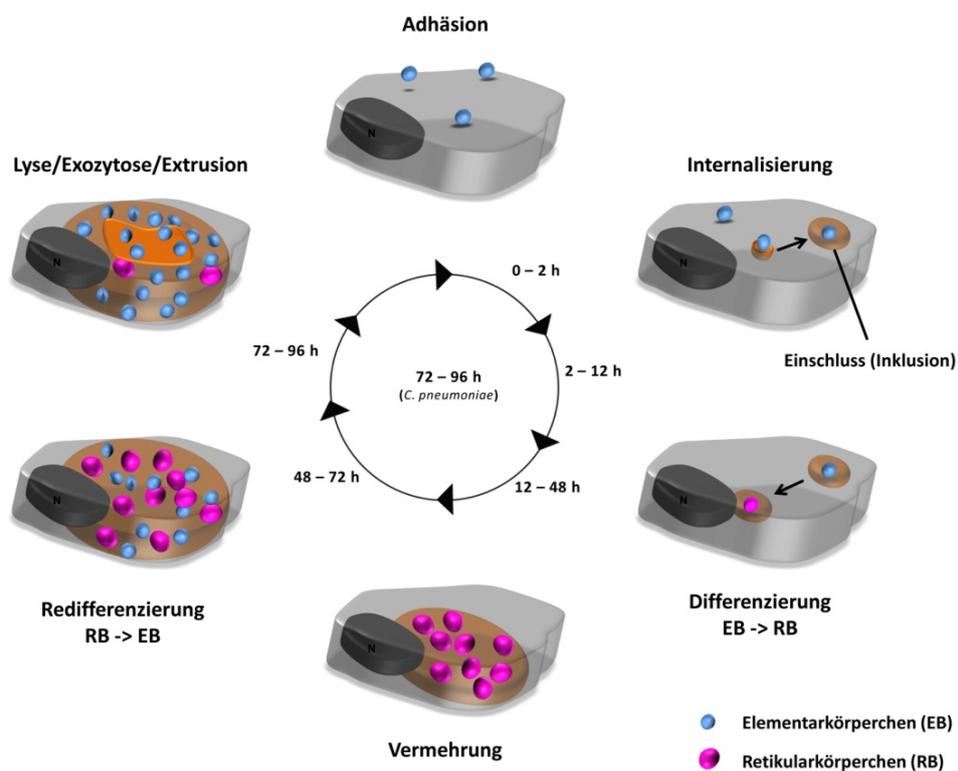
abgrenzt. Zwar entspricht der generelle Aufbau der EB- und RB-Hülle aus innerer Membran und äußerer Membran, die durch den periplasmatischen Raum voneinander getrennt sind, dem anderer Gram-negativer Bakterien, jedoch ist keine Mureinschicht detektierbar (Barbour, Amano et al. 1982; Everett and Hatch 1995). Paradoxerweise besitzen Chlamydien jedoch Gene für den Syntheseweg von Peptidoglykan und die Behandlung mit  $\beta$ -Laktam-Antibiotika zeigt einen nachhaltigen Effekt auf chlamydiales Wachstum und Entwicklung, weshalb dieser Umstand als „chlamydiale Anomalie“ bezeichnet wird (Moulder 1993; Rockey, Lenart et al. 2000; Abdelrahman and Belland 2005; McCoy and Maurelli 2006; Pavelka 2007). Alternativ wird die Rigidität der chlamydialen EB-Hülle durch die starke Quervernetzung der Cysteinereichen Proteine MOMP (major outer membrane protein), OmcA (outer membrane complex protein A) und OmcB (outer membrane complex protein B), für die ein stöchiometrisches Verhältnis von 5 (MOMP) zu 3 (OmcB) zu 2 (OmcA) kalkuliert wurde, durch Ausbildung von Disulfidbrücken gewährleistet (Everett and Hatch 1995; Hatch 1996).

### 1.1.3.2 Der chlamydiale Entwicklungszyklus

Alle Chlamydien durchlaufen den in Abbildung 1.2 dargestellten Entwicklungszyklus, jedoch variiert dessen Dauer je nach chlamydialer Spezies. Im Folgenden wird der Entwicklungszyklus repräsentativ für *C. pneumoniae* erörtert, der 72 h bis 96 h nach Infektion abgeschlossen ist (Wolf, Fischer et al. 2000). Der Infektionszyklus der *C. trachomatis* LGV Serovare ist beispielsweise bereits nach 48 h durchlaufen (Davis and Wyrick 1997).

Der Zyklus beginnt mit der Adhäsion der infektiösen EBs an die humane Wirtszelle, welche in zwei Schritten erfolgt. Zunächst binden die EBs über eine reversible, elektrostatische Wechselwirkung des chlamydialen Adhäsins OmcB an humane Glykosaminoglykane auf der Humanzelle (Carabeo and Hackstadt 2001; Dautry-Varsat, Balana et al. 2004; Abdelrahman and Belland 2005; Dautry-Varsat, Subtil et al. 2005). Diesem Schritt folgt eine irreversible Interaktion zwischen chlamydialen Proteinen und humanen Rezeptoren und die Aufnahme der EBs durch eine Chlamydien-induzierte Rezeptor-vermittelte Endozytose (Dautry-Varsat, Balana et al. 2004; Abdelrahman and Belland 2005; Dautry-Varsat, Subtil et al. 2005). Diese frühen Schritte der chlamydialen Infektion werden in Kapitel 1.4 (S. 23) detailliert dargestellt. Nach dem Eintritt in die Wirtszelle verbleiben die Chlamydien während des gesamten Entwicklungszyklus in einer membranumschlossenen Vakuole, die als Einschluss (Inclusion) bezeichnet wird. Während des gesamten Zyklus sekretieren Chlamydien zudem, unter anderem über das Typ III Sekretionssystem, Effektorproteine in das Zytoplasma der Wirtszelle, die Einschlussmembran oder ins Lumen des Einschlusses. Dies gewährleistet eine effiziente Internalisierung der EBs, die Maskierung des Einschlusses, die Akquisition von Nährstoffen und das intrazelluläre Überleben der Chlamydien durch Modulation von

Wirtszellprozessen (Peters, Wilson et al. 2007; Valdivia 2008). Für *C. trachomatis* konnte gezeigt werden, dass der frühe Einschluss entlang von Mikrotubuli zum Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC = microtubuli organizing center) in die Kernperipherie transportiert wird (Clausen, Christiansen et al. 1997). Beginnend acht bis zwölf Stunden nach dem ersten Kontakt differenzieren die infektiösen EBs zu den metabolisch aktiven RBs, welche sich anschließend durch binäre Zweiteilung vermehren (Wolf, Fischer et al. 2000). Während der Entwicklung sind Chlamydien auf die Zufuhr von ATP, Nukleotiden, Eisen, Aminosäuren und Lipiden von der Humanzelle angewiesen (McClarty 1994; Wylie, Hatch et al. 1997; Bavoil, Hsia et al. 2000; Carabeo, Mead et al. 2003; Kumar, Cocchiaro et al. 2006).



**Abbildung 1.2: Der chlamydialen Entwicklungszyklus**

Repräsentative Darstellung des biphasischen Entwicklungszyklus der Chlamydien. Die Zeitangaben beziehen sich auf die Infektion mit *C. pneumoniae* (Wolf, Fischer et al. 2000). N = Nukleus

Unter Nährstoffmangel oder unter dem Einfluss von Antibiotika können RBs in einen Übergangszustand übergehen, der sogenannten Persistenz. Diese zeichnet sich durch besonders große, abnorme Formen (AB = aberrant body) aus und geht häufig mit chronischen Infektionen einher (Hogan, Mathews et al. 2004). Die Redifferenzierung der RBs in die infektiösen EBs beginnt 48 hpi und verläuft deutlich asynchron, da sich einige RBs weiter teilen (acht bis zwölf Teilungen), während andere bereits redifferenzieren (Wolf, Fischer et al. 2000). Nach 72 hpi bis 96 hpi ist der Einschluss hauptsächlich mit EBs gefüllt,

welche die Wirtszelle über deren Lyse oder einen Exozytose-ähnlichen Prozess verlassen (Todd and Caldwell 1985; Moulder 1991; Wolf, Fischer et al. 2000). Zudem wurde ein weiterer Freisetzungsmechanismus beschrieben, die Extrusion, bei der sich der Einschluss oder Teile davon von der Wirtszelle ablösen, wobei letztere intakt bleibt (Hybiske and Stephens 2007). Die entlassenen infektiösen EBs können anschließend eine neue Zelle infizieren und einen weiteren Infektionszyklus starten.

## 1.2 Humane Endozytose

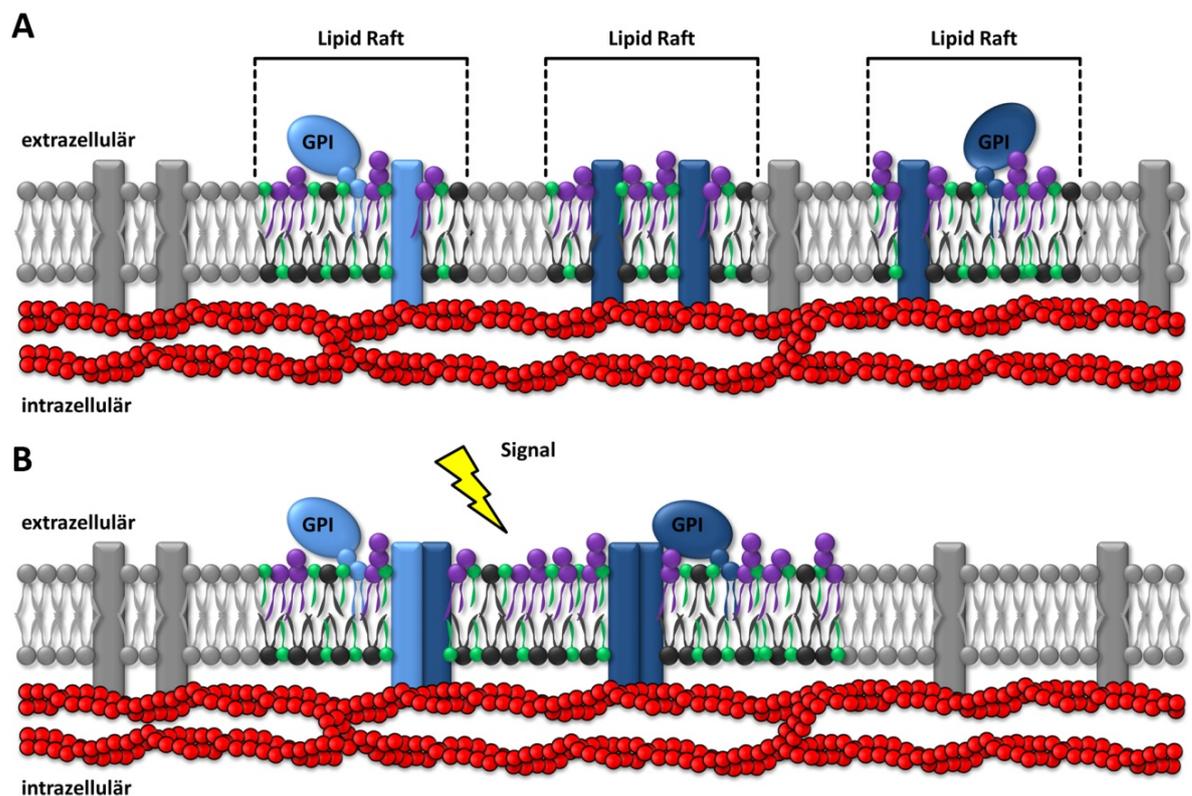
Bei der Endozytose werden Vesikel von der Membran abgeschnürt und in die Zelle aufgenommen. Zusammen mit der Exozytose reguliert die Endozytose somit maßgeblich die Komposition der Plasmamembran und die Interaktion der Zelle mit der Umwelt. Grundsätzlich werden zwei unterschiedliche Endozytosewege unterschieden: zum einen die Clathrin-abhängige (1.2.2, S. 10), zum anderen die Clathrin-unabhängige Endozytose (1.2.3, S. 11). Die Endozytose wird hauptsächlich durch Interaktionen zwischen Liganden mit spezifischen Rezeptoren der Plasmamembran reguliert. Einen wichtigen Beitrag zur Endozytose leisten kleine Mikrodomänen in der Plasmamembran, die als Lipid Rafts bezeichnet werden (1.2.1, S. 8). Sie sind angereichert mit oder ausgenommen von spezifischen Proteinen/Rezeptoren und haben daher einen essentiellen Anteil an der Signaltransduktion an der Plasmamembran der Zelle. Da die Endozytose der Humanzelle einen natürlichen Weg bietet, um „von außen“ in die Zelle aufgenommen zu werden, wird sie häufig von invasiven Pathogenen manipuliert und genutzt, um in die Wirtszelle zu gelangen (1.2.4, S. 12). Bei der Adhäsion und Internalisierung dieser Pathogene spielen Lipid Rafts häufig eine entscheidende Rolle (1.2.5, S. 13).

### 1.2.1 Lipid Rafts

Die Membran der Zelle ist keine starre Struktur, sondern nach dem „Fluid Mosaic Model“ vielmehr eine, aus zwei Lipidschichten bestehende, hoch fluide Schicht in der sich die Komponenten relativ frei bewegen können (Singer and Nicolson 1972). Die Lipidkomposition der Plasmamembran von Blutplättchen ähnelt der von anderen Säugetierzellen. Die Lipidschicht besteht hierbei aus verschiedenen Phospholipiden, dem Sphingolipid Sphingomyelin, welches etwa 20 % der Lipidmasse ausmacht und Cholesterol, was ein molares Verhältnis zu den Phospholipiden von etwa 0,5 aufweist. Zu den Phospholipiden zählen Phosphatidylcholin (~ 35 %), Phosphatidylethanolamin (~ 35 %), Phosphatidylserin (~ 13 %) und Phosphatidylinositolvarianten (< 5 %). Hierbei sind diese jedoch nicht gleichmäßig in den

beiden Schichten verteilt. So sind Sphingomyelin und Phosphatidylcholin hauptsächlich in der äußeren Schicht zu finden, während die anderen Phospholipide hauptsächlich in der inneren Schicht lokalisiert sind (zusammengefasst aus (Boesze-Battaglia and Schimmel 1997; van Meer, Voelker et al. 2008). Dennoch können Phospholipide von der äußeren Schicht in die innere und umgekehrt „geflippt“ werden (Bever, Comfurius et al. 1999).

Zudem weisen Plasmamembranen kleine, hoch dynamische Mikrodomänen auf, die sogenannten Lipid Rafts, die durch eine starke Anreicherung von Cholesterol und Sphingolipiden definiert sind (Simons and Ikonen 1997; Owen, Magenau et al. 2012) (Abbildung 1.3 A). Cholesterol ist dabei sowohl in der inneren als auch der äußeren Schicht der doppelschichtigen Plasmamembran eingebaut, während Sphingolipide (Sphingomyelin, Glycosphingolipide) lediglich in der äußeren Schicht zu finden sind. Desweiteren weisen Lipid Rafts eine hohe Akkumulation an Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Proteinen auf. Die umgebenden Membranen hingegen bestehen zum größten Teil aus ungesättigtem Phosphatidylcholin (PC) und sind deutlich flüdrer als die eng gepackten Lipid Rafts (zusammengefasst aus (Simons and Ikonen 1997)).



**Abbildung 1.3: Lipid Raft-Mikrodomänen in der Plasmamembran eukaryotischer Zellen**

Schematische Darstellung des Aufbaus von Lipid Rafts modifiziert nach Simons and Ikonen 1997, Simons and Toomre 2000 und Owen, Magenau et al. 2012. Lipid Rafts sind kleine Mikrodomänen (A), die jedoch durch extrazelluläre und intrazelluläre Stimuli clustern und so größere Interaktionsplattformen bilden können (B). Grün: Cholesterol, Lila: Sphingolipide, Blau: Proteine, die spezifisch in Lipid Rafts angereichert sind, Rot: kortikales Aktin-Netzwerk, GPI = Glycosylphosphatidylinositol-verankerte Proteine

Lipid Rafts spielen in der Signaltransduktion der Zelle eine entscheidende Rolle, da spezifische Proteine/Rezeptoren in Lipid Rafts angereichert sind, während andere ausgeschlossen werden (ausführlich beschrieben in (Simons and Toomre 2000; Owen, Magenau et al. 2012)). Diese „Sortierung“ der Proteine dient wahrscheinlich der Maximierung von Signaltransduktionsprozessen. Lipid Raft-Mikrodomänen sind 10 nm bis 200 nm groß, können jedoch durch extrazelluläre und intrazelluläre Stimuli clustern und somit als große Signaltransduktionsplattformen fungieren (Abbildung 1.3 B). Hierbei können Raft-Proteine zu großen Signaltransduktionskomplexen verbunden werden. Der genaue Mechanismus, wie die rezeptorvermittelte Signaltransduktion über die Lipid Rafts und das Clustern der Lipid Rafts funktioniert ist noch unbekannt, jedoch scheint das kortikale Aktin-Netzwerk für die Organisation von Lipid Rafts entscheidend zu sein. Somit besteht die Hauptfunktion von Lipid Rafts in der „Protein-Protein-Interaktion“-vermittelten Signaltransduktion an der Plasmamembran der Zelle. Zusätzlich spielen sie bei Endo- und Exozytoseprozessen und damit einhergehend beim Membrantransport eine entscheidende Rolle (zusammengefasst aus (Simons and Toomre 2000; Owen, Magenau et al. 2012)).

### 1.2.2 Clathrin-abhängige Endozytose

Die Clathrin-abhängige Endozytose (CME = clathrin mediated endocytosis) ist der am besten verstandene Endozytosemechanismus eukaryotischer Zellen. Mittels CME kann eine Vielzahl verschiedener Cargos aufgenommen werden, wobei unterschiedliche akzessorische Proteine und Adapterproteine benötigt werden (ausführlich beschrieben in (Doherty and McMahon 2009; McMahon and Boucrot 2011)). Allgemein ist die CME in fünf aufeinander folgende Phasen unterteilt: der Initiation oder Nukleation, der Cargo Selektion, der Assemblierung von Clathrin, der Abschnürung des Vesikels und schließlich der Entfernung des Clathrin-Mantels vom Vesikel. Im ersten Schritt der Formierung eines Clathrin-umschlossenes Vesikel (CCV = clathrin coated vesicle) erfolgt die Assemblierung des Nukleationsmoduls an der Innenseite der Plasmamembran aus EPS15, FCH-only-Domänen-Proteinen (FCHO1,2) und Intersektinen, was eine ersten Krümmung der Plasmamembran ins Zytosol der Zelle induziert. Die Stelle der Krümmung wird dabei durch das Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat ( $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ ) definiert. Im zweiten Schritt wird AP2 rekrutiert, welches das Zentrum der Interaktionen bildet, indem es zum einen direkt  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  und die spezifischen Rezeptoren, zum anderen über Cargo-spezifische Adapterproteine indirekt das jeweilige Cargo bindet. Nach der Cargo Selektion erfolgt die Rekrutierung von Clathrin-Triskelien aus dem Zytosol der Zelle zum entstehenden Vesikel durch AP2 und weitere akzessorische Proteine, unter anderen Epsin. Clathrin stabilisiert hierbei die Invagination der

Membran, bis sich schließlich ein komplettes CCV gebildet hat. Die Abschnürung des CCV von der Plasmamembran erfolgt durch die intrazelluläre, mechanochemische GTPase Dynamin, welche unter anderen direkt durch SNX9 (sortin nexin 9) rekrutiert wird. Sofort nach der Abschnürung wird final der Clathrinmantel durch Auxillin und HSC70 vom Vesikel entfernt. Aktin ist während der CME nicht essentiell und wird daher nicht als Kernkomponente angesehen. Die durch Arp2/3 und N-WASP induzierte Polymerisation von Aktin wird jedoch benötigt, um größere Zugkräfte zu erzeugen, welche bei der Endozytose von großen Cargos und an besonders rigiden Membranen notwendig sind. Die Größe der CCVs ist direkt abhängig von der Größe des Cargos, jedoch wurde ein maximaler äußerer Umfang von 200 nm beschrieben. Somit werden sehr große Cargos wie Bakterien wahrscheinlich nicht durch ein einziges CCV aufgenommen (zusammengefasst aus (Doherty and McMahon 2009; McMahon and Boucrot 2011)). Alternativ wurde für VSV (Vesicular stomatitis virus) beschrieben, dass es über die Clathrin-abhängige Endozytose aufgenommen wird, obwohl es eigentlich zu groß für ein CCV ist. Hierbei wird das CCV lediglich teilweise von Clathrin ummantelt und die vollständige Internalisierung ist folgend abhängig von der Polymerisierung von Aktin (Cureton, Massol et al. 2009; Cureton, Massol et al. 2010).

### 1.2.3 Clathrin-unabhängige Endozytose

Unter der Clathrin-unabhängigen Endozytose (CIE = clathrin independent endocytosis) werden alle endozytotischen Mechanismen zusammengefasst, die, wie der Name impliziert, unabhängig von der Kernkomponente Clathrin ablaufen (ausführlich beschrieben in (Doherty and McMahon 2009; Sandvig, Pust et al. 2011)). Die CIE kann ebenfalls durch eine Ligand-Rezeptor-Interaktion induziert werden, jedoch zusätzlich auch durch zelluläre Freilassung von Sphingomyelinase nach Schädigung der Membran oder durch Einlagerung von Lipiden, die die Membranwölbung beeinflussen. Die jeweiligen CIE-Aufnahmemechanismen werden aufgrund der Beteiligung unterschiedlicher kleiner GTPasen so wie Lipid Rafts und Dynamin unterschieden. Mit CIE wurden zunächst 60 – 80 nm Strukturen an der Plasmamembran assoziiert, die als Caveolae bezeichnet wurden, hauptsächlich aus Caveolin-1 (Cav-1) bestehen und spezifisch an Lipid Rafts lokalisieren (Kirkham and Parton 2005). Jedoch wird heutzutage davon ausgegangen, dass Caveolae normalerweise immobile Strukturen an der Plasmamembran sind und lediglich Cav-1 an endozytotischen Prozessen beteiligt ist. Neben der Cav-1 vermittelten Endozytose werden weitere fünf CIE-Mechanismen unterschieden: die Flotillin-abhängige Endozytose, die RhoA-abhängige sowie die Cdc42-abhängige Aufnahme, die Arf6-assozierte Aufnahme und die Makropinozytose. Die Lipid Raft-assozierten Proteine

Flotellin-1 und Flotellin-2, auch als Reggie-Proteine bezeichnet, weisen eine Homologie zu Cav-1 auf und vermitteln die Endozytose sowohl über einen Dynamin-abhängigen als auch Dynamin-unabhängigen Weg. Die Formierung des Endozytosevesikels ist sowohl in der RhoA-abhängigen Endozytose als auch in der Cdc42-abhängigen Endozytose abhängig von der Integrität von Lipid Rafts. Während die RhoA-abhängige Aufnahme jedoch Dynamin-abhängig verläuft und ebenfalls Rac-1 involviert, ist die Cdc42-abhängige Endozytose unabhängig von Dynamin und involviert zudem Arf1. Die Arf6-assoziierte Aufnahme hingegen ist wahrscheinlich kein tatsächlicher Endozytose- sondern vielmehr ein Recycling-Mechanismus, der in den meisten Fällen unabhängig von Dynamin verläuft. Die Makropinozytose führt zur Formierung von relativ großen Vesikeln und involviert eine „Membrankräuselung“ (membrane ruffling). Sie ist abhängig von einer Vielzahl akzessorischer Proteine wie Rac-1, Cdc42, PAK1 und Sorting Nexinen (SNX), hingegen weitgehend unabhängig von Dynamin, jedoch abhängig von Cholesterol und Aktin. Die Unterscheidung der einzelnen CIE-Mechanismen voneinander gestaltet sich allerdings insofern als schwierig, da einzelne Proteine in mehr als einem CIE-Mechanismus beteiligt sein können. Ebenso wie bei der CME kann auch bei der CIE das Zytoskelett der Zelle und in besonderem das Aktin-Zytoskelett genutzt werden, um Zugkräfte auf die sich wölbende Membran auszuüben und somit die Invagination der Membran zu unterstützen (zusammengefasst aus (Doherty and McMahon 2009; Sandvig, Pust et al. 2011)).

#### **1.2.4 Ausnutzung der Endozytose durch Bakterien und Viren**

Die humane Endozytosemaschinerie wird durch eine Vielzahl von humanen Pathogenen genutzt, um effektiv in die Wirtszelle aufgenommen zu werden. So benutzen viele Viren sowohl die Clathrin-abhängige als auch die Clathrin-unabhängige Endozytose um ihre eigene Aufnahme in die Wirtszelle zu induzieren. Letztere bietet, durch die Beteiligung von Lipid Rafts, zudem die Möglichkeit den typischen Endosom-zu-Lysosom Weg zu umgehen und gewährt dem Pathogen damit eine alternative Route, um den lysosomalen Enzymen zu entgehen (Doherty and McMahon 2009). So dringt SV40 (Simian Virus 40) nach Bindung an das Lipid Raft-spezifische Gangliosid GM1 über Clathrin-unabhängige Endozytose in die Humanzelle ein (Damm, Pelkmans et al. 2005; Ewers, Romer et al. 2010). Adenoviren hingegen benutzen die Clathrin-abhängige Endozytose um in die Wirtszelle einzudringen, während Influenza sowohl die CME als auch die CIE für die Aufnahme ausnutzen kann (Manes, del Real et al. 2003; Rust, Lakadamyali et al. 2004). Auch eine Pak1-abhängige Makropinozytose wurde für die Aufnahme von Vaccinia-Viren beschrieben (Mercer and Helenius 2008). Ebenso wie Viren nutzen unterschiedliche Bakterien wie *Listeria monocytogenes*,

*Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, und *Rickettsia conorii*, um nur ein paar zu nennen, die CME für ihren Eintritt in die Zelle (Veiga and Cossart 2006; Pizarro-Cerda, Bonazzi et al. 2010). Hierbei ist die Clathrin- und Dynamin-abhängige, induzierte Aufnahme von *L. monocytogenes* wohl am besten untersucht. Die Listerien-Proteine InlA und InlB binden humanes E-Cadherin bzw. den HGF-Rezeptor (hepatocyte growth factor) Met, was eine Signaltransduktionskaskade induziert und letztendlich zu einer Hakai- und Cbl-vermittelten Ubiquitinierung der Rezeptoren und der Clathrin-abhängigen Aufnahme des Bakteriums führt (Doherty and McMahon 2009; Pizarro-Cerda, Bonazzi et al. 2010). Da Bakterien im Allgemeinen zu groß für eine Clathrin-vermittelte Endozytose sind, ist bis heute unbekannt, ob Clathrin eine direkte Rolle bei der Invagination der Membran spielt, oder ob es den Eintritt durch andere Gründe fördert (Doherty and McMahon 2009). *Shigella flexneri* induziert die Aufnahme über das IpaB-Protein, welches mit Lipid Raft-lokalisierten CD44 der Humanzelle interagiert und so das Clustern der Lipid Rafts so wie die Rho-vermittelte Polymerisation von Aktin induziert (Lafont, Tran Van Nhieu et al. 2002; Manes, del Real et al. 2003). Auch die Internalisierung von *Neisseria gonorrhoeae* ist abhängig vom Clustern von Lipid Rafts und damit einhergehend von Rezeptoren wie CEACAM3 und ASGPR. Dies führt zur Assemblierung von der kleinen GTPase Rac und von Clathrin, die damit die Internalisierung maßgeblich induzieren (Parton and Richards 2003; Veiga and Cossart 2006). Ebenso wie Viren und Bakterien werden bakterielle Toxine über Endozytosemechanismen in die Zelle aufgenommen. So bindet das Cholera-Toxin über seine B-Untereinheit (CT-B), genauso wie SV40, das Lipid Raft-spezifische GM1 und wird entweder über CME oder CIE aufgenommen (Parton and Richards 2003; Doherty and McMahon 2009). Hingegen werden sowohl das Shiga-Toxin als auch das Anthrax-Toxin, welches die Lipid Raft-spezifischen Transmembranproteine TEM8 und CMG2 bindet, ausschließlich über Clathrin-abhängige Endozytose aufgenommen (Lafont and van der Goot 2005; Doherty and McMahon 2009).

### **1.2.5 Lipid Rafts und die Adhäsion und Internalisierung von Pathogenen**

Viele unterschiedliche Pathogene wie Viren, Bakterien, Pilze, Protozoen und sogar Prionen nutzen Lipid Rafts, um an die Wirtszelle zu adhären und dadurch ihren Eintritt zu initiieren, da diese eine gute Signalplattform darstellen und mit spezifischen Proteinen angereichert sind (Lafont and van der Goot 2005; Vieira, Correa et al. 2010). So ist die Konzentration von Lipid Rafts an der Eintrittsstelle von bekannten Pathogenen wie SV40 (Simian Virus), Influenza, HIV, Ebola Virus, Epstein-Barr Virus, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Toxoplasma gondii* und *Plasmodium*

*falciparum* essentiell für die Internalisierung in die Wirtszelle. Für die Adhäsion und insbesondere die Internalisierung werden kleine Lipid Rafts häufig zu großen Interaktionsplattformen geclustert, da so die spezifischen Lipid Raft-lokalisierten Rezeptoren ebenfalls in räumliche Nähe gebracht werden und oligomerisieren können (zusammengefasst aus (Manes, del Real et al. 2003; Lafont and van der Goot 2005; Riethmuller, Riehle et al. 2006; Vieira, Correa et al. 2010)). So bindet HIV über das Glykoprotein gp120 an den, in Lipid Rafts lokalisierten, Rezeptor CD4 und die Korezeptoren CCR5 und CXCR4. Hierbei ist ein Clustern von Lipid Rafts und CD4 zu beobachten und bestimmt so die spezifische Domäne der Plasmamembran an der das Glykoprotein gp41 die Fusion mit der Plasmamembran vermittelt. Der Mechanismus der hier zum Clustern der Rafts führt ist jedoch unbekannt (Riethmuller, Riehle et al. 2006; Vieira, Correa et al. 2010). Der Pilz *P. brasiliensis* fördert ebenfalls die Aggregation von Lipid Rafts was einen wichtigen Schritt in der Adhäsion darstellt und zur Aktivierung von Src-Kinasen führt, die spezifisch an Lipid Rafts lokalisieren (Vieira, Correa et al. 2010). Sowohl *S. typhimurium* als auch *S. flexneri* besitzen als Gram-negative Bakterien ein Typ III Sekretionssystem (TTSS), das zur Sekretion von Effektorproteinen benötigt wird. Lipid Rafts sind in der Lage, das TTSS dieser beiden Pathogene zu aktivieren und so die Translokation der Cholesterol-bindenden Effektorproteine SipB (*Salmonella*) und IpaB (*Shigella*) zu induzieren. Dabei ist für *Salmonella* die Integrität der Lipid Rafts für den Eintritt, nicht jedoch für die Adhäsion an die Zelle nötig, während bei *Shigella* beide Prozesse abhängig von Lipid Rafts sind (Lafont and van der Goot 2005). Invasive *E. coli* Stämme binden über das Adhäsin FimH an das humane GPI-verankerte, Lipid Raft-lokalisierte CD48 und veranlassen so ihren Eintritt in die Wirtszelle durch geclusterte Lipid Rafts (Riethmuller, Riehle et al. 2006). Lipid Rafts spielen jedoch auch für die Adhäsion von nicht-invasiven Bakterien eine Rolle. So sekretieren nicht-invasive *E. coli* Stämme das Tir-Protein, welches in Lipid Rafts clustert. Es wird anschließend durch die Lipid Raft-lokalisierte Src-ähnliche Kinase c-Fyn phosphoryliert, was zur Neuorganisation des Aktinzytoskeletts und der Ausbildung einer „Podeststruktur“ (actin pedestal) führt, auf dem das Bakterium an die Zelle gebunden bleibt (Lafont and van der Goot 2005). Interessanterweise sind für die Ausbildung dieser „Podeststrukturen“ ebenfalls Clathrin und Dynamin notwendig, die typische Komponenten der Endozytosemaschinerie sind (Pizarro-Cerda, Bonazzi et al. 2010).

Neben der Adhäsion und Internalisierung sind Lipid Rafts an weiteren Aspekten der Infektion beteiligt, zu denen die intrazelluläre Reifung des pathogenhaltigen Phagosoms, dessen Lyse und Fusion, sowie die Aktivierung von intrazellulären Signalmolekülen und die Induktion des Zelltodes gehören (Riethmuller, Riehle et al. 2006).

## 1.3 Zelluläre Adhäsion und Invasion humanpathogener Bakterien

Invasive, pathogene Bakterien induzieren ihre Aufnahme in nicht-phagozytische Zellen und werden aufgrund ihrer Lebensweise in zwei Gruppen unterteilt. Eine Gruppe bilden die obligat intrazellulären Bakterien wie *Rickettsia* und *Chlamydia*, die abhängig von der Wirtszelle sind und daher extrazellulär nicht überleben können. Die andere Gruppe bilden die fakultativ intrazellulären Bakterien wie *Salmonella*, *Yersinia*, *Listeria* und *Neisseria*, deren Infektion sich sowohl an Zelloberflächen als auch intrazellulär manifestieren kann. Die Bindung (Adhäsion) der Bakterien an die Wirtszelle wird durch bestimmte oberflächenlokalisierte Proteine, die sogenannten Adhäsine vermittelt (1.3.1, S. 15). Die Invasion in die Wirtszelle erfolgt anschließend über den „Zipper“- oder den „Trigger“-Mechanismus (1.3.2, S. 18). Hierbei werden unterschiedliche Rezeptoren und/oder Adapterproteine der Wirtszelle rekrutiert und aktiviert um das Aktinzytoskelett der Wirtszelle an der Eintrittsstelle zu polymerisieren (1.3.2, S. 18).

### 1.3.1 Bakterielle Adhäsine

Bakterielle Proteine mit der Eigenschaft an bestimmte Strukturen der Zelloberfläche zu binden werden als Adhäsine bezeichnet. Sie vermitteln den Kontakt zwischen Bakterium und Wirtszelle und sind daher wichtige Schlüsselproteine von Pathogenen. Dabei exprimieren viele Bakterien nicht nur ein, sondern mehrere Adhäsine auf ihrer Oberfläche um möglichst effizient an die Wirtszelle zu binden (ausführlich beschrieben in (Gerlach and Hensel 2007)). Um Adhäsine auf der Zelloberfläche zu präsentieren müssen Gram-positive Bakterien das Protein lediglich durch eine Membran, jedoch durch eine dicke Mureinschicht transportieren. Gram-negative Bakterien hingegen müssen das Adhäsine sowohl über die zytoplasmatische Membran als auch durch das Periplasma und über die äußere Membran auf die Zelloberfläche befördern. Daher besitzen Gram-negative Bakterien verschiedene Typen von Adhäsinen, die über unterschiedliche Sekretionsmechanismen transportiert werden. Sie werden aufgrund ihrer Struktur in zwei Hauptgruppen unterteilt: Die fimbrienartigen (I) und die nicht-fimbrienartigen (II) Adhäsine (Gerlach and Hensel 2007).

(I) Fimbrienartige Adhäsine sind filamentöse, heteropolymere Fortsätze die sich aus mehreren, bis zu hunderten Untereinheiten zusammensetzen. Sie werden in fünf Untergruppen unterteilt: Typ I und P Pili, Afa/Dr Adhäsine, CS Pili, Typ IV Pili und Curli (ausführlich beschrieben in (Gerlach and Hensel 2007)).

(i) Sowohl die Typ I und P Pili, die Afa/Dr Adhäsine als auch die CS Pili werden über den CU Weg (Chaperone/Usher) oder einen CU-ähnlichen Weg assembliert (Pizarro-Cerda and

Cossart 2006). Hierbei werden alle Untereinheiten des heteropolymeren Pilus über den Sec-vermittelten Transport in das Periplasma transloziert, wobei Chaperone die vorzeitige Assemblierung verhindern. Die Translokation und die Assemblierung auf der bakteriellen Oberfläche wird durch ein Protein induziert, welches als Assemblierungsplattform (Usher) dient und das Adhäsins in der äußeren Membran verankert (zusammengefasst aus (Gerlach and Hensel 2007)). So besitzen uropathogene *E. coli* (UPEC) sowohl Adhäsine der Unterklasse Typ I als auch der Unterklasse P Pili. Varianten des P Pili Adhäsins PapG binden unterschiedliche aber verwandte terminale Zucker von Glykolipiden und vermitteln dadurch sowohl Wirts- als auch Gewebespezifität (Pizarro-Cerda and Cossart 2006; Gerlach and Hensel 2007). Das Mannose-bindende Typ I Adhäsins FimH hingegen erkennt CD48 und löst so die Aufnahme in die Wirtszelle aus (Riethmüller, Riehle et al. 2006; Gerlach and Hensel 2007).

(ii) Typ IV Pili werden nicht über den CU Weg assembliert, sondern in der zytoplasmatischen Membran verankert und durch die Polymerisation einer einzigen Untereinheit durch die äußere Membran auf die Oberfläche des Bakteriums gebracht. Für die Biogenese des Pilus ist jedoch eine Vielzahl akzessorischer Proteine nötig. Eine Besonderheit der langen, flexiblen Typ IV Pili ist, dass sie lateral aggregieren und somit Bündel formen können. Zudem können die Pili zurückgezogen werden, während die Spitze an die Wirtszelle adhärirt bleibt, so dass der Kontakt zwischen Bakterium und Wirtszelle intensiviert wird (zusammengefasst aus (Pizarro-Cerda and Cossart 2006; Gerlach and Hensel 2007)). So stellt der Typ IV PAK-Pilus von *Pseudomonas aeruginosa* das dominante Adhäsins dar, welches die Adhäsion des Bakteriums über die Bindung der Wirtszellen-Glykolipide asialo-GM1 und asialo-GM2 vermittelt (Gerlach and Hensel 2007).

(iii) Curli-Adhäsine assemblieren an der Oberfläche der Bakterien durch extrazelluläre Nukleationspräzipitation. Hierbei polymerisiert die Hauptuntereinheit des Adhäsins an einem oberflächenlokalisierten Nukleator (Gerlach and Hensel 2007).

(II) Nicht-fimbrienartige Adhäsine sind oberflächenlokalisierte Mono- oder Oligomere, die nicht über den CU Weg assembliert werden. Sie werden in drei Untergruppen unterteilt: Autotransporter-Adhäsine (AT-Adhäsine) (i), integrale Außenmembranadhäsine (ii) und sekretierte Adhäsine (iii) (ausführlich beschrieben in (Gerlach and Hensel 2007)).

(i) Die AT-Adhäsine werden nochmals in die klassischen AT-Adhäsine (ia), die trimeren AT-Adhäsine (TAA) (ib) und die TPS-Adhäsine (two partner system) (ic) unterteilt.

(ia) Die klassischen AT-Adhäsine sind Typ V Autotransporter mit einer N-terminalen Signalsequenz, die eine Sec-abhängige Translokation des Proteins in das Periplasma

ermöglicht. Die C-terminale Translokationsdomäne formt anschließend ein  $\beta$ -Barrel in der äußeren Membran und erlaubt somit die Sekretion der adhäsiven „Passagier“-Domäne.

(ib) Die TAA sind ebenfalls Typ V Autotransporter, welche Oligomerkomplexe auf der bakteriellen Zelloberfläche formen und über ihre C-terminalen Translokationsdomänen interagieren, um  $\beta$ -Barrel-Anker in der äußeren Membran zu formen. Die Struktur der TAA ähnelt dabei einem Lutscher bestehend aus einer Kopf-Domäne, die die Adhäsion vermittelt, einem langen Stiel aus repetitiven Elementen und einem Membrananker (zusammengefasst aus (Gerlach and Hensel 2007)). So bildet das TAA YadA von *Yersinia* hochmolekulare, trimere Strukturen auf der Oberfläche des Bakteriums und bindet extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen, Laminin und Fibronectin (Isberg and Barnes 2001).

(ic) TPS-Adhäsine zeichnen sich dadurch aus, dass die „Passagier“-Domäne und die Autotransporter-Domäne als zwei separate Proteine translatiert werden (Gerlach and Hensel 2007). So ist das TPS-Adhäsine FHA von *Bordetella pertussis* in der Lage, die Adhäsion durch Bindung unterschiedlicher Liganden zu vermitteln (Mazar and Cotter 2006; Gerlach and Hensel 2007). Interessanterweise wird ein großer Teil des Proteins durch die bakterielle Protease SphB1 gespalten und von der Oberfläche des Bakteriums abgelöst (Coutte, Antoine et al. 2001). Diese Freilassung von Adhäsinen in den extrazellulären Raum scheint ein verbreiteter, jedoch immer noch kaum verstandener Mechanismus zu sein (Gerlach and Hensel 2007).

(ii) Integrale Außenmembranadhäsine werden über das Typ I Sekretionssystem (T1SS) auf die bakterielle Oberfläche transloziert. Der heterotrimere T1SS-Komplex besteht aus einem ABC-Exporter (ATP-binding cassette) in der inneren Membran, einem Membranfusionsprotein (MFP) und einem porenformenden Protein in der äußeren Membran. Das integrale äußere Membranprotein Invasin von *Yersinia* besteht aus einem N-terminalen  $\beta$ -Barrel-Anker, vier Domänen aus der Ig Superfamilie (D1 – D4) und der D5-Domäne. Letztere gehört zu den C-Typ Lektinen und bindet mit hoher Affinität  $\beta$ 1-Integrine, was die Aufnahme des Bakteriums in die Wirtszelle induziert. Ein weiteres integrales Adhäsine stellt das Protein Intimin von enterohämorrhagischem und enteropathogenem *E. coli* (EHEC / EPEC) dar. Intimin ist ähnlich dem Invasin von *Yersinia* aufgebaut und besitzt einen N-terminalen  $\beta$ -Barrel-Anker, drei Domänen aus der Ig Superfamilie (D1 – D3) und eine C-Typ Lektin D4-Domäne. Die Domänen D3 und D4 vermitteln die Bindung der *E. coli*s an die Wirtszelle über die Interaktion mit dem bakteriellen Tir (translocated intimin receptor) in der humanen Zellmembran (zusammengefasst aus (Gerlach and Hensel 2007)). Das Tir-Protein ist ebenfalls ein *E. coli* Protein und wird über das Typ III Sekretionssystem in die Wirtszelle sekretiert, wo

es nach der Phosphorylierung in die Plasmamembran der Wirtszelle integriert und als Rezeptor für Intimin fungiert (Pizarro-Cerda and Cossart 2006; Gerlach and Hensel 2007).

(iii) Sekretierte Adhäsine können über das Typ I Sekretionssystem transloziert werden und zeichnen sich durch das Vorhandensein von Glyzin-reichen Wiederholungen aus. Das größte bekannte, sekretierte Adhäsion ist das 900 kDa LapA Adhäsion von *Pseudomonas fluorescens*. Der Mechanismus sekretierter Adhäsine ist jedoch immer noch unklar. So könnten sie einerseits eine „Brückenfunktion“ haben, indem sie zum einen mit bakteriellen, zum anderen mit wirtszellspezifischen Oberflächenstrukturen interagieren. Andererseits könnte das Protein, wie im Falle von FHA bei *Bordetella pertussis*, sowohl sekretiert als auch oberflächengebunden vorliegen, so dass beide Varianten zusammen die Adhäsion vermitteln (zusammengefasst aus (Gerlach and Hensel 2007)).

Wie in den zuvor genannten Beispielen beschrieben, vermitteln bakterielle Adhäsine die Bindung an die Wirtszelle, indem sie mit Zuckerstrukturen oder Proteinen der extrazellulären Matrix oder der humanen Zelloberfläche interagieren. Für einige Bakterien wie *Helicobacter pylori* und *H. mustelae*, sowie *Haemophilus influenzae*, EPEC und EHEC, als auch *Actinobacillus pleuropneumoniae* wurde zudem gezeigt, dass sie direkt mit dem Phospholipid Phosphatidylethanolamin (PE) der Wirtszellmembran interagieren können (Lingwood, Huesca et al. 1992; Gold, Huesca et al. 1993; Busse, Hartmann et al. 1997; Barnett Foster, Philpott et al. 1999; Jeannotte, Abul-Milh et al. 2003). In den meisten Fällen ist hierbei jedoch das entsprechende bakterielle Adhäsion unbekannt. Hingegen konnte für MAM7 (multivalent adhesion molecule 7) von *Vibrio parahaemolyticus* eine Bindung an das Phospholipid Phosphatidsäure (PA) sowie an das Protein Fibronectin nachgewiesen werden. Dies führt zur Ausbildung eines Komplexes auf der Oberfläche der Wirtszelle und unterstützt somit die Aufnahme des Bakteriums (Krachler, Ham et al. 2011; Krachler and Orth 2011). Homologe zu MAM7 werden unter anderem auch in *Yersinia*, *Salmonella* und EPEC gefunden, was die generelle Bedeutung von Lipid-Interaktionen bei frühen Schritten der bakteriellen Infektion hervorhebt.

### 1.3.2 Grundlegende Invasionsmechanismen

Nach der Bindung an die Wirtszelle induzieren viele pathogene Bakterien ihren Eintritt in die Zelle. Grundsätzlich werden zwei Mechanismen der induzierten Aufnahme unterschieden: der „Zipper“-Mechanismus und der „Trigger“-Mechanismus. (ausführlich beschrieben in (Cossart and Sansonetti 2004; da Silva, Cruz et al. 2011)).

Beim „Zipper“-Mechanismus interagieren die Bakterien im ersten Schritt über oberflächenlokalisierte Proteine entweder direkt oder indirekt über „Brückenproteine“ mit

Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle. Diese Interaktion löst im zweiten Schritt über ein Clustern des/der Rezeptor(en) eine Signalkaskade aus, bei der Proteine phosphoryliert sowie Adapterproteine rekrutiert und aktiviert werden, was zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts und Ausstülpung der Plasmamembran der Wirtszelle um das Bakterium führt. Typischerweise werden bei diesem Mechanismus verschiedene Komponenten der humanen Endozytose rekrutiert und aktiviert. Im zweiten Schritt bildet sich demnach das phagozytotische Vesikel um das Bakterium. Im dritten und finalen Schritt wird das phagozytotische Vesikel um das Bakterium geschlossen, von der Plasmamembran der Wirtszelle abgeschnürt und das Aktinzytoskelett wieder in den „natürlichen“ Zustand zurückversetzt (zusammengefasst aus (Cossart and Sansonetti 2004; da Silva, Cruz et al. 2011)).

Beim „Trigger“-Mechanismus hingegen erfolgt die Reorganisation des Aktinzytoskeletts direkt durch bakterielle Effektorproteine, die über das Typ III Sekretionssystem (TTSS) in die Wirtszelle injiziert werden (Cossart and Sansonetti 2004; da Silva, Cruz et al. 2011). Im ersten Schritt, der Prä-Interaktion, ist die Sekretion der Effektorproteine zunächst unterdrückt. Im folgenden Interaktionsschritt wird der Kontakt zwischen dem TTSS, das auch als Injektosom bezeichnet wird, und der Wirtszelle hergestellt und die bakteriellen Effektorproteine werden kontaktabhängig transloziert (Cossart and Sansonetti 2004; Cornelis 2006). Im dritten Schritt formt sich, durch Effektorprotein-induzierte Aktivierung zellulärer Proteine, die zur Veränderung der Wirtszellmembran und massiver Polymerisierung des Aktinzytoskeletts führen, die makropinozytotische Tasche um das Bakterium. Im vierten und finalen Schritt wird die Tasche um das Bakterium geschlossen und das Aktinzytoskelett durch Depolymerisierung in den „natürlichen“ Zustand zurückversetzt (zusammengefasst aus (Cossart and Sansonetti 2004)).

Nach der Invasion der Bakterien über den „Zipper“- oder „Trigger“-Mechanismus verbleiben die Bakterien wie *Salmonella* oder *Chlamydia* entweder im Phagosom und modifizieren dieses um der lysosomalen Fusion zu entgehen oder verlassen das Phagosom, wie *Shigella* oder *Listeria* und vermehren sich im Zytosol der Wirtszelle (Cossart and Sansonetti 2004).

### 1.3.3 Invasionsstrategien humanpathogener Bakterien

Die Internalisierung von *Yersinia pseudotuberculosis* und *Listeria monocytogenes* sind typische Beispiele für eine Invasion in die Wirtszelle über den „Zipper“-Mechanismus, während *Shigella flexneri* und *Salmonella typhimurium* klassische Vertreter einer Invasion über den „Trigger“-Mechanismus sind. Anhand dieser Pathogene sollen daher im Folgenden unterschiedlichen Invasionsstrategien detaillierter erläutert werden.

*Y. pseudotuberculosis* bindet über das trimere AT-Adhäsion (TAA) YadA Proteine der extrazellulären Matrix der Wirtszelle wie Kollagen und Fibronectin, welche wiederum  $\beta$ 1-Integrine der Wirtszelle binden (Isberg and Barnes 2001; Nummelin, Merckel et al. 2004; Heise and Dersch 2006). Somit bindet *Y. pseudotuberculosis* über YadA indirekt an  $\beta$ 1-Integrine der Wirtszelle. Die direkte, hoch affine Bindung an verschiedene  $\beta$ 1-Integrine wird über das integrale Außenmembran-Adhäsion Invasin vermittelt (Isberg and Leong 1990). Die Bindung induziert das Clustern von Integrinen und ermöglicht somit eine effizientere, nachgeschaltete Signalweitergabe (Dersch and Isberg 1999; Isberg and Barnes 2001). Diese führt zur Aktivierung der Rac-1-abhängigen Signalkaskade und Aktinpolymerisierung, induziert durch den Arp2/3-Komplex und involviert unter anderen die Aktivierung der Tyrosinkinase FAK (focal adhesion kinase) und Src (Alrutz and Isberg 1998; Alrutz, Srivastava et al. 2001). Die Invasin-vermittelte Aufnahme bedarf zusätzlich der Aktivierung des Rac-1-Effektorproteins PIP5K (Phosphatidylinositol-4-Phosphate-5-Kinase), welches wiederum durch Arf6 reguliert wird (Wong and Isberg 2003). Zusammen mit der Aktivierung von PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) reguliert PIP5K die Phosphatidylinositolkomposition der inneren Seite der Plasmamembran der Wirtszelle und führt somit zur Rekrutierung und Aktivierung weiterer Kinasen wie B/Akt, welche die Aufnahme von *Y. pseudotuberculosis* unterstützen (Eitel, Heise et al. 2005; Uliczka, Kornprobst et al. 2009).

Der Eintritt von *L. monocytogenes* in die Wirtszelle ist der zurzeit wohl am besten untersuchte Internalisierungsprozess. *L. monocytogenes* besitzt mit InlA und InlB (Internalin) zwei oberflächenlokalisierte Proteine, die den Eintritt in die Wirtszelle vermitteln können. Das LLR-Protein (leucin rich repeat) InlA interagiert mit der ersten Ektodomäne des transmembranen Glykoproteins E-Cadherin (Schubert, Urbanke et al. 2002). Diese Interaktion bewirkt die Rekrutierung von  $\beta$ -Catenin und  $\alpha$ -Catenin, wobei letzteres direkt Aktin binden kann (Lecuit, Hurme et al. 2000). Die InlA/E-Cadherin-induzierte Polymerisierung von Aktin wird durch den Aktinnukleator Arp2/3 vermittelt und bedarf der Aktivierung durch Cortaktin, welches durch die aktivierte Tyrosinkinase Src und die kleine GTPase Rac-1 rekrutiert wird (Sousa, Cabanes et al. 2007). Zudem wird E-Cadherin durch die InlA-Bindung zunächst durch Src phosphoryliert und anschließend durch die Ubiquitinligase Hakai ubiquitiniert (Bonazzi, Veiga et al. 2008). Diese Ubiquitinierung wiederum induziert die Rekrutierung von Clathrin, welches für eine effiziente Aufnahme benötigt wird. Interessanterweise spielt mit Caveolin-1 auch eine Komponente der Clathrin-unabhängigen Endozytose eine entscheidende Rolle in der InlA-vermittelten Aufnahme von *L. monocytogenes* (Bonazzi, Veiga et al. 2008). InlB hingegen interagiert mit drei verschiedenen zellulären Komponenten, wobei die wichtigste Interaktion die mit der HGF-Rezeptor

(hepatocyte growth receptor) Tyrosinkinase Met ist (Shen, Naujokas et al. 2000; Bierne and Cossart 2002). Diese Interaktion führt zur Phosphorylierung der Adaptoren Gab1, Cbl und Shc sowie zur Rekrutierung und Aktivierung von CrkII und PI3K (Ireton, Payrastra et al. 1999; Sun, Shen et al. 2005). Die Remodellierung des Aktinzytoskeletts, bedingt durch den Nukleotorkomplex Arp2/3, ist abhängig von Rac-1, PI3K, Abi1 und WAVE2 (Bierne, Gouin et al. 2001; Bierne, Miki et al. 2005; Seveau, Pizarro-Cerda et al. 2007; Seveau, Tham et al. 2007). Die Ubiquitinligase Cbl ubiquitiniert den Met-Rezeptor und induziert so die Rekrutierung der Clathrin-abhängigen Endozytosemaschinerie (Veiga and Cossart 2005). So ist die InlB/Met-induzierte Internalisierung von *L. monocytogenes* abhängig von den CME-Komponenten Clathrin, Dynamin, Grb2, Esp15 und Cortaktin (Veiga and Cossart 2005). Das InlB-Adhäsion ist im Gegensatz zu InlA nicht-kovalent in die Bakterienmembran verankert und kann durch Heparin von dieser abgelöst werden (Jonquieres, Pizarro-Cerda et al. 2001). Lösliches InlB ist in der Lage mit humanem gC1-R/p32 zu interagieren, wobei die Funktion bislang ungeklärt ist (Braun, Ghebrehiwet et al. 2000).

Sowohl die Internalisierung über InlA als auch über InlB ist abhängig von Lipid Rafts (Seveau, Bierne et al. 2004; Seveau, Tham et al. 2007). Hierbei sind Lipid Rafts essentiell bei der initialen InlA/E-Cadherin-Interaktion, spielen jedoch bei der InlB/Met-vermittelten Signalkaskade erst später eine Rolle (Seveau, Bierne et al. 2004).

*S. flexneri* induziert seine Aufnahme in die Wirtszelle über die Translokation von Effektorproteinen über das Typ III Sekretionssystem (TTSS). Hierbei erfolgt die Bindung an die Wirtszelle ebenso wie die Aktivierung der Typ III Sekretion abhängig von Lipid Rafts (Lafont, Tran Van Nhieu et al. 2002; van der Goot, Tran van Nhieu et al. 2004). Das Translokon bestehend aus dem cholesterolbindenden Protein IpaB und IpaC wird in die Plasmamembran der Wirtszelle integriert und ermöglicht so die weitere Sekretion von Effektorproteinen (Hayward, Cain et al. 2005; Schroeder and Hilbi 2008). Dabei rekrutiert IpaC über den zytoplasmatischen C-Terminus die Tyrosinkinase Src, welche wiederum Cortaktin phosphoryliert (Bougneres, Girardin et al. 2004; Mounier, Popoff et al. 2009). Zudem führt die Interaktion von IpaB mit Lipid Raft-lokalisiertem CD44 zum Clustern der Lipid Rafts und ermöglicht damit die Rekrutierung weiterer Signalmoleküle (Skoudy, Mounier et al. 2000; Lafont, Tran Van Nhieu et al. 2002). So akkumulieren die aktivierten Abl-Tyrosinkinasen Abl und Arg an der *S. flexneri*-Bindestelle und phosphorylieren den molekularen Adapter Crk (Burton, Plattner et al. 2003). Aktiviertes Crk aktiviert zum einen mutmaßlich einen GEF (guanidine nucleotide exchange factor) der GTPasen Cdc42 und Rac-1, aktiviert diese somit und führt zur Rekrutierung des Arp2/3 Komplexes (Tran Van Nhieu, Caron et al. 1999; Burton, Plattner et al. 2003; Pizarro-Cerda and Cossart 2006;

Schroeder and Hilbi 2008). Zum anderen induziert aktiviertes Crk zusammen mit dem Src-aktivierten Cortaktin die Polymerisation von Aktin über den Arp2/3 Komplex (Bougnères, Girardin et al. 2004). Des Weiteren aktiviert das translozierte Effektorprotein VirA Rac-1 indirekt über die Destabilisierung des Mikrotubulinetzwerks (Yoshida, Katayama et al. 2002). Das Effektorprotein IpaD wirkt als eine Inositol-4-Phosphatase, das an der Eintrittsstelle PtdIns4,5P<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) in der Plasmamembran der Wirtszelle zu PtdIns5P (Phosphatidylinositol-5-Phosphat) dephosphoryliert und somit maßgeblich zur Morphologieänderung der Wirtszellenmembran beiträgt (Niebuhr, Giuriato et al. 2002). Nach der erfolgreichen Invasion führt die Sekretion von IpaA zur Vinculin-vermittelten Depolymerisation des assemblierten Aktins an der Eintrittsstelle und stellt somit die ursprüngliche Membranarchitektur wieder her (Bourdet-Sicard, Rudiger et al. 1999; Hamiaux, van Eerde et al. 2006).

*Salmonella enterica* Serovar *typhimurium* (*S. typhimurium*) stellt den engen Kontakt mit der Wirtszelle über das Translokon aus SipB, SipC und SipD des TTSS her (Lara-Tejero and Galan 2009). Hierbei ist das SipD-Protein, ähnlich wie das IpaB-Protein von *S. flexneri*, ein cholesterolbindendes Protein. Im Gegensatz zu *S. flexneri* ist hier lediglich der Eintritt in die Wirtszelle und nicht die Adhäsion an selbige abhängig von der Integrität von Lipid Rafts (Garner, Hayward et al. 2002; Hayward, Cain et al. 2005). *S. typhimurium* sekretiert mit SipA und SipC zwei Proteine, die direkt Aktin binden können, wobei SipC essentiell für den Eintritt in die Wirtszelle ist, während SipA die Funktion von SipC unterstützt (McGhie, Hayward et al. 2001; McGhie, Hayward et al. 2004). Hierbei bündelt SipC Aktin und induziert die Polymerisation (Hayward and Koronakis 1999; Myeni and Zhou 2010). SipA hingegen bindet Aktin und verhindert die ADF/Cofilin-vermittelte Depolymerisation, so dass SipA und SipC zusammen direkt die Reorganisation des Aktinzytoskeletts an der Eintrittsstelle vermitteln (Zhou, Mooseker et al. 1999; McGhie, Hayward et al. 2001; McGhie, Hayward et al. 2004). Die Effektorproteine SopE und SopE2 sind GEFs für Rac-1 und Cdc42, aktivieren dies somit direkt und induzieren die Formation der Membranausstülpungen über die Aktivierung von Arp2/3 (Hardt, Chen et al. 1998; Stender, Friebe et al. 2000; Schlumberger, Friebe et al. 2003). Cdc42 wird zudem indirekt über SopB (SigD) aktiviert (Zhou, Chen et al. 2001; Patel and Galan 2006; Rodriguez-Escudero, Ferrer et al. 2011). SopB besitzt eine Inositol-Phosphatase-Aktivität und modifiziert hierdurch die Phosphatidylinositolkomposition der Wirtszellenmembran zusammen mit einer Wirtszelleninositolphosphatase, welche durch SopE aktiviert wird (Zhou, Chen et al. 2001). Ebenso wie *S. flexneri* induziert auch *S. typhimurium* die Wiederherstellung der natürlichen Plasmamembran- und Zytoskelettstruktur durch die Sekretion des Effektorproteins SptB (Fu and Galan 1999). SptB wirkt als GAP

(GTPase activating protein) von Rac-1 und Cdc42 und inaktiviert somit die Rac-1 und Cdc42-vermittelte Aktinpolymerisation (Fu and Galan 1999; Kubori and Galan 2003). Hierbei wird SptB zwar gleichzeitig mit SopE sekretiert, jedoch wird SopE im Wirtszellzytoplasma relativ schnell durch des Proteasom degradiert, so dass SptB wirkt, wenn SopE bereits degradiert und *S. flexneri* aufgenommen ist (Kubori and Galan 2003). Interessanterweise verfügt *S. enterica* Subspezies Enterica Serovar Enteridis neben der Invasion über den beschriebenen „Trigger“-Mechanismus auch die Möglichkeit durch das Protein Rck über den „Zipper“-Mechanismus in die Wirtszelle einzudringen (Rosselin, Virlogeux-Payant et al. 2010). Dies involviert die Aktivierung der Tyrosinkinase c-Src, Rac-1 über den PI3K-Akt Signalweg und Cdc42, welche die Arp2/3-induzierte Polymerisierung von Aktin vermitteln (Rosselin, Virlogeux-Payant et al. 2010; Mijouin, Rosselin et al. 2012; Wiedemann, Rosselin et al. 2012).

Trotz der unterschiedlichen involvierten Rezeptoren und aktivierten Signalwege weisen die geschilderten Internalisierungsprozesse deutliche Gemeinsamkeiten auf. So wird in jedem Fall zum einen die Ausstülpung der Wirtszellenmembran um das Bakterium durch die induzierte Polymerisierung von Aktin an der Eintrittsstelle vermittelt. Zum anderen wird die Phosphatidylinositol-Komposition der zytoplasmatischen Schicht der Plasmamembran der Wirtszelle häufig modifiziert, um die Ausstülpung der Membran zu unterstützen. Auch wird deutlich, dass zumeist mehr als eine bakterielle Komponente denselben Mechanismus der Wirtszelle aktivieren.

## 1.4 Adhäsion und Internalisierung bei Chlamydien

Die Adhäsion der chlamydialen EBs an die Wirtszelle erfolgt in zwei Schritten (Carabeo and Hackstadt 2001). Der erste, reversible Kontakt wird über das Adhäsिन OmcB vermittelt, das mit Glykosaminoglykanen (GAG) der Wirtszelle interagiert (1.4.1, S. 24). Die irreversible Adhäsion an die Wirtszelle wird folgend über Protein-Protein-Interaktionen vermittelt (1.4.2, S. 27). Die Aufnahme der Chlamydien in die Wirtszelle wird wahrscheinlich sowohl durch Typ III sekretierte Effektorproteine als auch durch Adhäsिन-vermittelte Aktivierung von Rezeptoren induziert und stellt daher eine Kombination aus „Zipper“- und „Trigger“-Mechanismus dar (1.4.3, S. 30).

Obwohl in neuen Studien Plasmid-DNA erfolgreich in chlamydiale EBs transformiert werden konnte, ist es bislang noch nicht gelungen sie genetisch stabil zu verändern (Wang, Kahane et al. 2011). Da somit chlamydiale Proteine nicht endogen markiert, oder ganz deletiert werden können, erfordert die Analyse chlamydialer Adhäsine oder Effektorproteine im besonderen Maße alternative Testsysteme. So kann die Identifizierung und Charakterisierung von

Adhäsinen über das Hefe- oder *E. coli*-Oberflächenexpressionssystem sowie über Latexkügelchen, welche mit rekombinantem Protein beschichtet wurden, erfolgen. Mittels Oberflächenexpressionssystem ist es möglich, ein zu charakterisierendes Protein auf der Oberfläche von lebenden Hefe- oder *E. coli*-Zellen zu präsentieren. Sollte das zu testende Protein eine adhäsive Eigenschaft aufweisen, so würde es die Bindung der Hefe- oder *E. coli*-Zellen an die Wirtszelle vermitteln. Auch ein rekombinantes Protein mit adhäsiver Eigenschaft sollte, wenn es auf die Oberfläche von Latexkügelchen gebracht wird, die Bindung der Kügelchen an die Wirtszelle vermitteln.

Aufgrund der Abhängigkeit von alternativen Testsystemen ist der chlamydiale Adhäsions- und Internalisierungsprozess trotz intensiver Forschung noch weitgehend unbekannt und nicht alle Proteine, die an diesen Schritten beteiligt sind, sind identifiziert (1.4.4, S. 33).

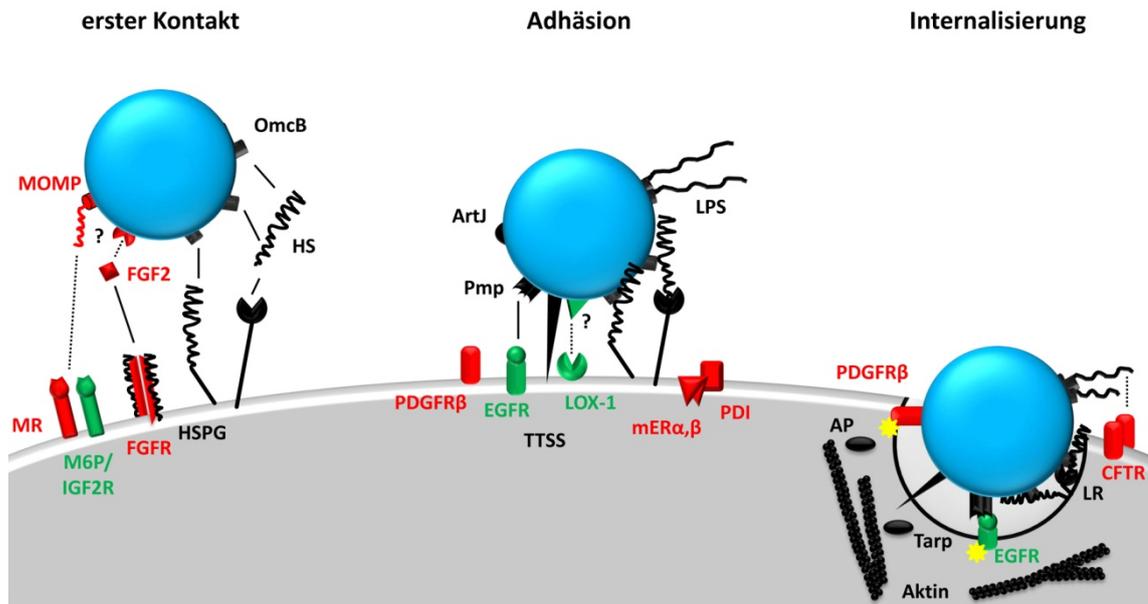
### 1.4.1 Kontaktaufnahme

Der erste, reversible Kontakt zwischen dem chlamydialen EB und der Wirtszelle wird über das Adhäsin OmcB und Glykosaminoglykanen (GAGs) vermittelt (Carabeo and Hackstadt 2001; Fudyk, Olinger et al. 2002) (Abbildung 1.4, S. 26). GAGs sind lineare, stark geladene saure Polysaccharide unterschiedlicher Länge, die zudem aufgrund unterschiedlicher Modifikationen wie N- und O-Sulfatierung, Carboxylierung und Acetylierung einen mikroheterogenen Charakter haben (Kjellen and Lindahl 1991; Bernfield, Gotte et al. 1999). GAGs kommen auf allen Zellen, zumeist kovalent an ein Kernprotein gebunden, vor und werden als Proteoglykane (PG) bezeichnet, die in der Zellmembran oder der extrazellulären Matrix lokalisiert sind (Bernfield, Gotte et al. 1999; Linhardt and Toida 2004). GAGs werden in vier große Gruppen unterteilt: Heparansulfat (HS)/Heparin, Chondroitinsulfat/Dermatansulfat, Keratinsulfat und Hyaluronsäure (Kjellen and Lindahl 1991). Für die chlamydiale Infektion wurde in vielen Studien gezeigt, dass Heparin- bzw. HS-ähnliche GAGs an der Adhäsion der EBs an die Wirtszelle beteiligt sind, während andere GAGs keine oder nur eine geringe Rolle spielen (Zhang and Stephens 1992; Chen and Stephens 1994; Chen, Zhang et al. 1996; Taraktchoglou, Pacey et al. 2001; Wuppermann, Hegemann et al. 2001; Beswick, Travelstead et al. 2003; Fadel and Eley 2004; Yan, Silvennoinen-Kassinen et al. 2006). Für *C. trachomatis* wurde früh ein trimolekularer Mechanismus der GAG-abhängigen Adhäsion vorgeschlagen, bei dem GAGs als Brücke zwischen bakteriellem und chlamydialem Rezeptor dienen (Zhang and Stephens 1992). Bei *C. trachomatis* Serovar E konnte keine Abhängigkeit der Adhäsion von Heparin- bzw. HS-ähnliche GAGs nachgewiesen werden (Davis and Wyrick 1997; Taraktchoglou, Pacey et al. 2001; Beswick, Travelstead et al. 2003).

Das bakterielle 60 kDa OmcB Protein ist innerhalb der Gattung *Chlamydia* stark konserviert (70 – 80 % Identität) und kann in einen hoch konservierten C-Terminus (80 – 98 % Homologie) und einen variablen, speziesspezifischen N-Terminus (AS 1 bis 100) mit 35 – 95 % Homologie unterteilt werden. Zunächst wurde OmcB als periplasmatisches Protein des cOMC (chlamydia outer membrane complex) beschrieben. Allerdings zeigten die bioinformatische Vorhersage, sowie biochemische und immunbiologische Untersuchungen, dass der N-Terminus von OmcB oberflächenzugänglich ist (Ting, Hsia et al. 1995; Mygind, Christiansen et al. 1998; Stephens, Koshiyama et al. 2001; Montigiani, Falugi et al. 2002; Fadel and Eley 2007; Moelleken and Hegemann 2008). Das OmcB von *C. trachomatis* Serovar L2 wurde mittels Affinitätschromatografie als Heparin-bindendes Protein beschreiben (Stephens, Koshiyama et al. 2001). Mittels Hefe- und *E. coli*-Oberflächenexpressionssystem sowie rekombinantem Protein konnte danach eindeutig gezeigt werden, dass das Adhäsion OmcB direkt mit Heparin- bzw. HS-ähnlichen GAGs der Wirtszelle interagiert (Fadel and Eley 2007; Fadel and Eley 2008; Moelleken and Hegemann 2008). Dabei konnte die adhäsive Eigenschaft mittels synthetischer Peptide und Deletionsanalysen auf den OmcB-N-Terminus (AS 40 - 100) eingeschränkt werden (Stephens, Koshiyama et al. 2001; Moelleken and Hegemann 2008). Innerhalb der N-terminalen Bindedomäne besitzt OmcB ein, bei *C. pneumoniae* zwei, konservierte(s) XBBXBH Heparinbindemotiv(e), die eine Interaktion mit Heparin oder HS ermöglichen (Cardin and Weintraub 1989; Stephens, Koshiyama et al. 2001; Capila and Linhardt 2002; Moelleken and Hegemann 2008). Hierbei steht X für eine hydrophatische und B für eine basische Aminosäure. Mutationsanalysen zeigten dann eindeutig, dass bei *C. pneumoniae* sowohl die basischen Aminosäuren innerhalb der beiden Motive als auch die flankierenden basischen Aminosäuren einen starken Einfluss auf die Adhäsion haben (Moelleken and Hegemann 2008; Fechtner, Stallmann et al. unveröffentlicht). Für *C. trachomatis* OmcB ist die Heparinabhängigkeit der Adhäsion Serovar-spezifisch zu betrachten. Ebenso wie bei der Adhäsion der EBs ist die Adhäsion von OmcB Serovar E unabhängig von Heparin, während das OmcB aller anderen Serovare zumindest partiell an Heparin- bzw. HS-ähnliche GAGs der Wirtszelle bindet (Fadel and Eley 2007; Fadel and Eley 2008; Moelleken and Hegemann 2008). Interessanterweise unterscheidet sich das OmcB der verschiedenen *C. trachomatis* Serovare lediglich in 13 von 548 Aminosäuren und weist innerhalb des Heparinbindemotivs Sequenzidentität auf. Die unterschiedliche Heparinabhängigkeit der OmcB-vermittelten Adhäsion wird hier lediglich durch Variation von drei Aminosäuren C-terminal des Heparinbindemotivs vermittelt (Moelleken and Hegemann 2008; Fechtner, Stallmann et al. unveröffentlicht). Die Variabilität innerhalb der OmcB-Bindedomäne vermittelt demnach die Spezies- und Serovar-spezifische Interaktion mit GAGs

der Wirtszelloberfläche und unterstützt somit wahrscheinlich die spezifische Infektion mit verschiedenen Wirten und Geweben (Moelleken and Hegemann 2008; Fechtner, Stallmann et al. unveröffentlicht).

Durch die reversible Bindung des chlamydialen Adhäsins OmcB an GAGs der Wirtszelle können die chlamydialen EBs nach erster Kontaktaufnahme eventuell über die Oberfläche der Wirtszelle „surfen“, um zu den spezifischen Regionen der Wirtszelle zu gelangen, an denen die Internalisierung induziert wird.



**Abbildung 1.4: Adhäsion und Internalisierung des chlamydialen EBs**

Schematische Darstellung des am Adhäsions- und Internalisierungsprozess beteiligten chlamydialen und humanen Proteine. In schwarz dargestellt sind dabei alle Proteine für die eine Beteiligung sowohl bei *C. pneumoniae* als auch *C. trachomatis* gezeigt wurde. Alle *C. pneumoniae*-spezifischen Proteine sind in grün, die *C. trachomatis*-spezifischen Proteine in rot dargestellt. Durchgehende Linien weisen auf gezeigte Interaktionen hin, gepunktete auf vermutete Interaktionspartner. Blau: EB, gelber Stern: Aktivierung

Auch für MOMP (major outer membrane protein) von *C. trachomatis* Serovar MoPn (mouse pneumonitis) wurde eine Bindung an Heparansulfat postuliert, welche für MOMP von *C. pneumoniae* nicht nachgewiesen werden konnte (Su, Raymond et al. 1996; Moelleken, Schmidt et al. 2010). Zudem wurde vermutet, dass MOMP durch elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen mit der Wirtszelle interagiert (Su, Watkins et al. 1990). Spätere biochemische Studien zeigten, dass für verschiedene Spezies diese Bindung über die Glykosylierung von MOMP über N-verknüpfte Oligosaccharide vom Mannosetyp vermittelt wird (Swanson and Kuo 1994; Kuo, Takahashi et al. 1996; Kuo, Lee et al. 2004). Als mögliche Zielstrukturen auf humaner Seite werden aufgrund von Neutralisationsexperimenten mit unterschiedlichen Oligosacchariden vom Mannosetyp für *C. pneumoniae* der MP6/IGF2-

Rezeptor (insulin-like growth factor), für *C. trachomatis* hingegen der Mannose-Rezeptor (MR) vorgeschlagen (Puolakkainen, Kuo et al. 2005; Puolakkainen, Lee et al. 2008).

Für *C. trachomatis* wurde zudem postuliert, dass der Wachstumsfaktor FGF2 (fibroblast growth factor) an die Oberfläche chlamydialer EBs bindet und den Kontakt mit der Wirtszelle über die Interaktion mit FGFR vermittelt (Kim, Jiang et al. 2011). Der Interaktionspartner von FGF2 auf chlamydialer Seite ist jedoch unbekannt. Der Kontakt zwischen EB und FGFR über FGF2 ist dabei abhängig von Heparansulfat (HS) auf der Humanzelle, nicht jedoch auf der Oberfläche der EBs (Kim, Jiang et al. 2011). Sowohl FGF2 als auch FGFR besitzen Bindestellen für HS und die Interaktion zwischen FGF2 und FGFR ist abhängig von HS-Proteoglykanen (HSPG) auf der Zelloberfläche der Wirtszelle (Esko and Selleck 2002; Linhardt and Toida 2004).

### 1.4.2 Adhäsion

Der zweite, irreversible Schritt in der chlamydialen Adhäsion erfolgt über Protein-Protein Wechselwirkungen. Hierfür sind bereits einige beteiligte chlamydiale Proteine und Wirtszellenrezeptoren identifiziert worden.

Auf chlamydialer Seite konnte gezeigt werden, dass GroEL1, ArtJ, LPS und Vertreter der Pmp-Familie an der engen Bindung zwischen Bakterium und Wirtszelle involviert sind.

GroEL1 von *C. pneumoniae* lokalisiert auf der Oberfläche von EBs und kann sowohl auf der Oberfläche von Hefezellen und als rekombinantes Protein die Adhäsion an Humanzellen vermitteln (Wuppermann, Molleken et al. 2008). Zudem führte die Inkubation der Humanzellen mit rekombinantes GroEL1 zu einer Aktivierung von NF $\kappa$ B und zu einer Reduktion der Infektion, nicht jedoch der Adhäsion von EBs. Daher ist unklar, ob GroEL1 direkt an dem Adhäsionsprozess beteiligt ist (Wuppermann, Molleken et al. 2008).

Auch das Arginin-bindende Protein ArtJ von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* konnte auf der Oberfläche von EBs detektiert werden und rekombinantes ArtJ bindet direkt an humane Wirtszellen (Montigiani, Falugi et al. 2002; Soriani, Petit et al. 2010). Antikörper gerichtet gegen rekombinantes *C. pneumoniae* ArtJ (Cpn0482) neutralisierten sowohl die *C. pneumoniae* als auch die *C. trachomatis* Infektion partiell, wohingegen Antikörper gerichtet gegen rekombinantes *C. trachomatis* ArtJ keine neutralisierende Wirkung hatten (Finco, Bonci et al. 2005; Soriani, Petit et al. 2010). Neutralisationsversuche mit rekombinantes ArtJ wurde in diesen Studien jedoch nicht durchgeführt, weshalb fragwürdig bleibt, ob es sich bei ArtJ tatsächlich um ein weiteres chlamydiales Adhäsion handelt.

LPS-Antikörper, sowie chlamydiales LPS und verschiedene LPS-Inhibitoren reduzierten die *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* Infektion, so dass LPS als potentielles Adhäsion in Betracht

gezogen wurde (Peterson, de la Maza et al. 1998; Fadel and Eley 2008). Zudem konnte mittels Immunpräzipitation LPS von *C. trachomatis* mit CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) der Wirtszelle in Verbindung gebracht werden (Ajonuma, Fok et al. 2010). Desweiteren waren CFTR-Mutanten-Zelllinien schlechter zu infizieren und die Internalisierung konnte mittels CFTR-Inhibitoren oder anti-CFTR Antikörper neutralisiert werden (Ajonuma, Fok et al. 2010). Dies deutet darauf hin, dass CFTR und LPS am Internalisierungsprozess beteiligt sein könnten.

Eine große Proteinfamilie stellen die Autotransporteradhäsine Pmp (Polymorphic membrane protein) dar. Hierbei besitzt *C. pneumoniae* 21 unterschiedliche Pmps, während *C. trachomatis* 9 Pmps aufweist (Grimwood and Stephens 1999). Für verschiedene Pmps von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* wurde gezeigt, dass sie EB-oberflächenlokalisiert sind und posttranslational prozessiert werden (Vandahl, Pedersen et al. 2002; Wehrl, Brinkmann et al. 2004; Crane, Carlson et al. 2006; Kiselev, Skinner et al. 2009; Swanson, Taylor et al. 2009; Moelleken, Schmidt et al. 2010; Tan, Hsia et al. 2010). Zudem neutralisierten anti-PmpD (*C. trachomatis*) und anti-Pmp21 (*C. pneumoniae*) Antikörper die chlamydiale Infektion (Wehrl, Brinkmann et al. 2004; Crane, Carlson et al. 2006; Moelleken, Schmidt et al. 2010). Jedoch wurde bisher nur in einer Studie die Adhäsion von *C. pneumoniae* Pmp21, Pmp20 und Pmp6 an Humanzellen direkt gezeigt (Moelleken, Schmidt et al. 2010). So vermittelte die Expression von Pmp21 auf der Oberfläche von Hefezellen deren Adhäsion an Humanzellen. Auch mit rekombinantem Pmp21-, Pmp20- und Pmp6-beschichtete Latexkügelchen adhärten an die Wirtszellen. Zudem führte die Vorbehandlung der Humanzellen mit rekombinantem Pmp21, Pmp20 oder Pmp6 zu einer Reduktion der Infektion und Adhäsion der EBs um bis zu 80 %. Eine Mutationsanalyse zeigte weiterhin, dass die Adhäsion über spezifische FxxN und GGA(I, L, V)-Motive vermittelt wird. Zudem neutralisierte ein 32 Aminosäuren großes synthetisches Peptid mit jeweils einem FxxN und einem GGAI Motiv die Infektion um etwa 40 % (Moelleken, Schmidt et al. 2010). In einer detaillierten Studie verschiedener Pmps wurden zudem Pmp2, Pmp14, Pmp16 und Pmp19 (*C. pneumoniae*) und alle neun *C. trachomatis* Pmps (PmpA - PmpI) analysiert. Hierbei zeigten alle Pmps eine direkte Adhäsion an die Humanzelle und die Vorbehandlung der Humanzellen mit den jeweiligen Pmps führte in jedem Fall zu einer reduzierten Infektion (Becker unveröffentlicht). Somit sind sehr wahrscheinlich alle Pmps an der Adhäsion des EBs an die Humanzelle beteiligt. Dabei zeigen verschiedene EBs *in vitro* unterschiedliche Pmp-Expressionsmuster, so dass ein einzelnes EB nicht alle Pmps auf der Oberfläche exprimiert (Tan, Hsia et al. 2010; Becker unveröffentlicht). In einer jüngsten Studie konnte mit EGFR (epidermal growth factor receptor) der direkte humane Interaktionspartner von Pmp21 identifiziert werden (Moelleken, Becker et al.

unveröffentlicht). Die Bindung von Pmp21 an EGFR führt zur Phosphorylierung von EGFR und Rekrutierung der Adaptoren Cbl und Grb2, was eine zusätzliche Funktion von Pmp21 und EGFR im Internalisierungsprozess belegt (Moelleken, Becker et al. unveröffentlicht).

Auf humaner Seite wird, je nach chlamydialer Spezies, neben den bereits genannten Transmembranproteinen CFTR und EGFR, dem PDGFR $\beta$  (platelet-derived growth factor receptor), LOX-1 (lectin-like ox-LDL receptor) und PDI (protein disulfid isomerase) eine entscheidende Rolle am Adhäsionsprozess zugeordnet.

So wird humanes PDGFR $\beta$  zur Eintrittsstelle von *C. trachomatis* rekrutiert und aktiviert (Elwell, Ceesay et al. 2008). Die Inhibierung von PDGFR $\beta$  durch RNA-Interferenz oder durch neutralisierende Antikörper führt zu einer verminderten Adhäsion der EBs (Elwell, Ceesay et al. 2008). Dabei könnten EBs über ein unbekanntes chlamydiales Protein zum einen direkt an PDGFR $\beta$  binden. Da der natürliche Ligand (PDGF) von PDGFR $\beta$  jedoch Heparansulfat (HS) binden kann, wäre zum anderen auch eine indirekte Bindung über HS und PDGF denkbar (Garcia-Olivas, Hoebeke et al. 2003; Elwell, Ceesay et al. 2008). Gleichzeitig scheint aktivierter PDGFR zudem Proteine der Wirtszelle zu rekrutieren und aktivieren, die wiederum den Eintritt in die Wirtszelle stimulieren (Elwell, Ceesay et al. 2008; Wang, Johnston et al. 2010).

Für die Adhäsion von *C. pneumoniae*, nicht jedoch für *C. trachomatis*, wird LOX-1 benötigt (Campbell, Puolakkainen et al. 2012). So wird die *C. pneumoniae* Infektion durch LOX-1-Liganden und neutralisierende Antikörper inhibiert, wobei letztere ebenfalls zu einer reduzierten Adhäsion der EBs führen (Campbell, Puolakkainen et al. 2012). Zudem kolokalisierten EBs mit LOX-1 (Campbell, Puolakkainen et al. 2012).

PDI ist als eine Komponente des Östrogenrezeptors an der Adhäsion beteiligt und interagiert mit EBs von *C. trachomatis* (Davis, Raulston et al. 2002). Zudem führen PDI-spezifische Inhibitoren und neutralisierende Antikörper zu einer reduzierten *C. trachomatis* Infektion (Davis, Raulston et al. 2002). Desweiteren ist die Adhäsion von *C. trachomatis* und *C. psittaci* EBs in PDI-defizienten CHO6 Zellen und nach RNA-Interferenz reduziert (Conant and Stephens 2007; Abromaitis and Stephens 2009). Dabei ist die Adhäsion nicht abhängig von der Aktivierung von PDI (Abromaitis and Stephens 2009). Auch scheint PDI nicht direkt als Rezeptor zu fungieren, sondern vielmehr eine strukturelle Komponente des EB-Rezeptors zu sein (Abromaitis and Stephens 2009). Damit einhergehend konnte gezeigt werden, dass Antikörper und Inhibitoren gegen membranassoziierten Östrogenrezeptor (mER $\alpha$  und mER $\beta$ ) die Infektion reduzieren (Hall, Schell et al. 2011). Neben der strukturellen Beteiligung am Adhäsionsprozess hat die aktivierte PDI zudem einen Einfluss auf die Internalisierung des EBs, indem sie möglicherweise die rigide Struktur des cOMC durch Reduktion der

Disulfidbrücken löst und somit weitere Interaktionen zwischen EB und Humanzelle erlaubt (Abromaitis and Stephens 2009).

Somit sind bislang mit der OmcB-GAG-Interaktion und der Pmp21-EGFR-Interaktion nur zwei Wege bekannt, bei denen beide Interaktionspartner (bakterieller und humaner) identifiziert wurden. Bei allen anderen Proteinen, für die eine Funktion bei der EB-Adhäsion postuliert wurde, ist entweder nur der chlamydiale oder der humane Interaktionspartner bekannt. Zudem stellt sich in vielen dieser Studien die Frage, ob es sich bei der postulierten Interaktion um eine direkte, oder eine indirekte Interaktion zwischen dem EB und der Humanzelle handelt.

### 1.4.3 Internalisierung

Nach der Adhäsion des Bakteriums an die Wirtszelle und der Sekretion von Effektorproteinen über das Typ III Sekretionssystem kommt es zur Rekrutierung und Aktivierung von Adapterproteinen (AP) an der Eintrittsstelle und zur Ausstülpung der Membran um das Bakterium, begleitet von massiver Aktinpolymerisierung (Abbildung 1.4, S. 26). Dabei gibt es allerdings bislang für keine chlamydiale Spezies ein vollständiges Verständnis für die Prozesse, die während der Internalisierung ablaufen.

So wird die Bedeutung von Lipid Rafts (LR) an der chlamydialen Endozytose kontrovers diskutiert. Bereits während der Adhäsion (5 min pi) ist für *C. caviae* GPIC eine Akkumulierung von Lipid Rafts an der Eintrittsstelle sichtbar (Subtil, Wyplosz et al. 2004). Zudem liefert diese Arbeit bislang den einzigen mikroskopischen Nachweis einer Kollokalisierung von Lipid Rafts mit dem internalisierenden Bakterium. Weitere Studien zur Beteiligung von Lipid Rafts an der Adhäsion oder Internalisierung der EBs erfolgten mit den chemischen Inhibitoren Methyl-beta-Cyclodextrin (M $\beta$ CD) oder Nystatin und Filipin. Die Zerstörung der Lipid Rafts durch Extraktion von Cholesterol aus der Plasmamembran der Humanzelle durch M $\beta$ CD führte zu einer reduzierten Internalisierung von *C. pneumoniae* und den *C. trachomatis* Serovaren D, E, K und L2, reduzierte jedoch die Adhäsion nicht (Jutras, Abrami et al. 2003; Gabel, Elwell et al. 2004; Korhonen, Puolakkainen et al. 2012). Da die Extraktion von Cholesterol weitreichende Effekte auf die Zelle hat, wurden weitere Internalisierungsstudien mit den Inhibitoren Nystatin und Filipin durchgeführt, die lediglich die laterale Organisation der Lipid Rafts stören. Hierbei wies eine erste Studie darauf hin, dass die Vorbehandlung der Humanzellen mit Nystatin und Filipin zu einer reduzierten Internalisierung von *C. trachomatis* Serovar K führt und diese somit abhängig von Lipid Rafts ist (Norkin, Wolfrom et al. 2001). Hingegen hatte in einer anderen Studie die Vorbehandlung der Humanzellen mit diesen Inhibitoren keinen Effekt auf die Adhäsion und Internalisierung der EBs von *C. trachomatis* Serovar D, E,

K und L2, weshalb diese Autoren eine Beteiligung von Lipid Rafts an der Internalisierung ausschlossen (Gabel, Elwell et al. 2004). In dieser Studie konnte zudem mikroskopisch 1 hpi keine Kolokalisation der EBs mit Lipid Raft positiven Strukturen beobachtet werden. Eine detaillierte, vergleichende Studie zur Infektion von verschiedenen chlamydialen Spezies und Serovaren unter Nystatin- und Filipin-Behandlung deutet darauf hin, dass die Internalisierung von *C. caviae* GPIC, *C. pneumoniae* sowie *C. trachomatis* Serovar E und F abhängig von der Integrität von Lipid Rafts ist, die Internalisierung von *C. trachomatis* Serovar A, B, C, L2 und MoPn jedoch nicht (Stuart, Webley et al. 2003). Auch eine neue, detaillierte Studie, erhärtete die Beobachtung, dass Lipid Rafts essentiell für die Internalisierung, nicht jedoch die Adhäsion von *C. pneumoniae* sind, während die Beteiligung von Lipid Rafts an der Internalisierung von *C. trachomatis* Serovar L2 ausgeschlossen wurde (Korhonen, Puolakkainen et al. 2012).

Caveolin-1 (Cav-1) ist häufig mit Lipid Rafts assoziiert. Hier konnte in einer Studie 1 hpi und 20 hpi keine Kolokalisation zwischen Cav-1 und den EBs respektive dem Einschluss von *C. trachomatis* Serovar D, E, K und L2 beobachtet werden (Gabel, Elwell et al. 2004). Auch die Depletion von Cav-1 mittels RNA-Interferenz führte nicht zu einer verminderten Infektion von *C. trachomatis* Serovar D und L2 (Hybiske and Stephens 2007). In einer früheren Studie konnte jedoch eine Kolokalisation von *C. trachomatis* Serovar K EBs mit Cav-1 zu frühen Zeitpunkten der Infektion (5 min pi, 15 min pi) und Einschlüssen zu späten Zeitpunkten der Infektion (48 hpi, 72 hpi) beobachtet werden (Norkin, Wolfrom et al. 2001). In einer vergleichenden Studie wurde beobachtet, dass sowohl *C. caviae* GPIC, *C. pneumoniae* sowie *C. trachomatis* Serovar E, F und K spät in der Infektion (48 hpi) mit Cav-1 kolokalisieren, während keine Kolokalisation bei *C. trachomatis* Serovar A, B, C, L2 und MoPn beobachtet wurde (Stuart, Webley et al. 2003). Jedoch ist zu bedenken, dass reine Kolokalisationsstudien keinen Aufschluss über eine direkte Beteiligung von Strukturen an der Internalisierung liefern. Eine Beteiligung der Clathrin-abhängigen Endozytose (CME) wurde für *C. caviae* GPIC und *C. pneumoniae* ausgeschlossen, da die Clathrin Depletion mittels RNA-Interferenz (RNAi) keinen negativen Einfluss auf die Internalisierung hatte (Boleti, Benmerah et al. 1999; Korhonen, Puolakkainen et al. 2012). Damit einhergehend zeigten dominant-negative Mutanten von Esp15, einer wichtigen Komponente der CME, keine Reduktion der *C. caviae* GPIC Infektion (Boleti, Benmerah et al. 1999). Hingegen deuten RNAi-Studien auf eine Beteiligung der CME am Eintritt von *C. trachomatis* Serovar D und L2 hin (Hybiske and Stephens 2007; Korhonen, Puolakkainen et al. 2012).

Die Beteiligung von Dynamin variiert ebenso Spezies-spezifisch. So haben dominant-negative Mutationen von Dynamin I keinen Einfluss auf die Internalisierung von *C. caviae* GPIC,

*C. pneumoniae* und *C. trachomatis* Serovar L2 (Boleti, Benmerah et al. 1999; Dautry-Varsat, Subtil et al. 2005). Hingegen weisen Infektionsstudien dominant-negativer Mutanten von Dynamin II diesem eine Rolle in der Internalisierung von *C. caviae* GPIC zu, während die *C. pneumoniae* Infektion unverändert blieb (Dautry-Varsat, Subtil et al. 2005). Für *C. trachomatis* Serovar K und L2 deutet die Depletion von Dynamin II mittels RNAi ebenfalls auf dessen Beteiligung hin (Hybiske and Stephens 2007).

Die Rekrutierung und Polymerisation von Aktin wird sowohl über die Aktivierung humaner Rezeptoren als auch über sekretierte Effektorproteine gewährleistet und stellt einen essentiellen Schritt in der Internalisierung dar. So führt die Zerstörung des Aktinzytoskeletts durch Cytochalasin D und die Inhibierung der GTPase Rac-1 zu einer verminderten Internalisierung, nicht jedoch zu einer verminderten Adhäsion von *C. trachomatis* (Majeed and Kihlstrom 1991; Boleti, Benmerah et al. 1999; Carabeo, Grieshaber et al. 2002; Carabeo, Grieshaber et al. 2004). Die Beteiligung von Rac-1 am Internalisierungsprozess wurde durch verschiedene weitere Studien bestätigt (Subtil, Wyplosz et al. 2004; Carabeo, Dooley et al. 2007; Hybiske and Stephens 2007; Elwell, Ceesay et al. 2008). Eine Beteiligung von Cdc42 wurde für *C. caviae* GPIC gezeigt, jedoch für *C. trachomatis* ausgeschlossen (Carabeo, Grieshaber et al. 2004; Subtil, Wyplosz et al. 2004). An der Arp2/3 Komplex-vermittelten Polymerisierung von Aktin sind bei *C. trachomatis* weiterhin die Kinase Abl-1, WAVE2 und Cortaktin beteiligt (Carabeo, Dooley et al. 2007; Elwell, Ceesay et al. 2008). Hierbei könnte die direkte Interaktion des EBs mit PDGFR $\beta$  diese Adapterproteine aktivieren (Elwell, Ceesay et al. 2008). Auch Arf6 und dessen Effektor PIP5K (Phosphatidylinositol-4-Phosphate-5-Kinase) wurden eine Rolle im Remodulierungsprozess von Aktin bei *C. trachomatis* zugeschrieben (Balana, Niedergang et al. 2005) Für *C. pneumoniae* wurde sowohl eine PI3K vermittelte Phosphorylierung und Aktivierung von Akt als auch eine MEK-vermittelte Phosphorylierung und Aktivierung ERK1/2 beschrieben, die zwei essentielle Signalwege für die Internalisierung darstellen (Coombes and Mahony 2002).

Das bislang einzige aktinmodulierende Typ III sekretierte Effektorprotein ist Tarp (translocated actin-recruiting phosphoprotein) (Clifton, Fields et al. 2004). Tarp führt über eine Aktin-Bindedomäne zur Nukleation von Aktin, wird speziesspezifisch phosphoryliert, wobei die Phosphorylierung keinen Einfluss auf die Rekrutierung von Aktin hat (Clifton, Dooley et al. 2005; Jewett, Fischer et al. 2006; Jewett, Miller et al. 2010). Hierbei kooperiert Tarp mit dem humanen Aktinnukleator Arp2/3-Komplex um die Rate der Aktinfilamentformierung zu erhöhen (Jiwani, Ohr et al. 2012).

#### 1.4.4 Identifizierung neuer, potentieller chlamydialer Adhäsine

Ebenso wie viele andere Bakterien besitzen auch Chlamydien wahrscheinlich ein breites Repertoire an Adhäsinen, um effizient an die Wirtszelle zu adhären (Gerlach and Hensel 2007). So führte die gleichzeitige Blockierung der bekannten Adhäsine OmcB und Pmp21 mit spezifischen Antikörpern zu einer Reduktion der Infektion um 63 % (Becker unveröffentlicht). Auch die gleichzeitige Blockierung der spezifischen OmcB- und Pmp21-Rezeptoren auf der Humanzelle mit rekombinantem OmcB und Pmp21 reduzierte die Infektion um 64 % (Becker unveröffentlicht). Dies deutet eindeutig darauf hin, dass *C. pneumoniae* weitere Adhäsine auf der EB-Oberfläche exprimiert. Daher wurden in einer Suche nach weiteren Adhäsinen ausgewählte Proteine mittels Hefe-Oberflächenexpressionssystem auf adhäsive Fähigkeiten hin untersucht (Fechtner 2009). Die Vorauswahl an zu testenden Proteinen erfolgte anhand von drei unterschiedlichen Parametern. Einerseits wurde eine Liste von potentiellen *C. pneumoniae* Oberflächenproteinen, die durch immunologische und biochemische Untersuchungen mittels Antikörper respektive 2D-SDS-Gel Proteomanalyse und anschließender Identifikation mittels MALDI-TOF identifiziert wurden, herangezogen (Montigiani, Falugi et al. 2002). Als zweiter Datensatz wurde ein laborinterner Microarray zur Analyse der Regulation der Transkription von *C. pneumoniae* herangezogen (Murra unveröffentlicht). Aufgrund der Arbeitshypothese, dass Proteine, die in frühen Stadien der Infektion benötigt werden, spät im Infektionszyklus exprimiert und auf der Oberfläche der infektiösen, metabolisch inaktiven EBs lokalisiert werden, wurde aus den Daten eine Liste von Proteinen erstellt deren Transkription spät im Zyklus hochreguliert wird. Die aus diesen Listen selektierten Proteine wurden anschließend gegen die COMP-Datenbank (chlamydia outer membrane protein) abgeglichen, die mittels bioinformatischer Analysen eine potentielle Membranlokalisierung chlamydialer Proteine vorschlägt (<http://131.130.66.201/comp>). Da lediglich die bekannten Adhäsine OmcB und die Pmp-Familie für alle drei Parameter positiv waren, wurden die sechs hypothetischen *C. pneumoniae* Proteine mittels Hefe-Oberflächenexpressionssystem analysiert, die nur für zwei der drei Parameter positiv waren (Fechtner 2009). Auf diese Weise wurden die neuen, potentiellen Adhäsine Yaa1 (Cpn0473), Yaa2 (Cpn0498) und Yaa3 (Cpn1006) (Yaa = yet another adhesin) identifiziert, die eine ähnliche Adhäsionsstärke aufwiesen wie das bekannte Adhäsion Invasin von *Yersinia pseudotuberculosis* (Fechtner 2009).

## 1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die potentiellen neuen Adhäsine Yaa1, Yaa2 und Yaa3 zu charakterisieren und ihre Funktion in der chlamydialen Infektion zu bestimmen.

Eine Grundvoraussetzung für Adhäsine ist, dass sie auf der Oberfläche von EBs zugänglich sind. Daher sollte in einem ersten Schritt die Expression und Lokalisation der bislang hypothetischen Proteine Yaa1, Yaa2 und Yaa3 mit spezifischen Antikörpern bestimmt werden. Da Adhäsine eine essentielle Rolle im Infektionszyklus spielen, führt ihre Blockierung mit spezifischen Antikörpern zu einer reduzierten Infektion. Im zweiten Schritt sollten daher die spezifischen anti-Yaa Antikörper genutzt werden, um zu überprüfen, ob die Blockierung der Yaa-Proteine auf dem EB zu einer Reduktion der Infektion führt.

Zur Generierung der spezifischen Antikörper muss zunächst rekombinantes Protein hergestellt werden. Dieses rekombinante Protein sollte im dritten Schritt genutzt werden, um die direkte Bindefähigkeit von Yaa1-3 an humane Zelle zu bestätigen.

Sollte ein Yaa-Protein alle drei beschriebenen und essentiellen Kriterien erfüllen, so würde es sich bei dem entsprechendem Protein sehr wahrscheinlich um eine neues, chlamydiales Adhäsins handeln.

Wird der spezifische humane Interaktionspartner eines Adhäsins durch rekombinantes Protein blockiert, so führt dies zu einer Reduktion der Infektion. Daher sollte die Wirkung von rekombinantem Yaa auf die Infektion und Adhäsion genau untersucht werden, um das Adhäsins zu charakterisieren und die Beteiligung am Adhäsionsprozess zu untermauern.

Da Adhäsine mit bestimmten humanen Zielstrukturen interagieren, sollte folgend für die identifizierten Adhäsine geklärt werden, mit welcher Zielstruktur auf der Humanzelle sie interagieren und welche Domäne im Yaa diese Interaktion vermittelt.

Sollte der humane Interaktionspartner identifiziert werden, so sollte diese Interaktion genau charakterisiert werden.

Die funktionelle Charakterisierung der Proteine Yaa1, Yaa2 und Yaa3 sollte demnach zur Aufschlüsselung der beteiligten chlamydialen und humanen Strukturen am Adhäsions- und Internalisierungsprozess beitragen und somit potentiell wichtige Hinweise für die Entwicklung eines Impfstoffes liefern.

## 2 Material

### 2.1 Gebrauchsartikel

Gebrauchsartikel	Hersteller
Dialyseklammern	Pierce
Dialyseschlauch, 12-15 kDa Ausschluss	Serva
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad
FACS-Röhrchen (5 ml)	Sarstedt
Glasperlen ( $\varnothing \sim 0,5$ mm)	Braun
Glasplättchen für Zellkultur (Deckgläschen $\varnothing$ 12 mm)	Roth
Isopropanol-Einfrierbox	Roth
Kryo-Röhrchen (1,8 ml)	Nunc
Küvetten	Sarstedt
Membran-Lipid-Streifen (Membrane Lipid Strips)	Echelon
Mikro-Schraubröhre (2 ml)	Sarstedt
Objektträger	Diagonal
PCR-Reaktionsgefäß (Multipli-Strip)	Sarstedt
PCR-Reaktionsgefäß (Optical Tube)	Applied Biosystems
Petri-Schalen ( $\varnothing$ 15 cm) [groß]	Sarstedt
Petri-Schalen ( $\varnothing$ 9 cm) [klein]	Sarstedt
Polypropylen Säule (10 ml)	Pierce
PVDF-Membran für Westernblots (Immobilon-P)	Millipore
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäß (2 ml)	Sarstedt
Röhre 15 ml, steril	Sarstedt
Röhre 50 ml, steril	Sarstedt
Saugpapier für Westernblots	VWR
Sensor Chip L1	BIAcore AB
Spin-Säulen	Pierce
Sterilfilter 0,2 $\mu$ m	Nalgene
Sterilfilter 0,45 $\mu$ m	Whatman
Ultrazentrifugationsröhrchen	Beckmann
Zellkulturflaschen (Polystyrol 25 cm <sup>2</sup> /50 ml), steril	Nunc
Zellkulturflaschen (Polystyrol 80 cm <sup>2</sup> /260 ml), steril	Nunc
Zellkulturplatte (24 Vertiefungen)	Nunc
Zellkulturplatte (96 Vertiefungen)	Nunc
Zellkultur-Zentrifugationsröhrchen (10 ml)	Greiner
Zellschaber (23 cm), steril	Nunc
Zentrifugationsröhrchen	Korex

### 2.2 Geräte und Maschinen

Gerät/Maschine	Hersteller
ABI PRISM 7000 Sequence Detektion System	Applied Biosystems
BioPhotometer plus	Eppendorf
Blotapparatur Fastblot B44	Biometra

<b>Gerät/Maschine</b>	<b>Hersteller</b>
BiacoreX	Biacore
Brutschrank HEPA Class 100	Thermo Electron Corporation
Elektroporationsapparatur Gen Pulser	Bio-Rad
FACSAria	BD
Feinwaage H110	Satorius
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 50 Filter A,B,C	Zeiss
Geldokumentationssystem	Bio-Rad
Inkubator	Heraeus
Konfokalmikroskop LSM 510 Meta	Zeiss
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
NanoDrop N-2000C Spectrophotometer	PeqLab
PCR-Thermocycler PTC-200	MJ Research
Photometer DU-800 Spectrophotometer	Beckmann
Precellys 24	PeqLab
Proteingelsystem	Hoefer SE-260
Schüttler Polymax 1040	Heidolph
Schüttler Unitron	Infors
Sicherheitswerkbank Herasafe	Heraeus
Speed-Vac Vakuumkonzentrator	Savant
Ultrafuge Optima Max-E, Rotor MLS 50	Beckmann
Ultraschallstab Sonoplus HD2200	Bandelin
Ultraschallwasserbad RK102H	Bandelin
Vibrax VXR	IKA
Vortex-Genie 2	Scientific industries
Waage TE3125	Satorius
Zentrifuge Avanti J-25, Rotoren JLA10.500, JA25-50	Beckmann
Zentrifuge Beckmann J2-21, Rotoren JA10, JA20	Beckmann
Zentrifuge Biofuge pico, Rotor #3324	Heraeus
Zentrifuge Biofuge Primo R, Rotor #7593	Heraeus
Zentrifuge Megafuge 1.0R, Rotor #3360	Heraeus
Zentrifuge Pico17	Heraeus
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich

## 2.3 Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)	Serva
Acrylamid (Rodiphorese 35)	Roth
Adenin	Roth
Agar	Difco/Gibco
Alanin	Merck
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck
Ammoniumsulfat	Roth
Ampicillin	Sigma
Arabinose	Sigma
Arginin	Fluka
Asparagin	Merck
Asparaginsäure	Merck

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Borsäure	Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva
Bovines Serumalbumin (BSA) Fettsäure frei	Serva
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
Bromphenolblau	Fluka
Calciumchlorid	Roth
Casein Pepton	Difco
Chloramphenicol	Merck
Coomassie Brillant Blau G250	Serva
Cycloheximid	Sigma
Cystein	Merck
Cytochalasin D	Sigma
D(+)-Glucose	Roth
Desoxynucleosid-5'-Triphosphate (dNTPs)	MBI Fermentas
Dimethylformamid (DMF)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
DMEM Zellkulturmedium GlutaMax	Invitrogen
DSP	Pierce
DTSSP	Pierce
Dynasore	Sigma
Essigsäure	Roth
Ethanol (96 %)	J. T. Baker
Ethanolamin	Sigma
Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)	Roth
Ethylendiamintetraacetat (Na <sub>2</sub> -EDTA)	Roth
EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin	Pierce
EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin	Pierce
Ficoll	Serva
Fötale-Kälber-Serum (FKS)	Invitrogen
Fungizone (Amphotericin B)	Invitrogen
Gastrographin	Schering
Gentamycin	Invitrogen
Glutamin	Merck
Glutaminsäure	Sigma
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Guanidin/HCl	Serva
Hanks' Salzlösung (HBSS)	Invitrogen
Harnstoff	J. T. Baker
Hefe Nitrogen Basis (YNB)	Difco
Hefeextrakt	Difco
Heparin	Sigma
Histidin	Roth
Imidazol	Sigma
Inositol	Sigma
Isoleucin	Roth
Isopropanol	Roth

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kanamycin	Fluka
Lachssperma-DNA (Carrier-DNA)	Sigma
LE-Agarose	Biozym
Leucin	Roth
Lithiumacetat	Roth
Lysin	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
Methanol	Riedel-deHaën
Methionin	Merck
Methyl-beta-Cyclodextrin	Sigma
Milchpulver	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdeoxycholat	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumdodecylsulphat (SDS)	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Fluka
Natriumhydroxid	Roth
Nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Serva
N-Lauroylsarcosin (Sarkosyl)	Sigma
NP-40	Sigma
Nystatin	Sigma
Para-Aminobenzoessäure	Fluka
Paraformaldehyd	Fluka
Phenylalanin	Acros
Phosphatidylcholin	Sigma
PMSF	Sigma
Polyethylenglycol 3350 (PEG)	Roth
Poly-L-Lysin	Sigma
POPC	Avanti Polar Lipids
Prolin	Merck
Protease-Inhibitor-Cocktail (EDTA frei)	Roche
Reduziertes Glutathion	Sigma
Roti-Phenol/C/I	Roth
Saccharose	Roth
Salzsäure	Roth
Serin	Merck
TEMED	Serva
Tetrazyklin	Sigma
Threonin	Merck
Triethanolamin	Roth
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Merck
Trypton Pepton	Difco
Tryptophan	Roth

Chemikalie	Hersteller
TurboFect™	Thermo Scientific
Tween 20	Merck
Tyrosin	Merck
Uracil	Roth
Valin	Merck
Vectashield (Anti-fade, mountig fluid)	Linaris
Vitaminlösung	Invitrogen
X-alpha-Gal	Clontech
Xylen-Cyanol FF	Serva
Zell-Dissoziation-Lösung	Sigma

## 2.4 Agarosen/Sepharosen, Latexkügelchen und Färbemittel

Agarosen/Sepharosen	Hersteller
Glutathion-Agarose	Sigma/Pierce
Ni-NTA-Agarose	Pierce/Qiagen
Streptavidin-Agarose	Pierce
NHS-aktivierte Sepharose	GE Healthcare

Latexkügelchen	Hersteller
Latexkügelchen (grün fluoreszierend, ø 1,1 µm)	Polysciences

Färbemittel	Hersteller
Alexa594-Wheat-Germ-Agglutini (WGA)	Invitrogen
FITC-Choleratoxin Untereinheit B (FITC-CT-B)	Sigma
DAPI	Sigma
NHS-Fluoreszein	Pierce
Rhodamine Phalloidin	Invitrogen
Streptavidin-AP	Sigma
Streptavidin-Qdot(605)	Invitrogen

## 2.5 Enzyme

Enzym	Hersteller
Lysozym	Sigma
Platinum Pfx DNA-Polymerase	Invitrogen
PreScission Protease	GE Healthcare
Proteinase K	Roche
Restriktionsenzyme ( <i>AccI</i> , <i>AvaI</i> , <i>BamHI</i> , <i>BglI</i> , <i>Bpu10I</i> , <i>ClaI</i> , <i>Eco52I</i> , <i>HindIII</i> , <i>MscI</i> , <i>NdeI</i> , <i>NotI</i> , <i>PstI</i> , <i>PvuII</i> , <i>SacI</i> , <i>ScaI</i> , <i>SmaI</i> , <i>XhoI</i> , <i>XmaI</i> )	Fermentas
RNase A	Qiagen
Taq-Polymerase	Eigene Herstellung (Fr. Volfson)
Trypsin/EDTA	Invitrogen

## 2.6 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
4 x Sammelgelpuffer (SDS-Gele)	0,4 % SDS 0,5 M Tris/HCl                      pH 6,8
4 x Trenngelpuffer (SDS-Gele)	0,4 % SDS 1,5 M Tris/HCl                      pH 8,8
Blockierungslösung Antikörper Antigenreinigung	0,5 M Ethanolamin 0,1 M Tris/HCl                      pH 8,5
Blockierungslösung Immunfluoreszenz	1 % Serum 0,5 % Tween 20 in PBS                                      pH 7,4
Blockierungslösung Westernblot	3 % Milchpulver 0,05 % Tween 20 in PBS                                      pH 7,4
Coomassie-Färbelösung	80 mg Coomassie G250 3 ml konz. HCl ad 1 l ddH <sub>2</sub> O
Detektionspuffer Westernblots	0,1 M NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub> 0,1 M Tris/HCl                      pH 9,5
DNA-Blaumarker	0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylen-Cyanol FF 15 % Ficoll 10 mM Tris/HCl 10 mM EDTA
Kopplungspuffer	0,2 M NaHCO <sub>3</sub> 0,5 M NaCl                              pH 8,6
Laufpuffer (SDS-Gele)	0,2 M Glycin 0,1 % SDS 0,05 M Tris/HCl                      pH 8,3
PBS (Phosphate Buffered Saline)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
Proteinblaumarker (4-fach)	2 % SDS 0,1 % Bromphenolblau 5 % Glycerin 50 mM Tris/HCl                      pH 6,9
Puffer 1 (Antigenreinigung Antikörper)	0,1 M Tris                                      pH 8,0
Puffer 2 (Antigenreinigung Antikörper)	0,1 M Natriumacetat 0,5 M NaCl                              pH 8,4
Puffer B (denaturierte Proteinaufreinigung)	8 M Harnstoff 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Tris/HCl                      pH 8,0
Puffer C (denaturierte Proteinaufreinigung)	8 M Harnstoff 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Tris/HCl                      pH 6,3

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
RIPA-Puffer (Zelllyse)	150 mM NaCl 0,1 % SDS 0,5 % Natriumdeoxycholat 1 % NP-40 50 mM Tris/HCl                      pH 7,4
SPG-Puffer (Saccharose-Phosphat-Glutaminsäure) (1 l)	75 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                      pH 7,5
TBE-Puffer (Agarosegele)	89 mM Tris/HCl 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
Transferpuffer Westernblots	50 mM Tris/HCl 135 mM Glycin 0,05 % SDS 10 % Methanol

## 2.7 Antikörper

Primäre Antikörper	Spezifität	Ursprung	Verdünnung	Hersteller/Referenz
Anti-cMyc	C-Myc-Epitop	Maus	1:500 (WB)	Roche
Anti-GST	Glutathion-S-Transferase (GST)	Kaninchen	1:1000 (WB)	Santa Cruz
Anti-Penta-His	6xHistidin	Maus	1:2000 (WB) 1:50 (IF)	Roche
Anti-EGFR-N	EGF Rezeptor N-Terminus	Maus	1:50 (IF)	Santa Cruz
Anti-hTfR	Transferrin Rezeptor	Maus	1:50(IF)	Santa Cruz
Anti-β-Aktin	Aktin	Maus	1:3000 (WB)	Sigma
Pathfinder	Chlamydiales LPS	Maus	1:6 (IF)	Bio Rad
Anti-DnaK	Chlamydiales DnaK	Maus	1:500 (WB)	Birkelund
Anti-EFTu	Chlamydiales EFTu	Ziege	1:100 (WB)	S. Stallmann Eurogentec
Anti-GroEL	Chlamydiales GroEL	Kaninchen	1:500 (WB)	Wuppermann
Anti-MOMP	Chlamydiales MOMP	Maus	1:200 (WB) 1:20 (IF)	Wuppermann
Anti-S1	Chlamydiales S1	Maus	1:500 (WB)	Birkelund
Anit-Yaa1 #712	Chlamydiales Yaa1 <sub>10xHis</sub>	Kaninchen	1:1000* (WB) 1:25* (IF)	Diese Arbeit Eurogentec
Anti-Yaa2 #714	Chlamydiales Yaa2 <sub>10xHis</sub>	Kaninchen	1:250** (WB) Pur** (IF)	Diese Arbeit Eurogentec

WB: Westernblot, IF: Immunfluoreszenz, \* abgereichert gegen HEp-2 Zellen, \*\* Antigengereinigt

Sekundäre Antikörper	Spezifität	Ursprung	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus-AP	Maus	Ziege	1:7500 (WB)	Promega
Anti-Kaninchen-AP	Kaninchen	Ziege	1:7500 (WB)	Promega
Anti-Human-AP	Mensch	Ziege	1:7500 (WB)	Promega
Anti-Ziege-AP	Ziege	Maus	1:200 (WB)	Santa Cruz
Alexa488-anti-Maus	Maus	Ziege	1:200 (IF)	Invitrogen
Alexa594-anti-Maus	Maus	Ziege	1:200 (IF)	Invitrogen
Alexa488-anti-Kaninchen	Kaninchen	Ziege	1:200 (IF)	Invitrogen
Alexa594-anti-Kaninchen	Kaninchen	Ziege	1:200 (IF)	Invitrogen

WB: Westernblot, IF: Immunfluoreszenz

## 2.8 Kits

Kit	Hersteller
Genomic Kit G20	Qiagen
Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System III	Clontech
Mate&Plate™ Library – Human Testis	Clontech
PeqGold Gel Extraction Kit	PeqLab
Plasmid Midi Kit	Qiagen
NucleoBond Xtra Midi EF	Macherey-Nagel
SYBR Green PCR Mastermix	Applied Biosystems

## 2.9 Größenstandards

DNA Standard	Fragmente (bp)	Hersteller
1 kb DNA-Ladder Mix	10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.200, 1.000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100	Fermentas
50 bp DNA-Ladder Mix	1.000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50	Fermentas

Protein Standard	Fragmente (kDa)	Hersteller
PageRuler	170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17, 11	Fermentas
PageRuler plus	250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10	Fermentas
SeeBlue 2 Plus	250, 148, 98, 64, 50, 36, 22, 16, 6, 4	Invitrogen

## 2.10 Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Amplifikation	Sequenz (5' → 3')	Interne Nr.
Cpn0473 in pFT8 hin	AGGTCGCTTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGGG ATCCATGGCAGTTGGTGGCGTAGG	C-1154

Oligonukleotide zur Amplifikation	Sequenz (5' → 3')	Interne Nr.
Cpn0473 in pFT8 her	GAGGCAGATCGTCAGTCAGTCAATGGTGATGGTGAT GGTGCTGTCCCTCTGGAGCAAATG	C-1155
Cpn0498 in pFT8 hin	AGGTCGTCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGGG ATCCAAATCAAGATGTTCTATTGATAA	C-1156
Cpn0498 in pFT8 her	GAGGCAGATCGTCAGTCAGTCAATGGTGATGGTGAT GGTGTCAAAAACAACCCTCTGAAATA	C-1157
Cpn1006 in pFT8 hin	AGGTCGTCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGGG ATCCATGTCTATAACCACCTTAGGG	C-1158
Cpn1006 in pFT8 her	GAGGCAGATCGTCAGTCAGTCAATGGTGATGGTGAT GGTGTCCTAGGGGTTTATTTCAGTTG	C-1159
pFT25 ATG neu hin	GAATTCATTTAAAGAGGAGAAATTAAC TATGGGATCC CCCGGGCACCATCACCAC	C-1311
pFT25 ATG neu her	GAGGTCATTACTGGATCTATCAACAGGAGTTCAATG GTGATGGTGATGATGGTGGTGATGGTGCCCGGGGA	C-1312
Cpn0473 pFT25 hin neu	ATTTACACAGAATTCATTTAAAGAGGAGAAATTAAC TATGGCAGTTGGTGGCGTAGG	C-1313
Cpn0473 in 10er her	CAGGAGTTCAATGGTGATGGTGATGGTGATGGTGAT GGTGCTGTCCCTCTGGAGCAAATG	C-1212
498 10erHis neu hin	ATTTACACAGAATTCATTTAAAGAGGAGAAATTAAC TATGAAATCAAGATGTTCTATTGATAA	C-1258
Cpn0498 in 10er her	CAGGAGTTCAATGGTGATGGTGATGGTGATGGTGAT GGTGTCAAAAACAACCCTCTGAAATA	C-1214
Cpn1006pFT25 neu hin	ATTTACACAGAATTCATTTAAAGAGGAGAAATTAAC TATGTCTATAACCACCTTAGGG	C-1294
Cpn1006 in 10er her	CAGGAGTTCAATGGTGATGGTGATGGTGATGGTGAT GGTGTCCTAGGGGTTTATTTCAGTTG	C-1216
1006 pelB hin	TGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCAGCCGGCGAT GGCCATGTCTATAACCACCTTAGGG	C-1473
1006 pelB her	GAGGCAGATCGTCAGTCAGTCAATGGTGATGGTGAT GGTGTCCTAGGGGTTTATTTCAGTTG	C-1474
1006 pKM32 hin	AACTATGAGAGGATCTCACCATCACCATCACCATAC GGATATGTCTATAACCACCTTAGGG	C-1475
1006 pKM32 her	TGAGGTCATTACTGGATCTATCAACAGGAGTCCAAG CTCATCCTAGGGGTTTATTTCAGTTG	C-1476
pFT25-Cpn0473-N hin	ACAATTTACACAGAATTCATTTAAAGAGGAGAAAT AACTATGGCAGTTGGTGGCGTAGG	C-1507
pFT25-Cpn0473-N her	CAGGAGTTCAATGGTGATGGTGATGATGGTGGTGAT GGTGCTGAACTGTAGACGTCGCTC	C-1508
pFT25-Cpn0473-C hin	ATTTACACAGAATTCATTTAAAGAGGAGAAATTAAC TATGGGAGCCTTAGGTGACGCTAA	C-1509
pFT25-Cpn0473-C her	CAGGAGTTCAATGGTGATGGTGATGATGGTGGTGAT GGTGCTGTCCCTCTGGAGCAAATG	C-1510
473 Y2H hin	GCTGATCTCAGAGGAGGACCTGCATATGGCCATGGA GGCCATGGCAGTTGGTGGCGTAGG	C-1623
473 Y2H her	GGGGTTATGCTAGTTATGCGGCCGCTGCAGGTCGAC GGATCTACTGTCCCCTGGAGCAAAT	C-1624
Cpn0473 pKM55 hin	CAGTATTGATCGGGAGAGCCGGAGCGAGCAAGCTTA CCCGATGGCAGTTGGTGGCGTAGG	C-1744
Cpn0473 pKM55 her	CGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATGAATT CACCCGTCTCCCCTGGAGCAAATG	C-1745
pKM22 pms 1 hin	ATGGGTAAGTCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGG TGACGTCGACCCCGGGGAACAAAACTCATCTCAGA	C-1781
pKM22 pms 1 her	TGTTATCCTCCTCGCCCTTGCTCACCATAGCGCTAG ATCTACGTGGCTTCTTCTGCCAAA	C-1782
pKM22 pms 2 hin	CATCATGCTTTGGCAGAAGAAGCCACGTAGATCTAG CGCTATGGTGAGCAAGGGCGAG	C-1783
pKM22 pms 2 her	AACTAGAAGGCACAGTCGAGGCTGATCTCGAGCGGC CGCCTTACTTGTACAGCTCGTCCA	C-1784

Oligonukleotide zur Amplifikation	Sequenz (5' → 3')	Interne Nr.
Cpn0473-N 55 hin	CAGTATTGATCGGGAGAGCCGGAGCGAGCAAGCTTACCCGATGGCAGTTGGTGGCGTAGG	C-1865
Cpn0473-N 55 her	CGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATGAATT CACCTGAACTGTAGACGTCGCTC	C-1866
Cpn0473-C 55 hin	TATTGATCGGGAGAGCCGGAGCGAGCAAGCTTACCCGATGGGAGCCTTAGGTGACGCTAA	C-1867
Cpn0473-C 55 her	CGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATGAATT CACCTGTCCCTCTGGAGCAAATG	C-1868

Cpn0473 = Yaa1, Cpn0498 = Yaa2, Cpn1006 = Yaa3

Oligonukleotide zur Sequenzierung	Sequenz (5' → 3')	Interne Nr.
pF <sup>T</sup> 25 seq-rev	CAATAAAAAACGCCCGCGG	C-1292
437 intern hin	TGGACTCGAGGGCTTTAGAG	C-1259
seq pKM32 tim her(hin)	TTTCGTCTTCACCTCGAGAAA	C-795
seq pKM32 tim her	GGTCATTACTGGATCTATCAA	C-796
pKM33 seq hin	TACTTGAAATCCAGCAAGTAT	C-673
GSTProteaseGenXHis seq	CAAGCTGTGACCGTCTCCG	C-803
seq-pKM55-s	TATCGATTCTAGCCGAGTCC	C-1401
seq-pKM55-as	ACACGCTGAACTTGTGGCCG	C-1402
Forward Primer pRJ1/2/4	TAATTCGTGTCGCTCAAGGC	C-1217
pKM22 seq Hin	GGAGACAGACACACTCCTGC	C-1777
pKM22 seq Her	AGTGTGGCACCACGATGACC	C-1778
Seq her mCherry	GCCATGTTATCCTCCTCGCC	C-1491
pGBT9-FP	GTGCGACATCATCATCG	GATC
pGBT9-RP	CGTTTTAAAACCTAAGAGTCAC	GATC

Oligonukleotide für die Real-Time PCR	Sequenz (5' → 3')	Interne Nr.
GAPDH hin	TGATGACATCAAGAAGGTGGT	C-353
GAPDH her	TCCTTGGAGGCCATGTAGGC	C-354
16S hin	CCAACACCTCACGGCAGG	C-2019
16S her	CGCCTGAGGAGTACACTCGC	C-2020

## 2.11 Plasmide

Plasmide	Vektor	Konstrukt	Interne Nr.
pGBKT7		Hefe-2-Hybrid Vektor, Expression der GAL4-Bindedomäne [Clontech]	# 1301
pGADT7		Hefe-2-Hybrid Vektor, Expression der GAL4-Aktivierungsdomäne [Clontech]	# 1675
pG-KJE8		<i>E. coli</i> Chaperon-Expressionsvektor (dnaK-dnaJ,grpE-groES-groEL) [TaKaRa]	# 1935
pGro7		<i>E. coli</i> Chaperon-Expressionsvektor (groES-groEL) [TaKaRa]	# 1936
pKJE7		<i>E. coli</i> Chaperon-Expressionsvektor (dnaK-dnaJ,grpE) [TaKaRa]	# 1937

Plasmide	Vektor	Konstrukt	Interne Nr.
pG-Tf2		<i>E. coli</i> Chaperon-Expressionsvektor (groES-groEL-tig) [TaKaRa]	# 1938
pTF16		<i>E. coli</i> Chaperon-Expressionsvektor (tig) [TaKaRa]	# 1939
pRJ2		<i>E. coli</i> Expressionsvektor mit pelB-Sequenz für die periplasmatische Expression (R. Jain)	
pKM22		Transfektionsvektor für humane Zellen zur Oberflächenpräsentation von Proteinen (K. Mölleken)	# 1216
pKM32		<i>E. coli</i> Expressionsvektor mit N-terminalem 6xHis-Tag (K. Mölleken)	# 1941
pKM55		YPF-Transfektionsvektor für humane Zellen (K. Mölleken)	# 1895
pFT8		<i>E. coli</i> Expressionsvektor mit N-terminalem GST-Tag und C-terminalem 6xHis-Tag (T. Fechtner)	# 1612
pFT25	pKM32 ( <i>Bpu1102I, SacI</i> )	Integration eines C-terminalen 10xHis-Tags unter Wegnahme des N-terminalen 6xHis-Tags, generiert mit den Oligonukleotiden C-1311/C-1312 (Dimer)	# 1924
pFT27	pFT8 ( <i>SmaI</i> )	Integration des <i>Cpn0498</i> -Gens (ohne Transmembrandomäne) generiert mit den Oligonukleotiden C-1156/C-1157 auf genomischer DNA	# 2131
pFT28	pFT8 ( <i>SmaI</i> )	Integration des <i>Cpn1006</i> -Gens generiert mit den Oligonukleotiden C-1158/C-1159 auf pFT24 DNA	# 2132
pFT29	pFT8 ( <i>SmaI</i> )	Integration des <i>Cpn0473</i> -Gens generiert mit den Oligonukleotiden C-1154/C-1155 auf pFT22 DNA	# 2133
pFT30	pFT25 ( <i>SmaI</i> )	Integration des <i>Cpn0498</i> -Gens (ohne Transmembrandomäne) generiert mit den Oligonukleotiden C-1258/C-1214 auf genomischer DNA	# 2134
pFT31	pFT25 ( <i>SmaI</i> )	Integration des <i>Cpn1006</i> -Gens generiert mit den Oligonukleotiden C-1294/C-1216 auf genomischer DNA	# 2135
pFT34	pFT25 ( <i>SmaI</i> )	Integration des <i>Cpn0473</i> -Gens generiert mit den Oligonukleotiden C-1313/C-1212 auf genomischer DNA	# 2138
pFT40	pRJ2 ( <i>BamHI</i> )	Integration des <i>Cpn1006</i> -Gens generiert mit den Oligonukleotiden C-1473/C-1474 auf pFT31 DNA	# 2144
pFT42	pFT25 ( <i>SmaI</i> )	Integration des C-terminalen Fragments (bp 736-1527) des <i>Cpn0473</i> -Gens generiert mit den Oligonukleotiden C-1509/C-1510 auf pFT29 DNA	# 2146
pFT43	pFT25 ( <i>SmaI</i> )	Integration des N-terminalen Fragments (bp 1-735) des <i>Cpn0473</i> -Gens generiert mit den Oligonukleotiden C-1507/C-1508 auf pFT29 DNA	# 2147
pFT45	pGBKT7 ( <i>SmaI</i> )	Integration des <i>Cpn0473</i> -Gens generiert mit den Oligonukleotiden C-1623/C-1624 auf pFT34 DNA	# 2149
pFT46	pKM55 ( <i>SmaI</i> )	Integration des <i>Cpn0473</i> -Gens generiert mit den Oligonukleotiden C-11744/C-1745 auf pFT34 DNA	# 2150
pFT48	pKM32 ( <i>SmaI, NotI</i> )	Fusion von m-Cherry an den zytoplasmatischen Teil der Transmembrandomäne des PDGFR generiert mit den Oligonukleotiden C-1781/C-1782 auf pDisplay DNA und C-1783/C-1784 auf mCherry	# 2152
pFT49	pKM55 ( <i>SmaI</i> )	Integration des N-terminalen Fragments (bp 1-735) des <i>Cpn0473</i> -Gens generiert mit den Oligonukleotiden C-1865/C-1866 auf pFT34 DNA	# 2153
pFT50	pKM55 ( <i>SmaI</i> )	Integration des C-terminalen Fragments (bp 736-1527) des <i>Cpn0473</i> -Gens generiert mit den Oligonukleotiden C-1867/C-1868 auf pFT34 DNA	# 2154

Cpn0473 = Yaa1, Cpn0498 = Yaa2, Cpn1006 = Yaa3

## 2.12 Zellen und Zelllinien

### 2.12.1 Prokaryotische Zellen und Zelllinien

#### Escherichia coli

<b>XL<sub>1</sub>-blue</b>	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac-[F' proAB lac<sup>f</sup> ZΔM15 Tn10(tetr)]</i> Stratagene
<b>BL21</b>	<i>F ompT hsdSB(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3) Invitrogen
<b>Origami</b>	<i>Δara-leu7697 ΔlacX74, ΔpboAPvull pboR araD139 galE galK rpsLF<sup>+</sup> [lac<sup>+</sup>(lac<sup>P</sup>)pro] gor522::Tn10(Tc<sup>R</sup>) trxB::kan</i> (DE3) Novagen
<b>Rosetta:</b>	<i>F ompT hsdSB(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3) pRARE ( <i>argU, argW, ileX, glyT, leuW, proL</i> ) Novagen

#### Chlamydia pneumoniae

<b>GiD</b>	Herkunft: Gießener Isolat eines Patienten mit akuter Bronchitis (Jantos, Heck et al. 1997)
------------	--

#### Chlamydia trachomatis

<b>L2/434/Bu</b>	ATCC Nr. VR-902B (kultiviert und bereitgestellt von K. Mölleken)
<b>E</b>	DK-20, erhalten von Dr. Straube aus Jena (kultiviert und bereitgestellt von S. Kobus)

### 2.12.2 Eukaryotische Zellen und Zelllinien

#### Adhärente Zellkulturzellen

<b>HEp-2</b>	epitheliale Larynxkarzinom-Zelllinie, menschlichen Ursprungs, HeLa-Morphologie, 46 Chromosomen ATCC Nr.: CCL-23
<b>HeLa 229</b>	epitheliale Zervixkarzinom-Zelllinie, menschlichen Ursprungs ECACC Nr.: 86090201; ATCC Nr.: CCL-2.1

*Saccharomyces cerevisiae*

**CEN.PK 2-1C** *MAT<sub>a</sub> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>C</sup> SUC2*

Entian, Schuster et al. 1999

**AH109** *MAT<sub>a</sub> trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1<sub>UAS</sub> - GAL1<sub>TATA</sub> - HIS3::GAL2<sub>UAS</sub> - GAL2<sub>TATA</sub> - ADE2 UR43::MEL1<sub>UAS</sub> - MEL1<sub>TATA</sub> - LacZ MEL1*

Clontech

**Y187** *MAT<sub>α</sub> trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 ade2-101 gal4Δ gal80Δ met - UR43::MEL1<sub>UAS</sub> - MEL1<sub>TATA</sub> - LacZ MEL1*

Clontech

## 2.13 Medien

### 2.13.1 Medium für adhärenzte Zellkulturzellen (DMEM+5)

DMEM-GlutaMax Medium wird folgendes zugegeben:

- |   |                            |
|---|----------------------------|
| • 50 ml FKS (hitzeinaktiviertes 60 min / 56 °C) | Endkonzentration 10 %      |
| • 5 ml Vitamine (100-fach)                      | Endkonzentration 1-fach    |
| • 5 ml nicht-essentielle Aminosäuren (100-fach) | Endkonzentration 1-fach    |
| • 5 ml Fungizone (250 µg/ml)                    | Endkonzentration 2,5 µg/ml |
| • 0,5 ml Gentamycin (50 mg/ml)                  | Endkonzentration 50 µg/ml  |

### 2.13.2 Medium für Chlamydieninfektionen

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

### 2.13.3 Medien für *Escherichia coli*

#### LB-Medium:

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

In einem Liter deionisierten Wasser lösen und autoklavieren. Nach dem Autoklavieren erfolgt die Zugabe von Antibiotika zur Selektion

Ampicillin	Endkonzentration 50 µg/ml
Kanamycin	Endkonzentration 15 µg/ml (flüssig), 10 µg/ml (fest)
Chloramphenicol	Endkonzentration 20 µg/ml

### 2.13.4 Medien für *Saccharomyces cerevisiae*

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

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

In einem Liter deion. Wasser lösen und autoklavieren.

#### SD-Minimalmedium:

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

In einem Liter deion. Wasser lösen. Vor dem Autoklavieren mit 1 M NaOH auf pH 6 einstellen (nur bei Festmedium). Zur Selektion wird die entsprechende Nukleo-Base oder Aminosäure nicht mit in den Aminosäure-Mix gegeben.

**Aminosäuremix +24:**

Der Aminosäure-Mix ist die Kombination aus den folgenden Aminosäuren, Nukleo-Basen und Chemikalien unter Wegnahme der entsprechenden Substanz für die Selektion. Der Mix wird mindestens 15 min mit sterilen Mahlkugeln gemischt.

<b>Aminosäure</b>	<b>Menge</b>	<b>Aminosäure</b>	<b>Menge</b>
Adenin	0,5 g	Leucin	10,0 g
Alanin	2,0 g	Lysin	2,0 g
Arginin	2,0 g	Methionin	2,0 g
Asparagin	2,0 g	Para-Aminobenzoesäure	2,0 g
Asparaginsäure	2,0 g	Phenylalanin	2,0 g
Cystein	2,0 g	Prolin	2,0 g
Glutamin	2,0 g	Serin	2,0 g
Glutaminsäure	2,0 g	Threonin	2,0 g
Glycin	2,0 g	Tryptophan	2,0 g
Histidin	2,0 g	Tyrosin	2,0 g
Inositol	2,0 g	Uracil	2,0 g
Isoleucin	2,0 g	Valin	2,0 g

## 3 Methoden

### 3.1 Kultivierung verschiedener Organismen

#### 3.1.1 Kultivierung eukaryotischer adhärenter Zellkulturzellen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (HEp-2 und HeLa 229 (2.12.2, S. 46)) sind adhärenente epitheliale Zellen mit ähnlichem Wachstumsverhalten und werden daher nach denselben Protokollen behandelt. Die Kultivierung erfolgt in DMEM+5 Medium (2.13.1, S. 47).

##### 3.1.1.1 Auftauen adhärenter Zellen zur Kultivierung

- Ein Kryo-Röhrchen mit adhärenenten Epithelzellen wird aus der  $-80\text{ °C}$ -Truhe entnommen, bei  $37\text{ °C}$  im Brutschrank erwärmt.
- Die Zellsuspension wird kurz gemischt und mit 9 ml Zellkulturmedium in ein Zellkultur-Zentrifugationsröhrchen (12 ml) überführt.
- Die Suspension wird für 10 min bei  $25\text{ °C}$  und  $43,3 \times g$  (500 Upm / Rotanta 460R) zentrifugiert.
- Die sedimentierten Zellen werden vorsichtig in 2 ml Zellkulturmedium resuspendiert, in eine  $25\text{ cm}^2$  oder  $80\text{ cm}^2$  Zellkulturflasche mit 5 ml respektive 14 ml Zellkulturmedium überführt und bei  $37\text{ °C}$  im Brutschrank inkubiert.

##### 3.1.1.2 Passagieren adhärenter Zellen durch Trypsinbehandlung

- Das Zellkulturmedium einer konfluent bewachsenen  $80\text{ cm}^2$  Zellkulturflasche wird abgenommen und der Zellmonolayer vorsichtig mit 10 ml HBSS gewaschen.
- Die Zellen werden mit 5 ml  $0,5 \times$  Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet und bis zum Ablösen der Zellen inkubiert (etwa 10 min). Durch leichtes Schwenken der Flasche kann das Ablösen gefördert werden.
- Es werden 5 ml Zellkulturmedium hinzupipettiert um die Trypsinreaktion abzustoppen.
- Die Suspension wird vorsichtig gemischt, in ein Zentrifugationsröhrchen (10 ml) überführt und für 10 min bei  $25\text{ °C}$  und  $43,3 \times g$  (500 Upm/Rotanta 460R) zentrifugiert.
- Die sedimentierten Zellen werden vorsichtig in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert (mehrmaliges pipettieren) und können passagiert werden.
  - Zur Passage in  $25\text{ cm}^2$  Zellkulturflasche werden 5 ml Zellkulturmedium vorgelegt und  $0,2\text{ ml} - 0,5\text{ ml}$  der Zellsuspension hinzupipettiert.

- Zur Passage in 80 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen werden 15 ml Zellkulturmedium vorgelegt und 0,5 ml – 1,5 ml der Zellsuspension hinzupipettiert.
- Zur Passage in 24-Well Platten werden optional sterile Deckgläschen (ø 12 mm) in die Vertiefungen gelegt, die Zellsuspension mit Zellkulturmedium verdünnt (1:10 bis 1:40) und je 1 ml der Verdünnung je Well pipettiert. Mögliche Luftblasen werden entfernt.
- Die passagierten Zellen werden leicht geschwenkt und bis zur gewünschten Zelldichte bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

### 3.1.1.3 Einfrieren adhärenter Zellen

- Sedimentierte Zellen aus einer 80 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (3.1.1.2, S. 50) werden in 1 ml Einfriermedium (90 % FKS, 10 % DMSO) resuspendiert und in ein Kryo-Röhrchen (1,8 ml) überführt.
- Die Zellen werden in einer Isopropanol-Einfrierbox schonend bei -80 °C eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

## 3.1.2 Kultivierung von Chlamydien

Chlamydien sind obligat intrazelluläre Erreger und vermehren sich somit ausschließlich in Wirtszellen (hier HEp-2 Zellen). Durch Zentrifugation kann die Infektion des HEp-2 Monolayers mit Chlamydien unterstützt werden. Das Chlamydienkultur-Medium enthält Cycloheximid, ein Inhibitor der eukaryotischen Proteinbiosynthese, um die Zellteilung der humanen Zellen deutlich zu reduzieren und die ATP-Produktion zu erhöhen, was sich positiv auf die Chlamydieninfektion auswirkt (2.13.2, S. 47).

### 3.1.2.1 Auftauen von Chlamydien zur Kultivierung

- Ein Kryo-Röhrchen mit infektiösen chlamydialen Partikeln wird aus der -80 °C-Truhe entnommen, bei 37 °C im Brutschrank erwärmt.
- Die aufgetaute Suspension kann entweder direkt zur Infektion genutzt werden („Pool“/ Gradienten-gereinigte EBs) oder wird zunächst in Zellkulturmedium verdünnt (sedimentierte Chlamydien) um humane Zellen zu infizieren.

### 3.1.2.2 Passagieren von Chlamydien in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen

- Die aufgetaute Suspension wird durch Zugabe von Zellkulturmedium auf ein Volumen von 6 ml pro 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche aufgefüllt und gevortext. Mit 1 ml aufgetauter

Chlamydien suspension können, je nach Infektionsdosis, eine bis vier konfluent bewachsene 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen infiziert werden.

- Die konfluent bewachsenen Zellkulturflaschen werden unter sterilen Bedingungen geöffnet, das überstehende Zellkulturmedium wird abgenommen.
- Die Chlamydien suspension wird vorsichtig in die Flasche pipettiert.
- Die Flaschen werden fest verschlossen, 60 min bei 30 °C und 1560 x g (2920 Upm/ Rotanta 460R) zentrifugiert und anschließend 60 min zur Adsorption bei 37 °C inkubiert.
- Nach der Adsorption werden die Flaschen unter sterilen Bedingungen geöffnet, das Medium wird vorsichtig abgenommen und die infizierten Zellen mit 6 ml Chlamydienkultur-Medium (1,2 µg/ml Cycloheximid) überschichtet.
- Die infizierten Zellen werden bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> für 72 bis 96 Stunden (*C. pneumoniae*) oder 50 bis 60 Stunden (*C. trachomatis*) im Brutschrank inkubiert.
- Der Grad der Infektion wird mittels Phasenkontrastmikroskopie bei 200-facher Gesamtvergrößerung bestimmt. Bei starken Infektionen, u.a. gekennzeichnet durch Ablösen der Zellen vom Flaschengrund, kann die Suspension bei der nächsten Passage 1:2 oder 1:4 mit Zellkulturmedium verdünnt werden. Bei schwächeren Infektionen wird die Suspension nicht weiter verdünnt.
- Mit Hilfe eines sterilen Zellschabers werden die infizierten Zellen vom Flaschengrund gelöst und die Suspensionen von bis zu sechs 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in einem Röhrchen (50 ml) vereinigt.
- Die Suspension wird 45 sek bei 40 % Leistung mit dem Ultraschallstab (Sonoplus HD2200) beschallt.
- Die Suspension wird 10 min bei 2670 Upm (Rotanta 460R) und 20 °C zentrifugiert (Differentialzentrifugation), der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert.
- Der Überstand des zweiten Zentrifugationsschrittes wird zur weiteren Infektion neuer konfluent bewachsener 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen verwendet (bei hohen Infektionsraten 1:2 oder 1:4 verdünnt, s.o.) oder eingefroren.

### 3.1.2.3 Herstellung eines Chlamydien-Pools

- Zur Herstellung von Chlamydien suspensionen mit geringer Anzahl infektiöser Partikel wird der Überstand stark infizierter Zellen nach der Differentialzentrifugation (3.1.2.2, S. 51) 1:1 mit SPG-Puffer verdünnt.
- Der so erstellte „Chlamydien-Pool“ wird in 1 ml Aliquots bei -80 °C weggefroren.

#### 3.1.2.4 Sedimentation und Einfrieren von Chlamydien

- Zur Herstellung von Chlamydien suspensionen mit hoher Anzahl infektiöser Partikel wird der Überstand infizierter Zellen nach der Differentialzentrifugation (3.1.2.2, S. 51) in ein steriles Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und 30 min bei 4 °C und 30000 x g (15000 Upm/Beckmann Avanti J-25) zentrifugiert.
- Der Überstand wird abgenommen, das Pellet in 1 ml SPG-Puffer resuspendiert (Ultraschallwasserbad), in Kryo-Röhrchen überführt und bei -80 °C eingefroren.

#### 3.1.2.5 Reinigung von Chlamydien durch Dichtegradientenzentrifugation

Chlamydien werden mittels Dichtegradientenzentrifugation von eukaryotischen Zelltrümmern gereinigt. Für die Reinigung werden die sedimentierten Chlamydien von bis zu 40 infizierten, konfluent bewachsenen 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen auf einem Gradienten aufgetrennt.

- Die Chlamydien suspension in SPG-Puffer (3.1.2.4, S. 53) wird aufgetaut, für 30 min bei 4 °C und 21885 x g (15000 Upm/ Heraeus Biofuge Primo R) zentrifugiert und das SPG-Medium abgenommen.
- Die Pellets von bis zu 40 infizierten, konfluent bewachsenen 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen werden in 1 ml HBSS vereinigt und vollständig resuspendiert (Ultraschallwasserbad).
- Ein steriles Zentrifugenröhrchen wird mit 9 ml 30 % Gastrografin in sterilem ddH<sub>2</sub>O befüllt, mit der Chlamydien suspension überschichtet und 1 h bei 4 °C und 30000 x g (15000 Upm/Beckmann J2-21) zentrifugiert.
- Der Überstand wird vorsichtig abgenommen, das Chlamydien pellet in 1 ml HBSS resuspendiert und für 30 min bei 4 °C und 21885 x g (15000 Upm/Heraeus Biofuge Primo R) zentrifugiert. Dieser Schritt wird wiederholt.
- Das Chlamydien pellet wird in 200 ml SPG-Puffer vollständig resuspendiert (Ultraschallwasserbad), auf 1 ml mit SPG-Puffer aufgefüllt und in 200 µl Aliquots bei -80 °C weggefroren.

#### 3.1.2.6 Titration von Chlamydien suspensionen

Zur Bestimmung der Infektiösität von Chlamydien suspensionen wird die Anzahl einschlussbildender Einheiten (IFUs: „inclusion forming units“) pro µl einer Chlamydien suspension durch Titration bestimmt.

- Die Chlamydien suspension wird 1:10 bis zu einer Verdünnungsstufe von 10<sup>-8</sup> mit Zellkulturmedium schrittweise verdünnt.
- Konfluent bewachsene Wells einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen werden in Dreifachbestimmung mit 100 µl jeder Verdünnung überschichtet, für 60 min bei 30 °C

und 1560 x g (2920 Upm/Rotanta 460R) zentrifugiert und anschließend 60 min zur Adsorption bei 37 °C inkubiert.

- Nach der Adsorption wird das Medium vorsichtig abgenommen und die infizierten Zellen mit 200 µl Chlamydienkultur-Medium (1,2 µg/ml Cycloheximid) je Vertiefung überschichtet.
- Die infizierten Zellen werden bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> für 50 Stunden (*C. pneumoniae*) oder 24 Stunden (*C. trachomatis*) im Brutschrank inkubiert, für 10 min mit 100 µl Methanol fixiert und die Einschlüsse durch direkte Immunfluoreszenz mittels FITC-markiertem Antikörper gegen chlamydiales LPS gefärbt (Pathfinder 1:6).
- Die Anzahl der gebildeten Einschlüsse je Vertiefung werden mikroskopisch bestimmt und somit Zahl einschlussbildender Einheiten (IFUs) pro µl der Chlamydien suspension berechnet.

### 3.1.2.7 Stationäre Chlamydieninfektion

Für verschiedene experimentelle Ansätze in 24-Well Platten wird auf das Aufzentrifugieren der Chlamydien auf die Zellen verzichtet.

- Das Zellkulturmedium wird abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gespült.
- Die Chlamydien suspension wird auf die Zellen pipettiert für 2 h bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.
- Das Medium wird abgenommen und die infizierten Zellen vorsichtig mit 1 ml Chlamydienkultur-Medium (1,2 µg/ml Cycloheximid) je Vertiefung überschichtet.
- Das Chlamydienwachstum erfolgt für 50 Stunden (*C. pneumoniae*) oder 24 Stunden (*C. trachomatis*) bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank.
- Die Zellen werden 5 min Methanol-fixiert und die Einschlüsse mittels direkter Immunfluoreszenz angefärbt (Pathfinder 1:6).

### 3.1.3 Kultivierung von *E. coli*

Die verwendeten *E. coli* Stämme werden in LB-Medium in aeroben Schüttelkulturen bei 37 °C und 140 Upm kultiviert (2.13.3, S. 48). Der Rosetta *E. coli*-Stamm besitzt zusätzlich ein Plasmid, auf das unter Zugabe von 20 µg/ml Chloramphenicol selektioniert wird. Zur Selektion von Plasmid-Transformanten werden dem Medium, je nach Plasmidmarker zusätzlich 50 µg/ml Ampicillin oder 15 µg/ml Kanamycin hinzugegeben.

### 3.1.3.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

- Zellen aus der Stammsammlung werden in 5 ml SOB-Medium (20 mM  $\text{MgSO}_4$ ) ü/N bei 37 °C unter rotierendem Schütteln inkubiert.
- 50 ml SOB-Medium werden mit 1 ml der ü/N-Kultur beimpft und bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von ~0,5 bei 37 °C unter rotierendem Schütteln inkubiert.
- Die Kultur wird auf Eis abgekühlt und 10 min bei 4 °C und 5000 Upm (Beckmann J2-21) zentrifugiert.
- Die pelletierten Zellen werden in 20 ml kaltem FSB-Puffer (10 mM KAc pH 7,5, 45 mM  $\text{MnCl}_2$ , 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100 mM KCl 3 mM Hexaminkobaltchlorid, 10 % Glycerol) resuspendiert und erneut 10 min bei 4 °C und 5000 Upm (Beckmann J2-21) pelletiert.
- Die Zellen werden in eiskaltem FSB-Puffer resuspendiert, mit 140  $\mu\text{l}$  DMSO versetzt und 15 mi auf Eis inkubiert.
- Zur Suspension werden weitere 140  $\mu\text{l}$  DMSO hinzugegeben, der Ansatz gut gemischt und in 10  $\mu\text{l}$  Aliquots portioniert.
- Die Zellen werden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.1.3.2 Herstellung elektrokompetenter Zellen

- $\text{XL}_1$ -blue Zellen aus der Stammsammlung werden auf einer LB-Medium-Platte mit Tetrazyklin-Selektion (30  $\mu\text{l}$ /Platte) ausgestrichen und ü/N bei 37 °C inkubieren.
- Es werden zwei 5 ml ü/N-Kulturen angesetzt
- Die zwei 5 ml ü/N-Kulturen werden jeweils in 1 l LB-Medium übergeimpft und bei 37 °C unter rotierendem Schütteln (140 Upm) inkubiert bis eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,7 - 0,8 erreicht ist.
- Die 1-Liter-Kulturen werden 30 min auf Eis abgekühlt und 15 min bei 4 °C und 4000 Upm (Beckmann J2-21) abzentrifugiert.
- Die pelletierten Zellen jeder Liter-Kultur werden zweimal mit 1 l eiskaltem, sterilem  $\text{ddH}_2\text{O}$  gewaschen.
- Die Pellets werden anschließend in je 20 ml eiskaltem, sterilem 10 %igem Glycerin resuspendiert und erneut 15 min bei 4000 Upm und 4 °C abzentrifugiert.
- Die Zellen werden in je 2 - 3 ml 10 %igem Glycerin resuspendiert, aliquotiert und 1 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

- Die elektrokompenten Zellen werden bei -80 °C gelagert und die Transformations-effizienz durch eine Testtransformation mit 0,01 ng pBIISK+ in 1 µl Volumen bestimmt.

### 3.1.4 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die verwendeten *S. cerevisiae* Stämme werden bei 30 °C in unterschiedlichen Fest- und Flüssigmedien kultiviert (2.13.4, S. 48). Die Selektion auf Plasmid-haltige Zellen erfolgt durch das Weglassen der entsprechenden Marker-Aminosäure oder Nukleo-Base.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittel Polymerase-Kettenreaktion ist es möglich, eine beliebige DNA-Sequenz durch zyklische Amplifikation zu vervielfältigen. Ein Zyklus umfasst drei Reaktionsschritte. Im ersten Schritt, der Denaturierung, werden die beiden DNA-Stränge der Template-DNA voneinander getrennt. Im Annealing-Schritt wird die Temperatur Oligonukleotid-spezifisch abgesenkt, so dass sich die einzelsträngigen synthetischen Oligonukleotide (Sigma) an der Zielsequenz des jeweiligen einzelsträngigen Stranges anlagern. Im dritten Schritt, der Elongation, wird die Temperatur auf das Polymerase-spezifische Temperaturoptimum angehoben um das 3' OH-Ende der Oligonukleotide komplementär zum Matrizenstrang zu verlängern.

#### 3.2.1.1 Berechnung der optimalen Annealingtemperatur für Oligonukleotide

Für die Berechnung der optimalen Annealing-Temperatur wird folgende Formel verwendet:

$$3 \times A + 2 \times B \text{ [}^\circ\text{C]}$$

A: Anzahl der Guanin- und Cytosin-Basen innerhalb der Oligonukleotidsequenz die komplementär zur Matrize sind.

B: Anzahl der Adenin- und Thymin-Basen innerhalb der Oligonukleotidsequenz die komplementär zur Matrize sind.

#### 3.2.1.2 Ansatz der PCR-Reaktion

Das Reaktionsvolumen beträgt in der Regel 50 µl. Als DNA-Template dienen entweder Plasmid-DNA, chlamydiale genomische DNA (10 - 100 ng) oder Hefezellen. Um eine möglichst hohe Genauigkeit der Amplifikation einer DNA-Sequenz zu erreichen, wie für die Amplifikation eines Gens für Klonierungszwecke, wird die Pfx-Polymerase mit Korrekturlesefunktion („proof-reading“) verwendet. Für alle PCR-Reaktionen die keine

Korrekturlesefunktion erfordern wird die Taq-Polymerase verwendet. Die PCR-Reaktion wird im Thermocycler durchgeführt und anschließend auf einem Agarosegel überprüft.

<b>Pfx-PCR</b>		<b>Taq-PCR</b>	
x µl	DNA-Template (10-100 ng)	x µl	DNA-Template (10-100 ng)
1 µl	Oligonukleotid 1 (50 pmol)	1 µl	Oligonukleotid 1 (50 pmol)
1 µl	Oligonukleotid 2 (50 pmol)	1 µl	Oligonukleotid 2 (50 pmol)
5 µl	dNTPs (4 mM)	5 µl	dNTPs (4 mM)
5 µl	Puffer (10 x)	5 µl	Puffer (10 x)
0,5 µl	Pfx-Polymerase (1 U/µl)	1 µl	Taq-Polymerase (1 U/µl)
4 µl	MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	4 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
5 µl	Enhancer (10 x)		
ad 50 µl	ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl	ddH <sub>2</sub> O

### 3.2.1.3 Bedingungen der PCR-Reaktion

Die Wahl der optimalen Elongationstemperatur ist abhängig von der verwendeten thermostabilen DNA-Polymerase und liegt für die Pfx-Polymerase bei 68 °C, für die Taq-Polymerase bei 72 °C. Die Länge des Elongationsschritts ist abhängig von der Größe des zu amplifizierenden Fragments und wird mit 1 min pro 1000 Nukleotide angesetzt.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95 °C	5 min	x 35
Denaturierung	95 °C	1 min	
Annealing	45 – 55 °C	1 min	
Elongation	68 °C/72 °C	1 – 3 min	
finale Elongation	68 °C/72 °C	7 min	
Abkühlung	16 °C	∞	

### 3.2.1.4 PCR auf Hefezellen

Für die PCR auf Hefezellen werden dem PCR-Ansatz wenige Zellen mit einer Pipettenspitze zugefügt. Die Hefezellen sollten hierfür möglichst frisch ausgestrichen sein.

<b>PCR-Ansatz</b>		<b>PCR-Bedingungen</b>			
		Schritt	Temp	Dauer	Zyklen
0,3 µl	Oligonukleotid 1 (50 pmol)	Denaturierung	95 °C	10 min	x 40
0,3 µl	Oligonukleotid 2 (50 pmol)	Denaturierung	95 °C	1 min	
0,24 µl	dNTPs (25 mM)	Annealing	45–55 °C	1 min	
3 µl	Puffer (10 x)	Elongation	68 °C	1 min	
0,3 µl	Taq-Polymerase (1 U/µl)	finale Elongation	68 °C	7 min	
1,8 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	Abkühlung	16 °C	∞	
1 µl	DMSO				
1 µl	Tween 20				
ad 30 µl	ddH <sub>2</sub> O				

### 3.2.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von DNA-Molekülen werden Agarosegele (0,7 % - 2 %) verwendet. Die Porengröße der Gele und damit ihre Auftrennungseigenschaft ist dabei direkt von der Agarosekonzentration abhängig. Standardmäßig werden 0,7 % Agarosegele verwendet. Unter Anlegung eines elektrischen Feldes (100 – 140 V) in der Elektrophoresekammer wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente Richtung Anode und werden aufgrund ihrer Größe aufgetrennt. Hierbei gilt, je kleiner das Fragment, desto schneller wandert es durch das Gel. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid (1 µg/ml), ein DNA-interkalierender Farbstoff, kann die DNA unter UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht werden. Zur Größenbestimmung der einzelnen DNA-Fragmente wird ein Größenstandard aufgetragen.

#### 3.2.2.1 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgt mit dem peqGOLD Gel Extraction Kit der Firma PeqLab.

### 3.2.3 Transformation von Zellen

#### 3.2.3.1 Transformation in *E. coli*

##### 3.2.3.1.1 Ein-Minuten-Transformation

Die Ein-Minuten-Transformation ist aufgrund der niedrigen Effizienz nur für die Transformation hoch konzentrierter Plasmid-DNA mit Ampicillinselektion geeignet.

- 10 µl DMSO-kompetente Zellen (XL<sub>1</sub>blue, Rosetta, BL21, Origami, eigene Herstellung) werden auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Plasmid-DNA (50 - 500 ng) gemischt.
- Der Reaktionsansatz wird für 1 min bei 42 °C inkubiert, sofort mit 100 µl LB-Medium versetzt und auf einer LB-Medium-Platte mit 50 µg/ml Ampicillin zur Selektion ausplattiert.
- Die Platte wird ü/N bei 37 °C inkubiert.

##### 3.2.3.1.2 Transformation durch Elektroporation

Die Transformation gering konzentrierte Plasmid-DNA isoliert aus *S. cerevisiae* und hoch konzentrierte Plasmid-DNA mit Kanamyzinselektion erfolgt durch Elektroporation nach einem hoch effizienten Protokoll (Sambrook, Maniatis et al. 1989).

- Sterile Elektroporationsküvetten werden auf Eis vorgekühlt und 10 µl elektrokompente Zellen je Transformationsansatz auf Eis aufgetaut.

- 2 – 5  $\mu\text{l}$  kalte und möglichst salzfreie DNA (0,1 ng – 1  $\mu\text{g}$ ) wird in 40  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O aufgenommen, mit den Zellen auf Eis gemischt und in eine eiskalte Küvette pipettiert.
- Die Küvette wird von außen getrocknet und der Hochspannung ausgesetzt. Geräteparameter: Spannung: 2,1 kV, 200 Ohm, 25  $\mu\text{F}$  (Bio-Rad Gene Pulser / Bio-Rad Pulse Controller).
- Zu den Zellen wird sofort 1 ml LB-Medium zugeben, der Ansatz in ein vorbereitetes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 30 min bis 1 h bei 37 °C unter rotierendem Schütteln (140 Upm) inkubiert.
- Die Zellen werden 5 sek bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) pelletiert, der Überstand abgekippt und das Zellpellt in dem verbleibenden Rest LB-Medium resuspendiert.
- Die Zellen werden auf einer LB-Medium-Platte mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion ausplattieren und ü/N bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.3.2 Transformation in *Saccharomyces cerevisiae*

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

- Eine 5 ml ü/N-Kultur des zu transformierenden Hefestammes wird in YPD<sup>+</sup>-Medium angesetzt.
- Die Zellzahl der ü/N-Kultur wird photometrisch bestimmt und eine 50 ml YPD<sup>+</sup>-Kultur mit  $5 \times 10^6$  Zellen/ml angeimpft.
- Es erfolgt Wachstum bei 30 °C unter rotierendem Schütteln (140 Upm) bis zu einer Konzentration von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml. (Falls die Zellmenge geringer ist, sollte beachtet werden, dass mindestens 2 Zellteilungen vor der Transformation durchlaufen werden müssen. Die Transformationseffizienz bleibt über 3 bis 4 Zellteilungen konstant.)
- Die Kultur wird 5 min bei 3500 Upm (Heraeus Megafuge 1.0R) sedimentiert, der Überstand verworfen, und die Zellen in 25 ml ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.
- Die Zellsuspension wird erneut 5 min bei 3500 Upm (Heraeus Megafuge 1.0R) zentrifugiert, das erhaltene Zellsediment in 1 ml 100 mM LiAc pH 8,4 - 8,9 resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.
- Die Zellsuspension wird 5 sek bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert und in 0,1 M LiAc pH 8,4 - 8,9 resuspendiert, nachdem der Überstand mit einer Pipette abgezogen wurde. Die Zellmenge sollte bei  $2 \times 10^9$  Zellen/ml liegen.

- Für die Transformation werden 50 µl Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäße und erneut 5 sek bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen.
- Die Carrier-DNA (2 mg/ml) wird zum Denaturieren für 10 min auf 100 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt.
- Zu den kompetenten Hefezellen wird der folgende „Transformationsmix“ in der vorgegebenen Reihenfolge zugegeben:

240 µl PEG (50 % w/v)  
 36 µl 1 M LiAc pH 8,4 - 8,9  
 50 µl Carrier DNA  
 x µl zu transformierende DNA (0,1 – 1 µg)  
 34-x µl ddH<sub>2</sub>O

- Der Ansatz wird gut gemischt (Vortex Genie), zunächst 30 min bei 30 °C und anschließend für 30 min bei 42 °C im Thermoblock inkubiert.
- Der Transformationsansatz wird bei 13000 Upm für 5 sek sedimentiert (Heraeus Biofuge pico) und in 200 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.
- Die Zellsuspension wird zu je 90 % und 10 % auf zwei Selektivmedium-Platten ausgestrichen und bei 30 °C für 2 - 3 Tage inkubiert.

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

Um ein gewünschtes DNA-Fragment in einen Zielvektor in *S. cerevisiae* zu integrieren, wird dieses durch PCR amplifiziert. Für die PCR werden zwei spezifische Oligonukleotide mit jeweils 40 Nukleotiden Homologie im 5`-Bereich zur Integrationssequenz des Zielvektors und 18 - 22 Nukleotiden Homologie im 3`-Bereich zur Insertionssequenz verwendet. Der Zielvektor wird linearisiert und zusammen mit dem PCR-Produkt im Verhältnis 1:3 in Hefe transformiert. Infolge der homologen Bereiche des PCR-Produkts und des Zielvektors wird in der Hefe das amplifizierte Fragment über homologe Rekombination in das Plasmid integriert.

## 3.2.4 DNA-Isolation

### 3.2.4.1 DNA Isolation aus Chlamydien-infizierten HEp-2 Zellen

Die Isolation von DNA aus infizierten Humanzellen erfolgt mittels Phenol-Chloroform-Extraktion.

- Das durch Zentrifugation gewonnene Pellet infizierter Humanzellen wird in 120 µl HBSS mit Proteinase K (500 µg/ml) resuspendiert und 60 min bei 37 °C zur Reaktion inkubiert.
- Die Suspension wird mit 240 µl Roti-Phenol/C/I gemischt und 10 min bei RT inkubiert. An dieser Stelle kann die Emulsion ü/N bei -20 °C gelagert werden.
- Die Emulsion wird 10 min bei RT und 13000 Upm (Heraeus Biofuge Primo R) zentrifugiert, 100 µl der DNA-haltigen, wässrigen oberen Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml eiskaltem Isopropanol gemischt und 30 min auf Eis inkubiert.
- Die DNA wird für 30 min bei 15000 Upm (Heraeus Biofuge Primo R) pelletiert, das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol überschichtet und erneut für 10 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge Primo R) zentrifugiert.
- Das Pellet wird im Vakuum-Konzentrator getrocknet, anschließend in 100 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und mit 11,7 µl RNase-Puffer (10x) und 5 µl RNase A (25 mg/ml) für 1 h bei 37 °C inkubiert.
- Zum Ansatz werden 13 µl 3 M NaAc pH 5 (final 0,3 M) und 130 µl Isopropanol hinzupipettiert.
- Der Ansatz wird gut gemischt, 10 min bei RT inkubiert und die DNA für 20 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) pelletiert.
- Das DNA-Pellet wird mit 200 µl 70 % Ethanol überschichtet, erneut 10 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert und im Vakuum-Konzentrator getrocknet.
- Die DNA wird in 25 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert, die Konzentration photometrisch ermittelt (3.2.6, S. 63) und kann bei -20 °C gelagert werden.

#### **3.2.4.2 Gewinnung chlamydialer genomischer DNA**

Zur Isolation chlamydialer genomischer DNA aus Gradienten-gereinigte Chlamydien wird das Genomic Kit G20 von Qiagen verwendet.

#### **3.2.4.3 Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

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

##### **3.2.4.3.1 Plasmid MIDI-Präparation**

Für die Gewinnung größerer Mengen sauberer Plasmid-DNA wird das Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen verwendet. Um die Verunreinigung mit Endotoxinen möglichst gering zu halten

erfolgt die Isolation von Plasmid-DNA für Transfektionen mit dem NucleoBond Xtra Midi EF der Firma Macherey-Nagel. Die Aufreinigung erfolgt jeweils über eine Säule aus einer 50 ml *E. coli* Übernachtskultur.

#### **3.2.4.3.2 Plasmid MINI-Präparation**

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

- 1,5 ml der Übernachtskultur werden in ein Reaktionsgefäß überführt, und 5 sek bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen, das *E. coli*-Pellet in 100 µl P1 mit RNase (100 µg/ml) vollständig resuspendiert und 100 µl P2 hinzugefügt.
- Der Ansatz wird durch mehrmaliges Invertieren gemischt, 5 min bei RT inkubiert und 100 µl P3 hinzugefügt.
- Der Ansatz wird erneut durch mehrmaliges Invertieren gemischt und für 10 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert.
- Der Plasmid-DNA-haltige Überstand (300 µl) wird in ein neue Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml eiskaltem 98 % Ethanol vermischt und 10 min auf Eis inkubiert.
- Die Plasmid-DNA wird für 20 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) pelletiert, das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol überschichtet und erneut für 10 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert.
- Das Pellet wird im Vakuum-Konzentrator getrocknet, anschließend in 100 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

#### **3.2.4.4 Gewinnung von Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae***

Die Isolation der DNA erfolgt durch Aufschluss der Hefezellen einer 5 ml Übernachtskultur mit Glasperlen und unter Verwendung des Prinzips der alkalischen Lyse (Fink 1983). Die Zusammensetzung der Puffer entspricht denen des Qiagen Plasmid Midi Kits.

- 4 ml der Übernachtskultur werden in einer 2 ml Mikro-Schraubröhre für 5 sek bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) pelletiert.
- Das Zellpellet wird in 1 ml ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und erneut für 5 sek bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) pelletiert.
- Der Überstand wird verworfen, das Hefe-Pellet in 300 µl P1 mit RNase (100 µg/ml) vollständig resuspendiert, 300 µl P2 hinzugefügt und Glasperlen (2/3 des Volumens) zugesetzt.
- Der Zellaufschluss erfolgt durch drei Vortexzyklen a 20 sek mit 6000 rpm (Precellys 24).

- Die Glasperlen werden für 2 min bei 2000 Upm (Heraeus Biofuge pico) abzentrifugiert und 500 µl des Überstands in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.
- Dem Überstand werden 250 µl P3 hinzugefügt, der Ansatz durch vortexen gemischt und 10 min auf Eis abgekühlt.
- Der Ansatz wird 15 min bei 13000 Upm zentrifugiert, der Überstand (750 µl) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 750 µl eiskaltem Isopropanol vermischt.
- Die DNA wird für 30 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) pelletiert, das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol überschichtet und erneut für 10 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert.
- Das Pellet wird im Vakuum-Konzentrator getrocknet, anschließend in 20 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

### **3.2.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen**

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgt unter Verwendung der für das jeweilige Enzym spezifischen Reaktionsbedingungen und Puffer (vom Hersteller mitgeliefert) für 3 – 4 h oder ü/N. Die DNA-Restriktionsfragmente werden über Agarosegele aufgetrennt, analysiert und gegebenenfalls extrahiert.

### **3.2.6 DNA-Konzentrationsbestimmung durch photometrische Messung**

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen erfolgt mittels Adsorptionsmessung bei 260 nm im Nanodrop. Die Reinheit der DNA-Probe wird über den Quotienten der Adsorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### **3.2.7 Sequenzierung**

Alle generierten Plasmide werden zur Überprüfung der Richtigkeit der integrierten Sequenz von der Firma GATC-Biotech sequenziert.

### **3.2.8 Quantitative Real-Time-PCR zum Vergleich der DNA-Kopienzahl**

Mittels quantitativer Real-Time-PCR ist es möglich, über die Fluoreszenzintensität eines in dsDNA interkalierenden Farbstoffes (SYBR Green), kontinuierlich die Menge an Produkt während der PCR zu bestimmen. Die Messung erfolgt am Ende der Elongation jedes PCR-Zyklus. Der Zyklus, bei dem die gemessene Amplifikationskurve den festgesetzten

Schwellenwert übersteigt, wird als CT-Wert (Cycle Threshold) definiert und befindet sich immer in der exponentiellen Phase der Amplifikation. Je höher die Menge an Template-DNA in der Ausgangslösung ist, desto eher wird die exponentielle Phase erreicht und desto niedriger ist folglich der CT-Wert.

Zur Bestimmung der Internalisierungsrate von Chlamydien wird die Real-Time-PCR auf 200 ng isolierter DNA aus infizierten Humanzellen mit spezifischen 16S rRNA Oligonukleotiden durchgeführt (ABI PRISM 7000 Sequence Detektion System). Zur Quantifizierung wird das humane Referenzgen GAPDH herangezogen. Die Quantifizierung erfolgt nach der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode.

PCR-Ansatz		PCR-Bedingungen			
		Schritt	Temp	Dauer	Zyklen
10 $\mu\text{l}$	Template-DNA (20 ng/ $\mu\text{l}$ )	Denaturierung	95 °C	5 min	x 60
15 $\mu\text{l}$	SYBP Green Master Mix	Denaturierung	95 °C	15 sek	
4 $\mu\text{l}$	Primer-Mix (je 500 nM)	Annealing	60 °C	15 sek	
ad 30 $\mu\text{l}$	ddH <sub>2</sub> O	Elongation	68 °C	30 sek	
		Detektion			

### 3.2.9 Hefe-2-Hybrid-Screening

Das Hefe-2-Hybrid-System dient der Identifizierung direkter Protein-Protein-Interaktion *in vivo*. Das System beruht auf dem Transkriptionsfaktor Gal4p der Hefe *S. cerevisiae*. Dieser besteht zum einen aus der DNA-Bindedomäne (BD), die an die GAL UAS (Upstream-Aktivierungs-Sequenz) bindet, und der Aktivierungsdomäne (AD), die mit der basalen Transkriptionsmaschinerie interagiert und so die Transkription aktiviert. Zum Nachweis direkter Protein-Protein-Interaktion wird das Gen des einen Proteins mit der GALA-BD, das des anderen Proteins mit der GAL4-AD im jeweiligen Expressionsvektor fusioniert (pGBKT7, pGADT7) und anschließend in *S. cerevisiae* transformiert. Interagieren die beiden Proteine, so gelangen Gal4p-AD und Gal4p-BD in enge räumliche Nähe was die Funktionalität des Transkriptionsfaktors wiederherstellt und die Expression von genomisch integrierten Reportergenen ermöglicht.

Zur Identifikation eines unbekanntem proteinösen Interaktionspartners eines definierten Proteins können DNA-Bibliotheken mittels Hefe-2-Hybrid-Systems analysiert werden (Hefe-2-Hybrid-Screen). In dieser Arbeit wurde eine humane Testis-cDNA-Bibliothek der Firma Clontech verwendet, welche bereits in den Expressionsvektor pGADT7 (Gal4p-AD) kloniert und in den *S. cerevisiae* Stamm Y187 (*MAT $\alpha$* ) transformiert ist. Das Gen des zu testenden Proteins wird in den Expressionsvektor pGBKT7 (Gal4p-BD) kloniert und in den *S. cerevisiae* Stamm AH109 (*MAT $\alpha$* ) transformiert. Aufgrund der unterschiedlichen Paarungstypen können die beiden Stämme gepaart werden und die resultierenden diploiden Hefestämme mit

entsprechendem Selektivmedium auf Expression der Reportergene überprüft werden. Die Selektion kann zum einen auf Selektivmedium mit geringem Selektionsdruck (SD -Trp/-Leu/-His/X- $\alpha$ -Gal) erfolgen um auch schwache Protein-Protein-Interaktionen zu detektieren. Zum anderen kann Selektivmedium mit hohem Selektionsdruck verwendet werden (SD -Trp/-Leu/-His/-Ade/X- $\alpha$ -Gal).

Der Screen wird nach dem Protokoll der Firma Clontech durchgeführt.

### 3.3 Biochemische Methoden

#### 3.3.1 Generierung von rekombinanten Proteinen

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

Die Expression von Proteinen unter der Kontrolle des *lac*-Promotors erfolgt durch die Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) zu einer *E. coli* Kultur bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,8. Die Induktion der Genexpression wird durch die Aufarbeitung von Proteinproben vor und nach der Induktion ( $t_0/t_4$ ) überprüft.

- Eine 1 Liter Induktionskultur wird auf OD<sub>600</sub> von 0,1 aus einer 50 ml ü/N-Kultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 – 0,8 bei 37 °C und 140 Upm (Schüttler Unitron) inkubiert.
- Die Induktion erfolgt durch Zugaben von 1 ml 1 M IPTG (1 mM final) für 4 h bei standardmäßig 37 °C und 140 Upm (Schüttler Unitron).
- Die *E. coli* Zellen werden für 10 min bei 5000 Upm (Beckmann J2-21) abzentrifugiert, in 40 ml PBS resuspendiert und in ein 50 ml Röhre überführt.
- Die *E. coli* Zellen werden 5 min bei 6000 Upm und 4 °C (Megafuge 1.0) pelletiert und in 1 ml PBS vollständig resuspendiert.
- Das Zellpellet kann in der Regel bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert werden.

##### 3.3.1.1.1 Koexpression von Chaperonen zur Faltungsunterstützung

Zur Faltungsunterstützung und Stabilisierung von Proteinen können Chaperone eingesetzt werden. Hierzu werden Chaperon-Plasmide (Chloramphenicolselektion) kotransformiert und die Expression durch Zugabe von L-Arabinose (1 mg/ml) und oder Tetrazyklin (5 ng/ml) induziert.

##### 3.3.1.2 Affinitätschromatografische Aufreinigung von Proteinen

Durch Affinitätschromatographie können GST- oder His-Fusionsproteine an Glutathion-Agarose respektive Ni-NTA-Agarose gebunden werden, während unspezifische Proteine eines

Extraktes nicht an das Trägermaterial binden und auf diese Weise durch mehrmaliges Waschen entfernt werden können. Die Elution der Fusionsproteine erfolgt durch Zugabe eines spezifischen Kompetitors (reduziertes Glutathion respektive Imidazol).

#### **3.3.1.2.1 Lyse der *E. coli* Zellen**

Um Proteine aus einer *E. coli* Induktionskultur aufzureinigen, müssen die Zellen erst aufgebrochen und die Proteine zugänglich gemacht werden. Dies geschieht je nach Aufreinigungsart unter nativen oder denaturierten Bedingungen.

##### **Lyse unter nativen Bedingungen:**

- Das Zellpellet einer 1 Liter Induktionskultur wird in 25 ml PBS mit 1 mM PMSF, Proteaseinhibitor (1:100), 0,5 mg/ml Lysozym, 1 % Triton X-100 und optional 1 % Sarkosyl ü/N auf Eis lysiert.
- Das Lysat wird in vorgekühlte Metallbecher überführt und 3 x 10 sek mit bei 40 % Leistung mit dem Ultraschallstab (Sonoplus HD2200) sonifiziert. Zwischen den Beschallungen sollte genügend Zeit gelassen werden, dass sich das Lysat vollständig abkühlen kann.
- Das Lysat wird 30 min bei 4 °C und 15000 Upm (Avanti J-25) zentrifugiert. Der geklärte Überstand kann nun in die affinitätschromatographische Reinigung eingesetzt werden.

##### **Lyse unter denaturierenden Bedingungen:**

- Das Zellpellet einer 1 Liter Induktionskultur wird in 20 ml Puffer B unter rotierendem Schütteln ü/N bei RT lysiert.
- Das Lysat wird 30 min bei 15000 Upm (Avanti J-25) zentrifugiert. Der geklärte Überstand kann nun in die affinitätschromatographische Reinigung eingesetzt werden.

#### **3.3.1.2.2 Reinigung von GST-Fusionsproteinen unter nativen Bedingungen**

Die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen basiert auf der Affinität von GST (Glutathion-S-Transferase) zu einem Säulenmaterial aus Glutathion-Agarose. Alle Schritte werden bei 4 °C durchgeführt.

- 500 µl Glutathion-Agarose Suspension wird mit 30 ml kaltem PBS gewaschen und mit dem geklärten Überstand der Lyse einer 1 Liter Induktionskultur für 2 h bei 4 °C unter rotierendem Schütteln inkubiert.
- In eine Polypropylen Säule (10 ml) wird ein Gazestopfen eingelegt, der die Glutathion-Agarose daran hindert durch die Säule durchzulaufen.
- Die Säule wird mit dem Proteingemisch beladen und der Durchfluss verworfen.

- Die Agarose wird mit 2 x 10 ml 1 % Triton X-100 in PBS und 10 ml 50 mM Tris/HCl pH 9,5 gewaschen.
- Die Elution erfolgt mit 5 x 1 ml 10 mM reduziertem Glutathion in 50 mM Tris/HCl pH 9,5 (2 min Inkubationszeit).

### **3.3.1.2.3 Reinigung von His-Fusionsproteinen unter nativen Bedingungen**

Die Aufreinigung von His-Fusionsproteinen basiert auf der Affinität von Oligohistidinen zu einem Säulenmaterial aus Ni-NTA-Agarose. Alle Schritte werden bei 4 °C durchgeführt.

- 700 µl Ni-NTA-Agarose Suspension wird mit 30 ml kaltem PBS gewaschen und mit dem geklärten Überstand der Lyse einer 1 Liter Induktionskultur und 20 mM Imidazol für 2 h bei 4 °C unter rotierendem Schütteln inkubiert.
- In eine Polypropylen Säule (10 ml) wird ein Gazestopfen eingelegt, der die Ni-NTA-Agarose daran hindert durch die Säule durchzulaufen.
- Die Säule wird mit dem Proteingemisch beladen und der Durchfluss verworfen.
- Die Agarose wird mit 10 ml 20 – 50 mM Imidazol in PBS und 10 ml 50 – 80 mM Imidazol in PBS gewaschen.
  - Die Konzentration an Imidazol in den Waschschritten ist Protein-spezifisch und wird für jedes Protein neu ermittelt.
  - Yaa1: 50 mM / 80 mM, Yaa2: 20 mM / 60 mM
- Die Elution erfolgt mit 5 x 1 ml 500 mM Imidazol in PBS (2 min Inkubationszeit).

### **3.3.1.2.4 Reinigung von His-Fusionsproteinen unter denaturierenden Bedingungen**

Im Gegensatz zur Aufreinigung unter nativen Bedingungen erfolgt die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen bei RT.

- 700 µl Ni-NTA-Agarose Suspension wird mit 30 ml PBS gewaschen und mit dem geklärten Überstand der Lyse einer 1 Liter Induktionskultur und 0 - 20 mM Imidazol für 2 h bei RT unter rotierendem Schütteln inkubiert.
- In eine Polypropylen Säule (10 ml) wird ein Gazestopfen eingelegt, der die Ni-NTA-Agarose daran hindert durch die Säule durchzulaufen.
- Die Säule wird mit dem Proteingemisch beladen und der Durchfluss verworfen.
- Die Agarose wird mit 10 ml 10 – 20 mM Imidazol in Puffer B und 10 ml 20 – 50 mM Imidazol in Puffer C gewaschen.
  - Die Konzentration an Imidazol in den Waschschritten ist Protein-spezifisch und wird für jedes Protein neu ermittelt.
- Die Elution erfolgt mit 5 x 1 ml 500 mM Imidazol in Puffer C (2 min Inkubationszeit).

### 3.3.1.2.5 Dialyse von rekombinanten Proteinen

Um den Kompetitor (reduziertes Glutathion oder Imidazol) aus den Elutionsfraktionen zu entfernen und um denaturierte Proteine zu renaturieren werden die Elutionsfraktionen gegen PBS bei 4 °C dialysiert.

- Ein 5 cm langer Abschnitt eines Dialyseschlauchs (12 – 15 kDa Ausschluss) wird 20 min in deion. Wasser bei 100 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt.
- Die Proteinsuspension wird mittels einer sterilen Pipette in einen Dialyseschlauch gefüllt, der zuvor durch eine sterile Klemme an einem Ende verschlossen wurde.
- Der Dialyseschlauch wird am verbleibenden Ende mit einer weiteren Klemme verschlossen.
- Die Dialyse erfolgt unter leichtem Rühren ü/N gegen 2 l kaltes PBS.
  - Zur Renaturierung von Proteinen wird dieser Schritt zweimal wiederholt.
- Die dialysierten Proteine werden in Reaktionsgefäße aliquotiert, zur Stabilisierung mit Proteaseinhibitor (1:100) versetzt und auf Eis oder bei 4 °C oder -20 °C gelagert.

### 3.3.2 Proteinmengenbestimmung mittels Bradford-Reagenz

Die Proteinmengenbestimmung nach Bradford basiert einer spezifischen Farbreaktion des Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G250. Dieser Farbstoff reagiert in saurer Lösung mit den Proteinen und bildet Komplexe was zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm führt.

- $800 - x \mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O werden mit  $x \mu\text{l}$  Proteinlösung und  $200 \mu\text{l}$  Bradford-Reagenz vermischt und 10 min bei RT inkubiert. ( $x = 1 - 20 \mu\text{l}$ ).
- Die Adsorption des Gemisches wird bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch bestimmt (BioPhotometer plus).
- Der Abgleich erfolgt gegen  $800 \mu\text{l}$  Wasser +  $200 \mu\text{l}$  Bradford-Reagenz.
- Die Proteinmenge der Lösung wird anhand der Adsorptionswerte einer zuvor erstellten Eichkurve (BSA 0 – 10  $\mu\text{g}$ , 2  $\mu\text{g}$ -Schritte) ermittelt.

Für die eingesetzte Konzentration an Protein gilt:

$$\text{Abs. 595 nm} = 0,064 * x \text{ Proteinkonzentration } [\mu\text{g/ml}]$$

$$\Rightarrow \text{Proteinkonzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{Abs. 595 nm} / 0,064$$

Für die Proteinkonzentration der Lösung gilt dann:

$$\text{Proteinlösung } [\mu\text{g/ml}] = \text{Proteinkonz. } [\mu\text{g/ml}] \times 1000 / \text{eingesetzte Menge (x)}$$

*\* ermittelt aus der Steigung der Eichkurve*

### 3.3.3 Detektion von Proteinen

#### 3.3.3.1 Proteinprobenaufarbeitung für SDS-Polyacrylamidgele

Proteinproben müssen denaturiert werden, um sie der Größe nach über ein Polyacrylamidgel zu separieren.

- Von Proteinlösungen wird 32,5 µl abgenommen oder ein geringeres Volumen auf 32,5 µl mit PBS aufgefüllt.
- Die Zellsuspension einer *E. coli*-Kultur wird für 1 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge Pico) zentrifugiert und das Zellpellet in 32,5 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.
- Die Zellsuspension einer Hefe-Kultur wird für 1 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge Pico) zentrifugiert und das Zellpellet in 32,5 µl 4 M Harnstoff resuspendiert.
- Die Ansätze werden mit 12,5 µl Proteinblaumarker (4-fach) und 5 µl 1 M DTT aufgefüllt (50 µl final) und 10 min bei 100 °C erhitzt.

#### 3.3.3.2 Auftrennung von Proteinproben mittels SDS-PAGE

Für die Analyse von Proteinen werden 10 %ige bis 15 %ige, 7 x 9 cm große Polyacrylamidgele verwendet. Die Glasplatten, Teflonplatten und Abstandhalter werden sorgfältig mit dest. Wasser und 70 %igen Ethanol gereinigt und getrocknet.

##### 3.3.3.2.1 Herstellung des Trenngels

Im Trenngel werden die Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe separiert.

- Acrylamid (30:0.8), Wasser und Trenngelpuffer werden zusammenpipettiert und gut gemischt.
- Als letztes werden Ammoniumpersulfat (APS: 10 %ige Stocklösung) und TEMED hinzugegeben.
- Die Gelmasse wird zügig ohne Blasenbildung zwischen die Glas- und Aluminiumplatte bis 2 cm unter den oberen Rand gegossen und das Gel mit Isopropanol überschichtet.
- Nach dem Auspolymerisieren wird der Isopropanol abgegossen und das Gel vorsichtig mehrfach mit dest. Wasser gespült.

Prozentigkeit des Trenngels	Acrylamid-Lösung	Wasser	4 x Trenngelpuffer	APS	TEMED
10 %	6,7 ml	8,3 ml	5 ml	200 µl	70 µl
15 %	10 ml	5 ml	5 ml	200 µl	70 µl

### 3.3.3.2 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 Acrylamid-Lösung (30:0.8), 6 ml Wasser und 2,5 ml Sammelgelpuffer werden zusammenpipettiert und gut gemischt.
- Als letztes werden 100 µl Ammoniumpersulfat (APS: 10 %ige Stocklösung) und 40 µl TEMED hinzugegeben.
- Das Sammelgel wird auf das Trenngel gegossen, wobei sich keine Luftblasen bilden dürfen und der Kamm in das Sammelgel gesteckt, sodass sich Ladetaschen bilden können.
- Nach dem Auspolymerisieren kann das Gel für die Elektrophorese verwendet werden indem der Kamm gezogen wird und die Ladetaschen mit Ladepuffer gespült werden.

### 3.3.3.2.3 SDS-Gelelektrophorese

- Das Gel wird in die Apparatur eingespannt, mit Laufpuffer hintergossen und die Kammer mit Laufpuffer gefüllt.
- Die Proben (max. 25 µl pro Tasche pro Ladung) werden aufgetragen.
  - In einer Spur können durch mehrmaliges Laden bis zu 50 µl Probe aufgetragen werden. Die Proteinprobe darf hierbei vor der letzten Ladung das Trenngel noch nicht erreicht haben.
- Für die Elektrophorese wird der Strom (200 V) für etwa 1 h bis 1,5 h angelegt.

### 3.3.3.3 Färbung von Proteingelen mit Coomassie-Blau

- Das Proteingel wird in Wasser gelegt, 30 sek bei 600 Watt in der Mikrowelle erwärmt und anschließend 10 min unter leichtem Schwenken gewaschen (3 x).
- Die Färbung erfolgt mit Coomassie-Lösung für 15 min bis 2 h unter leichtem Schwenken.
- Die Coomassie-Lösung wird abgenommen. Die Färbung wird deutlicher, wenn das Gel anschließend mit Wasser gewaschen wird.

#### 3.3.3.3.1 Fixierung und Färbung von Proteingelen

Zur Präparation von Proben für die massenspektrometrische Analyse werden Proteingele vor der Färbung fixiert.

- Das Proteingel wird in 46 % Methanol, 7 % Essigsäure für 1 h unter leichtem Schwenken fixiert.

- Die Färbung erfolgt für 1 - 2 h unter leichtem Schwenken mit 0,1 % Coomassie-Brillant-Blau G250 in 46 % Methanol, 7 % Essigsäure (filtriert).
- Das Gel wird mit 5 % Methanol, 7,5 % Essigsäure unter leichtem Schwenken ü/N entfärbt.

### **3.3.3.4 Westernblotanalyse**

Das Verfahren beruht auf dem Transfer von Proteinen aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran, wodurch diese immobilisiert werden. Auf der Membran können Proteine spezifische mit Antikörpern nachgewiesen werden.

#### **3.3.3.4.1 Aufbau der Blotapparatur**

- Zwei Filterpapiere werden auf die Maße 7 x 9 cm zurechtgeschnitten und in Transferpuffer inkubiert.
- Eine PVDF-Membran (Immobilon-P) wird ebenfalls auf 7 x 9 cm zugeschnitten, kurz in Methanol gewendet und auch in Transferpuffer inkubiert.
- Ein Transferpuffer-getränktes Filterpapier wird auf die Graphitplatte der unteren Blotapparatur gelegt, die aktivierte PVDF-Membran aufgelegt und Luftblasen zwischen den Schichten entfernt.
- Die PVDF-Membran wird mit Transferpuffer übergossen, das SDS-Polyacrylamidgel mit Wasser von der Teflonplatte gewaschen, kurz in Transferpuffer gelegt und luftblasenfrei auf die Membran gelegt.
- Der Stapel wird mit dem zweiten Transferpuffer-getränkten Filterpapier bedeckt und Luftblasen erneut durch vorsichtiges Auswalzen mit einer sterilen Glaspipette entfernt.
- Die Graphitplatte der obere Blotapparatur wird auf den Stapel gelegt, die Kontakte an das Stromgerät angeschlossen und ein Gewicht von etwa 1 kg auf die Apparatur gestellt, um den Transfer zu begünstigen.
- Der Proteintransfer erfolgt bei 225 mA und maximal 8 W für 15 – 45 min je nach Proteingröße.
  - Je größer das Protein, desto länger die Transferdauer.
- Nach dem Transfer wird die PVDF-Membran kurz in PBS gewaschen um Salze zu entfernen und für 1 h bei RT oder ü/N bei 4 °C mit Blockierungslösung inkubiert.

#### **3.3.3.4.2 Antikörperreaktion auf der PVDF-Membran**

Die Detektion von Proteinen auf der PVDF-Membran erfolgt durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern.

- Der Primärantikörper, gerichtet gegen das spezifische Protein, wird in 5 ml Blockierungslösung verdünnt und 1 – 2 h bei RT oder ü/N bei 4 °C unter rotierendem Schwenken mit der Membran inkubiert.
- Die Membran wird dreimal für 10 min unter leichtem Schwenken mit PBS gewaschen.
- Der Sekundärantikörper, mit Alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelt und gegen den Primärantikörper gerichtet, wird in Blockierungslösung verdünnt und 1 h bei RT oder ü/N bei 4 °C unter rotierendem Schwenken mit der Membran inkubiert.
- Die Membran wird erneut dreimal für 10 min unter leichtem Schwenken mit PBS gewaschen.

#### **3.3.3.4.3 Farbentwicklung mittels Alkalischer Phosphatase**

- Die Membran wird für 5 min unter rotierendem Schwenken in Detektionspuffer inkubiert.
- Anschließend wird die Membran mit 20 ml Detektionspuffer mit 33 µl BCIP-Lösung (0.5 g BCIP in 10 ml DMF) und 66 µl NBT-Lösung (0.5 g NBT in 10 ml 70 %igem DMF) für mindestens 2 min bis zu mehreren Stunden inkubiert.
- Die Farbentwicklung wird durch mehrfaches Waschen mit Wasser abgestoppt und die Membran luftgetrocknet.

#### **3.3.4 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen**

Die massenspektrometrische Analyse einzelner, aus SDS-Polyacrylamidgelen ausgeschnittener Proteinbanden erfolgt durch die Zentrale Bioanalytik des Zentrums für Molekulare Medizin der Universität Köln (ZMMK) durch LC-MS nach Trypsinbehandlung.

#### **3.3.5 Beschichtung von Latexkügelchen mit rekombinantem Protein**

- $1 \times 10^9$  Latexkügelchen ( $\varnothing$  1,1 µm) werden in 1 ml PBS pipettiert und 5 min bei 10000 Upm (Heraeus Biofuge pico) pelletiert.

$$\text{Kügelchen}/\mu\text{l} = (6,03 \times 1 \times 10^7 \times \text{Feststoffgehalt}) / (3,3 \times \text{Durchmesser} [\mu\text{m}]^3)$$

- Die Latexkügelchen werden erneut in 1 ml PBS resuspendiert und 5 min bei 10000 Upm (Heraeus Biofuge pico) pelletiert.
- Die Latexkügelchen werden mit 1 ml Kopplungspuffer vollständig resuspendiert (Ultraschallwasserbad) und 10 min bei 13000 Upm zentrifugiert (Heraeus Biofuge pico). Dieser Schritt wird wiederholt.

- Die Latexkügelchen werden in 100 µl Kopplungspuffer resuspendiert (Ultraschallwasserbad) und mit 100 µl Proteinlösung in PBS versetzt, so dass die Endkonzentration 12,5 – 100 µg/ml beträgt.
- Die Suspension wird gemischt und 1 h bei 37 °C oder ü/N auf Eis inkubiert.
- Es werden 500 µl Kopplungspuffer hinzugegeben, die Suspension 2 min sonifiziert (Ultraschallwasserbad) und 500 µl 40 mg/ml BSA in Kopplungspuffer hinzupipettiert.
- Die Suspension wird gemischt und 1 h bei 37 °C oder 4 h auf Eis inkubiert.
- Die proteinbeschichteten Latexkügelchen werden 5 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) pelletiert und in 1 ml 1 mg/ml BSA in PBS resuspendiert.
- Die proteinbeschichteten Latexkügelchen werden 5 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) pelletiert, in 500 µl 0,2 mg/ml BSA in PBS resuspendiert und können etwa eine Woche bei 4 °C gelagert werden.

### 3.3.5.1 Überprüfung der Beschichtungsqualität

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

- $1 \times 10^8$  proteinbeschichtete Latexkügelchen werden 5 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) pelletiert, in 32,5 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und mit 12,5 µl Proteinblaumarker (4-fach) und 5 µl 1 M DTT für 10 min bei 100 °C erhitzt.
- Es werden 25 µl (entspricht  $5 \times 10^7$  Latexkügelchen) mittels Westernblot analysiert.

### 3.3.6 Markierung von Organismen/Proteinen

#### 3.3.6.1 Fluoreszenzmarkierung chlamydialer EBs mit CFSE

Um die Adhäsion von Chlamydien an HEp-2 Zellen mittels Durchflusszytometrie untersuchen zu können, müssen diese zuvor für das FACSAria „sichtbar“ gemacht werden. Dies geschieht durch die Einlagerung von Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) in lebende EBs.

- Ein 200 µl Aliquot Gastrografin-gereinigte Chlamydien (3.1.2.5, S. 53) wird mit 800 µl PBS + 0,1% BSA auf 1 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und mit 25 µM CFSE (5 µl 5 mM Stocklösung in DMSO) für 1,5 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.
- Die Suspension wird mit 500 µl PBS + 1% BSA aufgefüllt und 25 min bei 4 °C und 15000 Upm (Heraeus Biofuge Primo R) zentrifugiert.
- Das CFSE-markierte Chlamydienpellet wird zweimal mit PBS + 1% BSA gewaschen und in 200 µl SPG-Puffer vollständig resuspendiert (Ultraschallwasserbad).

### 3.3.6.2 Fluoreszenzmarkierung von rekombinantem Protein mit Fluoreszein

Proteine können direkt durch NHS-Fluoreszein fluoreszenzmarkiert werden. Dabei reagiert der NHS-Ester mit primären Aminogruppen ( $-\text{NH}_2$ ) des Proteins und formt eine stabile Amid-Bindung.

- 1 mg NHS-Fluoreszein wird direkt vor der Reaktionsansetzung in 100  $\mu\text{l}$  DMSO gelöst.
- Die zur Reaktion verwendeter Menge an gelöstem NHS-Fluoreszein berechnet sich nach folgender Formel:  

$$\text{mg Protein/MW Protein [Da]} \times a \times 47340 = \mu\text{l NHS-Fluoreszein-Lösung}$$
 MW= Molekulargewicht, a = Überschuss NHS-Fluoreszein
- Die Markierung erfolgt standardmäßig mit einem 20-fachen Überschuss an NHS-Fluoreszein für 2 h auf Eis.
- Überschussiges NHS-Fluoreszein wird durch Dialyse ü/N gegen PBS entfernt.

### 3.3.6.3 Biotinylierung von rekombinantem Protein

Proteine können auch durch Sulfo-NHS-Biotin markiert werden. Dabei reagiert der NHS-Ester ebenfalls mit primären Aminogruppen ( $-\text{NH}_2$ ) des Proteins und formt eine stabile Amid-Bindung. Die Markierung mit EZ-Link-Sulfo-SS-NHS-Biotin kann im Gegensatz zur Markierung mit EZ-Link-Sulfo-NHS-Biotin durch Reduktion der Disulfidbrücke mit 50 mM DTT wieder gelöst werden.

- 1,1 mg Sulfo-NHS-Biotin werden direkt vor der Reaktionsansetzung in 250  $\mu\text{l}$  PBS gelöst.
- Die zur Reaktion verwendeter Menge an gelöstem Sulfo-NHS-Biotin berechnet sich nach folgender Formel:  

$$\text{mg Protein/MW Protein [Da]} \times a \times 100000 = \mu\text{l Sulfo-NHS-Biotin -Lösung}$$
 MW= Molekulargewicht, a = Überschuss NHS-Fluoreszein
- Die Markierung erfolgt standardmäßig mit einem 20-fachen Überschuss an Sulfo-NHS-Biotin für 1 h auf Eis.
- Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 M Tris/HCl pH 8 auf 50 mM final über Nacht auf Eis abgestoppt.

### 3.3.7 Far Western Analyse für Protein-Protein Interaktion

Der Far Westernblot ermöglicht die Detektion direkter Protein-Protein-Interaktion *in vitro*. Hierbei wird das eine Protein (1  $\mu\text{g}$ ) zunächst mittels Westernblot auf eine PVDF-Membran

transferiert (3.3.3.4.1, S. 71), mit 6 M Guanidin-HCl vollständig denaturiert und dann schrittweise mit abnehmender Konzentration Guanidin-HCl renaturiert.

<b>Guanidin-HCL (M)</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>0,1</b>	<b>0</b>
Milchpulver (g)	1	1	1	1	1
Glycerin (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
5 M NaCl (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
1 M Tris/HCl pH 7,5 (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
10 % Tween-20 (ml)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
0,5 M EDTA (ml)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
1 M DTT (ml)	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
8 M Guanidin-HCl (ml)	18,75	9,30	3,13	0,31	0
ddH <sub>2</sub> O (ml)	2,45	12,82	18,07	20,89	21,20
Volumen total (ml)	25	25	25	25	25
<b>Zeit/Temperatur</b>	<b>30 min/RT</b>	<b>30 min/RT</b>	<b>30 min/RT</b>	<b>30 min/4 °C</b>	<b>ü/N /4 °C</b>

Die Membran wird anschließend 2 h bei RT mit einer Lösung des zweiten, biotinylierten Proteins (2 µg/ml) inkubiert. Die Überprüfung der Interaktion erfolgt mit AP-gekoppeltem Streptavidin zur Detektion des biotinylierten Proteins (Wu, Li et al. 2007).

### 3.3.8 Protein-Phospholipid-Interaktion

#### 3.3.8.1 Liposomen Zentrifugationsexperiment

Die Bindung von rekombinantem Protein an Liposomen stellt ein einfaches Verfahren dar um die Interaktion von Proteinen mit Membranen zu bestimmen.

##### 3.3.8.1.1 Generierung der Liposomen mittels „Freeze-Thaw-Sonication“-Methode

Die verwendeten Liposomen wurden ausschließlich aus dem Phospholipid Phosphatidylcholin generiert. Die Prä-Liposomen wurden freundlicherweise von B.Sc. Jan Wiese (Institut für Biochemie der Pflanzen, HHU Düsseldorf) bereitgestellt.

- Phospholipide (final 3 % Phosphatidylcholin (PC)) werden in Puffer (50 mM K-gluconat, 100 mM Tricin-KOH pH 7,6) gelöst, auf Eis sonifiziert und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren (bereitgestellt von Jan Wiese).
- Die Prä-Liposomen werden bei RT aufgetaut, zehnmal 10 sek sonifiziert (Ultraschallwasserbad) und über eine PD-10 Säule isoliert.
  - Die PD-10 Säule wird fünfmal mit 5 ml Puffer (100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,8) equilibriert und mit 1 ml aufgetauter Prä-Liposomen-Emulsion beladen.
  - Die Emulsion wird vollständig durch die Säule laufen gelassen und der Durchfluss verworfen.
  - Die Elution erfolgt mit 3 ml Puffer. Die Liposomen werden eluiert, wenn der Durchfluss trüb wird.

- Die Liposomen werden aufgefangen und umgehend für den Bindeassay eingesetzt.

### **3.3.8.1.2 Bindung von Proteinen an Phospholipidmembranen**

Für den experimentellen Ansatz werden die PC-Liposomen frisch über die PD10-Säule aufgereinigt. Die Proteinlösungen werden vor der Injektion zentrifugiert um potentielle Proteinaggregate zu pelletieren.

- 5 µg rekombinantes lösliches Protein in 50 µl PBS wird mit 50 µl frisch aufgereinigten PC-Liposomen (s.o.) für 20 min bei RT inkubiert.
- Die Liposomen werden für 15 min bei 16000 x g (Heraeus Zentrifuge Pico17) pelletiert, der lösliche Überstand (100 µl) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Liposomen-Pellet in 100 µl PBS resuspendiert.
- Die Auswertung erfolgt mittels Westernblotanalyse.

### **3.3.8.2 Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)**

Mittels Oberflächenplasmonenresonanz kann die Interaktion von rekombinantem Protein mit Phospholipid-Membranen quantifiziert werden. Dies geschieht durch die quantitative Bestimmung der Schichtdicke im Nanometerbereich welche als Resonanz in RU (Resonanz Units) wiedergegeben wird. Bindet das Protein an die Membran, so erhöht sich die Schichtdicke und folglich die Resonanz. Die Experimente werden im Forschungszentrum Jülich im „Institute of Complex Systems“, Strukturbiochemie (ICS-6) unter Anleitung von Dr. Bernd König und Yu-Fu Hung durchgeführt. Sämtliche Puffer werden steril filtriert und entgast. Die Proteinlösungen werden vor der Injektion zentrifugiert um potentielle Proteinaggregate zu pelletieren.

#### **3.3.8.2.1 Beschichtung des Sensorchips mit Phospholipidmembranen**

- Der Sensorchip L1 (mit 2 Durchflusszellen) wird durch Injektion von 20 mM CHAPS regeneriert.
- Die Beschichtung des Sensorchips mit Membran erfolgt durch die Injektion von 100 µl Liposom-Emulsion in PBS (bereitgestellt durch Yu-Fu Hung) bei einer Flussgeschwindigkeit von 2 µl/min.
  - Als Phospholipid wird 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholin (POPC) verwendet.
- Die Membran wird durch mehrfache Injektionen von 20 µl 50 mM NaOH bei einer Flussgeschwindigkeit von 20 µl/min geglättet, bis eine stabile Basislinie erreicht ist.
- Unspezifische Bindestellen werden durch eine Injektion von 20 µl 0,1 mg/ml BSA in PBS bei einer Flussgeschwindigkeit von 20 µl/min abgesättigt.
- Der beschichtete Sensorchip kann nun für Interaktionsstudien genutzt werden.

### **3.3.8.2 Bindung von Proteinen an Phospholipidmembranen**

Um die Interaktion von Proteinen mit Membranen zu untersuchen werden Proteinlösungen unterschiedlicher Konzentrationen (0,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M) injiziert. Die Injektion erfolgt mit 20  $\mu$ l Proteinlösung in PBS bei einer Flussgeschwindigkeit von 20  $\mu$ l/min.

### **3.3.8.3 Membran-Lipid-Streifen**

Mit Membran-Lipid-Streifen kann die Interaktion von Proteinen mit spezifischen Lipiden nachgewiesen werden.

- Der Lipid-Streifen wird ü/N bei 4 °C mit 3 % BSA (fettsäurefrei), 0,1 % Tween-20 in PBS oder TBS blockiert.
- Der Streifen wird 1 h bei RT mit 3 ml 1  $\mu$ g/ml rekombinantes His-Fusionsprotein, 3 % BSA (fettsäurefrei), 0,1 % Tween in PBS oder TBS inkubiert.
- Der Streifen wird dreimal 5 min mit 0,1 % Tween-20 in PBS oder TBS gewaschen.
- Die Detektion erfolgt mit primärem anti-His und sekundärem AP-gekoppeltem Antikörper in 3 % BSA (fettsäurefrei), 0,1 % Tween-20 in PBS oder TBS.

## **3.3.9 Generierung polyklonaler Antikörper**

Zur Generierung von polyklonalen Antikörpern werden Kaninchen mit 10xHis Fusionsprotein immunisiert. Die Immunisierung und Gewinnung des Antiserums wird von der Firma Eurogentec durchgeführt. Pro Antikörper sind mindestens 800  $\mu$ g sauberes rekombinantes Protein nötig, da jeweils zwei Kaninchen mit je 100  $\mu$ g in vier Schritten immunisiert werden. Zunächst werden 400  $\mu$ g gereinigtes rekombinantes Protein über ein 10 % SDS-Gel aufgetrennt, das Vollängenprotein nach Coomassiefärbung ausgeschnitten und für die ersten zwei Immunisierungsschritte zur Firma Eurogentec gesandt. Für die folgenden zwei Immunisierungsschritte wird natives, gereinigtes rekombinantes Protein in PBS verwendet. Optional kann ein weiterer Immunisierungsschritt mit nativem, gereinigtem rekombinantes Protein durchgeführt werden.

### **3.3.9.1 Abreicherung polyklonaler Antikörper gegen HEp-2 Zellen**

Eine schnelle aber Effiziente Methode die Spezifität von Antiseren zu erhöhen ist die Abreicherung gegen HEp-2 Zellen. Dies kann zum einen gegen fixierte Zellen oder gegen Zellysat erfolgen.

### 3.3.9.1.1 Abreicherung gegen fixierte Zellen

- Ein konfluenter Zellrasen von HEp-2 Zellen in einer 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche wird entweder 3 min mit Methanol oder 20 min mit 3 % PFA fixiert.
- 1,5 ml Antiserum werden 1:1 mit HBSS verdünnt und ü/N bei 4 °C gegen die fixierten und HBSS-gewaschenen Zellen unter leichtem Schwenken abgereichert und bei -20 °C gelagert.
- Das abgereicherte Antiserum kann nun für die Immunfluoreszenz oder Westernblot-Analyse verwendet werden.

### 3.3.9.1.2 Abreicherung gegen Zelllysate

- Das Zelllysate von HEp-2 Zellen wird mittels Westernblot auf eine PVDF-Membran transferiert (3.3.3.4, S. 71).
- Das Antiserum wird mit Blockierungslösung verdünnt (1:100 bis 1:1000) und 2 h bei RT mit dem geblotteten Zelllysate inkubiert.
- Die Antikörperlösung wird aufgefangen und bei -20 °C gelagert.
- Das abgereicherte Antiserum kann pur oder weiter verdünnt in Blockierungslösung für Westernblot-Analysen verwendet werden.

### 3.3.9.2 Antigenreinigung polyklonaler Antikörper

Um die Spezifität des Antiserums deutlich zu erhöhen kann der polyklonale Antikörper mittels Antigenreinigung aufgereinigt werden. Hierzu wird das spezifische Antigen stabil an eine NHS-Sepharose gebunden (Amidbindung) welche folgend mit dem Antiserum inkubiert wird um die spezifischen Antikörper an das Antigen binden zu lassen. Nach mehreren Waschschrritten können die spezifischen polyklonalen Antikörper eluiert und aufgefangen werden. Die Methode erfolgt nach „Using Antibodies: A Laboratory Manual“ (Harlow and Lane 1999) und nach Herstellerangaben. Für die Antigenreinigung werden 2 ml Serum, 1 ml NHS-Sepharose und 1 mg rekombinantes Protein benötigt.

- 1 ml NHS-Sepharose wird in einer Polypropylen Säule (10 ml) mit Fritte gegeben und mit 2 x 10 ml kaltem 1 mM HCl und 2 x 5 ml kaltem Kopplungspuffer gewaschen.
- Die Proteinlösung in PBS (1 mg total) wird 1:1 mit Kopplungspuffer verdünnt und ü/N bei 4 °C unter ständigem Invertieren inkubiert.
- Um nicht reagierte NHS-Gruppen zu blockieren wird das gleiche Volumen Blockierungslösung hinzugegeben und 4 h bei 4 °C unter ständigem Invertieren inkubiert.

- Die NHS-Sepharose mit gebundenem Antigen wird fünfmal alternieren mit 3 x 2 ml Puffer 1 und Puffer 2 gewaschen und mit 2 ml Antiserum in 8 ml Puffer 1 für 2 h bei 4 °C unter ständigem Invertieren inkubiert.
- Die Sepharose wird mit 2 x 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5 und 2 x 10 ml 10 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl gewaschen.
- Die erste Elution (saure Elution) erfolgt mit 2 x 1,8 ml 100 mM Glycin pH 2,5. Die Lösung verbleibt dabei vor der Elution 5 min auf der Säule. Die Eluate werden getrennt in je 200 µl 1 M Tris/HCl pH 9,0 aufgefangen um den pH-Wert zu neutralisieren.
- Die zweite Elution (basische Elution) erfolgt mit 2 x 1,8 ml 100 mM Triethanolamin pH 11,5. Die Lösung verbleibt dabei vor der Elution 5 min auf der Säule. Die Eluate werden getrennt in je 200 µl 1 M Tris/HCl pH 7,5 aufgefangen um den pH-Wert zu neutralisieren.
- Der Antigen-gereinigte Antikörper wird aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

## 3.4 Zellbiologische Methoden

### 3.4.1 Transfektion adhärenter Zellen mit TurboFect™

- HEp-2 oder HeLa 229 Zellen werden 24 h vor der Transfektion dünn (etwa  $5 \times 10^4$  Zellen) in einer mit Deckgläschen bestückten 24 Well-Platte ausgesät.
- Die Zellen werden vor der Transfektion mit 300 µl frischen DMEM+5-Zellkultur-Medium überschichtet.
- Für die Transfektion von Zellen eines Wells wird 1 µg Plasmid-DNA (Endotoxin-frei) in 100 µl Serum-freiem DMEM-Medium verdünnt.
- Zur verdünnten Plasmid-DNA wird 2 µl TurboFect™ hinzugegeben, der Ansatz durch leichtes Vortexen gemischt und für 15 – 20 min bei RT inkubiert.
- 100 µl des Ansatzes werden tropfenweise auf die zu transfizierenden Zellen gegeben, durch leichtes Schütteln gut verteilt und für 24 h bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.
- Die Zellen können 24 h nach der Transfektion fixiert, oder mit Chlamydien infiziert werden.

### 3.4.2 Löslichkeitstest chlamydialer Proteine mit Detergenzien

- 75  $\mu$ l gradientengereinigte Chlamydien werden 30 min bei 4 °C und 21885 x g (15000 Upm/Heraeus Biofuge Primo R) pelletiert.
- Das Chlamydienpellet wird vollständig in 100  $\mu$ l PBS resuspendiert (Ultraschallwasserbad) und auf 150  $\mu$ l zur Detergenzienbehandlung aufgefüllt:
  - PBS
  - 1 % Triton X-100
  - 2 % Sarkosyl
  - 1 % NP-40 und 50 mM DTT
- Die Behandlung erfolgt für 1 h bei 37 °C unter wiederholtem Vortexen und Ultraschallbehandlung (Ultraschallwasserbad).
- Die Suspension wird 1 h bei 4 °C und 100000 x g (Ultrafuge Optima Max-E) zentrifugiert.
- Der Überstand (150  $\mu$ l) wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet vollständig in 150  $\mu$ l PBS resuspendiert
- Die Ansätze werden mit 57,7  $\mu$ l Proteinblaumarker (4-fach) und 23  $\mu$ l 1 M DTT versetzt und 10 min bei 100 °C erhitzt.

### 3.4.3 Adhäsionsexperimente

#### 3.4.3.1 Adhäsionsanalyse mit Protein-beschichteten Latexkügelchen

- Ein konfluenter Zellrasen HEp-2 Zellen in 24 Well-Platten (1 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Well) wird mit HBSS gewaschen.
- 1 x 10<sup>7</sup> proteinbeschichtete, grün fluoreszierende Latexkügelchen (3.3.5, S. 72) werden in 300  $\mu$ l Zellkultur-Medium aufgenommen, auf die HBSS-gewaschenen HEp-2 Zellen gegeben und durch Schütteln verteilt (zehnfacher Überschuss).
- Die Latexkügelchen werden für 5 min bei 30 °C und 700 Upm (Rotanta 460R) auf die Humanzellen zentrifugiert und 1 h bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank zur Adhäsion inkubiert.
- Nicht gebundene Latexkügelchen werden unter mikroskopischer Beobachtung durch HBSS-Waschungen entfernt.

- Die Humanzellen mit adhären Latexkügelchen werden durch Inkubation mit 300 µl Zell-Dissoziations-Lösung (10 min bei 37 °C) abgelöst, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 20 min bei RT oder ü/N bei 4 °C mit 300 µl 3 % PFA fixiert.
- Die fixierten Zellen werden für 5 min bei 1000 x g (Heraeus Biofuge Primo R) pelletiert und in 250 µl HBSS resuspendiert.
- Die quantitative Analyse erfolgt durch Bestimmung der mittleren Fluoreszenz von 10000 HEp-2 Zellen mit gebundenen grün-fluoreszierenden Latexkügelchen (FACS Aria).

#### **3.4.3.2 Adhäsionsanalyse mit löslichem rekombinantem Protein**

- Ein konfluenter Zellrasen HEp-2 Zellen in 24 Well-Platten (1 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Well) wird 15 min bei 4 °C abgekühlt und mit kaltem HBSS gewaschen.
- Die Zellen werden mit 250 µl 100 µg/ml rekombinantem Protein in Zellkulturmedium überschichtet und für unterschiedliche Zeitpunkte (1 min, 15 min, 30 min und 60 min) bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank oder 4 °C inkubiert.
- Das Zellkulturmedium wird entfernt und die Humanzellen fünfmal mit HBSS gewaschen.
- Die Humanzellen mit gebundenem rekombinantem Protein werden durch Inkubation mit 200 µl Zell-Dissoziations-Lösung (10 min bei 37 °C) abgelöst, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 1000 x g (Heraeus Biofuge Primo R) pelletiert.
- Das Zellpellet wird in 97,5 µl PBS resuspendiert mit 37,5 µl Proteinblaumarker (4-fach) und 15 µl 1 M DTT versetzt (final 150 µl) und 10 min bei 100 °C erhitzt.
- Die Auswertung erfolgt mittels Westernblotanalyse.

#### **3.4.3.3 Adhäsionsexperiment mit CFSE-markierten chlamydialen EBs**

- Ein konfluenter Zellrasen HEp-2 Zellen in 24 Well-Platten (1 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Well) wird 15 min bei 4 °C abgekühlt und mit kaltem HBSS gewaschen.
- Die Zellen werden mit 250 µl 100 µg/ml rekombinantem Protein in Zellkultur-Medium überschichtet und für 1 h bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank oder 4 °C inkubiert.
  - Erfolgt die Inkubation bei 37 °C werden die Zellen nachfolgend erneut für 15 min bei 4 °C abgekühlt.
- Zu den vorbehandelten Zellen werden unterschiedliche IFUs (5 x 10<sup>6</sup>, 1 x 10<sup>7</sup>, 2 x 10<sup>7</sup>) CFSE-markierter Chlamydien (3.3.6.1, S. 73) hinzugegeben und durch Schütteln verteilt.
  - Zur Kontrolle einer verminderten Adhäsion werden CFSE-markierte Chlamydien 15 min bei 4 °C mit 500 µg/ml Heparin in HBSS behandelt.

- Die Zellen werden für 1 h bei 4 °C inkubiert um die Adhäsion der CFSE-markierten EBs zu erlauben, die Internalisierung jedoch zu verhindern.
- Das Zellkulturmedium wird entfernt und die Humanzellen dreimal mit kaltem HBSS gewaschen.
- Die Humanzellen mit adhären EBs werden durch Inkubation mit 200 µl Zell-Dissoziations-Lösung (10 min bei 4 °C) abgelöst, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und ü/N mit 3 % PFA fixiert.
- Die quantitative Analyse erfolgt durch Bestimmung der mittleren Fluoreszenz von 10000 HEP-2 Zellen mit gebundenen CFSE-markierten EBs (FACSAria).

### 3.4.4 Neutralisation der chlamydialen Infektion

#### 3.4.4.1 Neutralisation der Chlamydialen Infektion mit Antikörpern

- $2 \times 10^7$  IFUs gradientengereinigter chlamydialer EBs (3.1.2.5, S. 53) werden in 50 µl Zellkultur-Medium mit unterschiedlichen Verdünnungen (1:10, 1:100 und 1:1000) Prä-Immunsersums oder Antiserums für 2 h bei 4 °C inkubiert.
- Ein konfluenter Zellrasen HEP-2 Zellen in 24 Well-Platten ( $1 \times 10^6$  Zellen pro Well) wird HBSS gewaschen, mit 250 µl Zellkultur-Medium überschichtet und 2 h bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> mit den vorbehandelten EBs (MOI = 20) im Brutschrank infiziert.
- Das Medium wird abgenommen und die infizierten Zellen vorsichtig mit 1 ml Chlamydienkultur-Medium (1,2 µg/ml Cycloheximid) je Vertiefung überschichtet.
- Das Chlamydienwachstum erfolgt für 50 Stunden (*C. pneumoniae*) bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank.
- Die Zellen werden 5 min Methanol-fixiert und die Einschlüsse mittels direkter Immunfluoreszenz angefärbt (Pathfinder 1:6).
- Zur quantitativen Analyse wird mikroskopisch die Anzahl an chlamydialen Einschlüssen in zehn Gesichtsfeldern bestimmt.

#### 3.4.4.2 Neutralisation der chlamydialen Infektion mit rekombinantem Protein

- Ein konfluenter Zellrasen HEP-2 Zellen in 24 Well-Platten ( $1 \times 10^6$  Zellen pro Well) wird mit HBSS gewaschen.
- Die Zellen werden mit 250 µl 100 µg/ml rekombinantem Protein in Zellkultur-Medium überschichtet und für unterschiedliche Zeitpunkte bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

- Die vorbehandelten HEp-2 Zellen werden mit gradientengereinigte EBs (3.1.2.5, S. 53) für 2 h bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank infiziert (MOI = 20).
  - Zur Kontrolle einer verminderten Infektion werden gradientengereinigte EBs 15 min bei 4 °C mit 500 µg/ml Heparin in HBSS behandelt.
- Das Medium wird abgenommen und die infizierten Zellen vorsichtig mit 1 ml Chlamydienkultur-Medium (1,2 µg/ml Cycloheximid) je Vertiefung überschichtet.
- Das Chlamydienwachstum erfolgt für 50 Stunden (*C. pneumoniae*) oder 24 Stunden (*C. trachomatis*) bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank.
- Die Zellen werden 5 min Methanol-fixiert und die Einschlüsse mittels direkter Immunfluoreszenz angefärbt (Pathfinder 1:6).
- Zur quantitativen Analyse wird mikroskopisch die Anzahl an chlamydialen Einschlüssen in zehn Gesichtsfeldern bestimmt.

### 3.4.5 Endozytoseexperimente

#### 3.4.5.1 Internalisierungsexperiment chlamydialer EBs

- Ein konfluenter Zellrasen HEp-2 Zellen in 24 Well-Platten (1 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Well) wird 15 min bei 4 °C abgekühlt und mit HBSS gewaschen.
- Die Zellen werden mit 250 µl 100 µg/ml rekombinantem Protein in Zellkultur-Medium überschichtet, für 1 h bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert und 15 min bei 4 °C abgekühlt.
- Zu den behandelten Zellen werden 2 x 10<sup>7</sup> IFUs chlamydialer EBs hinzugegeben (MOI = 20) und der Ansatz für die Adhäsion 1 h bei 4 °C inkubiert.
  - Zur Kontrolle einer verminderten Internalisierung werden chlamydiale EBs 15 min bei 4 °C mit 500 µg/ml Heparin in HBSS behandelt.
- Die Internalisierung der EBs erfolgt für 2 h bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank.
- Überschüssige EBs werden durch fünfmaliges Waschen mit HBSS entfernt.
- Der Zellrasen wird mit 15 min mit 300 µl 0,5 x Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert um sowohl die HEp-2 Zellen vom Wellgrund als auch die adhären, nicht internalisierten EBs von der Zelloberfläche abzulösen.
- Die infizierten Zellen werden 5 min bei 1000 x g (Heraeus Biofuge Primo R) pelletiert, in 1 ml HBSS resuspendiert und erneut 10 min bei 250 x g (Heraeus Biofuge Primo R) pelletiert um nicht internalisierte EBs zu entfernen.

- Die DNA infizierter Zellen wird isoliert (3.2.4.1, S. 60) und die Internalisierung mittels Real-Time-PCR auf 200 ng DNA mit GAPDH und 16S Oligonukleotiden bestimmt (3.2.8, S. 63).

### 3.4.5.2 Blockierung der Endozytose mit chemischen Inhibitoren

Um spezifische Mechanismen der Endozytose der Humanzellen zu inhibieren werden chemische Inhibitoren eingesetzt. Die Zellen werden mit dem Inhibitor in Serum-freiem Medium vorbehandelt (s.u.). Beim Adhäsionsexperiment mit löslichem rekombinantem Protein (3.4.3.2, S. 81) und Neutralisationsexperiment der Chlamydialen Infektion mit rekombinantem Protein (3.4.4.2, S. 82) wird der Inhibitor ebenfalls bei der Protein-Behandlung hinzugefügt. Beim Neutralisationsexperiment wird der Inhibitor mit dem Medienwechsel entfernt.

Inhibitor	Wirkung	Behandlungszeit	Konzentration
Cytochalasin D	Depolymerisierung von Aktin	45 min	20 $\mu$ M
Dynasore	Inhibierung von Dynamin	30 min	0,1 mM
Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin	Zerstörung der Integrität von Lipid Rafts	60 min	5 mM
Nystatin	Laterale Zertörung von Lipid Rafts	30 min	30 $\mu$ g/ml

### 3.4.5.3 Internalisierung Protein-beschichteter Latexkügelchen

- Ein konfluenter Zellrasen HEp-2 Zellen in 24 Well-Platten ( $1 \times 10^6$  Zellen pro Well) wird mit HBSS gewaschen.
- $5 \times 10^6$  proteinbeschichtete, grün fluoreszierende Latexkügelchen (3.3.5, S. 72) werden in 300  $\mu$ l Zellkultur-Medium aufgenommen, auf die HBSS-gewaschenen HEp-2 Zellen gegeben und durch Schütteln verteilt (fünffacher Überschuss).
- Die Latexkügelchen werden für 5 min bei 30 °C und 700 Upm (Rotanta 460R) auf die Humanzellen zentrifugiert und 4 h bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank zur Adhäsion und Internalisierung inkubiert.
- Nicht gebundene Latexkügelchen werden unter mikroskopischer Beobachtung durch HBSS-Waschungen entfernt.
- Die Humanzellen werden für 10 min mit 3 % PFA fixiert und extrazelluläre proteinbeschichtete Latexkügelchen mit spezifischem primärem und Alexa594-gekoppeltem sekundärem Antikörper ohne Permeabilisierung gefärbt.

- Zur Auswertung wird mikroskopisch die Anzahl internalisierter (nicht gefärbter) und extrazellulärer (gefärbter) Latexkügelchen in zehn Gesichtsfeldern bestimmt.

#### **3.4.5.4 Bestimmung der allgemeinen Endozytose humaner Zellen**

Das Protokoll ist eine Abwandlung des Zelloberflächen-Protein-Isolationskits der Firma Thermo Scientific.

##### **3.4.5.4.1 Mikroskopische Analyse der Endozytose**

- Ein konfluenter Zellrasen HEp-2 Zellen in 24 Well-Platten ( $1 \times 10^6$  Zellen pro Well) wird zweimal mit HBSS gewaschen mit 1 ml Zellkultur-Medium überschichtet und 20 min bei 4 °C abgekühlt um biologische Prozesse der Zelle zu unterbinden.
- Die abgekühlten Zellen werden dreimal mit kaltem HBSS gewaschen und oberflächenzugängliche Moleküle (e.g. Proteine) für 30 min bei 4 °C mit 1 ml 0,25 mg/ml EZ-Link-Sulfo-NHS-SS-Biotin reversibel biotinyliert.
- Die Reaktion wird durch Zugabe von 50 µl 1 M Tris/HCl pH 7,8 (50 mM final) für 15 min bei 4 °C abgestoppt.
- Die biotinylierten Zellen werden zweimal mit HBSS gewaschen, mit 1 ml Zellkultur-Medium überschichtet und 30 min bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert um Endozytose zuzulassen.
- Die Zellen werden dreimal mit kaltem HBSS gewaschen, mit 500 µl kaltem 50 mM DTT in HBSS überschichtet und 1 h bei 4 °C inkubiert um oberflächenzugängliches Biotin durch Reduktion der Disulfidbrücke zu entfernen.
- Die Zellen werden 10 min mit 3 % PFA fixiert und mit 2 % Saponin permeabilisiert. Die Analyse erfolgt durch Detektion des Biotins mit Streptavidin-Qdot(605).

##### **3.4.5.4.2 Analyse der Endozytose mittels Westernblot**

- Ein 80 % konfluenter Zellrasen HEp-2 Zellen in einer 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche wird zweimal mit HBSS gewaschen mit 2 ml Zellkultur-Medium überschichtet und 20 min bei 4 °C abgekühlt um biologische Prozesse der Zelle zu unterbinden.
- Die abgekühlten Zellen werden dreimal mit kaltem HBSS gewaschen und oberflächenzugängliche Moleküle (e.g. Proteine) für 30 min bei 4 °C unter ständigem Schwenken mit 3 ml 0,5 mg/ml EZ-Link-Sulfo-NHS-SS-Biotin reversibel biotinyliert.
- Die Reaktion wird durch Zugabe von 150 µl 1 M Tris/HCl pH 7,8 (50 mM final) für 30 min bei 4 °C unter ständigem Schwenken abgestoppt.
- Die biotinylierten Zellen werden dreimal mit 50 mM Tris/HCl pH 7,8 gewaschen und mit 2 ml 100 µg/ml rekombinantem Protein in Zellkultur-Medium überschichtet.

- Die Zellen werden zunächst 15 min bei 4 °C inkubiert, gefolgt von 20 min bei 37 °C um Endozytose zu ermöglichen.
- Die Zellen werden dreimal mit kaltem HBSS gewaschen, mit 3 ml kaltem 50 mM DTT in HBSS überschichtet und 30 min bei 4 °C inkubiert um oberflächenzugängliches Biotin durch Reduktion der Disulfidbrücke zu entfernen.
- Die Zellen werden dreimal mit eiskaltem HBSS gewaschen, in 2 ml eiskaltem HBSS mit Hilfe eines sterilen Zellschabers vom Flaschengrund gelöst und die Suspension in ein Reaktionsröhrchen (2 ml) überführt.
- Die Zellen werden für 5 min bei 4 °C und 1000 x g (Heraeus Biofuge Primo R) pelletiert, in 150 µl HBSS mit Proteaseinhibitor (1:10) resuspendiert und mit 50 µl Proteinblaumarker (4-fach) versetzt 10 min bei 100 °C erhitzt (kein DTT!).

#### **3.4.5.5 Endozytose von biotinyliertem rekombinanten Protein**

- Rekombinantes Protein wird mit EZ-Link-Sulfo-NHS-SS-Biotin reversibel biotinyliert (3.3.6.3, S. 74).
- Ein 80 % konfluenten Zellrasen HEp-2 Zellen in einer 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche wird zweimal mit HBSS gewaschen mit 2 ml Zellkultur-Medium überschichtet und 20 min bei 4 °C abgekühlt um biologische Prozesse der Zelle zu unterbinden.
- Das Medium wird abgenommen, durch 2 ml Zellkultur-Medium mit 100 µg/ml biotinyliertem, rekombinanten Protein ersetzt und die Zellen 15 min bei 4 °C zur Bindung des Proteins inkubiert.
- Die Zellen werden anschließend für die Adhäsions- und Debiotinylierungskontrolle 20 min bei 4 °C für die Endozytose 20 min bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.
- Die Zellen werden dreimal mit eiskaltem HBSS gewaschen und für die Debiotinylierungskontrolle und Endozytose 30 min bei 4 °C mit 2 ml 50 mM DTT in HBSS inkubiert um oberflächenzugängliches Biotin durch Reduktion der Disulfidbrücke zu entfernen. Für die Adhäsionskontrolle werden die Zellen mit 2 ml HBSS bei 4 °C inkubiert.
- Die Zellen werden dreimal mit eiskaltem HBSS gewaschen, in 2 ml eiskaltem HBSS mit Hilfe eines sterilen Zellschabers vom Flaschengrund gelöst und die Suspension in ein Reaktionsröhrchen (2 ml) überführt.
- Die Zellen werden für 5 min bei 4 °C und 1000 x g (Heraeus Biofuge Primo R) pelletiert, in 150 µl HBSS resuspendiert und mit 50 µl Proteinblaumarker (4-fach) versetzt 10 min bei 100 °C erhitzt (kein DTT!).

### 3.4.6 „Pull Down“ zur Identifizierung humaner Interaktionspartner

- 400 µg rekombinantes Protein werden für 30 min auf Eis mit 20-fachem Überschuss EZ-Link-Sulfo-NHS-Biotin biotinyliert (3.3.6.3, S. 74).
- Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 M Tris/HCl pH 8 auf 50 mM final über Nacht auf Eis abgestoppt und auf 4 ml mit Zellkultur-Medium aufgefüllt (100 µg/ml final).
- Ein konfluenten Zellrasen HEp-2 Zellen in einer 80 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche wird zweimal mit HBSS gewaschen mit der Proteinlösung überschichtet und durch Schwenken verteilt.
- Die Bindung des biotinylierten rekombinanten Proteins an die HEp-2 Zellen erfolgt für 1 h bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank.
- Der Überstand wird abgenommen, die Zellen zweimal mit kaltem HBSS gewaschen und alle Interaktionen mit 4 ml 1 mM Vernetzer in HBSS für 2 h bei 4 °C stabilisiert.
  - Die reversible Vernetzung erfolgt zum einen mit zellpermeablen DSP zum anderen mit zellimpermeablen DTSSP.
- Die Reaktion wird durch Addition von 80 µl 1 M Tris/HCl pH 7,5 (20 mM final) für 15 min bei RT abgestoppt.
- Die Zellen werden mit HBSS gewaschen, in 5 ml HBSS mit Hilfe eines sterilen Zellschabers vom Flaschengrund gelöst und die Suspension in ein Zentrifugationsröhrchen (10 ml) überführt.
- Die Zellen werden für 10 min bei 4 °C und 2800 Upm (Rotanta 460R) zentrifugiert und das Zellpellet in 500 µl RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitor (1:10) resuspendiert.
- Zur Lyse werden die Zellen 5 sek bei 10 % Leistung mit dem Ultraschallstab (Sonoplus HD2200) beschallt, ü/N auf Eis inkubiert und nochmals sonifiziert (5 sek, 10 % Leistung).
- Das Lysat wird weitere 6 h auf Eis inkubiert und 2 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert.
- 250 µl Streptavidin-Agarose werden dreimal mit 500 µl PBS gewaschen (Spin-Säule) und auf der Säule mit dem Überstand des Zellysats für 10 min bei RT unter ständigem Invertieren inkubiert um den Biotin-Protein-Interaktionspartner-Komplex zu binden.
- Die Säule wird 1 min bei 500 x g (Heraeus Zentrifuge Pico17) zentrifugiert und die Agarose fünfmal mit 500 µl PBS gewaschen.
- Zur Lösung des Vernetzers wird die Agarose 30 min bei 37 °C mit 100 µl 50 mM DTT in PBS inkubiert.

- Die Elution des Interaktionspartners erfolgt durch Zentrifugation für 1 min bei 500 x g (Heraeus Zentrifuge Pico17).
- Dem Eluat (~80 µl) werden 25 µl Proteinblaumarker (4-fach) hinzugefügt und der Ansatz 10 min bei 100 °C erhitzt.
- Zur Analyse wird 40 µl des Eluats auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen. Zur bestmöglichen Detektion werden die Proteine im Gel fixiert (3.3.3.3.1, S. 70). Zur Identifizierung werden die Banden möglichst genau ausgeschnitten und für die massenspektrometrischen Analyse zur Zentralen Bioanalytik des Zentrums für Molekulare Medizin Köln gesandt (3.3.4, S. 72).

### 3.5 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Analysen werden mit dem FACSaria (BD Biosciences) durchgeführt. Es erlaubt die Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften. Die Bedienung des FACS-Gerätes erfolgt durch Klaus L. Meyer.

### 3.6 Mikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgt entweder mit dem Axioskop 50 (Zeiss) oder im Institut für Genetik der HHU Düsseldorf am Konfokalmikroskop LSM 510. Zur Aufnahme und Bearbeitung von Bildern dient die jeweilige Software (Image Pro Plus [Axioskop], AxioVision 3.4 und ZEN11 [LSM 510]).

#### 3.6.1 Fixierung humaner Zellen

Zur mikroskopischen oder durchflusszytometrischen Analyse werden Zellen entweder mit Methanol oder PFA fixiert.

- Die zu fixierenden Zellen werden dreimal mit HBSS gewaschen und folgend mit 200 µl Methanol oder 3 % PFA zur Fixierung überschichtet.
  - Die Methanol-Fixierung erfolgt für 5 min bei RT.
  - Die PFA-Fixierung erfolgt für 10 min, bei Infektionen für 20 min bei RT.
- Die Fixierungslösung wird abgenommen, die Zellen mit HBSS gewaschen, anschließend überschichtet und können bei 4 °C gelagert werden.

### 3.6.2 Permeabilisierung PFA-fixierter Zellen

PFA-fixierte Zellen müssen vor der Färbung permeabilisiert werden. Dies erfolgt entweder durch Behandlung der fixierten Zellen für 30 min mit 0,2 % Triton X-100 oder 2 % Sarkosyl. Bei der Permeabilisierung mit Sarkosyl ist die Anwesenheit von 0,5 % Sarkosyl auch während der Färbung notwendig. Durch diese Behandlung sollten intra-chlamydiale Proteine nicht zugänglich sein (Knudsen, Madsen et al. 1999; Moelleken and Hegemann 2008; Wuppermann, Moelleken et al. 2008; Moelleken, Schmidt et al. 2010).

### 3.6.3 Immunfluoreszenz

Die Detektion chlamydialer und humaner Proteine erfolgt entweder mittels direkter oder indirekter Immunfluoreszenz.

#### 3.6.3.1 Detektion humaner und chlamydialer Proteine

- Fixierte Humanzellen werden dreimal mit PBS gewaschen, mit 25 µl primär-Antikörperlösung überschichtet und standardmäßig 30 min bei 30 °C inkubiert.
  - Bei der direkten Immunfluoreszenz handelt es sich um einen fluoreszenzmarkierten Antikörper.
- Die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen, mit 25 µl fluoreszenzmarkierter sekundär-Antikörperlösung überschichtet und standardmäßig 30 min bei 30 °C inkubiert.
  - Bei der direkten Immunfluoreszenz entfällt dieser Schritt
- Die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen, und können optional für 10 min bei RT mit 1 µg/ml DAPI gefärbt werden.
- Das Glasplättchen wird entnommen, das Präparat unter einem Luftstrom getrocknet und mit dem Zellrasen nach unten auf ein Objektträger mit einem Tropfen Vectashield gelegt und mit Nagellack versiegelt.
- Die Proben könne bei 4 °C im Dunkeln gelagert werden.

##### 3.6.3.1.1 Detektion von Lipid Rafts

Die Detektion von Lipid Rafts erfolgt mit dem klassischen Marker Cholera-Toxin Untereinheit B (CT-B) als FITC-Konjugat, welches mit dem Gangliosid GM1 einen spezifischen Bestandteil des Lipid Rafts erkennt.

- Zur Detektion von Lipid Rafts auf lebenden Zellen werden diese für 15 min bei 4 °C mit 10 µg/ml FITC-CT-B in 250 µl Zellkultur-Medium inkubiert.

- Zur Detektion von Lipid Rafts auf fixierten Zellen werden diese für 30 min bei 30 °C mit 10 µg/ml FITC-CT-B inkubiert.

#### **3.6.3.1.2 Lokalisation von rekombinantem Protein auf adhärenen Zellen**

- Ein semikonfluenter Zellrasen humaner HEp-2 Zellen wird 15 min bei 4 °C abgekühlt und dreimal mit kaltem HBSS gewaschen.
- Die Zellen werden 15 min bei 4 °C mit 20 µg/ml rekombinantem Protein in 250 µl Zellkultur-Medium inkubiert, anschließend intensiv mit HBSS gewaschen (5x) und 10 min mit 3 % PFA fixiert.
  - Zur parallelen Detektion von Lipid Rafts wird der Lösung zusätzlich 10 µg/ml FITC-CT-B zugesetzt.
- Die Zellen werden mit Saponin permeabilisiert. Die Detektion des rekombinanten Proteins erfolgt über den His-Tag mit primärem Maus-anti-His Antikörper und fluoreszenzmarkiertem sekundärem Antikörper.
  - Die Membran der Zelle kann optional mit für 30 min bei 30 °C 2 µg/ml fluoreszenzmarkiertem WGA (Wheat germ agglutinin) gefärbt werden.

## 4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, die im Hefe-Oberflächenexpressionssystem identifizierten, potentiellen Adhäsine Yaa1, Yaa2 und Yaa3 zu charakterisieren. Hierzu sollte zunächst rekombinantes Protein erzeugt werden um Antikörper gegen Yaa1, Yaa2 und Yaa3 zu generieren. Mit Hilfe dieser Antikörper sollte dann die Expression und Lokalisierung der potentiellen Adhäsine geklärt werden. Zudem sollten die adhäsiven Eigenschaften der potentiellen Adhäsine mit rekombinantem Protein bestätigt werden um folgend den humanen Interaktionspartner zu identifizieren. Abschließend sollte die Funktion der potentiellen Adhäsine in der chlamydialen Infektion beschrieben werden.

Im Folgenden wird die Charakterisierung der potentiellen Adhäsine nach absteigender, im Hefe-Oberflächenexpressionssystem beobachteter Bindestärke abgehandelt.

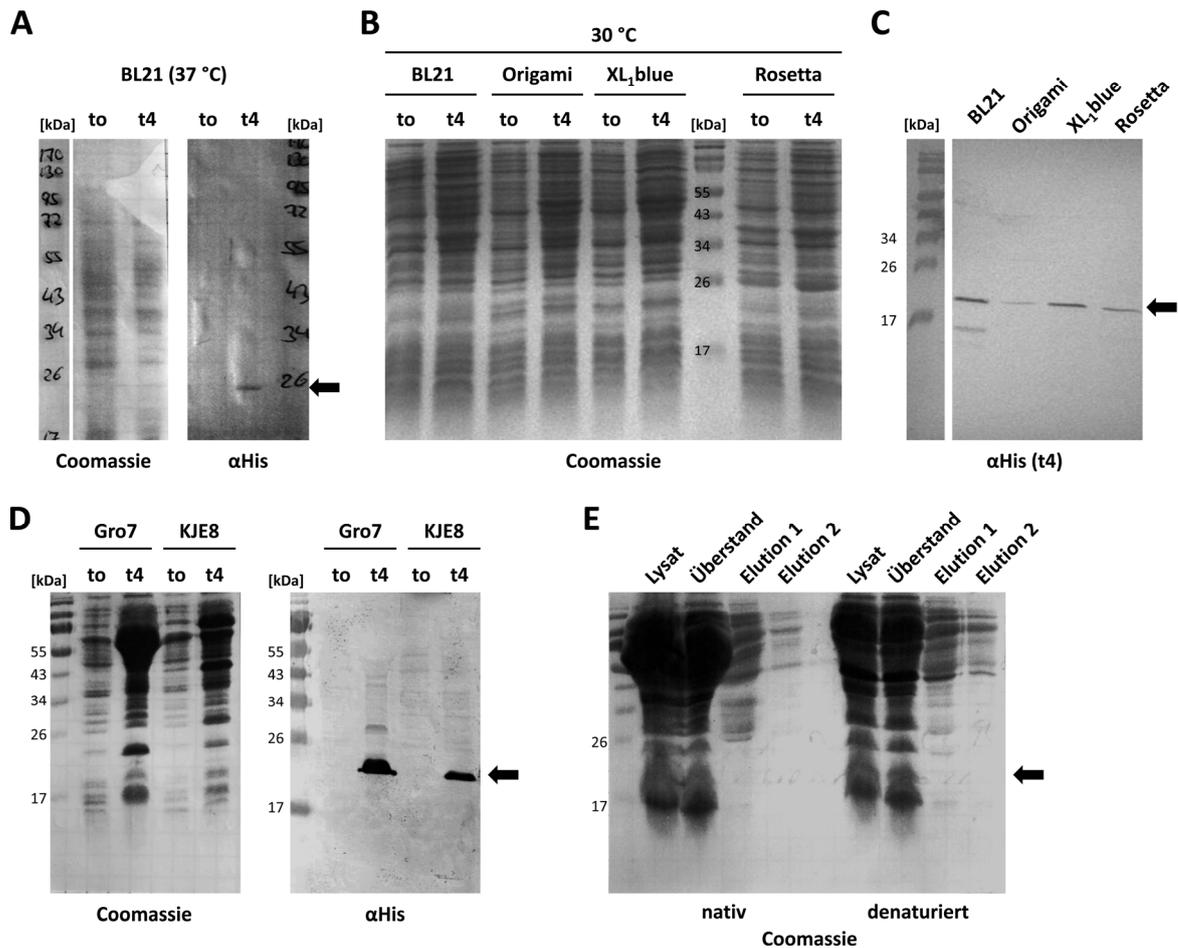
### 4.1 Charakterisierung des potentiellen Adhäsins Yaa3

Das hypothetische, 18 kDa-Protein Yaa3 zeigte im Hefe-Oberflächenexpressionssystem die stärkste Bindeeigenschaft (Fechtner 2009). Yaa3 ist ein innerhalb der Familie *Chlamydiaceae* hoch konserviertes Protein mit variablem N-Terminus (Aminosäure 1 bis 25) und einem C-Terminus mit hoher Identität (83 – 91 %). Yaa3 besitzt zudem eine nicht weiter charakterisierte DUF720-Domäne (Aminosäure 33 – 156), die spezifisch in chlamydialen Proteinen gefunden wird. Zunächst sollte rekombinantes Yaa3-Volllängenprotein in *E. coli* erzeugt und aufgereinigt werden, um weitere Analysen vorzunehmen.

#### 4.1.1 Expression und Aufreinigung von rekombinantem Yaa3

Die Expression und Aufreinigung von rekombinantem Yaa3 (rYaa3) erwies sich als sehr problematisch. Zunächst wurde versucht, Yaa3 in dem neu generierten Expressionsvektor pFT25 mit zehnfachem, C-terminalen His-Tag zu exprimieren. Hierzu wurden sowohl unterschiedliche *E. coli* Stämme (XL<sub>1</sub>blue, Origami, BL21 und Rosetta) (Abbildung 4.1 A, B) als auch unterschiedliche Temperaturen (20 °C, 25 °C, 30 °C und 37 °C) getestet (Daten nicht gezeigt). Nach der Induktion konnte Yaa3<sub>10xHis</sub> in Westernblots bei der erwarteten Laufhöhe von etwa 20 kDa nachgewiesen werden, jedoch war die Expression für die Aufreinigung nicht stark genug (Abbildung 4.1 A-C). Die Koexpression von Yaa3<sub>10xHis</sub> mit verschiedenen Chaperonen der Chaperon-kodierenden Plasmide pGro7 (groES, groEL) und pG-KJE8 (dnaK, dnaJ, grpE, groES, groEL) zeigte eine deutliche Verbesserung der Expression (Abbildung 4.1 D). Bei pGro7 war die Expression deutlich stärker als bei pG-KJE8.

Nachfolgend konnte  $Yaa3_{10xHis}$  aber leider weder unter nativen noch unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt werden (Abbildung 4.1 E).



**Abbildung 4.1: Expressions- und Aufreinigungsversuche von rekombinantem  $Yaa3_{10xHis}$**

**A:** Überprüfung der Expression von  $rYaa3_{10xHis}$  im *E. coli* Expressionsstamm BL21. Die Induktion der Expression erfolgte bei einer  $OD_{600}$  von etwa 0,6 ( $t_0$ ) mit 1 mM IPTG. Die Expression erfolgte für 4 h bei 37 °C ( $t_4$ ). Die Detektion erfolgte mittels Coomassiefärbung oder primärem Maus-anti-His (1:2000) und sekundärem AP-gekoppelten anti-Maus Antikörper (1:7500).  $rYaa3_{10xHis}$  (19 kDa), M: PageRuler, Pfeil:  $rYaa3_{10xHis}$

**B:** Coomassie-gefärbtes SDS-Gel zur Überprüfung der Expression von  $Yaa3_{10xHis}$  in verschiedenen *E. coli*-Stämmen. Die Induktion der Expression erfolgte bei einer  $OD_{600}$  von etwa 0,6 ( $t_0$ ) mit 1 mM IPTG. Die Expression erfolgte für 4 h bei 37 °C ( $t_4$ ).

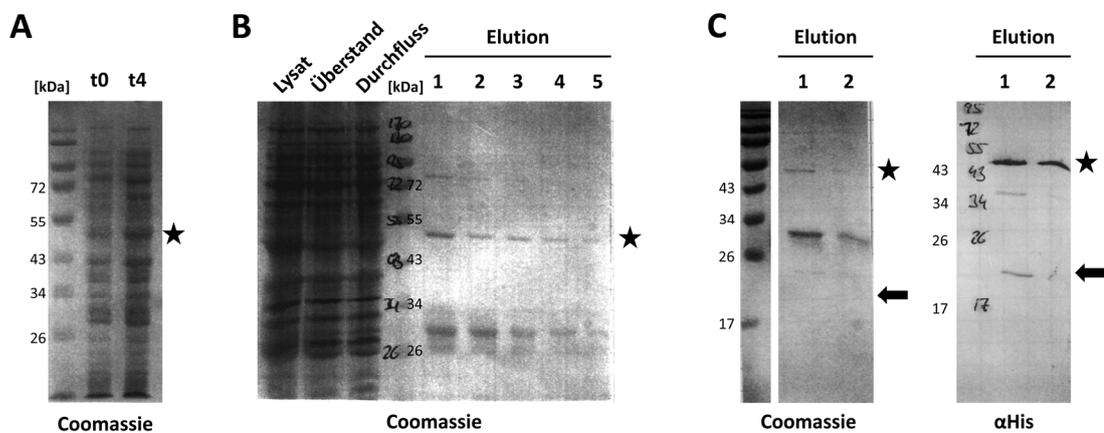
**C:** Westernblotanalyse zur Überprüfung der Expression von  $Yaa3_{10xHis}$  in verschiedenen *E. coli*-Stämmen (B). Die Detektion erfolgte mittels primärem Maus-anti-His (1:2000) und sekundärem AP-gekoppelten anti-Maus Antikörper (1:7500).

**D:** Überprüfung der Expression von  $rYaa3_{10xHis}$  im *E. coli* Expressionsstamm  $XL_1blue$  mit der Hilfe von Chaperonen. Die Induktion der Expression von  $rYaa3_{10xHis}$  erfolgte bei einer  $OD_{600}$  von etwa 0,6 ( $t_0$ ) mit 1 mM IPTG. Die Induktion der Expression der Chaperone erfolgte über 1 mg/ml Arabinose (Gro7, KJE8) und 2 mg/ml Tetrazyklin (KJE8). Die Expression erfolgte für 4 h bei 37 °C ( $t_4$ ). Die Detektion erfolgte mittels Coomassiefärbung oder primärem Maus-anti-His (1:2000) und sekundärem AP-gekoppelten anti-Maus Antikörper (1:7500).

**E:** Coomassie-gefärbtes SDS-Gel zur Überprüfung der Aufreinigung von  $rYaa3$ . Die induzierten *E. coli* Zellen wurden in PBS mit 1 mM PMFS, Proteaseinhibitor (1:100), 0,5 mg/ml Lysozym und 1 % Triton ü/N auf Eis lysiert. Der lösliche Überstand wurde mit Ni-NTA-Agarose inkubiert und unspezifische Proteine durch Waschschritte mit je 10 ml 20 mM Imidazol und 50 mM Imidazol entfernt. Das  $rYaa3_{10xHis}$  wurde anschließend mit 500 mM Imidazol eluiert.

Die Expression im Expressionsvektor pKM32 (N-terminaler, sechsfacher His-Tag) und die periplasmatische Expression über eine pelB-Sequenz lieferte ebenfalls kaum detektierbares rYaa3 Protein (Daten nicht gezeigt, studentisches Laborpraktikum)

Auch die Aufreinigung von rYaa3 über ein GST-Yaa3<sub>6xHis</sub> Fusionsprotein war leider erfolglos. Die Expression von GST-Yaa3<sub>6xHis</sub> im *E. coli* Stamm Rosetta war zwar erfolgreich (Abbildung 4.2 A), jedoch konnte das GST-Yaa3<sub>6xHis</sub>-Fusionsprotein kaum an die GST-Agarose gebunden und somit nur in relativ geringen Mengen isoliert werden (Abbildung 4.2 B). Zudem wiesen die Eluate hohe Kontaminationen auf. Daher wurde Yaa3<sub>6xHis</sub> mittels PreScission-Protease vom GST-Fusionsprotein abgespalten und spezifisch über den His-Tag aufgereinigt. Diese Aufreinigung war allerdings nicht erfolgreich (Abbildung 4.2 C).



**Abbildung 4.2: Expressions- und Aufreinigungsversuche von rekombinantem GST-Yaa3<sub>6xHis</sub>**

**A:** Coomassie-gefärbtes SDS-Gel zur Überprüfung der Expression von GST-Yaa3<sub>6xHis</sub> im *E. coli* Expressionsstamm Rosetta. Die Induktion der Expression erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,6 (t<sub>0</sub>) mit 1 mM IPTG. Die Expression erfolgte für 4 h bei 37 °C (t<sub>4</sub>). rGST-Yaa3<sub>6xHis</sub> (46 kDa), M: PageRuler, Stern: GST-Yaa3<sub>6xHis</sub>

**B:** Coomassie-gefärbtes SDS-Gel zur Überprüfung der Aufreinigung von rGST-Yaa3<sub>6xHis</sub>. Die induzierten *E. coli* Zellen wurden in PBS mit 1 mM PMFS, Proteaseinhibitor (1:100), 0,5 mg/ml Lysozym und 1 % Triton ü/N auf Eis lysiert. Der lösliche Überstand wurde mit GST-Agarose inkubiert und unspezifische Proteine durch Waschschritte mit 2 x 10 ml Waschlösung entfernt. Das rGST-Yaa3<sub>6xHis</sub> wurde anschließend mit 10 mM reduziertem Glutathion eluiert.

**C:** Überprüfung der Aufreinigung von Yaa3<sub>6xHis</sub> nach Spaltung von GST-Yaa3<sub>6xHis</sub> mittel PreScission-Protease. Das GST-Yaa3<sub>6xHis</sub> Fusionsprotein wurde ü/N mit PreScission-Protease verdaut und der Ansatz mit Ni-NTA-Agarose inkubiert. Unspezifische Proteine wurden durch zwei Waschschritte mit je 10 ml 20 mM Imidazol und 60 mM Imidazol entfernt. Das rYaa3<sub>6xHis</sub> wurde anschließend mit 500 mM Imidazol eluiert. Die Detektion erfolgte mittels Coomassiefärbung oder primärem Maus-anti-His (1:2000) und sekundärem AP-gekoppelten anti-Maus Antikörper (1:7500). Yaa3<sub>6xHis</sub> (19 kDa). Pfeil: Yaa3<sub>6xHis</sub>

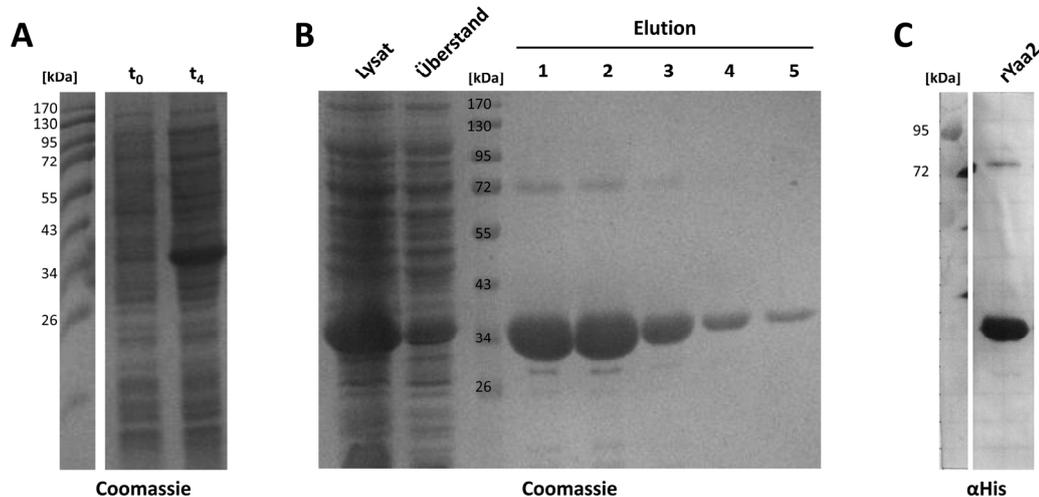
Da in einem anderen Projekt auch die Expression und Aufreinigung des *C. trachomatis* Homologs CT849 zu gleichen Problemen führte, wurde die Analyse der beiden anderen potentiellen Adhäsine Yaa1 und Yaa2 vorgezogen und die Analyse von Yaa3 im Rahmen dieser Arbeit eingestellt.

## 4.2 Charakterisierung des potentiellen Adhäsins Yaa2

Yaa2 wies im Hefe-Oberflächenexpressionssystem die zweitstärkste Adhäsion an humane HEp-2 Zellen auf (Fechtner 2009). Das hypothetische, 36 kDa-Protein ist Transkriptionsanalysen zu folge spät hochreguliert (Murra unveröffentlicht). Es weist lediglich Homologe in *C. caviae*, *C. felis* und *C. abortus* auf und besitzt N-terminal eine vorhergesagte Transmembrandomäne (Aminosäure 1 – 29). Yaa2 wurde bereits als Oberflächenlokalisiert beschrieben und erfüllt somit die Grundvoraussetzung eines Adhäsins (Montigiani, Falugi et al. 2002).

### 4.2.1 Expression und Aufreinigung von rekombinantem Yaa2

Die Expression von rekombinantem Yaa2, ohne die als Transmembrandomäne vorhergesagten ersten 29 Aminosäuren, erfolgte mit zehnfachem C-terminalem His-Tag (rYaa2<sub>10xHis</sub>) (Abbildung 4.3 A). Nach der Aufreinigung enthielten die ersten drei Elutionsfraktionen etwa 4 mg/ml natives rYaa2<sub>10xHis</sub> Protein (Abbildung 4.3 B). Rekombinantes Yaa2<sub>10xHis</sub> (34 kDa) konnte mittels Coomassiefärbung und anti-His Antikörper in etwa bei der erwarteten Laufhöhe von 34 kDa detektiert werden (Abbildung 4.3 B, C).



**Abbildung 4.3: Expression, Aufreinigung und Nachweis von rekombinantem Yaa2**

**A:** Coomassie-gefärbtes SDS-Gel zur Überprüfung der Expression von Yaa2<sub>10xHis</sub> im *E. coli* Expressionsstamm Origami. Die Induktion der Expression erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,6 (t<sub>0</sub>) mit 1 mM IPTG. Die Expression erfolgte für 4 h bei 37 °C (t<sub>4</sub>). rYaa2<sub>10xHis</sub> (34 kDa), M: PageRuler

**B:** Coomassie-gefärbtes SDS-Gel zur Überprüfung der Aufreinigung von rYaa2. Die induzierten *E. coli* Zellen wurden in PBS mit 1 mM PMFS, Proteaseinhibitor (1:100), 0,5 mg/ml Lysozym und 1 % Triton ü/N auf Eis lysiert. Der lösliche Überstand wurde mit Ni-NTA-Agarose inkubiert und unspezifische Proteine durch Waschschritte mit je 10 ml 20 mM Imidazol und 60 mM Imidazol entfernt. Das rYaa2<sub>10xHis</sub> wurde anschließend mit 500 mM Imidazol eluiert.

**C:** Westernblotanalyse von gereinigtem rYaa2<sub>10xHis</sub>. Die Detektion erfolgte mit primärem Maus-anti-His (1:2000) und sekundärem AP-gekoppelten anti-Maus Antikörper (1:7500).

Eine weitere, sehr schwache Bande war bei etwa 70 kDa erkennbar, die damit auf der Höhe des doppelten berechneten Molekulargewichts lief. Das auf diese Weise aufgereinigte rYaa2<sub>10xHis</sub> wurde verwendet, um zwei Kaninchen zu immunisieren und Antikörper gegen Yaa2 zu generieren.

#### 4.2.2 Expression und Lokalisierung von Yaa2 in der chlamydialen Infektion

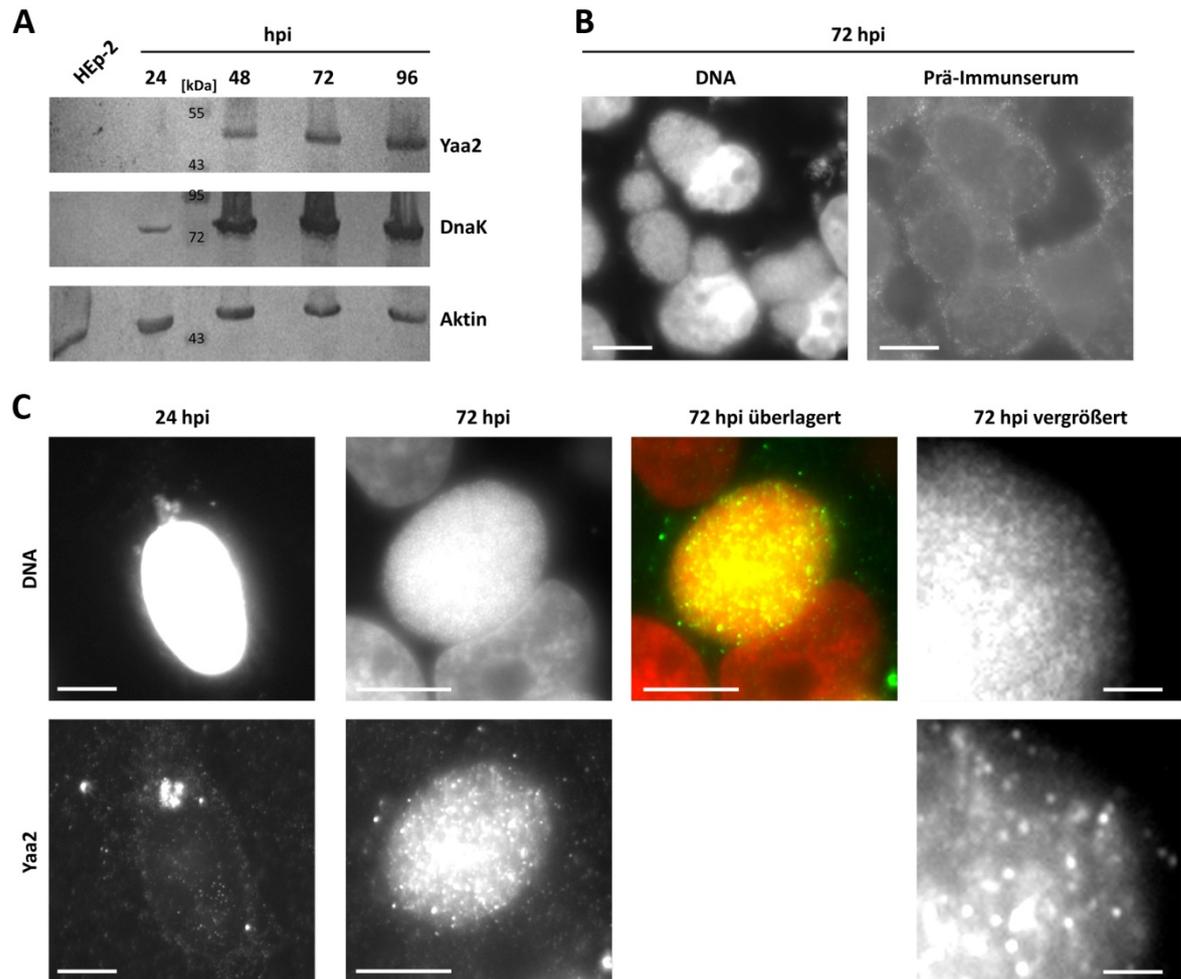
Der generierte anti-Yaa2 Antikörper wurde genutzt, um zu überprüfen, ob und wann das hypothetische Protein Yaa2 im Infektionszyklus exprimiert wird und wo Yaa2 in der Infektion lokalisiert.

Für die Expressionsüberprüfung wurden humane HEp-2 Zellen für unterschiedliche Zeitpunkte mit *C. pneumoniae* infiziert und die Gesamtzellproteinprobe auf Yaa2 überprüft. Zur Ladekontrolle wurden die Proben mit anti- $\beta$ -Aktin Antikörper entwickelt (Abbildung 4.4 A). Die Detektion mit anti-DnaK Antikörper, gerichtet gegen ein konstitutiv exprimiertes chlamydiales Protein, diente der Überprüfung der Anzahl chlamydialer Partikel. Hierbei konnte ein starker Anstieg der Bandenintensität von 24 hpi zu 48 hpi beobachtet werden, der auf die starke Replikation der Chlamydien in diesem Zeitraum zurückzuführen ist. Nach 48 hpi beginnt die asynchrone Redifferenzierung der RBs in EBs, weshalb das DnaK-Signal zwischen 48 hpi und 72 hpi nur leicht anstieg und dann nahe zu konstant blieb.

Bei der Inkubation mit anti-Yaa2 Antikörpern konnte das Protein erstmals 48 hpi nachgewiesen werden. Diese Bande lief bei etwa 50 kDa und damit deutlich höher als dem berechneten Molekulargewicht von Yaa2 (36 kDa) entsprechend. Da die 50 kDa Bande im Zelllysate von uninfizierten Humanzellen nicht nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass es sich bei dem detektierten 50 kDa-Protein um Yaa2 handelt. Die Intensität der Yaa2-Bande nahm jedoch im Gegensatz zur DnaK-Kontrolle bis 96 hpi weiter zu. Somit wird Yaa2, beginnend zwischen 24 hpi und 48 hpi, spät im Infektionszyklus exprimiert.

Neben der Expressionsanalyse wurde die Lokalisation von Yaa2 in der Infektion mikroskopisch bestimmt. Die Färbung infizierter Humanzellen 72 hpi mit dem Prä-Immunsereum zeigte keine spezifischen Signale im chlamydialen Einschluss sondern lediglich schwache, unspezifische Hintergrundsignale im Zytoplasma der Humanzelle (Abbildung 4.4 B). Für die Färbung von Yaa2 mussten die anti-Yaa2 Antikörper mittels Antigenreinigung aus dem Antiserum aufgereinigt werden. Zudem wurden die Zellen mit 3 % PFA fixiert und mit 0,2 % Triton permeabilisiert, um die Zellmembranen der Humanzelle und die Inklusionsmembran für die Antikörper durchgängig zu machen, jedoch eine Färbung von intrazellulären, chlamydialen Proteinen zu verhindern (Knudsen, Madsen et al. 1999;

Moelleken and Hegemann 2008; Wuppermann, Molleken et al. 2008; Moelleken, Schmidt et al. 2010).



#### Abbildung 4.4: Expression und Lokalisation von Yaa2

**A:** Westernblots zur Überprüfung der Expression von Yaa2. Jeweils 2 kleine Zellkulturflaschen wurden mit *C. pneumoniae* für unterschiedliche Zeitpunkte infiziert. Die Zellen wurden geerntet und Ganzzellproteinproben generiert. Die geblotteten Proteine wurden mittels Guanidin-HCl-Gradienten renaturiert. Die Detektion erfolgte mit primärem Antigen-gereinigtem Kaninchen-anti-Yaa2 Antikörper (1:250), Maus-anti-DnaK (1:500) oder Maus-anti- $\beta$ -Aktin (1:3000) Antikörper und sekundärem Ap-gekoppeltem anti-Kaninchen oder anti-Maus Antikörper (1:7500). Yaa2 (36 kDa), DnaK (71 kDa),  $\beta$ -Aktin (42 kDa), Proteinmarker: PageRuler

**B:** Überprüfung des Prä-Immuneserums. Humane HEp-2 Zellen wurden 72 hpi mit *C. pneumoniae* infiziert, mit Methanol fixiert und mit DAPI (1:1000) und primärem Yaa2-Prä-Immuneserum (1:25) und sekundärem Alexa488-gekoppeltem anti-Kaninchen Antikörper (1:200) gefärbt. Längenmarker: 10  $\mu$ m

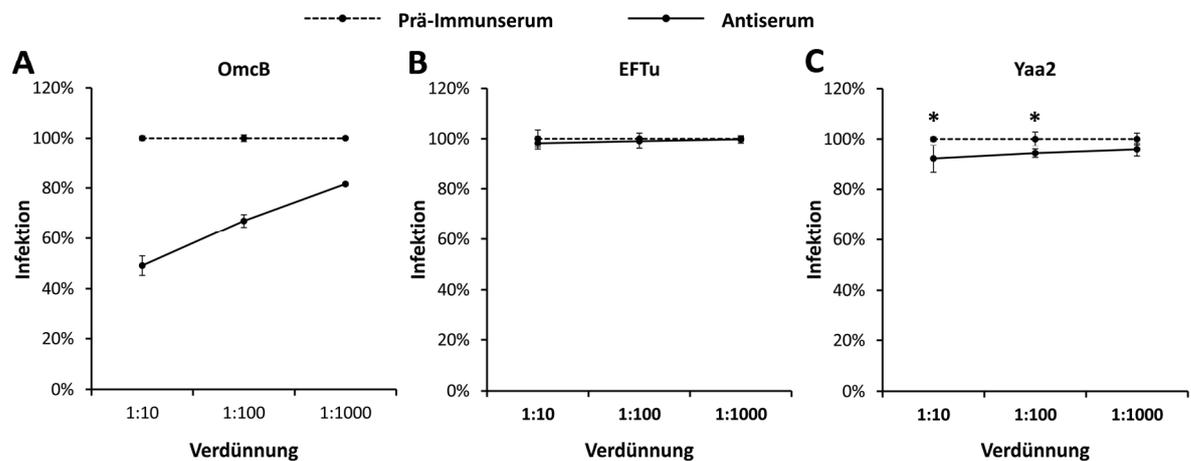
**C:** Humane HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* infiziert und 24 hpi und 72 hpi für 10 min mit 3 % PFA fixiert und mit 0,2 % Triton permeabilisiert. Die Färbung erfolgte mit DAPI (1:1000) und primärem Antigen-gereinigtem Kaninchen-anti-Yaa2 Antikörper (pur) und sekundärem Alexa488-gekoppelten anti-Kaninchen Antikörper. Längenmarker = 10  $\mu$ m, in der Vergrößerung 2,5  $\mu$ m

Sowohl früh (24 hpi) als auch spät (72 hpi) in der Infektion konnte ein spezifisches Yaa2-Signal im chlamydialen Einschluss detektiert werden (Abbildung 4.4 C). Das Signal war punktiert, wobei eine Kolo-kalisation mit der chlamydialen DNA trotz Verwendung eines

antigengereinigten Antikörpers nicht gezeigt werden konnte. Das punktierte Signal lässt zwar vermuten, dass Yaa2 mit den chlamydialen Partikeln assoziiert ist, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass Yaa2 im Einschlusslumen punktuell lokalisiert. Die Färbung zeigte jedoch eindeutig, dass Yaa2 weder in der Einschlussmembran akkumuliert, noch eine spezielle Lokalisation außerhalb des Einschlusses im Zytoplasma der Humanzelle aufweist. Eine, für die Adhäsine OmcB und Pmp21 typische, das chlamydiale Partikel umrundende, ringförmige Lokalisation von Yaa2 konnte hier nicht beobachtet werden (Moelleken and Hegemann 2008; Moelleken, Schmidt et al. 2010).

### 4.2.3 Yaa2-Antikörper neutralisieren die chlamydiale Infektion nicht signifikant

Die Expressions- und Lokalisationsanalyse von Yaa2 in der *C. pneumoniae* Infektion deutete darauf hin, dass Yaa2 spät im Infektionszyklus exprimiert wird und entweder auf der Oberfläche von EBs zugänglich ist, oder ins Lumen des Einschlusses sekretiert wird. In einer vorangegangenen Studie konnte allerdings bereits die Oberflächenlokalisierung von Yaa2 auf *C. pneumoniae* EBs gezeigt werden (Montigiani, Falugi et al. 2002).



**Abbildung 4.5: Vorbehandlung der chlamydialen EBs mit anti-Yaa2 Antikörper**

Chlamydiale EBs wurden für 2 h bei 4 °C entweder mit dem Prä-Immunsereum oder Antiserum in verschiedenen Verdünnungen (1:10, 1:100 oder 1:1000) inkubiert. Anschließend wurden  $1 \times 10^6$  HEp-2 Zellen mit den vorbehandelten EBs infiziert (MOI=20). Die Infektiosität wurde 50 hpi bestimmt, indem mikroskopisch die Anzahl der gebildeten Einschlüsse in 10 Gesichtsfeldern unter 40-facher Objektvergrößerung gezählt wurden. Die Vorbehandlung der EBs mit Prä-Immunsereum der jeweiligen Verdünnung wurde auf 100 % Infektion gesetzt. Die Experimente wurden in Dubletten durchgeführt (n=3). \* p = 0,05

**A:** Serum gegen OmcB, **B:** Serum gegen EFTu, **C:** Serum gegen Yaa1

Sollte es sich bei Yaa2 um ein neues chlamydiales Adhäsion handeln, das eine essentielle Rolle in der Adhäsion einnimmt, so sollte die Vorbehandlung der infektiösen EBs mit dem anti-

Yaa2 Antikörper die Adhäsion und folglich die Infektion vermindern. Hierzu wurden Antikörper-Neutralisationsexperimente durchgeführt, wobei die chlamydialen EBs vor der Infektion entweder mit Prä-Immunsrum oder Antiserum behandelt wurden.

Als Positivkontrolle wurden EBs mit Serum gegen das bekannte Adhäsion OmcB vorinkubiert. Bei der Vorbehandlung der EBs mit anti-OmcB Antiserum nahm die Infektion mit steigender Antikörpermenge stetig ab (Abbildung 4.5 A). Die stärkste Reduktion der Infektion auf  $49,1 \pm 3,9 \%$  war bei der 1:10 Verdünnung sichtbar. Als Negativkontrolle wurden EBs mit Serum gegen das intra-chlamydiale Protein EFTu vorbehandelt. Mit Infektionsraten von  $99,8 \pm 1,5 \%$  (1:1000),  $99,1 \pm 3,2 \%$  (1:100) und  $98,3 \pm 2,6 \%$  (1:10) konnte hier keine signifikant verminderte Infektion beobachtet werden (Abbildung 4.5 B). Wurden die EBs mit anti-Yaa2 Antiserum vorinkubiert, so war die Infektion bei der 1:1000 Verdünnung nicht vermindert ( $95,6 \pm 2,6 \%$ ). Die Verwendung einer Verdünnung von 1:100 respektive 1:10 führte zu einer sehr schwachen, aber signifikanten ( $p = 0,05$ ) Reduktion der Infektion auf  $94,1 \pm 1,7 \%$  respektive  $92,0 \pm 5,4 \%$ .

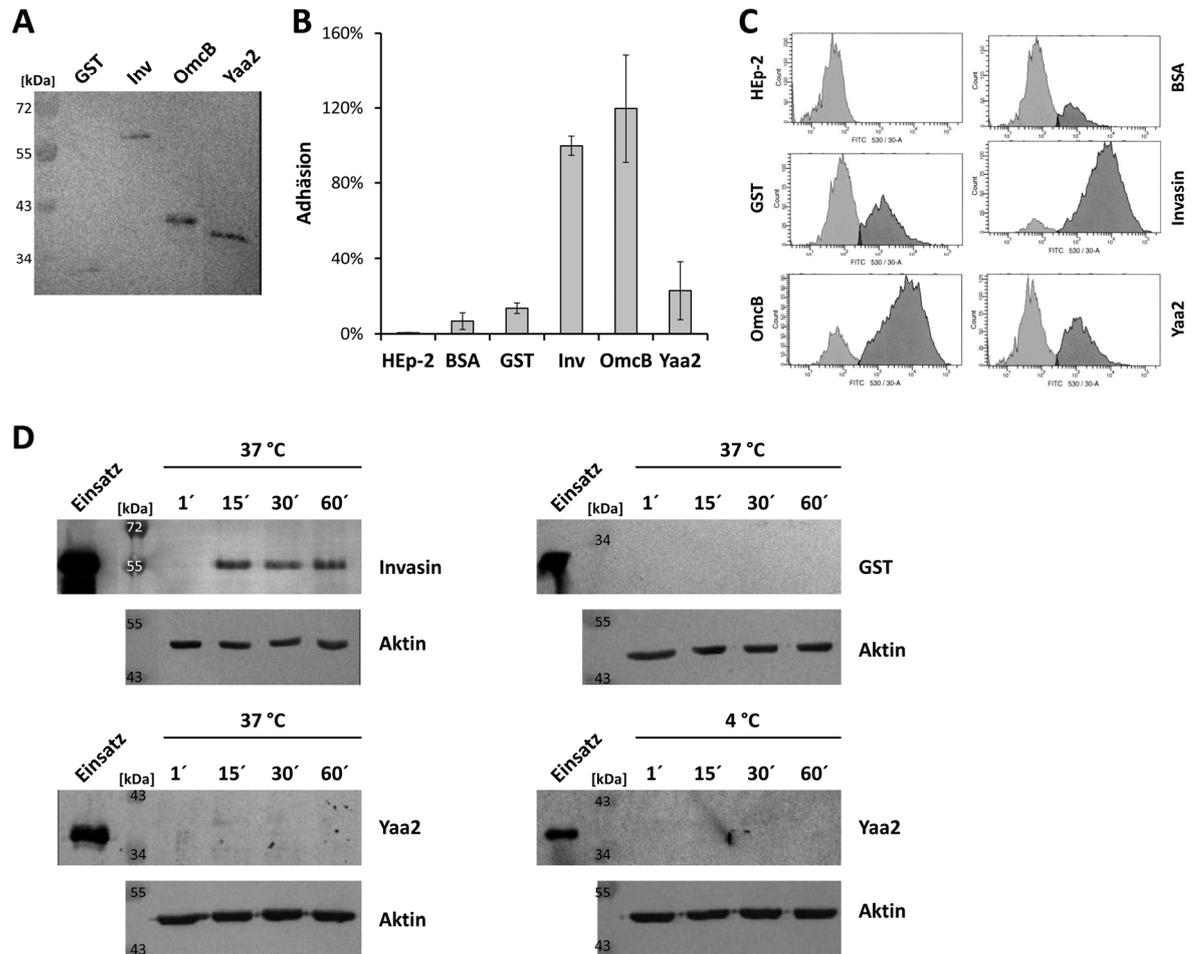
Daher konnte festgehalten werden, dass anti-Yaa2-Antikörper die Infektion chlamydialer EBs sehr schwach, aber signifikant verminderten.

#### 4.2.4 Rekombinantes Yaa2 besitzt keine adhäsiven Eigenschaften

Da anti-Yaa2 Antikörper die chlamydiale Infektion nur sehr schwach verschlechterten, wurde die, im Hefe- Oberflächenexpressionssystem beobachtete, Adhäsivität von Yaa2 mit rekombinantem Protein in zwei unterschiedlichen experimentellen Ansätzen überprüft. Zuerst wurde die Bindefähigkeit mit Protein-beschichteten, grün fluoreszierenden Latexkügelchen an humane HEp-2 Zellen bestimmt. Die Bindungseigenschaften von Invasin (Inv) und der Bindedomäne von OmcB (OmcB-BD) konnten in diesem Testsystem bereits gezeigt werden (Dersch and Isberg 1999; Fechtner 2009) und wurden daher als Positivkontrollen verwendet.

Die Latexkügelchen wurden mit  $100 \mu\text{g/ml}$  rekombinantem Protein beschichtet. Die Überprüfung der Beschichtungsqualität ergab, dass in etwa gleiche Mengen an  $\text{rYaa2}_{10\text{xHis}}$  und  $\text{GST-OmcB-BD}_{6\text{xHis}}$  auf den Latexkügelchen nachweisbar waren (Abbildung 4.6 A). Die Bande von Invasin ( $\text{Inv}_{497\ 6\text{xHis}}$ ) war um etwa die Hälfte schwächer als die von  $\text{GST-OmcB-BD}_{6\text{xHis}}$ . Die Beschichtung der Latexkügelchen mit  $\text{GST}_{6\text{xHis}}$  war nochmals um etwa das Fünffache ineffizienter.

In der Analyse des Bindeexperimentes zeigten sowohl die mit Invasin beschichteten Latexkügelchen, deren Bindefähigkeit auf  $100 \pm 7,8 \%$  Adhäsion normiert wurde, als auch die OmcB-beschichteten Latexkügelchen ( $102 \pm 14,1 \%$ ) eine starke Bindung an HEp-2 Zellen.



**Abbildung 4.6: Bindung von rekombinantem Yaa2 an humane HEP-2 Zellen**

**A-C:** Bindung von Protein-beschichteten Latexkugeln an humane Zellen.  $1 \times 10^9$  grün fluoreszierende,  $1,1 \mu\text{m}$  Latexkugeln wurden mit  $100 \mu\text{g/ml}$  rekombinantem Protein gekoppelt. Diese wurden im 10-fachen Überschuss mit  $1 \times 10^6$  HEP-2 Zellen für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, anschließend unter mikroskopischer Beobachtung gewaschen, abgelöst und PFA-fixiert. Die Bestimmung des Adhäsionsverhaltens erfolgte durch Bestimmung der mittleren Fluoreszenz von 10000 HEP-2 Zellen mittels FACS-Aria. Die Experimente wurden in Triplets durchgeführt ( $n=3$ ).

**A:** Westernblot zur Bestimmung der Beschichtung von  $5 \times 10^7$  Latexkugeln detektiert mit primärem Maus-anti-His-Antikörper (1:2000) und sekundärem AP-gekoppelten anti-Maus-Antikörper (1:7500). GST<sub>6xHis</sub> (26 kDa), Inv<sub>497 6xHis</sub> (50 kDa), GSTOmcB-BD<sub>6xHis</sub> (35 kDa), Yaa2<sub>10xHis</sub> (34 kDa), Proteinmarker: PageRuler

**B:** Quantitative Auswertung der Bindung grün fluoreszierender Latexkugeln an 10000 HEP-2 Zellen. Die Bindung der Invasin-gekoppelten Latexkugeln wurde auf 100 % Adhäsion gesetzt.

**C:** Repräsentative Darstellungen der FACS-Ausgabedatei mit Gegenüberstellung der Intensität der Fluoreszenz (X-Achse) gegen die Zellzahl (Y-Achse) der HEP-2 Zellen.

**D:** Repräsentative Westernblots der Bindung von rekombinantem Protein an HEP-2 Zellen.  $1 \times 10^6$  humane HEP-2 Zellen wurden 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  vorgekühlt und anschließend mit  $250 \mu\text{l}$  Medium mit  $100 \mu\text{g/ml}$  rekombinantem Protein unter angegebener Temperatur für unterschiedliche Zeitpunkte inkubiert und anschließend intensiv gewaschen. Die Bestimmung des Bindeverhaltens erfolgte über Westernblotanalyse durch Detektion mit primärem Maus-anti-His Antikörper (1:2000) und sekundärem AP-gekoppelten anti-Maus Antikörper (1:7500). Inv<sub>497 6xHis</sub> (50 kDa), GST<sub>6xHis</sub> (26 kDa), Yaa2<sub>10xHis</sub> (34 kDa), Proteinmarker: PageRuler

Dagegen wiesen die als Negativkontrollen verwendeten BSA- und GST-beschichteten Latexkugeln lediglich eine schwache Adhäsion von  $5,1 \pm 1,4 \%$  respektive  $13 \pm 0,7 \%$  auf.

Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Beschichtungsqualität der GST-gekoppelten Latexkügelchen deutlich schlechter war als die der Positivkontrollen.

Die mit rYaa2<sub>10xHis</sub>-beschichteten Latexkügelchen adhärten mit  $22,9 \pm 15,4$  % Adhäsion nicht signifikant besser an humane HEp-2 Zellen als die Negativkontrollen. Somit konnte in diesem experimentellen Ansatz die adhäsive Eigenschaft von Yaa2 nicht bestätigt werden.

Um die Adhäsionsfähigkeit weiter abzuklären wurde ein weiteres Bindeexperiment mit löslichem rYaa2<sub>10xHis</sub> durchgeführt, in dem die Bindung an die Humanzelle direkt in Abhängigkeit der Expositionszeit überprüft werden konnte.

Als Positivkontrolle wurden HEp-2 Zellen mit rekombinatem Invasin (Inv<sub>497 6xHis</sub>) inkubiert. Bereits nach 15 min Inkubationszeit war eine deutliche Bande detektierbar, deren Intensität mit zunehmender Inkubationszeit nicht signifikant anstieg (Abbildung 4.6 D oben links). GST<sub>6xHis</sub>, welches als Negativkontrolle diente, konnte zu keinem Zeitpunkt an die Humanzellen gebunden vorgefunden werden, ist aber in der Ladekontrolle deutlich sichtbar (Abbildung 4.6 D unten links).

Auch bei der Inkubation der Humanzellen mit rYaa2<sub>10xHis</sub> konnte das Protein zu keinem Zeitpunkt detektiert werden. Hierbei spielte es keine Rolle, ob die Inkubation bei 37 °C oder 4 °C stattfand (Abbildung 4.6 D rechts oben, unten). Wie auch bei GST<sub>6xHis</sub> war rYaa2<sub>10xHis</sub> in der Ladekontrolle deutlich sichtbar, so dass auch mit diesem experimentellen Ansatz die Bindefähigkeit von rYaa2 nicht nachgewiesen werden konnte.

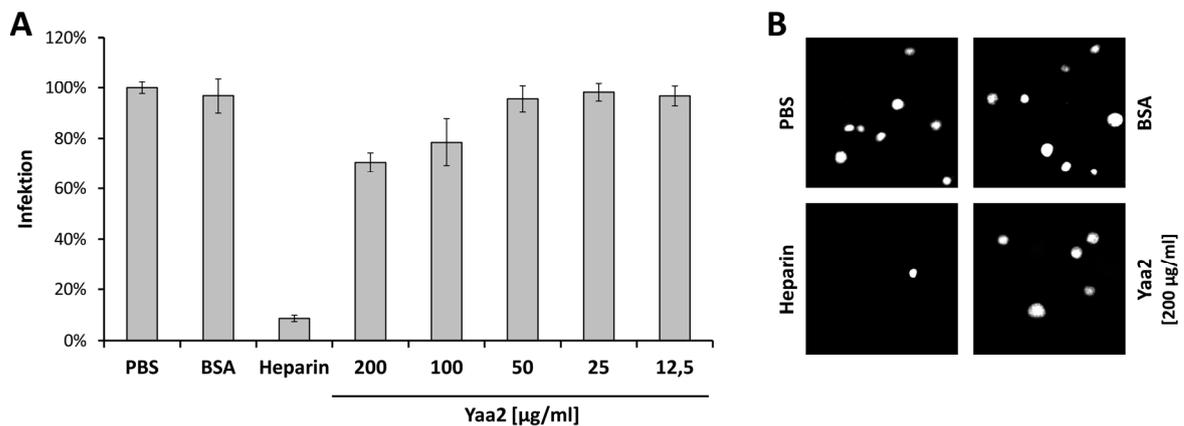
Zusammenfassend konnte die Bindefähigkeit von Yaa2 in zwei unterschiedlichen experimentellen Ansätzen mit rekombinatem Protein nicht bestätigt werden. Sollte es allerdings für die Adhäsion oder Internalisierung der EBs wichtig sein, sollte dies in Neutralisationsexperimenten mit rYaa2 sichtbar sein.

#### 4.2.5 Rekombinantes Yaa2 besitzt schwache neutralisierende Wirkung

Um die Wirkung von rYaa2 auf die Infektion zu überprüfen wurden Neutralisationsexperimente mit rekombinatem Protein durchgeführt. Hierbei werden humane HEp-2 Zellen vor der Infektion mit rekombinatem potentiellen Adhäsion behandelt, so dass dieses den natürlichen humanen Interaktionspartner bindet und diesen folglich gegen das Adhäsion auf der Oberfläche der EBs abschirmt. Dies resultiert in einer verminderten Adhäsion und demzufolge einer verminderten Infektion.

Zur Auswertung des Experiments wurde die Infektion PBS-vorbehandelter Humanzellen auf  $100 \pm 2,3$  % normiert (Abbildung 4.6 A). Die Vorbehandlung der HEp-2 Zellen mit 200 µg/ml BSA als unspezifisches Protein änderte die Infektionsrate nicht ( $96,9 \pm 7,0$  %). Zum Vergleich einer deutlich reduzierten Infektion wurden chlamydiale EBs mit Heparin

vorbekannt, was zu einer deutlich verminderten Infektion von  $8,7 \pm 1,3 \%$  führte. Die Vorbehandlung der Humanzellen mit  $200 \mu\text{g/ml}$  rekombinantem  $\text{Yaa2}_{10\times\text{His}}$  resultierte in einer leicht aber signifikant reduzierten Infektionsrate von  $70,5 \pm 3,8 \%$ . Auch bei der Inkubation mit  $100 \mu\text{g/ml}$   $\text{Yaa2}_{10\times\text{His}}$  war die Infektion mit  $78,5 \pm 9,2 \%$  signifikant reduziert. Die Vorbehandlung mit geringeren Konzentrationen hatte hingegen keinen Einfluss auf die Infektiosität.



**Abbildung 4.7: Einfluss von rYaa2 auf die chlamydiale Infektion**

**A:**  $1 \times 10^6$  humane HEp-2 Zellen wurden für 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  mit PBS,  $200 \mu\text{g/ml}$  BSA oder unterschiedlichen Konzentrationen an  $\text{Yaa2}_{10\times\text{His}}$  vorinkubiert und anschließend infiziert (MOI=20). Als Kontrolle einer reduzierten Infektion dienen EBs, die mit  $500 \mu\text{g/ml}$  Heparin für 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  behandelt wurden. Nach 2 h erfolgte ein Medienwechsel. Die Infektiosität wurde 50 hpi bestimmt, indem mikroskopisch die Anzahl der HEp-2 Zellen und der gebildeten Einschlüsse in 10 Gesichtsfeldern unter 63-facher Objektvergrößerung gezählt wurden. Die Vorbehandlung der Humanzellen mit PBS wurde auf 100 % Infektion gesetzt. Die Experimente wurden in Dubletten durchgeführt ( $n=3$ ).

**B:** Repräsentative mikroskopische Bilder der Infektion unter verschiedenen Vorbehandlungen der HEp-2 Zellen. Die Einschlüsse wurden mit Pathfinder (1:6) gefärbt.

Mit diesem experimentellen Ansatz konnte somit gezeigt werden, dass die Vorbehandlung humaner HEp-2 Zellen mit hohen Konzentrationen an  $\text{rYaa2}_{10\times\text{His}}$  zu einer leichten, aber signifikanten Reduktion der Infektion führte. Somit lieferte dieses Experiment einen Hinweis darauf, dass es sich bei Yaa2 tatsächlich um ein neues chlamydiales Adhäsins handeln könnte.

Zusammenfassend zeigte die Charakterisierung des potentiellen Adhäsins Yaa2, dass es spät im Infektionszyklus exprimiert wird. Die Vorbehandlung der infektiösen EBs mit spezifischen anti-Yaa2 Antikörper konnte die Infektion nur sehr schwach neutralisieren. Auch die Vorbehandlung der Humanzellen mit rYaa2 führte zu einer schwach reduzierten Infektion. Die im Hefe-Oberflächenexpressionssystem identifizierte adhäsive Eigenschaft von Yaa2 konnte mit rekombinantem Protein hingegen nicht bestätigt werden. Diese Daten liefern

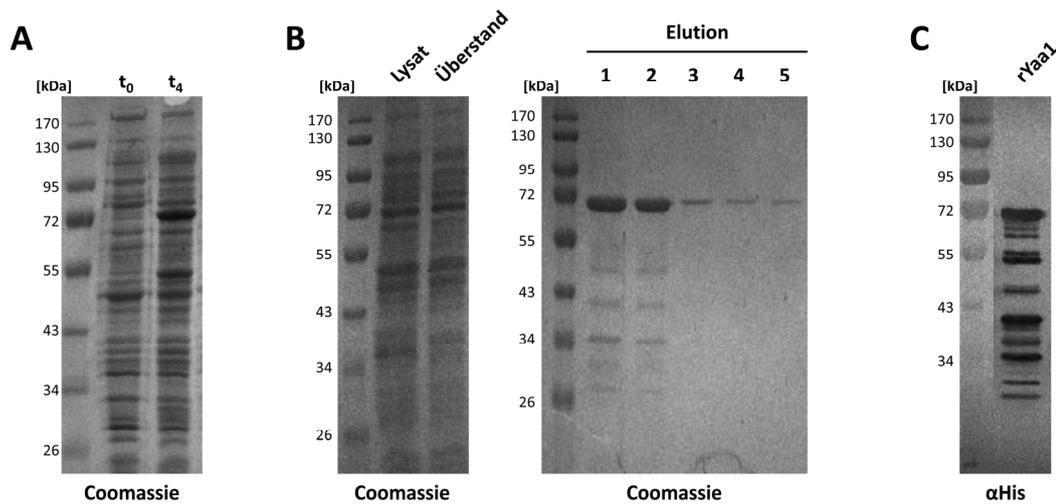
somit widersprüchliche Hinweise für die These, dass es sich bei Yaa2 um neues, chlamydiales Adhäsins handeln könnte.

### 4.3 Charakterisierung des potentiellen Adhäsins Yaa1

Yaa1 wurde im Hefe-Oberflächen-Expressionssystem als potentielles Adhäsins gefunden, wies jedoch im Vergleich zu den beiden anderen Yaa-Proteinen die geringste Bindefähigkeit auf (Fechtner 2009). Yaa1 ist ein 54 kDa, *C. pneumoniae*-spezifisches, hypothetisches Protein, das Expressionsanalysen zu Folge spät im Infektionszyklus hochreguliert wird (Murra unveröffentlicht). Ansonsten waren keine publizierten Daten zu Yaa1 verfügbar. Auch die Suche nach bekannten Domänen oder Transmembrandomänen blieb erfolglos. Demnach sollte zunächst rekombinantes Yaa1-Volllängenprotein in *E. coli* erzeugt und aufgereinigt werden um weitere Analysen vorzunehmen.

#### 4.3.1 Expression und Aufreinigung von rekombinantem Yaa1

Die Expression von rekombinantem Yaa1 erfolgte mit zehnfachem C-terminalem His-Tag (rYaa1<sub>10xHis</sub>) (Abbildung 4.8 A). Nach der Aufreinigung enthielten die ersten beiden Elutionsfraktionen etwa 300 µg/ml natives rYaa1<sub>10xHis</sub> Protein (Abbildung 4.8 B). Rekombinantes Yaa1<sub>10xHis</sub> (55 kDa) konnte mittels Coomassiefärbung und anti-His Antikörper deutlich oberhalb der erwarteten Laufhöhe bei etwa 72 kDa detektiert werden (Abbildung 4.10 B, C). Im Coomassie-gefärbten SDS-Gel war zu erkennen, dass das Protein sauber aufgereinigt werden konnte mit mehreren Degradationsfragmenten geringer Intensität bei 50 kDa, 40 kDa und 34 kDa aufwies (Abbildung 4.8 B). Im Westernblot, waren diese Banden unterhalb der rYaa1<sub>10xHis</sub> Volllängenbande deutlich sichtbar (Abbildung 4.8 C). Eine weitere prominente Bande war bei einer Laufhöhe von etwa 55 kDa detektierbar. Da diese Banden allerdings mittels His-Tag detektiert werden konnten, handelt es sich um Yaa1-spezifische Degradationsbanden. Das auf diese Weise aufgereinigte rYaa1<sub>10xHis</sub> wurde verwendet, um zwei Kaninchen zu immunisieren und Antikörper gegen Yaa1 zu generieren.



**Abbildung 4.8: Expression, Aufreinigung und Nachweis von rekombinantem Yaa1**

**A:** Coomassie-gefärbtes SDS-Gel zur Überprüfung der Expression von Yaa1<sub>10xHis</sub> im *E. coli* Expressionsstamm Origami. Die Induktion der Expression erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,6 (t<sub>0</sub>) mit 1 mM IPTG. Die Expression erfolgte für 4 h bei 37 °C (t<sub>4</sub>). rYaa1<sub>10xHis</sub> (55 kDa), M: PageRuler

**B:** Coomassie-gefärbtes SDS-Gel zur Überprüfung der Aufreinigung von rYaa1. Die induzierten *E. coli* Zellen wurden in PBS mit 1 mM PMFS, Proteaseinhibitor (1:100), 0,5 mg/ml Lysozym, 1 % Triton und 1 % Sarkosyl ü/N auf Eis lysiert. Der lösliche Überstand wurde mit Ni-NTA-Agarose inkubiert und unspezifische Proteine durch Waschstschritte mit je 10 ml 50 mM Imidazol und 80 mM Imidazol entfernt. Das rYaa1<sub>10xHis</sub> wurde anschließend mit 500 mM Imidazol eluiert.

**C:** Westernblotanalyse von gereinigtem rYaa1<sub>10xHis</sub>. Die Detektion erfolgte mit primärem Maus-anti-His (1:2000) und sekundärem AP-gekoppelten anti-Maus Antikörper (1:7500).

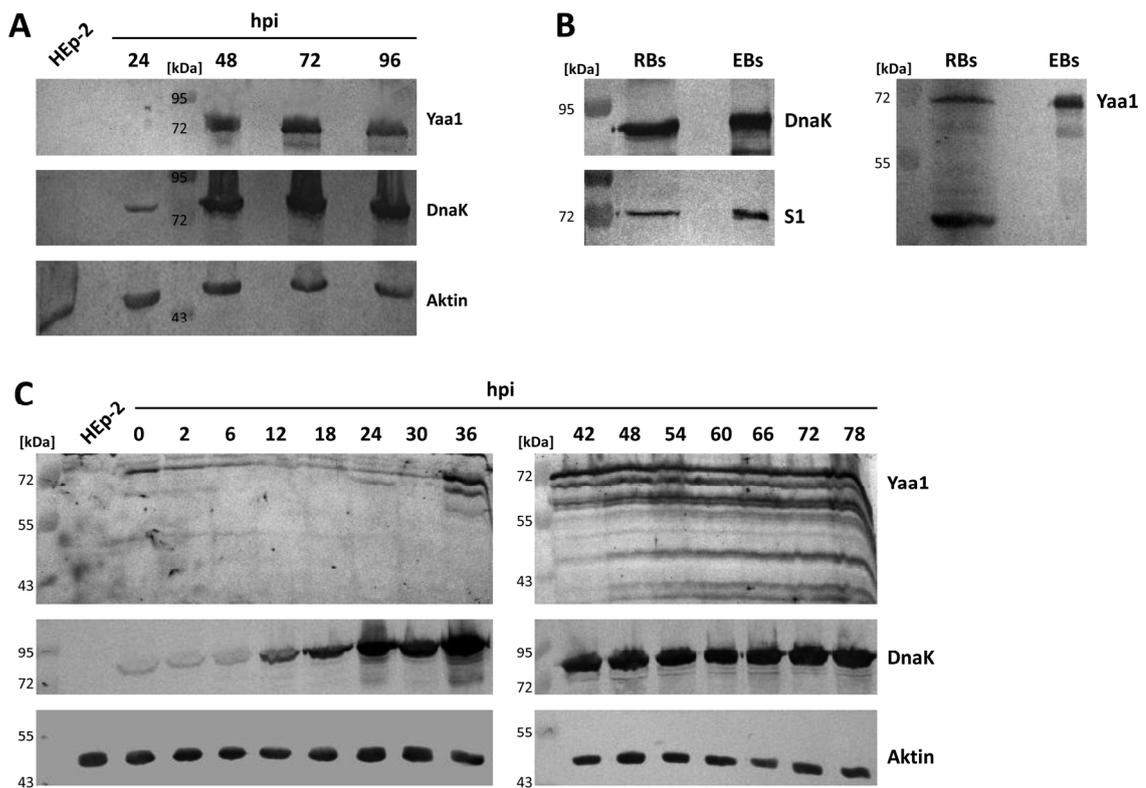
### 4.3.2 Expression und Lokalisierung von Yaa1 in der chlamydialen Infektion

Der generierte anti-Yaa1 Antikörper wurde genutzt, um zu überprüfen, ob und wann das hypothetische Protein Yaa1 im Infektionszyklus detektiert werden kann und wo Yaa1 in der Infektion lokalisiert.

Zur Expressionsanalyse wurden zunächst humane HEp-2 Zellen für vier unterschiedliche Zeitpunkte mit *C. pneumoniae* infiziert und die Gesamtzellproteinproben auf Yaa1 überprüft. Zur Ladekontrolle wurden die Proben mit anti-β-Aktin Antikörper entwickelt (Abbildung 4.9 A). Die Detektion mit anti-DnaK Antikörper, gerichtet gegen ein konstitutiv exprimiertes Protein, diente der Überprüfung der Anzahl chlamydialer Partikel.

Bei der Inkubation mit anti-Yaa1 Antiserum konnte erstmals 48 hpi eine Bande nachgewiesen werden (Abbildung 4.9 A). Diese Bande lief bei etwa 72 kDa und damit höher als nach dem theoretischen Molekulargewicht von Yaa1 (54 kDa) vermutet, jedoch auf derselben Höhe wie rYaa1<sub>10xHis</sub>. Da die spezifische 72 kDa Bande in der Proteinprobe von uninfizierten Humanzellen nicht nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass es sich bei dem detektierten 72 kDa-Protein um Yaa1 handelt. Zwischen 48 und 92 Stunden nach der

Infektion konnte kein signifikanter Anstieg der Bandenintensität beobachtet werden. Obwohl in der Zeitkinetik bei 24 hpi, wobei der Einschluss ausschließlich mit RBs gefüllt sein sollte, die spezifische 72 kDa Yaa1-Bande nicht sichtbar war, konnte Yaa1 in Lysaten gereinigter EBs und RBs nachgewiesen werden (Abbildung 4.9 B). Hierbei war Yaa1 isoliert aus EBs größtenteils als Vollängenprotein detektierbar, während bei RBs neben dem Vollängenprotein eine deutlich intensivere Bande bei etwa 45 kDa sichtbar war. Bei dieser Bande könnte es sich um eine der prominenten Degradationsbanden von rekombinantem Yaa1<sub>10xHis</sub> handeln (Abbildung 4.8 B, C).



**Abbildung 4.9: Expression von Yaa1 in der chlamydialen Infektion**

**A-C:** Westernblots zur Überprüfung der Expression von Yaa1.

**A:** Jeweils 2 kleine Zellkulturflaschen wurden mit *C. pneumoniae* für unterschiedliche Zeitpunkte infiziert. Die Zellen wurden geerntet und Ganzzellproteinproben generiert. Die geblotteten Proteine wurden mittels Guanidin-HCl-Gradienten renaturiert. Die Detektion erfolgte mit primärem gegen HEp-2 Zellen abgereicherten Kaninchen-anti-Yaa1 Antiserum (1:1000), Maus-anti-DnaK (1:500) oder Maus-anti- $\beta$ -Aktin (1:3000) Antikörper und sekundärem Ap-gekoppeltem anti-Kaninchen oder anti-Maus Antikörper (1:7500). Yaa1 (54 kDa), DnaK (71 kDa),  $\beta$ -Aktin (42 kDa), Proteinmarker: PageRuler

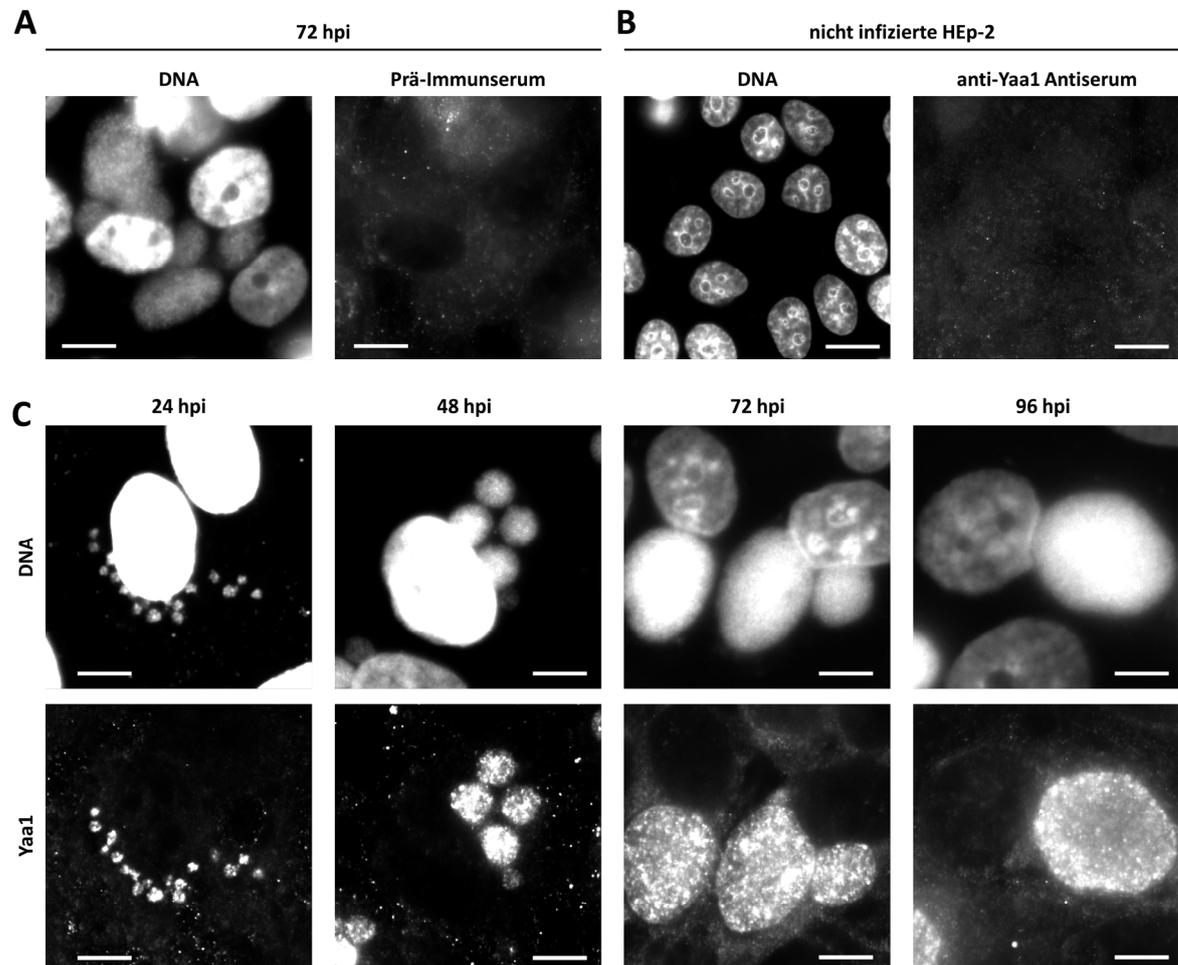
**B:** RBs und EBS wurden 30 hpi respektive 72 hpi aufgereinigt und RB- bzw. EB-Proteinproben erstellt. Die Detektion erfolgte mit primärem Maus-anti-DnaK (1:500), Maus-anti-S1 (1:500) Antikörper oder gegen HEp-2 Zellen abgereicherten Kaninchen-anti-Yaa1 Antiserum (1:1000) und sekundärem AP-gekoppeltem anti-Kaninchen oder anti-Maus Antikörper (1:7500). S1 (62 kDa)

**C:** Jeweils 2 kleine Zellkulturflaschen wurden mit *C. pneumoniae* für unterschiedliche Zeitpunkte infiziert. Die Zellen wurden geerntet, mit 2% SDS und 2% Sarkosyl lysiert und Ganzzellproteinproben generiert. Die Detektion erfolgte mit primärem gegen Humanzellen abgereicherten Kaninchen-anti-Yaa1 Antiserum (1:1000) Maus-anti-DnaK (1:500) oder Maus-anti- $\beta$ -Aktin (1:3000) Antikörper und sekundärem AP-gekoppeltem anti-Kaninchen Antikörper (1:7500).

Um die Expression von Yaa1 im Infektionszyklus detaillierter zu beschreiben, wurden Proben einer Infektionszeitkinetik mit engeren Zeitabständen generiert. Um den Nachweis von Yaa1 zu maximieren wurden hierbei die infizierten Zellen vor der Generierung der Gesamtzellproteinprobe mit 2 % SDS und 2 % Sarkosyl lysiert um möglichst alle Proteine in Lösung zu bringen (Abbildung 4.9 C). Zu Beginn der Infektion (0 min) war die 72 kDa Yaa1-Bande ebenso wie die DnaK-Bande detektierbar. Mit voranschreitender Infektionsdauer (2 hpi und 6 hpi) nahm die Intensität der Yaa1-Bande deutlich ab und blieb bis etwa 30 hpi kaum nachweisbar. Ab 36 hpi konnte ein starker Anstieg der Intensität der 72 kDa Yaa1-Bande beobachtet werden, die, wie in der vorangegangenen, kleineren Zeitkinetik (Abbildung 4.9 A), im weiteren Verlauf der Infektion nicht intensiver wurde. Die Lyse der Zellen mit 2 % SDS und 2 % Sarkosyl führte zur deutlichen Detektion weiterer Yaa1-Fragmente bei etwa 68 kDa, 60 kDa, 45 kDa, 40 kDa und 35 kDa. Dennoch blieb das 72 kDa Yaa1-Volllängenfragment die am stärksten sichtbare Bande. Die 68 kDa-Bande ist hierbei ebenso wie die 72 kDa Volllängenbande erstmals 36 hpi nachweisbar, während das 60 kDa-Fragment erstmals 42 hpi auftrat. Die kleinen 45 kDa-, 40 kDa- und 35 kDa-Banden waren erstmals 48 hpi deutlich erkennbar. Die Intensitäten aller Yaa1-Fragmente nahmen über die Infektion schnell zu und blieben ab 54 hpi konstant hoch. Keines dieser Fragmente war in der Probe von nicht-infizierten Zellen nachweisbar, weshalb sie alle sehr wahrscheinlich Yaa1-Ursprungs sind. Da die Redifferenzierung der RBs in die infektiösen EBs 48 hpi beginnt, wird Yaa1 bereits vor diesem Schritt stark exprimiert.

Neben der Expressionsanalyse wurde die Lokalisation von Yaa1 in der Infektion mikroskopisch bestimmt. Die Färbung von *C. pneumoniae*-infizierten Humanzellen 72 hpi mit dem Prä-Immunsereum zeigte keine spezifischen Signale im chlamydialen Einschluss sondern lediglich schwache, unspezifische Hintergrundsignale im Zytoplasma der Humanzelle (Abbildung 4.10 A). Auch bei der Färbung nicht-infizierter HEp-2 Zellen mit dem anti-Yaa1 Antiserum konnten nur schwache Hintergrundsignale beobachtet werden (Abbildung 4.10 B). Daher sind die Signale, die in der Infektion detektiert werden konnten, spezifisch für Yaa1 (Abbildung 4.10 C). Sowohl 24 hpi, 48 hpi, 72 hpi und 96 hpi konnten spezifische punktierte Yaa1-Signale im chlamydialen Einschluss detektiert werden. Das spezifische Yaa1-Signal, dass in der Expressionsanalyse 24 hpi nur schwach detektiert werden konnte, ist somit in der Immunfluoreszenzmikroskopie deutlich sichtbar. Zu keinem der getesteten Zeitpunkte war das spezifische Yaa1-Signal in der Einschlussmembran oder im Zytoplasma der Wirtszelle nachweis. Bei den sichtbaren, helleren Bereichen handelt es sich unspezifisches Hintergrundsignal, dass auch in der Färbung mit dem Prä-Immunsereum und in Färbungen uninfizierter Zellen mit dem anti-Yaa1 Antiserum sichtbar war (Abbildung 4.10 A, B). Da die

Fixierung der Zellen mit Methanol erfolgte, konnte nicht bestimmt werden, ob Yaa1 auf der Oberfläche chlamydialer Partikel lokalisiert oder nicht.



**Abbildung 4.10: Lokalisation von Yaa1 in der chlamydialen Infektion**

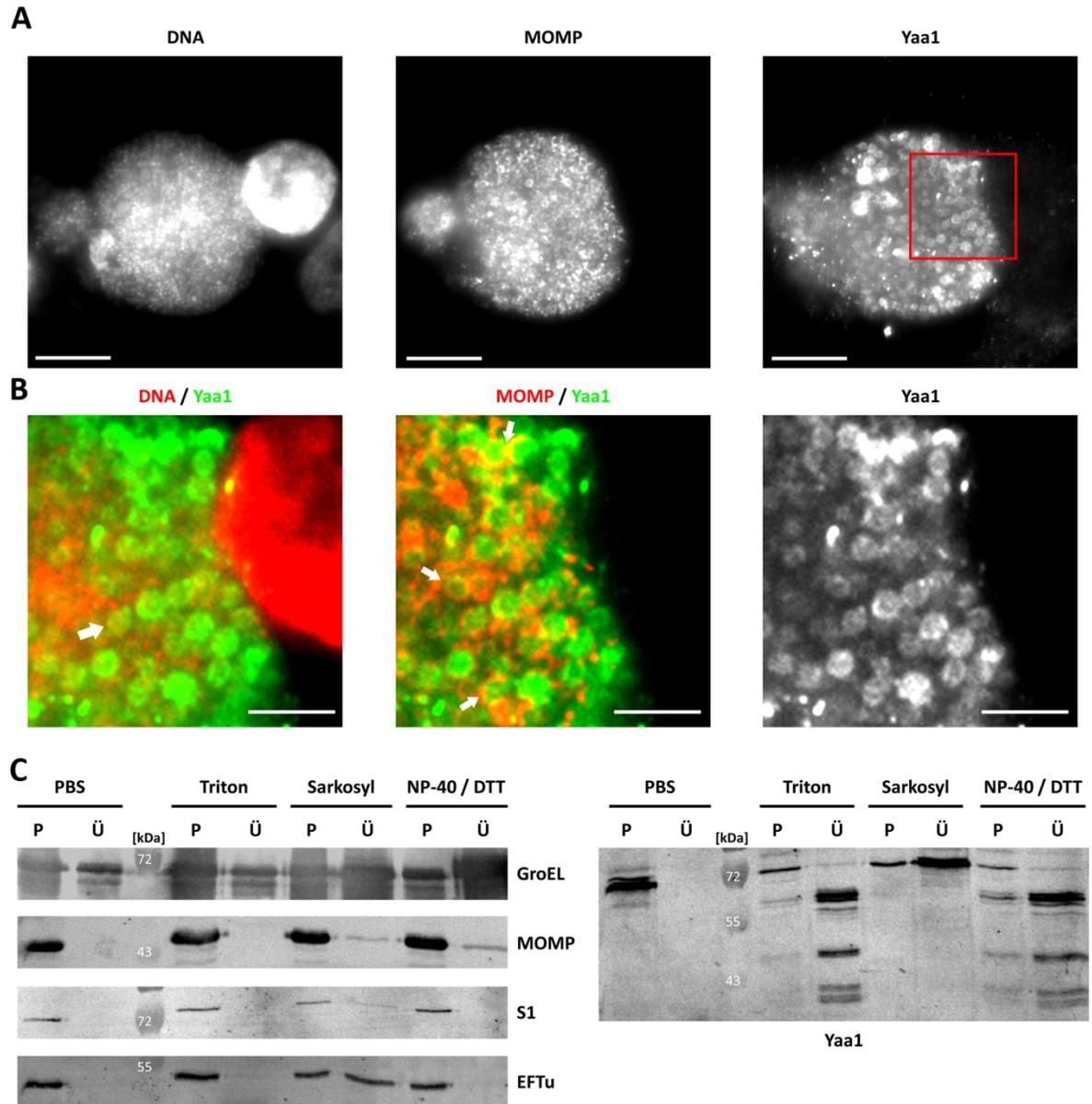
**A:** Überprüfung des Prä-Immunsereums. Humane HEp-2 Zellen wurden 72 hpi mit *C. pneumoniae* infiziert, mit Methanol fixiert und mit DAPI (1:1000) und primärem Yaa1-Prä-Immunsereum (1:25) und sekundärem Alexa488-gekoppeltem anti-Kaninchen Antikörper (1:200) gefärbt. Längenmarker: 10  $\mu$ m

**B:** Nicht-infizierte humane HEp-2 Zellen wurden mit Methanol fixiert. Die Färbung erfolgte mit DAPI (1:1000) und primärem Kaninchen-anti-Yaa1 Antiserum (1:50) und sekundärem Alexa488-gekoppeltem anti-Kaninchen Antikörper. Längenmarker: 20  $\mu$ m

**C:** Humane HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* infiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Methanol fixiert. Die Färbung erfolgte mit DAPI (1:1000) und primärem Kaninchen-anti-Yaa1 Antiserum (1:50) und sekundärem Alexa488-gekoppeltem anti-Kaninchen Antikörper. Längenmarker: 10  $\mu$ m

#### 4.3.2.1 Yaa1 ist auf der Bakterienoberfläche exponiert

Die Grundvoraussetzung für ein potentiell chlamydiales Adhäsins ist die Oberflächenzugänglichkeit, so dass es mit Interaktionspartner auf der Oberfläche der Humanzellen interagieren kann. Daher wurde die Lokalisation von Yaa1 72 hpi überprüft, da zu diesem Zeitpunkt der Einschluss fast ausschließlich mit infektiösen EBs gefüllt ist.



#### Abbildung 4.11: Oberflächenzugänglichkeit von Yaa1

**A:** Humane HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* infiziert, 72 hpi mit 3 % PFA für 10 min fixiert und mit 0,2 % Triton permeabilisiert. Die Färbung erfolgte mit DAPI (1:1000), primärem Maus-anti-MOMP (1:20) und gegen fixierte Humanzellen abgereichertem Kaninchen-anti-Yaa1 Antiserum (1:50) und sekundärem Alexa594-gekoppeltem anti-Maus und Alexa488-gekoppeltem anti-Kaninchen Antikörper (1:200). Längenmarker: 12  $\mu$ m

**B:** Ausschnitt aus A, Längenmarker: 2  $\mu$ m

**C:** Gradientengereinigte *C. pneumoniae* EBs wurden mit 150  $\mu$ l PBS, 1 % Triton X-100, 2 % Sarkosyl oder 1 % NP-40 und 50 mM DTT für 1 h bei 37 °C inkubiert und wiederholt gevortext. Die behandelten EBs wurden bei 100.000 g für 1 h pelletiert. Die 150  $\mu$ l Überstand wurden in ein separates Reaktionsgefäß überführt und das EB-Pellet in 150  $\mu$ l PBS aufgenommen. Von beiden Fraktionen wurde Proteinproben erstellt und mittels Westernblot analysiert. Die Detektion erfolgte mit primärem Kaninchen-anti-GroEL (1:500), Maus-anti-MOMP (1:200), Ziege-anti-EFTu, (1:100), Maus-anti-S1 (1:500) und gegen HEp-2 Zellen abgereichertem Kaninchen-anti-Yaa1 (1:1000) Antiserum und sekundärem AP-gekoppeltem anti-Kaninchen, anti-Ziege oder anti-Maus Antikörper (1:7500). GroEL1 (58 kDa), MOMP (42 kDa), S1 (62 kDa), EFTu (43 kDa) Yaa1 (54 kDa). Proteinmarker: PageRuler

Zudem wurden die Zellen mit 3 % PFA fixiert und mit 0,2 % Triton permeabilisiert, um die Zellmembranen der Humanzelle und die Einschlussmembran für die Antikörper durchgängig zu machen, jedoch eine Färbung von intrazellulären, chlamydialen Proteinen zu vermeiden (Knudsen, Madsen et al. 1999; Moelleken and Hegemann 2008; Wuppermann, Molleken et al. 2008; Moelleken, Schmidt et al. 2010). Für Yaa1 war unter PFA-Fixierung ein spezifisches Signal sichtbar, was bedeutet, dass Yaa1 wahrscheinlich auf der Oberfläche chlamydialer EBs zugänglich ist (Abbildung 4.11 A). Diese Signale erwiesen sich in der Ausschnittsvergrößerung als ringförmige Strukturen, welche die DNA des EBs zu umrunden schienen (Abbildung 4.11 B, links, Pfeil). Zudem konnte eine partielle oder vollständige Kolo-kalisation mit dem EB-oberflächenzugänglichen Protein MOMP nachgewiesen werden (Abbildung 4.11 B, Mitte Pfeil). Solche, für Yaa1 beobachteten, ringartigen Strukturen konnten bereits zuvor für die bekannten Adhäsine OmcB und Pmp21 gezeigt werden (Moelleken and Hegemann 2008; Moelleken, Schmidt et al. 2010).

Um die beobachtete Oberflächenzugänglichkeit von Yaa1 auf infektiösen EBs biochemisch zu bestätigen, wurden Löslichkeitsexperimente von EB-Oberflächenproteinen mit unterschiedlichen Detergenzien durchgeführt.

Zur Kontrolle wurden EBs mit PBS behandelt, was lediglich einen Großteil von GroEL1 von der Oberfläche der EBs lösen konnte, während MOMP, S1, EFTu und Yaa1 in der EB-Pelletfraktion verblieben (Abbildung 4.11, C). Die Löslichkeit von GroEL1 durch PBS-Behandlung wurde bereits in einer früheren Studie beschrieben (Wuppermann, Molleken et al. 2008).

Mit der Behandlung der EBs mit 2 % Sarkosyl, einem anionischen Detergenz, konnten GroEL1 und das intra-chlamydiale Protein EFTu etwa zur Hälfte in den Überstand gebracht werden. Ein weiteres intra-chlamydiales Protein, S1, hingegen verblieb unter der Sarkosylbehandlung größtenteils im Pellet. Auch das oberflächenexponierte Protein MOMP war nahezu ausschließlich in der Pelletfraktion nachweisbar. MOMP ist ein Teil des stark über Disulfidbrücken vernetzten cOMC, der bekanntermaßen Sarkosyl-unlöslich ist (Caldwell, Kromhout et al. 1981). Yaa1 konnte mit 2 % Sarkosyl größtenteils in den löslichen Überstand gebracht werden.

Bei der Behandlung mit 1 % Triton, einem nicht-ionischen und nicht-denaturierendem Detergenz, konnte GroEL1 etwa zur Hälfte in den Überstand überführt werden. Hingegen waren die intra-chlamydialen Proteine EFTu und S1 sowie das cOMC-Protein MOMP ausschließlich im EB-Pellet nachweisbar. Für Yaa1 konnten unter 1 % Triton spezifische Yaa1-Fragmente im löslichen Überstand mit Laufhöhen von etwa 60 kDa, 45 kDa, 40 kDa

und 35 kDa detektiert werden, jedoch kaum Vollängen-Yaa1. Diese Fragmente konnten bereits in der detaillierten Expressionskinetik von Yaa1 beobachtet werden (Abbildung 4.9 C). Die Yaa1-Fragmente waren ebenso, aber nur sehr schwach, in der Pelletfraktion sichtbar. Die Hauptbande in der Pelletfraktion war die Yaa1-volllängenspezifische 72 kDa Bande. In der Gesamtheit war deutlich mehr Yaa1 im löslichen Überstand als im Pellet nachweisbar.

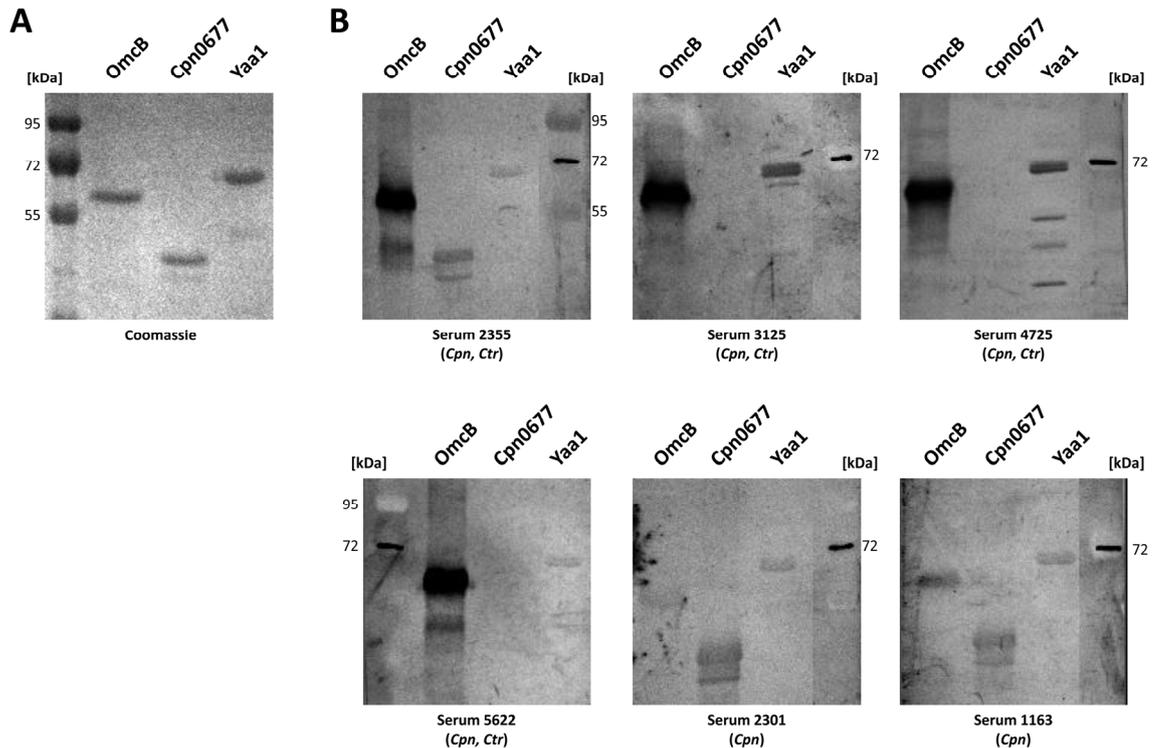
Die Behandlung der EBs mit einem weiteren nicht-ionischen Detergenz, NP-40, zeigte für alle Proteine bis auf MOMP dasselbe Verteilungs- und Bandenmuster wie die Triton-Behandlung. Da bei der NP-40-Behandlung zusätzlich DTT eingesetzt wurde, welches die Disulfidbrücken des cOMC reduzieren kann und somit die Löslichkeit von Proteinen des cOMC erhöhen sollte, konnten auch geringe Mengen von MOMP in den löslichen Überstand überführt werden.

Zusammenfassend deuteten sowohl die ringartigen Yaa1-Strukturen, die chlamydiale EBs 72 hpi unter PFA-Fixierung umrundeten, als auch die Löslichkeitsanalyse mit Triton X100 und NP-40 darauf hin, dass es sich bei Yaa1 um ein oberflächenzugängliches Protein handelt. Die Expressionsanalyse von Yaa1 zeigte zudem eine interessante Fragmentierung von Yaa1 in der Infektion auf.

### **4.3.3 *C. pneumoniae* infizierte Menschen besitzen Antikörper gegen Yaa1**

Da Yaa1 mit der Oberflächenzugänglichkeit das Grundkriterium eines potentiellen Adhäsins erfüllte, konnte postuliert werden, dass *C. pneumoniae* infizierte Menschen Antikörper gegen Yaa1 entwickeln könnten. Daher wurden die Seren von sechs Patienten mit nachgewiesener *C. pneumoniae* Infektion auf anti-Yaa1 Antikörper getestet. Alle Patientenserum wiesen Antikörper gegen das immundominante Adhäsin OmcB auf, auch wenn die Detektion bei Serum 2301 sehr schwach war (Abbildung 4.12). Ebenso konnten in allen Seren Antikörper gegen das *C. pneumoniae*-spezifische Yaa1-Protein nachgewiesen werden, wenn auch die Bandenintensitäten deutlich schwankend waren. Das *C. pneumoniae*-spezifische Protein Cpn0677, dessen *C. pneumoniae* TW-183 Homolog CpB0704 als immunodominant eingestuft worden war (Bunk, Susnea et al. 2008), konnte hingegen nur mit drei der sechs getesteten Seren detektiert werden.

Aus der serologischen Analyse ging demnach hervor, dass das potentielle Adhäsिन Yaa1, ebenso wie das Adhäsिन OmcB, stark immunreaktiv zu sein scheint.



**Abbildung 4.12: Immunreaktivität von Yaa1**

**A:** Ladekontrolle der eingesetzten Proteine. OmcB<sub>6xHis</sub> (60 kDa), Cpn0677<sub>6xHis</sub> (41 kDa), Yaa1<sub>10xHis</sub> (55 kDa), Proteinmarker: PageRuler

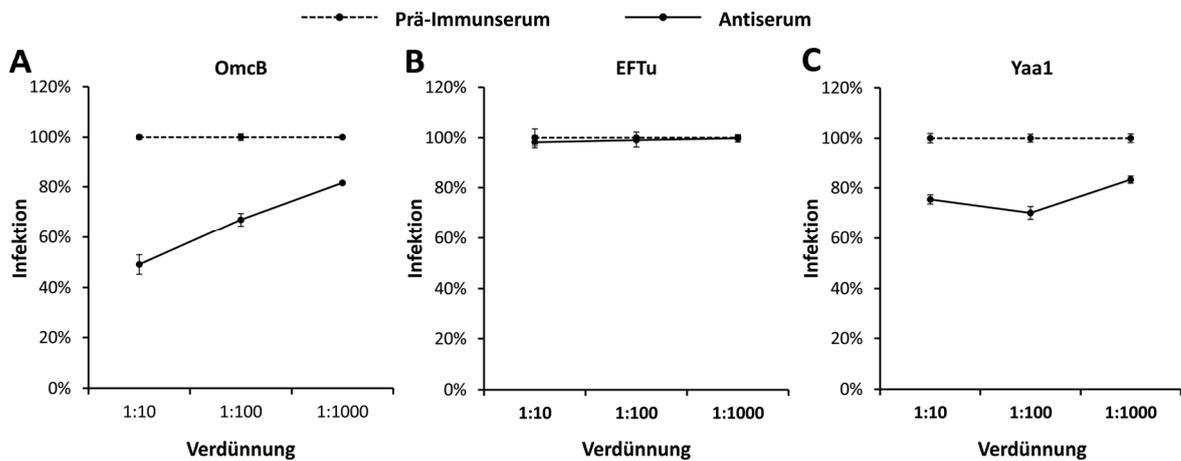
**B:** Westernblot zur Überprüfung der Immunreaktivität. 1 µg rekombinantes OmcB<sub>6xHis</sub>, Cpn0677<sub>6xHis</sub> und Yaa1<sub>10xHis</sub> wurden geblottet, mittels Guanidin-HCl-Gradienten auf der Membran renaturiert und mit humanen Seren (1:1000) und AP-gekoppeltem anti-Mensch Antikörper (1:7500) detektiert.

#### 4.3.4 Yaa1-Antikörper neutralisieren die chlamydiale Infektion

Da durch *C. pneumoniae* infizierte Personen Antikörper gegen Yaa1 bilden (4.3.3, S. 109), Yaa1 zudem sehr wahrscheinlich oberflächenexponiert ist (4.3.2.1, S. 106) und im Hefe-Oberflächen-Expressionssystem adhäsive Eigenschaften zeigte (Fechtner 2009), wurde im Folgenden die Bedeutung von Yaa1 in der Adhäsion und Internalisierung des EBs untersucht. Hierzu wurden zunächst Antikörper-Neutralisationsexperimente durchgeführt, bei denen die infektiösen EBs entweder mit dem Prä-Immunsereum oder mit dem anti-Yaa1 Antiserum in unterschiedlichen Verdünnungen vorinkubiert wurden. Der Antikörper sollte hierbei das Yaa1-Protein binden und auf der EB-Oberfläche abschirmen, so dass es sich an frühen Prozessen der Infektion nicht mehr beteiligen kann.

Als Positivkontrolle wurden EBs mit Serum gegen das bekannte Adhäsin OmcB vorinkubiert. Die Behandlung der EBs mit anti-OmcB Antiserum führte bei einer Verdünnung von 1:1000 zu einer Reduktion der Infektion auf  $81,6 \pm 0,6 \%$  und bei einer Verdünnung von 1:100 zur Reduktion auf  $66,9 \pm 2,5 \%$  (Abbildung 4.13 A). Die stärkste neutralisierende Wirkung mit

49,1 ± 3,9 % wurde bei der höchsten Antikörperkonzentration beobachtet. Als Negativkontrolle diente Serum gegen das intra-chlamydiale Protein EFTu. So vorbehandelte EBs zeigten mit Infektionsraten von 99,8 ± 1,5 % (1:1000), 99,1 ± 3,2 % (1:100) und 98,3 ± 2,6 % (1:10) keine signifikant verminderte Infektion (Abbildung 4.13 B).



**Abbildung 4.13: Neutralisation der chlamydialen Infektion durch anti-Yaa1 Antikörper**

Chlamydiale EBs wurden für 2 h bei 4 °C entweder mit dem Prä-Immunsereum oder Antiserum in verschiedenen Verdünnungen (1:10, 1:100 oder 1:1000) inkubiert. Anschließend wurden  $1 \times 10^6$  HEp-2 Zellen mit den vorbehandelten EBs infiziert (MOI=20). Die Infektiosität wurde 50 hpi bestimmt, indem mikroskopisch die Anzahl der gebildeten Einschlüsse in 10 Gesichtsfeldern unter 40-facher Objektvergrößerung gezählt wurde. Die Vorbehandlung der EBs mit Prä-Immunsereum der jeweiligen Verdünnung wurde auf 100 % Infektion gesetzt. Die Experimente wurden in Dubletten durchgeführt (n=3).

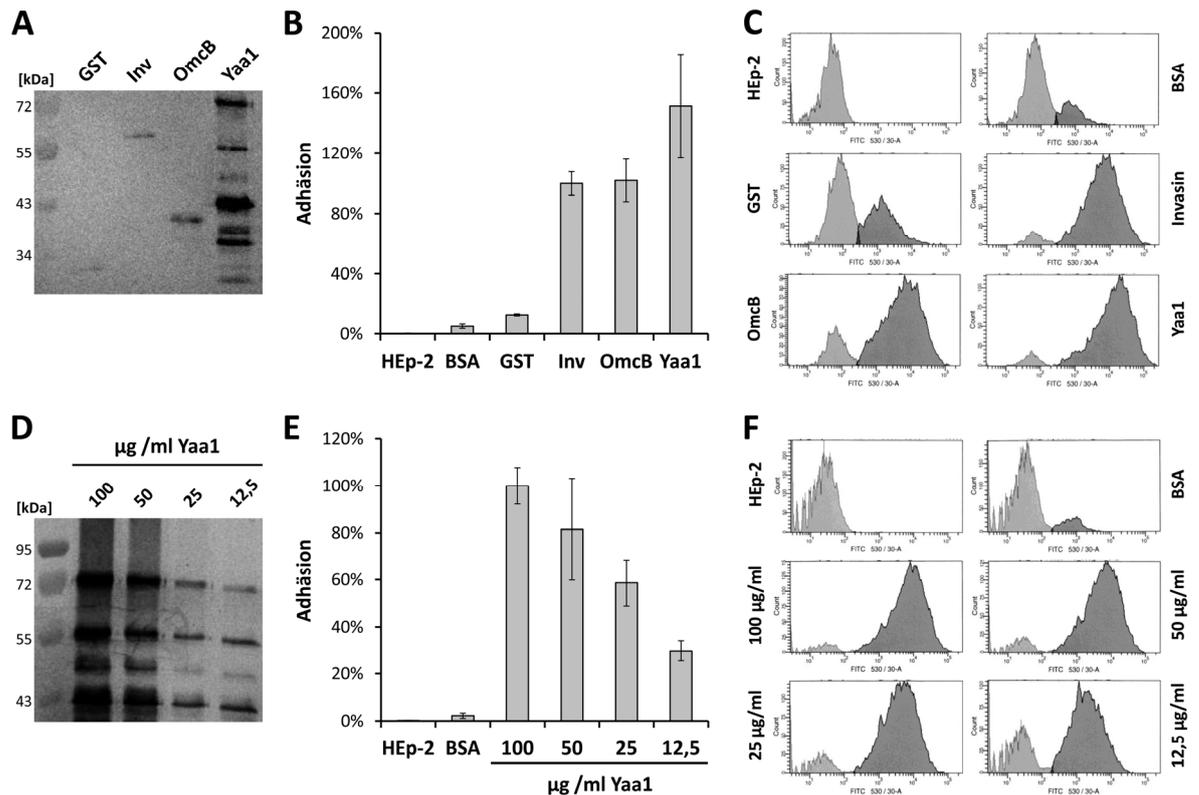
**A:** Serum gegen OmcB, **B:** Serum gegen EFTu, **C:** Serum gegen Yaa1

Wurden die chlamydialen EBs mit einem 1000-fach verdünnten Antiserum gegen Yaa1 vorinkubiert, so konnte im Vergleich zur Vorinkubation mit dem Prä-Immunsereum eine Reduktion der Infektion auf  $83,3 \pm 1,4$  % beobachtet werden. Die Infektiosität konnte bei Verwendung höherer Antikörperkonzentrationen von 1:100 und 1:10 auf  $70,1 \pm 2,5$  % respektive  $75,5 \pm 1,8$  % weiter reduziert werden (Abbildung 4.13 C). Hierbei war bemerkenswert, dass im Vergleich zur Positivkontrolle OmcB, wo eine direkte Abhängigkeit von verwendeter Antikörpermenge und Abnahme der Infektiosität bestand, für Yaa1 bereits bei einer Verdünnung von 1:100 die maximale Reduktion erreicht war. Zudem betrug die maximale Reduktion der Infektion durch anti-Yaa1 Antikörper 30 % und war somit schwächer als die Reduktion durch anti-OmcB Antikörper (50 %).

Mit diesem experimentellen Ansatz konnte gezeigt werden, dass Anti-Yaa1 Antikörper das Yaa1 Antigen auf der Oberfläche infektiöser EBs erkennen, was zu einer verminderten Infektiosität führte. Somit konnte die essentielle Bedeutung von Yaa1 in frühen Phasen der Infektion aufgezeigt werden. In folgenden Experimenten sollte nun die mögliche Funktion von Yaa1 während der EB-Adhäsion geklärt werden.

### 4.3.5 Rekombinantes Yaa1 bindet an humane Zellen

Die vorangegangenen Experimente und die Antikörper-Neutralisation im Besonderen (4.3.4, S. 110) hatten den Verdacht erhärtet, dass es sich bei Yaa1 um ein neues chlamydiales Adhäsion handelt. Daher sollte die adhäsive Eigenschaft des Proteins, die im Hefe-Oberflächen-Expressionssystem beobachtet worden war und die Grundlage dieser Arbeit bildete, mit rekombinantem Protein (rYaa1) bestätigt werden.



**Abbildung 4.14: Bindung von rYaa1 an humane HEP-2 Zellen**

**A-F:** Bindung von Protein-beschichteten Latexkugeln an humane Zellen.  $1 \times 10^9$  grün fluoreszierende,  $1,1 \mu\text{m}$  Latexkugeln wurden mit  $100 \mu\text{g/ml}$  (**A-C**) oder unterschiedlichen Konzentrationen (**D-F**) an rekombinantem Protein gekoppelt. Diese wurden im 10-fachen Überschuss mit  $1 \times 10^6$  HEP-2 Zellen für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, anschließend unter mikroskopischer Beobachtung gewaschen, abgelöst und PFA-fixiert. Die Bestimmung des Adhäsionsverhaltens erfolgte durch Bestimmung der mittleren Fluoreszenz von 10000 HEP-2 Zellen mittels FACS-Aria. Die Experimente wurden in Triplets durchgeführt ( $n=3$ ).

**A,D:** Westernblot zur Bestimmung der Beschichtung von  $5 \times 10^7$  Latexkugeln detektiert mit primärem Maus-anti-His-Antikörper (1:2000) und sekundärem AP-gekoppelten anti-Maus-Antikörper (1:7500). GST<sub>6xHis</sub> (26 kDa), Inv<sub>497 6xHis</sub> (50 kDa), GSTOmcB-BD<sub>6xHis</sub> (35 kDa), Yaa1<sub>10xHis</sub> (55 kDa), Proteinmarker: PageRuler

**B,E:** Quantitative Auswertung der Bindung grün fluoreszierender Latexkugeln an 10000 HEP-2 Zellen. Die Bindung der Invasin-gekoppelten Latexkugeln (**B**) bzw. der mit  $100 \mu\text{g/ml}$  Yaa1-gekoppelten Latexkugeln (**E**) wurde auf 100 % Adhäsion gesetzt.

**C,F:** Repräsentative Darstellungen der FACS-Ausgabedatei mit Gegenüberstellung der Intensität der Fluoreszenz (X-Achse) gegen die Zellzahl (Y-Achse) der HEP-2 Zellen.

Dazu wurde die Bindung von rYaa1<sub>10xHis</sub> an humane HEP-2 Zellen zunächst mit Hilfe grün fluoreszierender Latexkugeln bestimmt (Abbildung 4.14 A-C). Hierbei war die

Beschichtungsqualität der Kügelchen trotz gleicher Proteinkonzentrationen, die zur Beschichtung der Kügelchen eingesetzt wurden, deutlich unterschiedlich (Abbildung 4.14 A). Die Beschichtung der Latexkügelchen mit Invasin (Inv<sub>497 6xHis</sub>) war um etwa den Faktor zwei ineffizienter als die Beschichtung mit GST-OmcB-BD<sub>6xHis</sub>. Die GST<sub>6His</sub>-Bande war nochmals um etwa das Fünffache schwächer. Die Beschichtung mit rYaa1<sub>10xHis</sub> war deutlich am effektivsten und im Vergleich zu GST-OmcB-BD<sub>6xHis</sub> um das Fünf- bis Zehnfache erhöht. Zudem war die 72 kDa Yaa1-Volllängenbande nicht die prominenteste, sondern das schon zuvor beobachtete 45 kDa Fragment. Neben diesem Fragment konnten weitere Yaa1-Degradationsbanden bei etwa 55 kDa, 50 kDa, 40 kDa und 35 kDa eindeutig auf den Latexkügelchen nachgewiesen werden. Mit dem folgenden Adhäsionsexperiment war somit keine quantitative, sondern nur eine qualitative Analyse der Bindefähigkeit von rYaa1<sub>10xHis</sub> möglich.

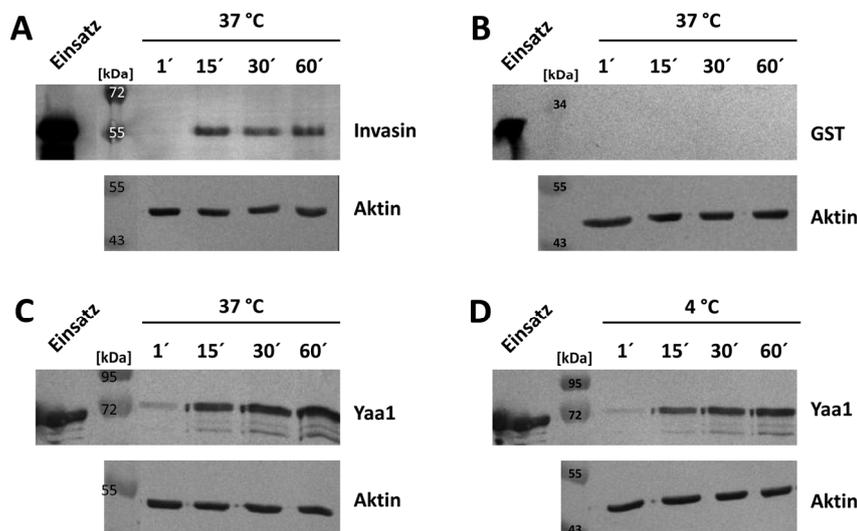
In der Analyse des Bindeexperimentes zeigten sowohl die mit Invasin beschichteten Latexkügelchen, deren Bindefähigkeit auf  $100 \pm 7,8$  % Adhäsion normiert wurde, als auch die OmcB-beschichteten Latexkügelchen ( $102 \pm 14,1$  %) als Positivkontrollen eine starke Bindung an HEp-2 Zellen (Abbildung 4.14 B, C). Die Negativkontrollen BSA und GST zeigten auf Latexkügelchen lediglich eine schwache Adhäsion von  $5,1 \pm 1,4$  % respektive  $13 \pm 0,7$  %. Die mit rYaa1<sub>10xHis</sub> beschichteten Latexkügelchen wiesen mit  $151,3 \pm 34,4$  % die stärkste Adhäsion auf. Allerdings ist hierbei zu berücksichtigen, dass die Beschichtung der Latexkügelchen mit rYaa1<sub>10xHis</sub> deutlich am stärksten war.

Im Folgenden wurde die Adhäsion von rYaa1<sub>10xHis</sub> in Abhängigkeit der Proteinkonzentration untersucht (Abbildung 4.14 D-F). Die Bandenintensitäten der spezifischen 72 kDa rYaa1-Bande sowie der prominenten Degradationsfragmente nahm mit sinkender Kopplungskonzentration ab (Abbildung 4.14 D). Die Bindung der mit 100 µg/ml beschichteten Latexkügelchen wurde auf  $100 \pm 7,8$  % Adhäsion normiert (Abbildung 4.14 E, F). Die mit 50 µg/ml und 25 µg/ml Yaa1-beschichteten Latexkügelchen besaßen Adhäsionsraten von  $81,5 \pm 21,7$  % respektive  $58,6 \pm 9,9$  % und adhärten somit immer noch stark an die humanen Zellen. Latexkügelchen, die mit 12,5 µg/ml rYaa1<sub>10xHis</sub> gekoppelt wurden wiesen mit  $29,8 \pm 4,4$  % Adhäsion immer noch eine zehnfach stärkere Bindefähigkeit als die BSA-Negativkontrolle auf ( $2,2 \pm 1,1$  %).

Diese Konzentrationskinetik zeigte somit, dass bereits geringe Mengen rYaa1<sub>10xHis</sub> auf den Latexkügelchen ausreichen um die Bindung an humane HEp-2 Zellen zu vermitteln. Die Stärke der Adhäsion stand hierbei nahezu in direkter Abhängigkeit zur Menge an eingesetztem Protein.

Um die Adhäsionsfähigkeit von rYaa1 weiter abzuklären wurde ein weiteres Bindeexperiment mit löslichem rYaa1<sub>10xHis</sub> durchgeführt, in dem die Bindung an die Humanzelle direkt in Abhängigkeit der Expositionszeit überprüft werden konnte.

Als Positivkontrolle wurden HEP-2 Zellen mit rekombinantem Invasin (Inv<sub>497 6xHis</sub>) inkubiert (Abbildung 4.15 A). Bereits nach 15 min Inkubationszeit war eine deutliche Bande detektierbar, deren Intensität mit zunehmender Inkubationszeit nicht signifikant anstieg, vermutlich weil die Bindestellen für Invasin bereits nach 15 min abgesättigt waren. GST<sub>6xHis</sub> konnte zu keinem Zeitpunkt an die Humanzellen gebunden vorgefunden werden, ist aber in der Ladekontrolle deutlich sichtbar (Abbildung 4.15 B). Die Inkubation der Humanzellen mit rYaa1<sub>10xHis</sub> wies bereits nach 1 min eine schwache Bande auf (Abbildung 4.15 C). Nach 15 min war eine starke Bande für rYaa1<sub>10xHis</sub> nachweisbar. Die Bandenintensität für rYaa1<sub>10xHis</sub> nahm mit der Zeit zu, was bedeutet, dass noch keine Sättigung mit rYaa1 eingetreten war.



**Abbildung 4.15: Bindung von löslichen rYaa1 an humane HEP-2 Zellen**

Repräsentative Westernblots der Bindung von rekombinantem Protein an HEP-2 Zellen.  $1 \times 10^6$  humane HEP-2 Zellen wurden 15 min bei 4 °C vorgekühlt und anschließend mit 250  $\mu$ l Medium mit 100  $\mu$ g/ml rekombinantem Protein unter angegebener Temperatur für unterschiedliche Zeitpunkte inkubiert und anschließend intensiv gewaschen. Die Bestimmung des Bindeverhaltens erfolgte über Westernblotanalyse durch Detektion mit primärem Maus-anti-His Antikörper (1:2000) und sekundärem AP-gekoppelten anti-Maus Antikörper (1:7500).

**A:** Inv<sub>497 6xHis</sub> (50 kDa), **B:** GST<sub>6xHis</sub> (26 kDa), **C, D:** Yaa1<sub>10xHis</sub> (55 kDa), Proteinmarker: PageRuler

Um die Bindung von rYaa1 weiter zu charakterisieren wurde das Bindeexperiment auch bei 4 °C durchgeführt, um Bindung ohne biologische Aktivität zu messen (Abbildung 4.15 D). Wie beim Experiment unter 37 °C konnte eine schwache rYaa1<sub>10xHis</sub>-Bande bereits nach 1 min Inkubationszeit detektiert werden, deren Intensität über die Zeit zunahm. Beim Vergleich der beiden getesteten Temperaturen war festzustellen, dass bei vergleichbarer Aktin-

Ladekontrolle, die Banden bei 37 °C leicht intensiver waren als bei 4 °C und rYaa1<sub>10xHis</sub> somit bei 37 ° etwas besser an den humanen Zelle zu binden schien als bei 4 °C.

Die adhäsiven Eigenschaften von rYaa1 konnten demnach in zwei unabhängigen experimentellen Ansätzen nachgewiesen werden und bestätigten somit die vorangegangenen Beobachtungen aus dem Hefe-Oberflächenexpressionssystem.

### **4.3.6 Die Suche nach dem humanen Interaktionspartner von Yaa1**

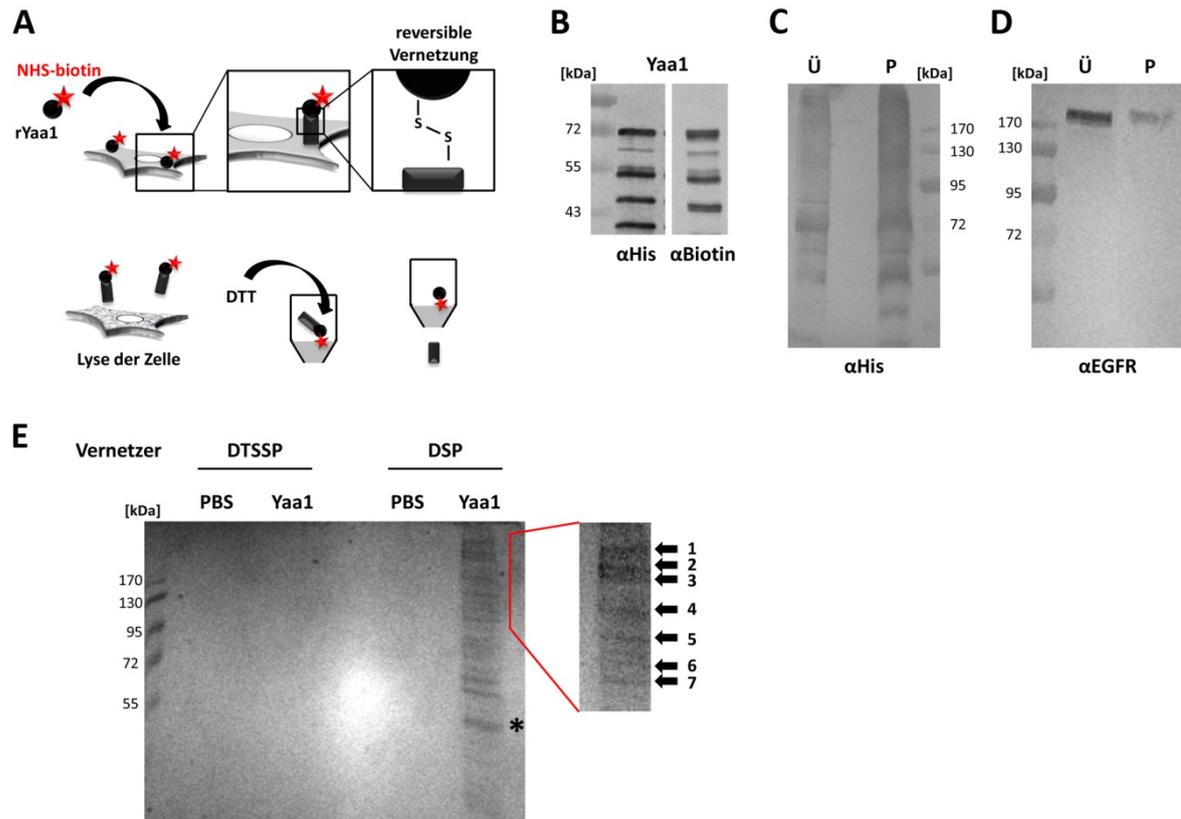
Da gezeigt werden konnte, dass es sich bei Yaa1 um ein oberflächenexponiertes, chlamydiales Protein handelt, das an humane HEp-2 Zellen binden kann, sollte nun der Interaktionspartner von Yaa1 auf der humanen Zelle identifiziert werden.

#### **4.3.6.1 Yaa1 interagiert wahrscheinlich nicht mit oberflächenexponierten, humanen Proteinen**

Da *C. pneumoniae* mit OmcB bereits über ein Adhäsion verfügt, das an Zuckerstrukturen der humanen Zellen bindet (Moelleken and Hegemann 2008), wurde zunächst vermutet, dass Yaa1 mit einem Protein auf der humanen Zelle interagiert. Um diesen Interaktionspartner zu finden wurde ein „Pull Down“-Experiment durchgeführt (Abbildung 4.16 A). Hierbei sollte biotinyliertes rYaa1<sub>10xHis</sub> an den humanen Interaktionspartner binden, woraufhin die Bindung mittels reversiblen Vernetzer stabilisiert wurde. Die humanen Zellen wurden anschließend lysiert um den rYaa1-Interaktionspartner-Komplex in den löslichen Überstand zu bringen und über den Biotinrest an Streptavidin-Agarose zu binden. Nach dem Aufschluss der Quervernetzung erfolgte schließlich die Elution der potentielle Interaktionspartner.

Die erfolgreiche Biotinylierung von rYaa1<sub>10xHis</sub> wurde zunächst mittels Westernblot überprüft (Abbildung 4.16 B). Nach der Lyse der Humanzelle konnte lediglich ein Teil des rYaa1<sub>10xHis</sub>-Rezeptor-Komplexes in den löslichen Überstand überführt werden, während unter diesen Bedingungen der humane Interaktionspartner von Pmp21, der EGF-Rezeptor, nahezu vollständig in den löslichen Überstand gebracht werden konnte (Abbildung 4.16 C, D). Erstaunlicherweise konnten in den Eluatn bei Einsatz des zellimpermeablen Vernetzers DTSSP keine spezifischen Banden im Vergleich zur PBS-Negativkontrolle beobachtet werden (Abbildung 4.16 E), während mit dem zellpermeablen Vernetzer DSP spezifische Banden angereichert wurden, die in der PBS-Kontrolle nicht sichtbar waren. Bei der stark sichtbaren Bande unterhalb der 55 kDa Markerbande handelte es sich um Aktin (Daten nicht gezeigt).

Die sieben prominenten Banden über der 72 kDa Markerbande, der Laufrhöhe von rYaa1<sub>10xHis</sub>, wurden ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Analyse zur Zentralen Bioanalytik des Zentrums für Molekulare Medizin an der Universität Köln gesandt.



**Abbildung 4.16: Die Suche nach einem proteinösen humanen Interaktionspartner von Yaa1**

**A:** Schematische Darstellung des experimentellen Ansatzes. 400 µg rYaa1<sub>10xHis</sub> wurde mit 20-fachem Biotin-Überschuss biotinyliert und für 1 h bei 37°C in 4 ml Medium (100 µg/ml) mit HEp-2 Zellen einer konfluent bewachsenen 80 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche inkubiert. Die Vernetzung erfolgte durch 1 mM DTSSP oder DSP für 2 h bei 4 °C. Die Zellen wurden mit RIPA-Puffer lysiert, der lösliche rYaa1-Interaktionspartner-Komplex an Streptavidin-Agarose gekoppelt und der potentielle Interaktionspartner mittels 50 mM DTT eluiert.

**B:** Westernblot zur Überprüfung der Biotinylierung von rYaa1<sub>10xHis</sub>, detektiert mit primärem Maus-anti-His Antikörper (1:2000) und sekundärem AP-gekoppeltem anti-Maus Antikörper (1:7500) (links) oder AP-gekoppeltem Streptavidin (1:1000) (rechts). Yaa1<sub>10xHis</sub> (55 kDa), Proteinmarker: PageRuler

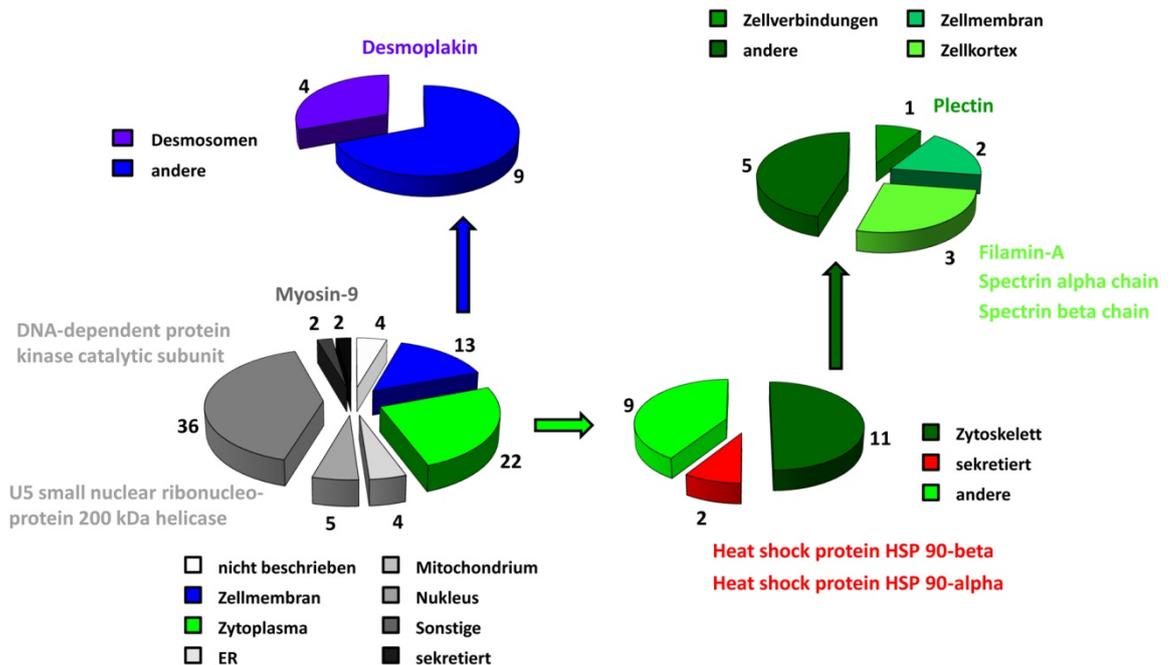
**C:** Westernblot zur Kontrolle der Lyse der Humanzellen. Die lysierten Zellen wurden zentrifugiert um die gelösten Proteine von dem Membranpellet zu trennen. rYaa1 und der rYaa1-Rezeptorkomplex wurden über primären Maus-anti-His Antikörper (1:1000) und sekundären AP-gekoppeltem anti-Maus Antikörper (1:7500) detektiert.

**D:** Überprüfung der Lyse der Humanzellen (siehe C). Proben des löslichen Überstands und des Pellets wurden mit primärem Maus-anti-EGFR (1:400) und sekundärem AP-gekoppeltem anti-Maus Antikörper (1:7500) auf EGFR überprüft.

**E:** Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der Eluate. Stern: Aktin

Diese ergab Treffer für 88 Proteine als potentielle Interaktionspartner, denen aufgrund der massenspektrometrischen Analyse unterschiedliche Punkte („Score“) zugeteilt wurden. Eine vollständige Liste mit den identifizierten Proteinen unter der Angabe in welcher Bande diese gefunden wurden findet sich im Anhang dieser Arbeit. Je mehr Punkte ein Protein besaß, desto höher war die Signifikanz des Treffers.

Die Proteine wurden, unabhängig von ihrer Punktzahl, in die Gruppen „nicht beschrieben“ (4 Proteine), „Zellmembran“ (13 Proteine), „Zytoplasma“ (22 Proteine), „Endoplasmatisches Retikulum“ (4 Proteine), „Mitochondrium“ (5 Proteine), „Nukleus“ (36 Proteine), „Sonstige“ (2 Proteine) und „sekretiert“ (2 Proteine) eingeteilt (Abbildung 4.17).



**Abbildung 4.17: Auswertung der massenspektrometrischen Analyse der potentiellen proteinösen Interaktionspartner von Yaa1**

Dargestellt sind die Treffer eingeordnet in funktionelle Gruppen nach UniProt. Die besten zehn Treffer sind mit ihrer entsprechenden Gruppenzugehörigkeit angegeben.

Hierbei wurde die Gruppe „Zellmembran“ mit 13 Proteinen weiter unterteilt in die Untergruppen „Desmosomen“ (4 Proteine) und „Sonstige“ (9 Proteine). Die Gruppe Zytoplasma mit 22 Proteinen wurde weiter unterteilt in „Zytoskelett“ (11 Proteine), „sekretiert“ (2 Proteine) und „Andere“ (9 Proteine). Die elf „Zytoskelett“-Kandidaten wurden weiter unterteilt in die Untergruppen „Zellverbindungen“ (1 Protein), „Zellmembran“ (2 Protein), „Zellkortex“ (3 Proteine) und „Andere“ (5 Proteine). Unter den elf Proteinen mit den höchsten Punktwerten befand sich keines, das zumindest als teilweise oberflächenlokalisiert beschrieben ist (Tabelle 4.1).

Die einzigen Rezeptoren, die als potentielle Interaktionspartner gefunden wurden, waren 4F2 Zell-Oberflächen Antigen schwere Kette, Transferrin Rezeptor Protein 1 und Integrin beta-1, jedoch mit sehr niedrigen Punktwerten von lediglich 375, 270 und 88. Aufgrund dieser Daten war ein proteinöser, oberflächenlokalisierter humaner Interaktionspartner von Yaa1 nicht wahrscheinlich. Interessanterweise waren jedoch mit Plectin (4726 Punkte), Filamin-A (2472 Punkte), Spektrin alpha Kette (15901 Punkte), Spektrin beta Kette (1180 Punkte) und

Filamin-B (943 Punkte) fünf der besten elf Treffer Proteine, die direkt unter der Plasmamembran der humanen Zelle lokalisieren und direkt mit dem Zytoskelett der humane Zelle in Interaktion treten, oder ein Teil davon sind. Alle fünf Proteine wurden auch in einem zweiten „Pull Down“-Versuch als potentielle Interaktionspartner gefunden (Tabelle 4.1).

**Tabelle 4.1: Top 11 Treffer der potentiellen humanen Interaktionspartner von Yaa1**

Die elf besten Treffer des „Pull Down“-Ansatzes zur Identifizierung des humanen Interaktionspartners von Yaa1 unter der Verwendung des membranpermeablen Vernetzers DSP. Die Proteine sind sortiert nach ihrer Punktzahl, die ein Maß für die Signifikanz eines Treffers darstellt.

Protein	Punkte	Sequenz- abdeckung [%]	Anzahl Peptide	gefunden (gesamt)	2te Analyse
Plectin	4726,4	20,0	88	3	JA
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	4017,8	21,0	93	3	JA
Filamin-A	2471,8	25,3	54	1	JA
Spectrin alpha chain	1590,9	13,3	33	1	JA
Heat shock protein HSP 90-beta	1389,7	31,9	27	1	NEIN
Myosin-9	1362,9	14,6	27	1	NEIN
Heat shock protein HSP 90-alpha	1261,1	30,5	10	1	NEIN
Desmoplakin	1224,8	10,6	21	2	NEIN
U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	1223,0	11,6	24	1	NEIN
Spectrin beta chain	1179,7	11,0	25	2	JA
Filamin-B	942,6	10,3	19	1	JA

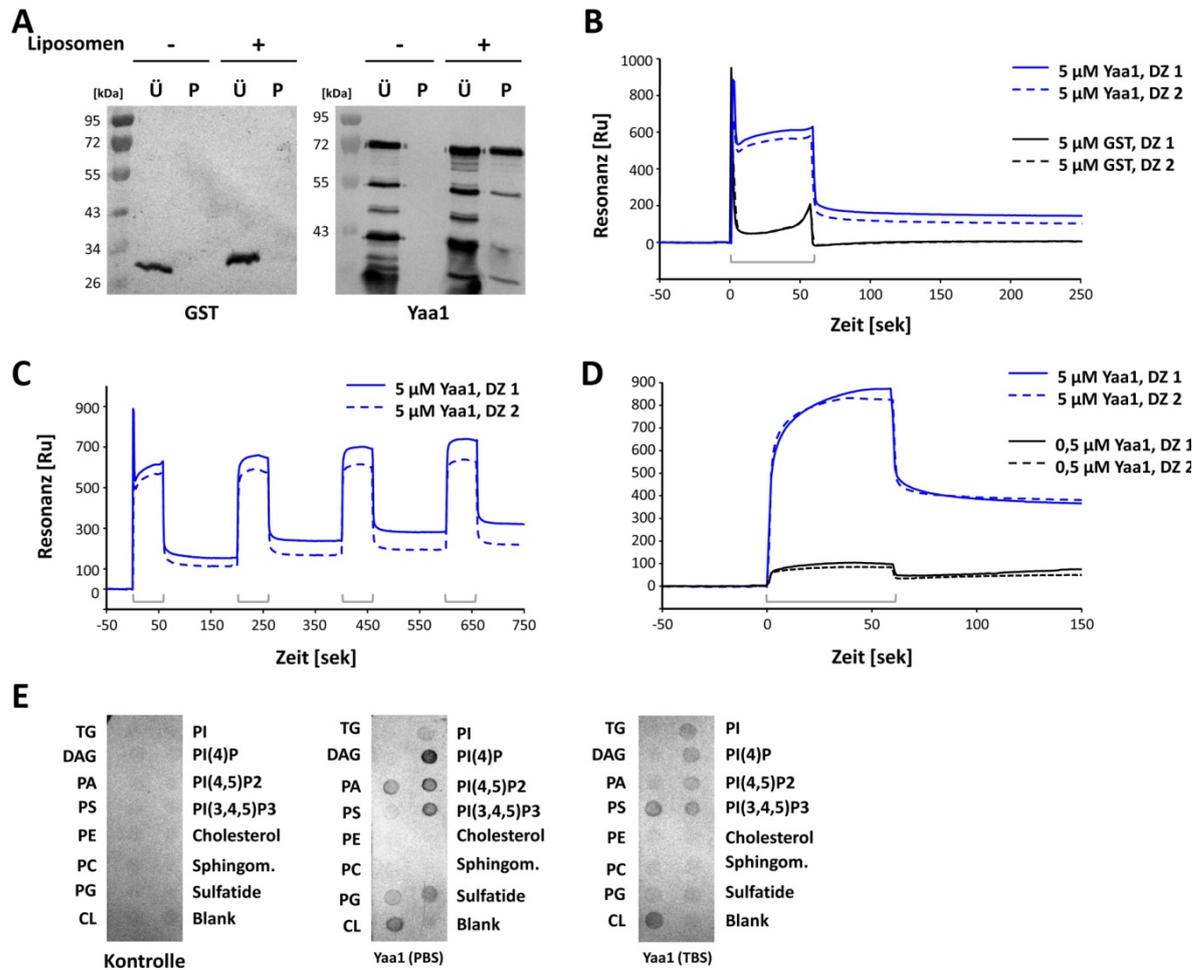
Neben dem „Pull Down“-Ansatz wurde ein Hefe-2-Hybrid-Screening durchgeführt, um den möglichen proteinösen Interaktionspartner von Yaa1 zu finden. Das Screening erfolgte gegen eine Testis-c-DNA-Bibliothek. Die Paarungseffizienz der Hefestämme lag mit 5,69 % über der Mindestanforderung von 2 %, so dass  $6,2 \times 10^6$  Klone getestet wurden, was dem Sechsfachen der Mindestanforderung entsprach. Für die Selektion wurde Medium mit niedrigem Selektionsdruck verwendet, da Yaa1 in Hefe einen Wachstumsdefekt hervorruft und so auch schwache Interaktionen detektiert werden konnten (Herbst 2011). In der ersten Selektion wurden 234 Kolonien gepickt und weiter vereinzelt. Nach drei Vereinzlungsschritten verblieben 11 Hefeklone, die potentielle Interaktionspartner von Yaa1 exprimierten. Die entsprechenden Plasmide wurden isoliert und zur Überprüfung retransformiert. Die potentiellen Interaktionen bestätigten sich allerdings nicht, so über das Hefe-2-Hybrid-System kein potentieller proteinöser Interaktionspartner von Yaa1 identifiziert werden konnte.

#### 4.3.6.2 Yaa1 interagiert direkt mit Phospholipidmembranen

In zwei unabhängigen experimentellen Ansätzen konnte somit kein potentieller oberflächenlokalisierter, proteinöser, humaner Interaktionspartner gefunden werden. Da rYaa1 im ersten experimentellen Ansatz nach der Vernetzung hauptsächlich im unlöslichen

Pellet verblieb (Abbildung 4.16 C), welches Membranen enthält, wurde vermutet, dass Yaa1 direkt mit der Plasmamembran der humanen Zelle interagiert. Um diese mögliche direkte Interaktion mit Phospholipidmembranen zu untersuchen wurde zunächst ein Liposomen-Zentrifugationsexperiment etabliert. Hierbei wurde rekombinantes Protein mit Liposomen bestehend aus Phosphatidylcholin (PC) inkubiert, welches das häufigste Phospholipid der äußeren Schicht der Plasmamembran ist (Op den Kamp 1979; Boesze-Battaglia and Schimmel 1997). Nach folgender Zentrifugation befanden sich die Liposomen im Pellet, lösliches Protein verblieb jedoch im Überstand. So konnte GST<sub>6xHis</sub> als Negativkontrolle, sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Liposomen lediglich im Überstand nachgewiesen werden (Abbildung 4.18 A links). rYaa1<sub>10xHis</sub> hingegen konnte bei Anwesenheit von PC-Liposomen sowohl im löslichen Überstand als auch in der Pellet-Fraktion detektiert werden (Abbildung 4.18 A rechts). In Abwesenheit von Liposomen wurde rYaa1<sub>10xHis</sub> ausschließlich im löslichen Überstand detektiert. Dies bedeutet, dass die Anwesenheit von rYaa1<sub>10xHis</sub> in der Liposomenfraktion auf eine direkte Interaktion mit den PC-Liposomen zurückzuführen ist, und nicht durch pelletierte Proteinaggregate begründet war. Wie auch vorher waren wieder prominente rYaa1-Fragmente bei 55 kDa, 45 kDa, 40 kDa und 35 kDa detektierbar. Bis auf das 45 kDa Fragment interagierten alle Fragmente mit den PC-Liposomen. Die stärkste Interaktion zeigte aber das rYaa1-Vollängenprotein, während das 40 kDa- und das 35 kDa-Fragment kaum mit PC-Liposomen zu interagieren schien.

Um die Bindefähigkeit von rYaa1<sub>10xHis</sub> an Phospholipidmembranen zu bestätigen, wurde für weitere Bindestudien die Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) genutzt. Dies geschah im Forschungszentrum Jülich im „Institute of Complex Systems“, Strukturbiochemie (ICS-6) unter Anleitung von Dr. Bernd König und Herrn Yu-Fu Hung. Hierzu wurde ein Sensorchip mit einer Phospholipidmembran aus 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholin (POPC) beschichtet. Als Negativkontrolle wurde zunächst die Bindung von 5  $\mu$ M GST<sub>6xHis</sub> an die POPC-Membran überprüft. Während der Injektion war eine leichte Erhöhung der Resonanz um  $76,1 \pm 3,1$  RU (Response Units) zu beobachten (Abbildung 4.18 B). Mit Abschluss der Injektion fiel das Resonanzniveau jedoch wieder auf 0 RU ab, was bedeutete, dass kein Protein an die Membran gebunden hatte. Nach Waschschritten wurde anschließend 5  $\mu$ M rYaa1<sub>10xHis</sub> injiziert. Während der Injektion stieg die Resonanz deutlich um  $607,3 \pm 25,8$  RU an. Auch nach der Injektion war die Resonanz der POPC-Membran um  $148,0 \pm 22,0$  RU im Vergleich zur Nulllinie vor der Injektion erhöht. Dies bedeutet, dass rYaa1<sub>10xHis</sub> auch nach der Injektion an der Membran gebunden blieb und somit die Beobachtungen aus dem Liposomen-Zentrifugationsexperiment bestätigt werden konnten.



**Abbildung 4.18: Die Interaktion von rYaa1 mit Phospholipidmembranen**

**A:** Repräsentative Westernblots des Liposomen-Zentrifugationsexperiments. Liposomen wurden mittels „Freez-Thaw-Sonation“ Methode aus Phosphatidylcholin (PC) erzeugt. 100  $\mu$ l Liposomen wurden mit 5  $\mu$ g Protein für 20 min bei RT inkubiert und anschließend bei 16.000 g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 100  $\mu$ l PBS resuspendiert und beide Fraktionen wurden über SDS-Gele analysiert. Die Detektion erfolgte mit primärem Maus-anti-His Antikörper (1:2000) und sekundärem AP-gekoppelten anti-Maus Antikörper (1:7500). Ü = Überstand, P = Pellet, GST<sub>6xHis</sub> (26 kDa), Yaa1<sub>10xHis</sub> (55 kDa), Proteinmarker: PageRuler

**B-D:** Ausgabedatei der Oberflächenplasmonenresonanz mit Gegenüberstellung der Resonanz (Y-Achse) gegen die Zeit (X-Achse). Der Mikrochip mit zwei Durchflusszellen (DZ) wurde mit einer Membran aus 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholin (POPC) beschichtet. Die Membran wurde durch Injektion von 50 mM NaOH geglättet und unspezifische Bindestellen durch Injektion von 100  $\mu$ g/ml BSA abgesättigt. Anschließend wurden 20  $\mu$ l der zu testenden Proteine bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 20  $\mu$ l/min injiziert (graue Klammer, 60 sek).

**B:** 5  $\mu$ M GST und 5  $\mu$ M rYaa1 in je 2 DZ, **C:** vier aufeinanderfolgende Injektionen von 5  $\mu$ M rYaa1 in 2 DZ, **D:** 5  $\mu$ M und 0,5  $\mu$ M rYaa1 in je 2 DZ.

**E:** Repräsentative Membran-Lipid-Streifen. Die Membran-Lipid-Streifen wurden für 1 h bei RT zur Antikörperkontrolle in PBS (links) oder mit 1  $\mu$ g/ml rekombinanten Yaa1 in PBS (Mitte) und TBS (rechts) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit primärem Maus-anti-His Antikörper (1:2000) und sekundärem AP-gekoppelten anti-Maus Antikörper (1:7500). TG = Triglyceride, DAG = Diacylglycerol, PA = Phosphatidsäure, PS = Phosphatidylserin, PE = Phosphatidylethanolamin, PC = Phosphatidylcholin, PG = Phosphatidylglycerol, CL = Cardiolipin, PI = Phosphatidylinositol, PI(4)P = Phosphatidylinositol-4-Phosphat, PI(4,5)P2 = Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat, PI(3,4,5)P3 = Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat, Sphingom. = Sphingomyelin

Nach der ersten Injektion von rYaa1<sub>10xHis</sub> erfolgten weitere Injektionen mit 5  $\mu$ M rYaa1<sub>10xHis</sub>, um festzustellen ob die Membran auf dem Sensorchip mit rYaa1<sub>10xHis</sub> abgesättigt werden kann. Im Vergleich zur ersten Injektion stieg während der zweiten Injektion die Resonanz mit  $491,7 \pm 11,9$  RU weniger stark an (Abbildung 4.18 C, zweite Kurve). Auch fiel die Erhöhung der Resonanz nach der Injektion mit  $83,7 \pm 11,8$  RU geringer aus. Dies war darauf zurückzuführen, dass bereits rYaa1<sub>10xHis</sub> an die Membran gebunden hatte und somit weniger Bindestellen zur Verfügung standen. Eine dritte und vierte Injektion von 5  $\mu$ M rYaa1<sub>10xHis</sub> erhöhte die Resonanz während der Injektion um  $457,5 \pm 6,8$  RU, respektive  $453,4 \pm 7,9$  RU. Die Erhöhung der Resonanz nach der Injektion im Vergleich zur Resonanz vor der Injektion betrug  $40,0 \pm 9,0$  RU, respektive  $39,5 \pm 8,3$  RU und blieb somit konstant (Abbildung 4.18 C, dritte und vierte Kurve). Dies könnte bedeuten, dass nach der zweiten Injektion die POPC-Membran für Yaa1-Bindung abgesättigt war. Die weitere Erhöhung der Resonanz könnte durch Protein-Protein-Interaktion begründet gewesen sein. Um weiter Bindestudien mit der Membran vorzunehmen, musste gebundenes rYaa1<sub>10xHis</sub> wieder entfernt werden. Jedoch war dies weder mit Waschungen mit NaCl (1 M und 3 M) noch mit basischen (10 mM und 50 mM NaOH) oder sauren (10 mM HCl) Waschschritten möglich (Daten nicht gezeigt). Die Bindung von rYaa1<sub>10xHis</sub> an die Membran erwies sich daher als sehr stark. Aufgrund dieser Tatsache war es nicht möglich einen  $K_D$ -Wert zu bestimmen, da hierfür die Bindung unterschiedlicher rYaa1<sub>10xHis</sub> Proteinkonzentrationen an dieselbe Membran gemessen werden müssten.

Um dennoch die Bindung zweier unterschiedlicher Konzentrationen von rYaa1<sub>10xHis</sub> Protein zu messen wurde die Membran auf dem Mikrochip mit frisch präparierten POPC-Liposomen erneuert. Auf dieser frisch präparierten POPC-Membran führte die Injektion von 5  $\mu$ M rYaa1<sub>10xHis</sub> zu einer Erhöhung der Resonanz um  $853,2 \pm 23,4$  RU (Abbildung 4.18 D). Nach der Injektion war die Resonanz der Membran mit  $363,5 \pm 10,5$  RU deutlich erhöht. Die Injektion von 0,5  $\mu$ M rYaa1<sub>10xHis</sub> führte zu einem Anstieg der Resonanz um  $92,5 \pm 8,7$  RU. Nach der Injektion blieb die Resonanz im Vergleich zur Nulllinie vor der Injektion um  $55,1 \pm 3,6$  RU erhöht. Somit konnte die Bindung von rYaa1<sub>10xHis</sub> an POPC-Membranen auch mit deutlich geringeren Proteinkonzentrationen nachgewiesen werden.

Nachdem eindeutig gezeigt werden konnte, dass rYaa1<sub>10xHis</sub> direkt atypische Phospholipidmembranen bestehend aus Phosphatidylcholin binden kann, stellte sich die Frage, ob Phosphatidylcholin an sich oder die Membranstruktur als solche den Bindepartner darstellen.

Um dies zu überprüfen wurden Membran-Lipid-Streifen verwendet, auf denen unterschiedliche Lipide aufgetropft waren. Im Vergleich zur Antikörperkontrolle, bei der keine positive Detektion zu beobachten war, zeigten die mit rYaa1<sub>10xHis</sub> behandelten

Membran-Lipid-Streifen positive Reaktionen für verschiedene Lipide (Abbildung 4.18 E). Unter Verwendung von PBS als Reaktionspuffer wurde die stärkste Reaktion bei Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PI(4)P) beobachtet. Schwache Reaktionen waren bei Phosphatidsäure (PA), Cardiolipin (CL), Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PI(4,5)P<sub>2</sub>), Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>) und Sulfatiden sichtbar. Ebenso wiesen Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidylglycerol (PG) ein schwaches Signal auf. Unter Verwendung von TBS als Reaktionspuffer zeigten Cardiolipin (CL) und Phosphatidylserin (PS) die stärksten Reaktionen (Abbildung 4.18 E rechts). Schwache Färbungen waren ebenfalls bei allen Phosphatidylinositolen zu beobachten.

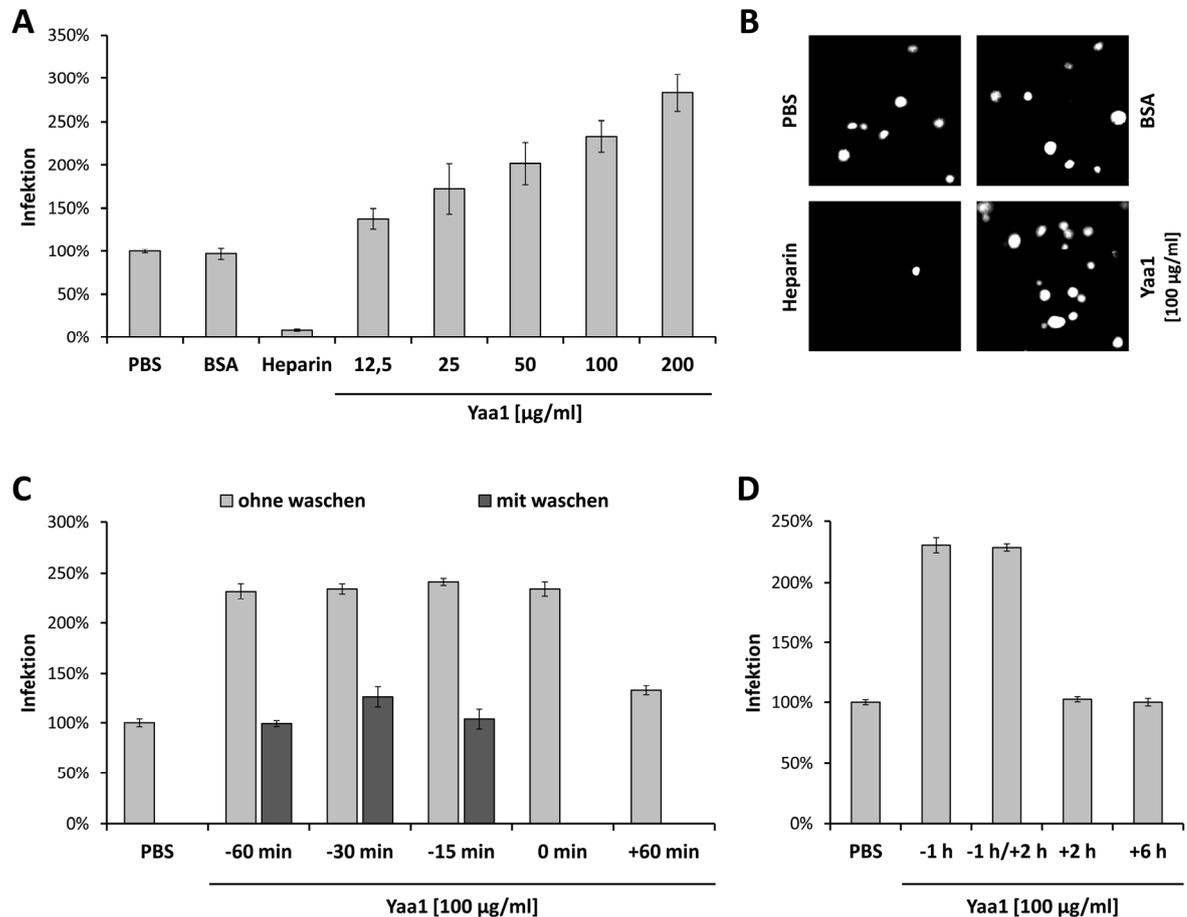
Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mehrere Lipide spezifisch durch rYaa1<sub>10xHis</sub> erkannt wurden. Allerdings war keine Interaktion mit Phosphatidylcholin (PC) zu beobachten, welches das einzige Phospholipid der atypischen Membranen der beiden vorangegangenen Experimente darstellte. Die Experimente mit den Membranen aus PC spiegeln jedoch die natürliche Situation eher wieder als die Lipid-Streifen. Hiermit wurde somit gezeigt, dass die adhäsiven Eigenschaften von rYaa1 auf die Interaktion mit Phospholipidmembranen zurückzuführen waren.

### 4.3.7 Rekombinantes Yaa1 steigert die Infektion

Nach der Identifikation des humanen Interaktionspartners sollte die Bedeutung von Yaa1 während des Adhäsionsprozesses genauer untersucht werden. Hierzu wurden Neutralisationsexperimente mit rekombinantem Protein durchgeführt. Werden humane HEp-2 Zellen vor der Infektion mit rekombinanten chlamydialen Adhäsinen behandelt, so bindet das rekombinante Protein den natürlichen Interaktionspartner des Adhäsins und schirmt diesen folglich gegen das Adhäsin auf der Oberfläche der EBs ab. Dies resultiert in einer verminderten Adhäsion und demzufolge einer verminderten Infektion (Moelleken and Hegemann 2008; Moelleken, Schmidt et al. 2010).

Zur Kontrolle wurden mit PBS vorbehandelte Zellen infiziert und auf  $100 \pm 2,3$  % Infektion normiert (Abbildung 4.19 A). Die Vorbehandlung mit 200 µg/ml BSA als unspezifisches Protein änderte die Infektionsrate nicht ( $96,9 \pm 7,0$  %). Als Kontrolle einer deutlich reduzierten Infektion wurden chlamydiale EBs mit Heparin vorbehandelt, was zu einer Verminderung der Infektion auf  $8,7 \pm 1,3$  % führte. Erstaunlicherweise resultierte die Vorbehandlung der humanen Zellen mit rYaa1<sub>10xHis</sub> nicht in einer deutlichen Reduktion der Infektion. Vielmehr steigerte rYaa1<sub>10xHis</sub> die Infektion dosisabhängig. So konnten bereits 12,5 µg/ml Yaa1<sub>10xHis</sub> die Infektion auf  $137,8 \pm 11,8$  % signifikant erhöhen, während die Vorinkubation mit 100 µg/ml Yaa1<sub>10xHis</sub> die Infektionsrate mit  $233,3 \pm 18,0$  % mehr als

verdoppelte. Die größte Verstärkung der Infektion war mit  $283,1 \pm 21,6$  % unter Verwendung von  $200 \mu\text{g/ml}$  Yaa1<sub>10xHis</sub> zu beobachten. Jedoch lösten sich unter dieser Behandlung die infizierten Humanzellen bereits teilweise ab.



#### Abbildung 4.19: Einfluss von rYaa1 auf die chlamydiale Infektion

**A:**  $1 \times 10^6$  humane HEp-2 Zellen wurden für 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  mit PBS,  $200 \mu\text{g/ml}$  BSA oder unterschiedlichen Konzentrationen an Yaa1<sub>10xHis</sub> vorinkubiert und anschließend infiziert (MOI=20). Als Kontrolle einer reduzierten Infektion dienten EBs, die mit  $500 \mu\text{g/ml}$  Heparin für 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  behandelt wurden. Nach 2 h erfolgte ein Medienwechsel. Die Infektiosität wurde 50 hpi bestimmt, indem mikroskopisch die Anzahl der HEp-2 Zellen und der gebildeten Einschlüsse in 10 Gesichtsfeldern unter 63-facher Objektvergrößerung gezählt wurden. Die Vorbehandlung der Humanzellen mit PBS wurde auf 100 % Infektion gesetzt. Die Experimente wurden in Dubletten durchgeführt (n=3).

**B:** Repräsentative mikroskopische Bilder der Infektion unter verschiedenen Vorbehandlungen der HEp-2 Zellen. Die Einschlüsse wurden mit Pathfinder (1:6) gefärbt.

**C:**  $1 \times 10^6$  humane HEp-2 Zellen wurden für unterschiedliche Zeitpunkte bei  $37^\circ\text{C}$  mit  $100 \mu\text{g/ml}$  rYaa1<sub>10xHis</sub> inkubiert und infiziert (MOI=20). Nach 2 h erfolgte ein Medienwechsel. Die Auswertung erfolgte wie unter A beschrieben. Die Experimente wurden in Dubletten durchgeführt (n=2).

**D:**  $1 \times 10^6$  humane HEp-2 Zellen wurden infiziert und vor (-) und/oder nach (+) Infektionsbeginn mit  $100 \mu\text{g/ml}$  Yaa1<sub>10xHis</sub> behandelt (MOI=20). Nach 2 h erfolgte ein Medienwechsel, teilweise inklusive  $100 \mu\text{g/ml}$  Yaa1<sub>10xHis</sub>. Die Auswertung erfolgte wie unter A beschrieben. Die Experimente wurden in Dubletten durchgeführt (n=2).

Um dieses ungewöhnliche Verhalten genauer zu studieren wurden die humanen Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor und nach der Zugabe der chlamydialen EBs mit rYaa1<sub>10xHis</sub>

behandelt (Abbildung 4.19 C). Hierbei stellte sich heraus, dass die Länge der Vorinkubation der HEp-2 Zellen irrelevant für den infektionssteigernden Effekt war. Auch die gleichzeitige Applikation von rYaa1<sub>10xHis</sub> und EBs steigerte die Infektionsrate auf  $234,4 \pm 7,0$  %. Wurde rYaa1<sub>10xHis</sub> 60 min nach dem Start der Infektion zugegeben, so war immer noch eine Steigerung der Infektion auf  $132,6 \pm 4,7$  % zu beobachten.

Wurden die humanen Zellen jedoch nach der 60-minütigen und 15-minütigen Vorinkubation mit rYaa1<sub>10xHis</sub>, aber vor der Infektion intensiv mit PBS gewaschen, so wurde die Infektion nicht gesteigert (Abbildung 4.19 C). Lediglich die Vorbehandlung für 30 min führte nach PBS-Waschung zu einer leicht erhöhten Infektion ( $125,8 \pm 10,1$  %). Da rYaa1<sub>10xHis</sub> trotz intensiver PBS-Waschung nicht von der Humanzelle entfernt werden konnte (Abbildung 4.14 G), war ausgeschlossen, dass die Steigerung der Infektion auf einer Interaktion der EBs mit dem an der Membran gebundenem rYaa1<sub>10xHis</sub> beruhte. Dies bedeutet, dass lösliches rYaa1 während der Adhäsion oder Internalisierung der EBs anwesend sein muss, um die Infektion zu verstärken. Somit löst die Bindung von rYaa1 an die humane Plasmamembran möglicherweise einen zeitlich begrenzten Prozess aus, der die frühen Prozesse der Infektion unterstützt.

Da in den vorangegangenen Experimenten zwei Stunden nach dem Start der Infektion ein Medienwechsel vorgenommen wurde und somit kein lösliches rYaa1<sub>10xHis</sub> mehr anwesend war, wurde im folgenden Experiment überprüft, ob rYaa1 auch nach der Adhäsion und Internalisierung der EBs einen Einfluss auf die Infektion hat (Abbildung 4.19 D).

Wurden die Zellen mit rYaa1<sub>10xHis</sub> vorbehandelt und lösliches rYaa1<sub>10xHis</sub> mit dem Medienwechsel entfernt (-1 h), so war eine Steigerung der Infektion auf  $230,3 \pm 6,2$  % zu beobachten. Auch wenn nach der Vorbehandlung mit dem Medienwechsel neues lösliches rYaa1<sub>10xHis</sub> hinzugegeben wurde (-1 h / +2 h), war die Infektion auf  $228,4 \pm 3,0$  % erhöht.

Wurde rYaa1<sub>10xHis</sub> hingegen erst 2 hpi (+2 h) oder 6 hpi (+6 h) und damit nach der Adhäsion und Internalisierung der EBs zugefügt, so konnte keine erhöhte Infektion mehr beobachtet werden ( $102,5 \pm 2,2$  %, respektive  $100,0 \pm 3,2$  %). Somit hatte rYaa1<sub>10xHis</sub> ausschließlich während der Adhäsion oder Internalisierung der EBs eine infektionssteigernde Wirkung.

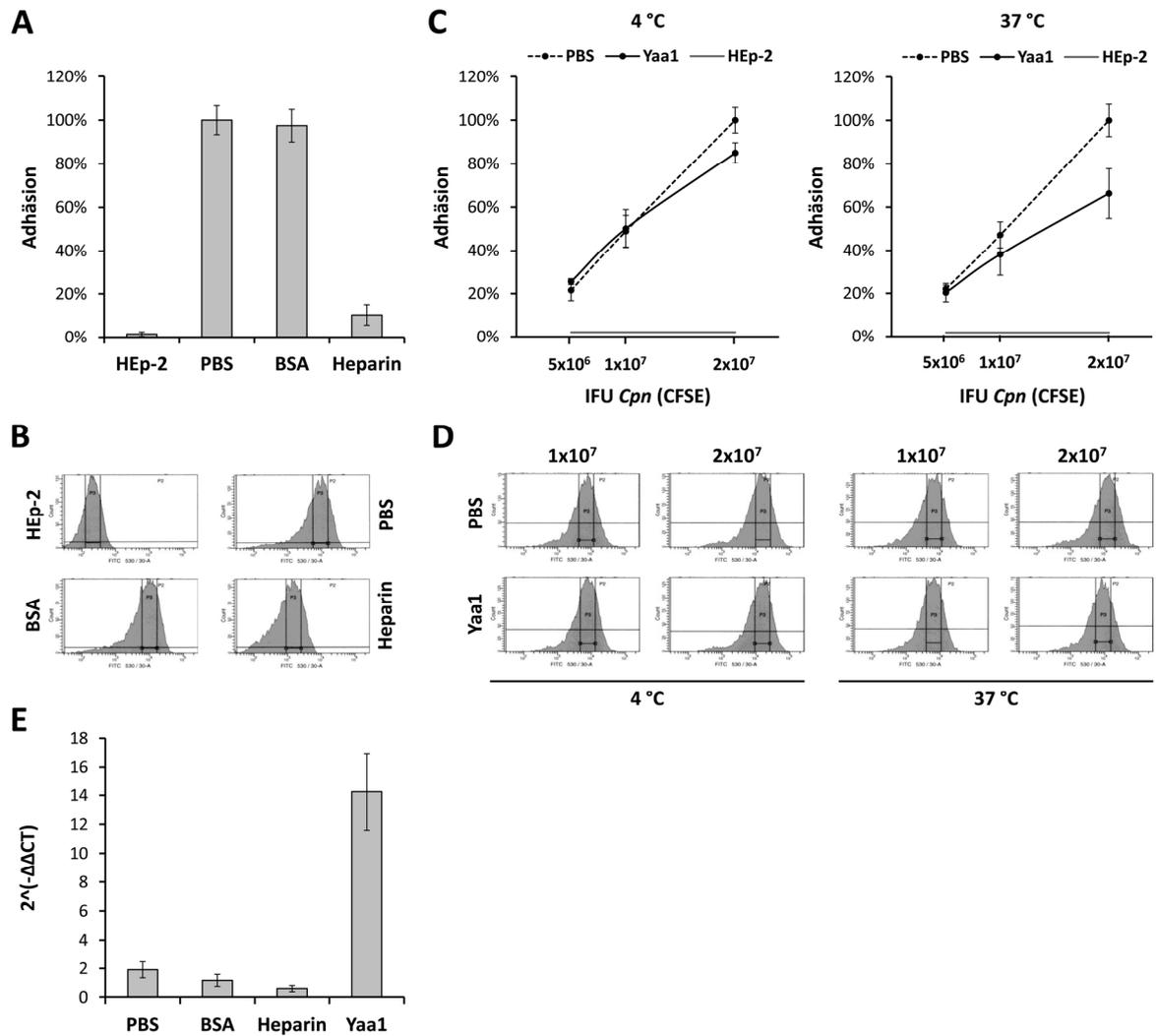
Zusammenfassend zeigten diese Experimente, dass rYaa1 eine steigernde Wirkung auf die Infektion hatte. Zudem war lösliches Protein und dessen direkte Wirkung auf die humane Zelle während der Adhäsion und/oder Internalisierung nötig, um diese zu steigern. Daher musste rYaa1<sub>10xHis</sub> in der Infektion auf den Adhäsions- und/oder Internalisierungsprozess wirken.

#### 4.3.7.1 rYaa1 steigert die Internalisierung und nicht die Adhäsion von EBs

Um zu überprüfen, ob die durch rYaa1 gesteigerte Infektion auf einer verbesserten Adhäsion oder einer Internalisierung beruhte, wurden zunächst Adhäsionsexperimente mit fluoreszenzmarkierten EBs durchgeführt.

Zunächst wurde ein Kontrollexperiment mit  $2 \times 10^7$  IFU CFSE-markierten EBs durchgeführt (Abbildung 4.20 A, B). Die Adhäsion unter PBS-Vorbehandlung wurde auf  $100 \pm 6,7\%$  Adhäsion normiert. Die Vorbehandlung der humanen Zellen mit BSA zeigte keine reduzierte Adhäsion der chlamydialen EBs ( $97,5 \pm 7,5\%$ ), wie auch diese Vorbehandlung keine Reduktion der Infektion gezeigt hatte (Abbildung 4.19 A). Wurden die CFSE-markierten EBs jedoch mit Heparin vorbehandelt, welches das chlamydiale Adhäsin OmcB bindet und somit die Adhäsion negativ beeinflusst, konnte eine deutliche Reduktion der Adhäsion auf  $10,3 \pm 4,7\%$  beobachtet werden (Abbildung 4.20 A, B) und war damit ähnlich niedrig wie im Infektionsexperiment (Abbildung 4.19 A). Somit konnte die Funktionalität des experimentellen Ansatzes gezeigt werden.

Für die Analyse der Auswirkung von rYaa1<sub>10xHis</sub> auf die Adhäsion von EBs wurde das Bindeexperiment mit unterschiedlichen IFUs CFSE-markierter EBs durchgeführt, um auszuschließen, dass aufgrund einer Übersättigung mit EBs eine gesteigerte Adhäsion nicht sichtbar wäre (Abbildung 4.20 C, D links). Die Vorbehandlung der humanen HEP-2 Zellen bei 4 °C mit PBS zeigt eine Verdopplung der adhärenzierten Bakterien bei Verdopplung der Anzahl eingesetzter Bakterien. Wurden die Zellen mit rYaa1<sub>10xHis</sub> vorbehandelt, so war die Adhäsion der EBs im Vergleich zur PBS-Kontrolle nicht erhöht, sondern bei der höchsten EB-Zahl leicht erniedrigt. Im Folgenden wurde der Adhäsionstest wiederholt, wobei die humanen Zellen, wie beim Infektionsexperiment, bei 37 °C mit rYaa1<sub>10xHis</sub> behandelt wurden. Vor Zugabe der CFSE-markierten EBs wurden die HEP-2 Zellen für 15 min bei 4 °C abgekühlt, um wiederum lediglich Adhäsion zuzulassen (Abbildung 4.20 C, D rechts). Bei Verwendung von  $2 \times 10^7$  IFUs CFSE-markierter EBs zeigte sich eine signifikant reduzierte Adhäsion ( $66,3 \pm 11,4\%$ ) im Vergleich zur PBS-Kontrolle ( $100 \pm 7,5\%$ ). Bei der Verwendung von  $1 \times 10^7$  und  $5 \times 10^6$  IFUs waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den rYaa1<sub>10xHis</sub>- und PBS-behandelten Zellen sichtbar. Diese Daten zeigten, dass die beobachtete, gesteigerte Infektion durch rYaa1<sub>10xHis</sub> nicht auf eine gesteigerte Adhäsion zurückzuführen war. Somit könnte rYaa1<sub>10xHis</sub> einen direkten Einfluss auf die Internalisierung der EBs zu haben.



**Abbildung 4.20: Auswirkung von rYaa1 auf die Adhäsion und Internalisierung der EBs**

**A:** Quantitative Auswertung des Kontrollexperiments zur Adhäsion von EBs an humane Zellen.  $1 \times 10^6$  humane HEP-2 Zellen wurden für 1 h bei 4 °C mit PBS oder 200  $\mu\text{g/ml}$  BSA vorbehandelt.  $2 \times 10^7$  Carboxyfluorescein-succinimidester (CFSE)-markierte EBs wurden für 1 h bei 4 °C hinzugegeben. Zur Kontrolle wurden EBs mit 500  $\mu\text{g/ml}$  Heparin behandelt. Die HEP-2 Zellen wurden gewaschen, gelöst und PFA-fixiert. Die Bestimmung der Adhäsion erfolgte durch Bestimmung der mittleren Fluoreszenz von 10000 HEP-2 Zellen mittels FACS-Aria. Die Experimente wurden in Triplets durchgeführt ( $n=3$ ).

**B,D:** Repräsentative Darstellungen der FACS-Ausgabedatei mit Gegenüberstellung der Intensität der Fluoreszenz (X-Achse) gegen die Zellzahl (Y-Achse) der HEP-2 Zellen.

**C:** Quantitative Auswertung der Adhäsion von EBs an humane Zellen.  $1 \times 10^6$  HEP-2 Zellen wurden für 1 h bei 4 °C oder 37 °C mit PBS oder 100  $\mu\text{g/ml}$  Yaa1<sub>10xHis</sub> inkubiert. Erfolgt die Inkubation bei 37 °C, so wurden die Zellen anschließend für 15 min bei 4 °C abgekühlt. Danach wurden unterschiedliche IFUs CFSE-markierter EBs für 1 h bei 4 °C hinzugegeben. Die HEP-2 Zellen wurden gewaschen, abgelöst und PFA-fixiert. Die Bestimmung der Adhäsion erfolgte wie unter A beschrieben. Die Experimente wurden in Triplets durchgeführt ( $n=3$ ).

**E:** Quantitative Auswertung der Internalisierung von EBs an humane Zellen.  $1 \times 10^6$  HEP-2 Zellen wurden für 1 h bei 37 °C mit PBS, 100  $\mu\text{g/ml}$  BSA oder 100  $\mu\text{g/ml}$  Yaa1<sub>10xHis</sub> vorbehandelt und für 15 min bei 4 °C abgekühlt. Die Zellen wurden infiziert (MOI=20) und zunächst für 1 h bei 4 °C und anschließend für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nicht internalisierte EBs wurden durch Behandlung für 15 min bei 37 °C mit 0,5 x Trypsin/EDTA und Zentrifugation bei 1000 g und 250 g entfernt. Die DNA wurde mittels Phenol-Chloroformfällung isoliert und 200 ng für die real-time PCR auf humanem GAPDH und chlamydialem 16 S eingesetzt. Die Auswertung der Daten erfolgte über den  $\Delta\Delta\text{CT}$ . Die Experimente wurden in Triplets durchgeführt ( $n=3$ ).

Um diese These zu überprüfen wurde ein Internalisierungsexperiment etabliert. Zur Bestimmung der Internalisierungsrate nach zwei Stunden Infektion wurde die chlamydiale Genommenge relativ zur Humanzellzahl bestimmt ( $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ ). Je höher der  $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ -Wert war, desto mehr EBs wurden internalisiert. Bei Vorbehandlung der Humanzellen mit PBS wurde ein Wert von  $1,90 \pm 0,56$  berechnet. Wurden die HEp-2 Zellen mit BSA vorbehandelt, so war der errechnete Wert mit  $1,16 \pm 0,42$  leicht erniedrigt. Zur Kontrolle einer reduzierten Internalisierung wurden, wie in vorangegangenen Experimenten, EBs mit Heparin behandelt. Bei dieser Behandlung war der  $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ -Wert mit  $0,58 \pm 0,22$  deutlich niedriger als bei der PBS-Kontrolle, was auf eine reduzierte Zahl internalisierter EBs hindeutete. Der errechnete Wert nach Vorbehandlung mit rYaa1<sub>10xHis</sub> hingegen war mit  $14,26 \pm 2,67$  gegenüber der PBS-Kontrolle um mehr als das Siebenfache erhöht. Folglich steigerte die Vorbehandlung der Humanzellen mit rYaa1<sub>10xHis</sub> die Internalisierung der EBs. Zusammenfassend zeigten die Adhäsions- und Internalisierungsexperimente, dass die durch rYaa1<sub>10xHis</sub> gesteigerte Infektionsrate nicht auf eine verbesserte Adhäsion der EBs, sondern auf eine verbesserte Internalisierung der EBs zurückzuführen war. Somit besitzt Yaa1 adhäsive Eigenschaften, indem es direkt mit der Phospholipidmembran interagiert, jedoch konnte die Funktion von Yaa1 dem Internalisierungsprozess zugeordnet werden.

#### 4.3.7.2 Yaa1 wirkt während früher Prozesse der Endozytose der EBs

Da die experimentellen Daten darauf hindeuteten, dass Yaa1 eine Rolle während der Endozytose der chlamydialen EBs hatte, wurde die Endozytosemaschinerie der humanen Zelle gezielt mit chemischen Inhibitoren attackiert, um die infektionssteigernde Wirkung unter diesen Bedingungen zu untersuchen. Als chemische Inhibitoren wurden Dynasore, Methyl-beta-Cyclodextrin (M $\beta$ CD), Nystatin und Cytochalasin D eingesetzt.

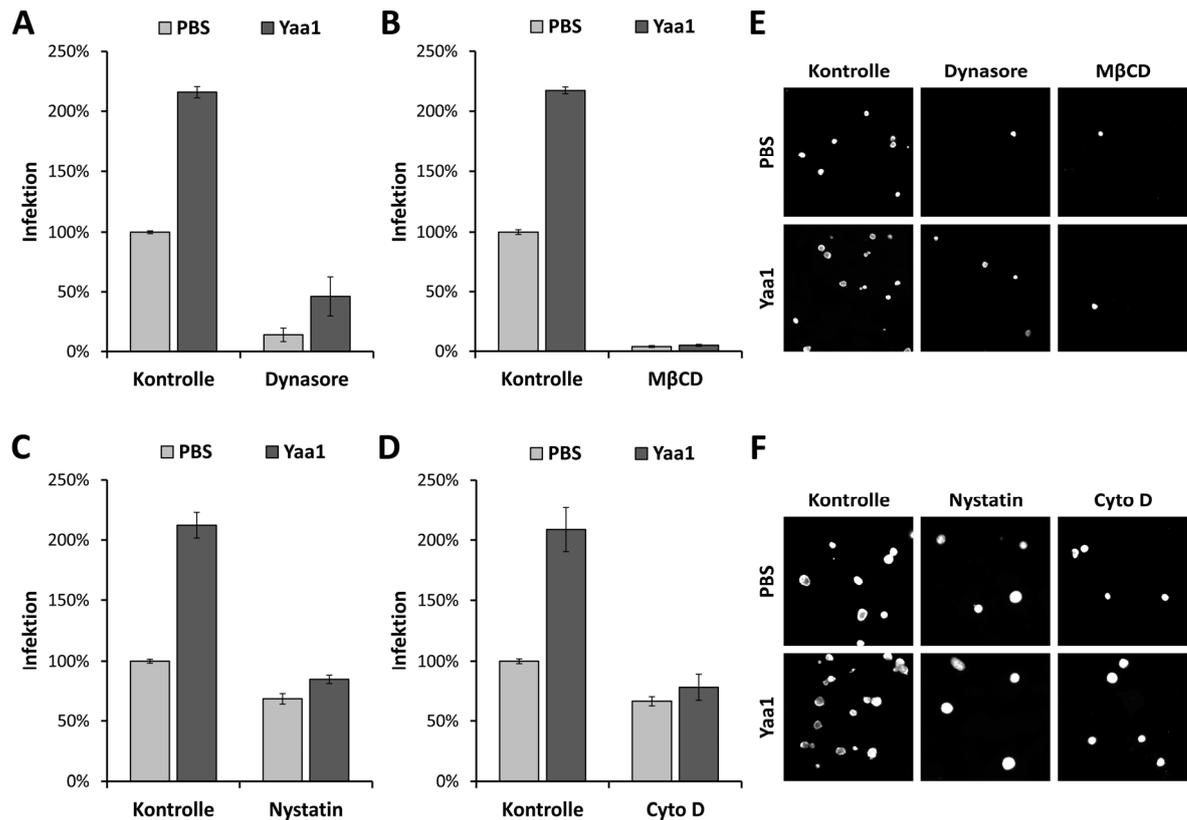
Dynasore inhibiert spezifisch Dynamin I und Dynamin II (Macia, Ehrlich et al. 2006; Kirchhausen, Macia et al. 2008). Dynamin ist ein Schlüsselprotein der Endozytose und für die Abschnürung des Endozytosevesikels von der Plasmamembran verantwortlich (Doherty and McMahon 2009; McMahon and Boucrot 2011). Mit Dynasore werden somit späte Schritte der Endozytose inhibiert. M $\beta$ CD entfernt Cholesterol aus der Membran und zerstört somit die Integrität von Mikrodomänen der Plasmamembran (Lipid Rafts) (Kilsdonk, Yancey et al. 1995). In einer anderen Studie konnte bereits gezeigt werden, dass die Internalisierung von *C. pneumoniae* EBs unter M $\beta$ CD deutlich reduziert ist (Korhonen, Puolakkainen et al. 2012). Da die Behandlung von humanen HEp-2 Zellen mit M $\beta$ CD weitere Nebeneffekte auf diese hat (Vercauteren, Vandenbroucke et al. 2010), wurde die Bedeutung von Lipid Rafts weiter untersucht indem Nystatin als Inhibitor verwendet wurde, welches die laterale Organisation

der Lipid Rafts stört und somit Lipid Raft-abhängige Endozytosemechanismen erschwert (Rothberg, Heuser et al. 1992). Ebenso wie für M $\beta$ CD war bekannt, dass die Behandlung von Humanzellen mit Nystatin zu einer Reduktion der *C. pneumoniae* Infektion führte (Korhonen, Puolakkainen et al. 2012). Als vierter Inhibitor wurde Cytochalasin D eingesetzt, der zur Depolymerisation des Aktin-Zytoskeletts führt. Aktin ist ein bekannter, essentieller Baustein der chlamydialen Internalisierung (Majeed and Kihlstrom 1991; Boleti, Benmerah et al. 1999) und zudem bei der Endozytose von großen Partikeln wie chlamydialen EBs nötig, um genügend Zugwirkung auf das sich entwickelnde Endozytosevesikel auszuüben (Doherty and McMahon 2009; Sandvig, Pust et al. 2011).

Zunächst wurde durch Vorbehandlung der Humanzelle mit dem Inhibitor Dynasore Dynamamin inhibiert. Die Behandlung der Humanzellen mit 0,1 mM Dynasore führte in der PBS-Kontrolle zu einer deutlichen Reduktion der Infektion auf  $13,6 \pm 5,5$  % (Abbildung 4.21 A, E). Die Zugabe von rYaa1<sub>10xHis</sub> unter Dynamamin-Inhibierung hingegen bewirkte lediglich eine Reduktion der Infektion auf  $46,2 \pm 16,2$  %. Somit wurde die Infektion durch rYaa1<sub>10xHis</sub> umgerechnet um  $338,9 \pm 119,0$  % gesteigert.

Als nächstes wurde der Effekt von rYaa1<sub>10xHis</sub> unter M $\beta$ CD und somit auf Zellen mit zerstörten Lipid Rafts analysiert. Die Behandlung der HEP-2 Zellen mit 5 mM M $\beta$ CD führte unter PBS zu einer drastischen Reduktion der Infektion auf  $3,9 \pm 0,8$  % (Abbildung 4.21 B, E). Im Gegensatz zur Behandlung mit Dynasore konnte hier mit  $4,9 \pm 0,8$  % Infektion kein infektionssteigernder Effekt durch rYaa1<sub>10xHis</sub> mehr beobachtet werden. Auch die Zerstörung der Integrität von Lipid Rafts durch 30 mg/ml Nystatin führte unter PBS zu einer Reduktion der Infektion auf  $68,2 \pm 4,4$  %. (Abbildung 4.21 C, F). Unter Zugabe von rYaa1<sub>10xHis</sub> wurde die Infektion auf  $84,3 \pm 3,4$  % reduziert. Dies bedeutet, dass die infektionssteigernde Wirkung von rYaa1<sub>10xHis</sub> unter Nystatin umgerechnet lediglich bei  $123,7 \pm 5,0$  % lag und im Vergleich zur Kontrollbehandlung ( $212,1 \pm 10,5$  %) deutlich geringer ausfiel.

Abschließend wurde untersucht, welchen Effekt die Depolymerisation des Aktin-Zytoskeletts durch Cytochalasin D (Cyto D) auf die infektionssteigernde Wirkung von rYaa1<sub>10xHis</sub> hat. Die Behandlung der HEP-2 Zellen mit 20  $\mu$ M Cytochalasin D führte unter PBS-Behandlung zu einer Reduktion der Infektion auf  $66,2 \pm 3,8$  % (Abbildung 4.21 D, F). Unter Zugabe von rYaa1<sub>10xHis</sub> wurde die Infektion auf  $77,9 \pm 10,8$  % reduziert. Dies bedeutete, dass die infektionssteigernde Wirkung von rYaa1<sub>10xHis</sub> unter Cytochalasin umgerechnet lediglich bei  $117,6 \pm 16,3$  % lag und im Vergleich zur Kontrollbehandlung ( $208,6 \pm 18,1$  %), wie auch schon unter Nystatin, deutlich geringer ausfiel. Da die spezifischen Inhibitoren mit dem Medienwechsel 2 hpi entfernt wurden, war es sehr unwahrscheinlich, dass sie einen zusätzlichen Effekt nach der Internalisierung des EBs hatten.



**Abbildung 4.21: Auswirkung von Endozytoseinhibitoren auf die Infektionssteigerung durch rYaa1**

**A-D:**  $1 \times 10^6$  humane HEP-2 Zellen wurden mit Endozytoseinhibitoren oder Kontrollen bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend infiziert, indem das Medium mit Medium inklusive Inhibitor, PBS oder 100 µg/ml rYaa1<sub>10xHis</sub> und EBs ersetzt wurde (MOI=20). Diese Schritte wurden mit serumfreiem Medium durchgeführt. Nach 2 h Infektion bei 37 °C wurde das Medium gewechselt (nun mit FKS). Die Infektiösität wurde 50 hpi bestimmt, indem mikroskopisch die Anzahl der gebildeten Einschlüsse in 10 Gesichtsfeldern unter 63-facher Objektvergrößerung gezählt wurden. Die Vorbehandlung der Humanzellen mit PBS unter Kontrollbedingungen wurde auf 100 % Infektion gesetzt. Die Experimente wurden in Dubletten durchgeführt (n=3).

**A:** Behandlung der HEP-2 Zellen für 30 min mit 0,1 mM Dynasore oder DMSO zur Kontrolle, **B:** Behandlung der HEP-2 Zellen für 60 min mit 5 mM Methyl-beta-Cyclodextrin (MβCD) oder PBS zur Kontrolle, **C:** Behandlung der HEP-2 Zellen für 30 min mit 30 µM Nystatin oder PBS zur Kontrolle, **D:** Behandlung der HEP-2 Zellen für 45 min mit 20 µM Cytochalasin D (Cyto D) oder DMSO zur Kontrolle.

**E,F:** Repräsentative mikroskopische Bilder der Infektion der HEP-2 Zellen unter unterschiedlichen Endozytoseinhibitoren. Die Einschlüsse wurden mit Pathfinder (1:6) gefärbt.

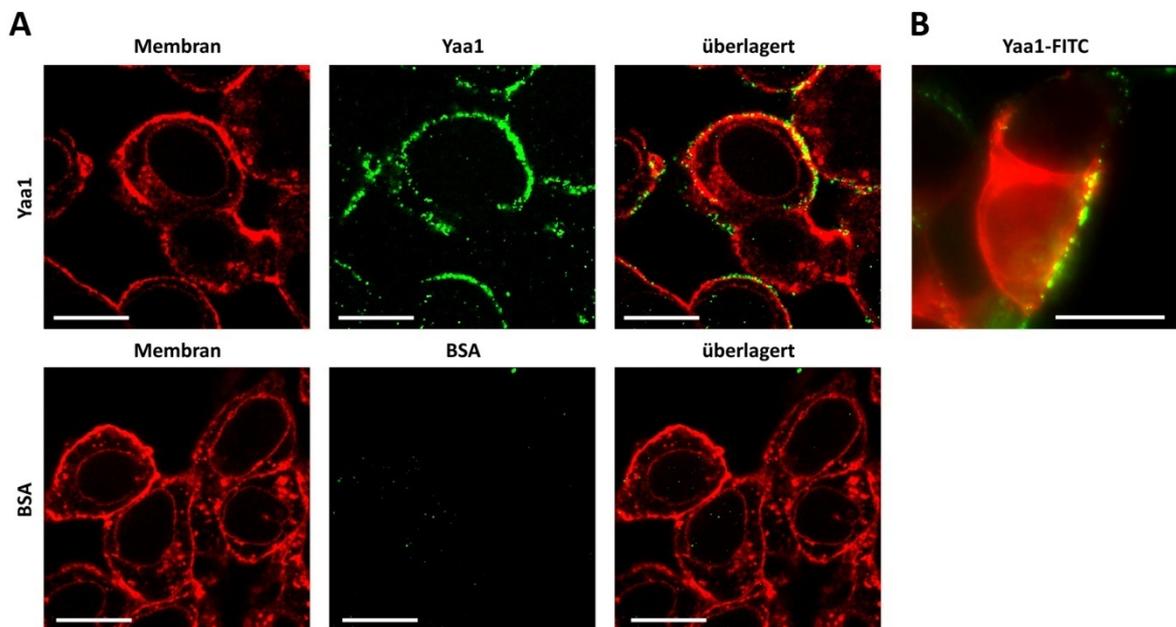
Zusammenfassend zeigten die Experimente mit verschiedenen Endozytoseblockern, dass Yaa1 während der frühen Prozesse der Endozytose wirkt, da unter Inhibierung von Dynamin, einem Schlüsselprotein, das spät in der Endozytose wichtig ist, die infektionssteigernde Wirkung von rYaa1<sub>10xHis</sub> noch sichtbar war. Hingegen war der infektionssteigernde Effekt von rYaa1<sub>10xHis</sub> nicht mehr sichtbar, wenn Endozytose über Lipid Rafts inhibiert wurde. Demnach ist die Funktion von Yaa1 während frühen Phasen der Endozytose abhängig von der Integrität von Lipid Rafts. Zudem konnte die Erhöhung der Infektion durch rYaa1 nicht mehr beobachtet werden, wenn das Aktin-Zytoskelett zerstört wurde.

### 4.3.8 Die Bedeutung von Lipid Raft Mikrodomänen während der Internalisierung

Da gezeigt werden konnte, dass die infektionssteigernde Wirkung abhängig von der Integrität von Lipid Rafts war, sollte folgend die Assoziation von Lipid Rafts mit rYaa1<sub>10xHis</sub> sowie der chlamydialen Infektion mikroskopisch untersucht werden.

#### 4.3.8.1 Yaa1 assoziiert mit Lipid Raft Mikrodomänen der humanen Zelle

Zunächst wurde überprüft, wie und wo rYaa1<sub>10xHis</sub> mit der humanen HEp-2 Zelle assoziiert. Die Kontrollfärbung BSA-behandelter Zellen zeigte kein Signal (Abbildung 4.22 A unten).



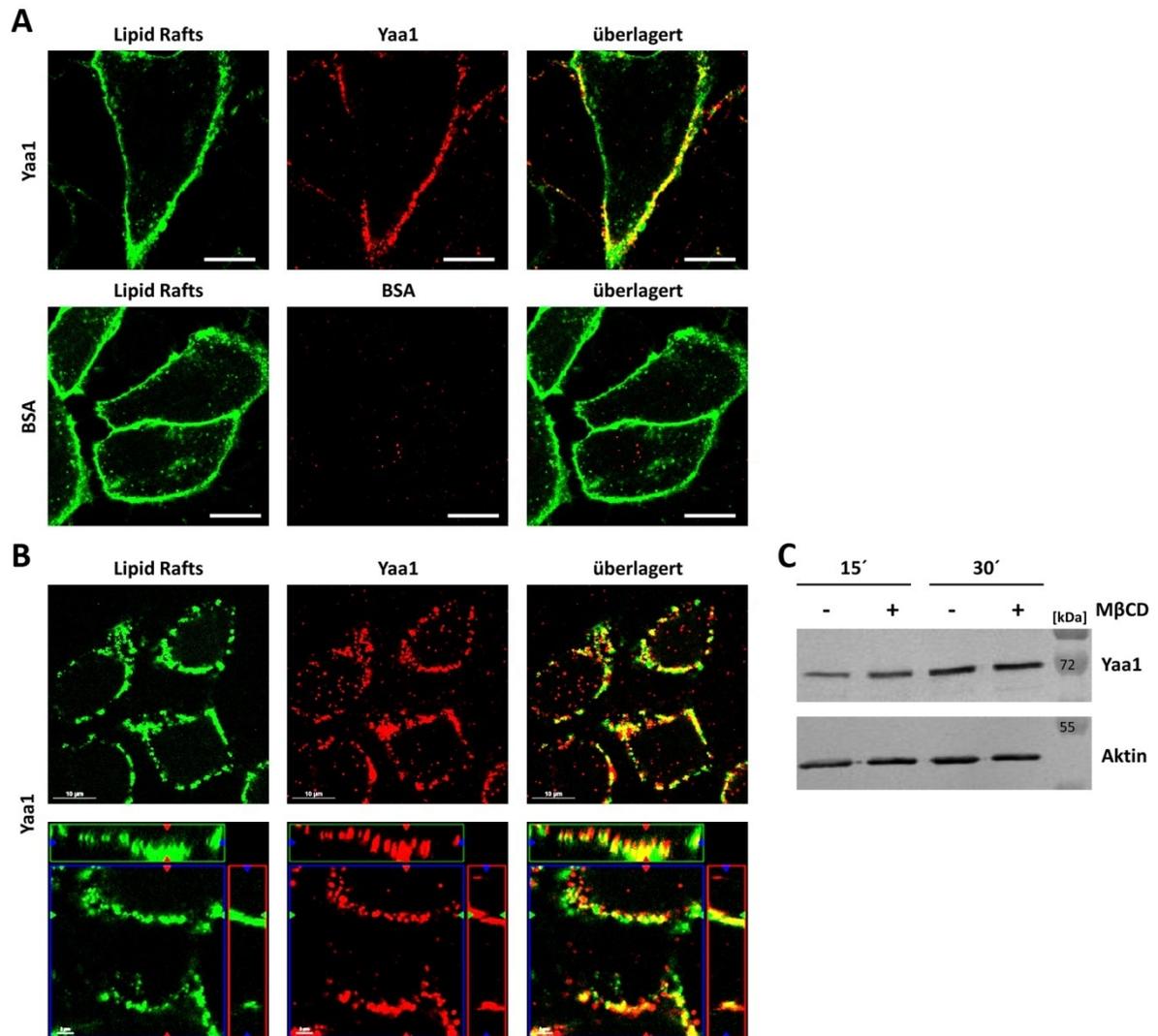
**Abbildung 4.22: Assoziation von rYaa1 mit der Plasmamembran humaner Zellen**

**A:**  $5 \times 10^5$  humane HEp-2 Zellen wurden 15 min bei 4 °C abgekühlt und anschließend für 15 min mit 20 µg/ml BSA oder Yaa1<sub>10xHis</sub> bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden intensiv mit PBS gewaschen, PFA fixiert und mit 2 % Saponin permeabilisiert. Die Detektion von rYaa1<sub>10xHis</sub> erfolgt durch primären Maus-anti-His Antikörper (1:50) und sekundärem Alexa488-gekoppelten anti-Maus Antikörper (1:200). Membranen wurden mit 2 µg/ml Alexa594-gekoppeltem Wheat germ Agglutinin (WGA) gefärbt. Längenmarker: 20 µm

**B:**  $5 \times 10^5$  humane HEp-2 Zellen wurden 15 min bei 4 °C abgekühlt und anschließend für 15 min mit 20 µg/ml FITC-gekoppeltem Yaa1<sub>10xHis</sub> bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden intensiv mit PBS gewaschen und PFA fixiert. Membranen wurden mit 2 µg/ml Alexa594-gekoppeltem Wheat germ Agglutinin (WGA) gefärbt. Längenmarker: 20 µm

Hingegen war für rYaa1<sub>10xHis</sub> ein Signal erkennbar, welches direkt mit der gefärbten Plasmamembran der Humanzelle kolokalisierte (Abbildung 4.22 A oben). Zudem zeigte die Färbung keine homogene Verteilung über die gesamte Plasmamembran der Humanzelle, sondern ein punktiertes Verteilungsmuster. Diese punktuellen Signale für rYaa1<sub>10xHis</sub> konnten ebenfalls beobachtet werden, wenn direkt FITC-markiertes rYaa1<sub>10xHis</sub> mit den HEp-2 Zellen

inkubiert wurde (Abbildung 4.22 B). Somit war eine Lokalisation von rYaa1<sub>10xHis</sub> an spezifische Bereiche der Membran sichtbar.



**Abbildung 4.23: Lokalisation von Lipid Rafts und rYaa1**

**A,B:**  $5 \times 10^5$  humane HEp-2 Zellen wurden 15 min bei 4 °C abgekühlt und anschließend für 15 min mit 20 µg/ml BSA oder Yaa1<sub>10xHis</sub> und 10 µg/ml FITC-markiertem Choleraerotoxin Untereinheit B (CT-B) bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden intensiv mit PBS gewaschen, PFA fixiert und mit 2 % Saponin permeabilisiert. Die Detektion von rYaa1<sub>10xHis</sub> erfolgt durch primären Maus-anti-His Antikörper (1:50) und sekundärem Alexa594-gekoppelten anti-Maus Antikörper (1:200). Längenmarker: A: 20 µm B oben: 10 µm B unten: 2 µm

**C:**  $1 \times 10^6$  humane HEp-2 Zellen wurden für 60 min mit 5 mM Methyl-beta-Cyclodextrin (MβCD) oder PBS bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µg/ml Yaa1<sub>10xHis</sub> unter Anwesenheit oder Abwesenheit von MβCD für 15 min oder 30 min inkubiert und intensiv mit PBS gewaschen. Die Bestimmung von gebundenem rYaa1<sub>10xHis</sub> erfolgte über Westernblotanalyse durch Detektion mit primärem Maus-anti-His Antikörper (1:2000) und sekundärem AP-gekoppelten anti-Maus Antikörper (1:7500) (n=3). Yaa1<sub>10xHis</sub> (55 kDa), Proteinmarker: PageRuler

Um zu überprüfen, ob die spezifischen Bereiche, an denen rYaa1 lokalisierte, Lipid Rafts waren, wurden Humanzellen parallel mit rYaa1<sub>10xHis</sub> und dem klassischen Lipid Raft-Marker Choleraerotoxin Untereinheit B (CT-B) inkubiert. Die Färbung der Lipid Rafts zeigte eine

inhomogene Verteilung mit Bereichen der Plasmamembran mit stärkerer und schwächerer Intensität (Abbildung 4.23 A). Eine nahezu identische Verteilung konnte für rYaa1<sub>10xHis</sub> beobachtet werden. Die Assoziation von Lipid Rafts und rYaa1<sub>10xHis</sub> wurde deutlicher sichtbar, wenn Zellen mikroskopiert wurden, die eine stärkere Abgrenzung von Lipid Raft positiven und negativen Bereichen der Plasmamembran zeigten (Abbildung 4.23 B). rYaa1<sub>10xHis</sub> konnte hier hauptsächlich an Bereichen nachgewiesen werden, die positiv für Lipid Rafts waren. In der konfokalen Mikroskopie war zu erkennen, dass das Lipid Raft-Signal und das Signal für rYaa1 teilweise überlagert, das rYaa1-Signal aber zudem auch auf dem Lipid Raft-Signal „aufgelagert“ sichtbar war.

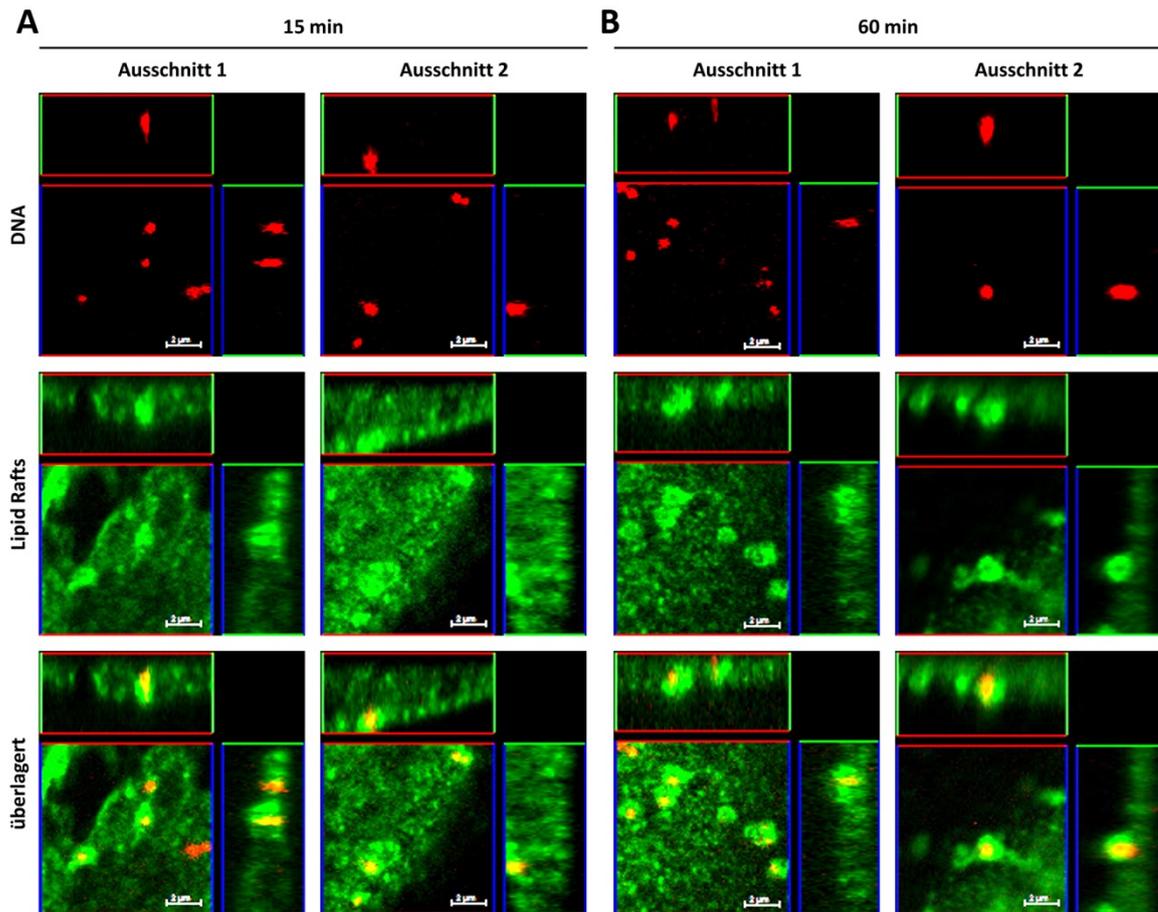
Da somit gezeigt werden konnte, dass rYaa1<sub>10xHis</sub> spezifisch an Lipid Rafts bindet, stellte sich die Frage, ob die Zerstörung der Integrität der Lipid Rafts mit M $\beta$ CD einen negativen Einfluss auf die Bindung von rYaa1<sub>10xHis</sub> an die Humanzelle hatte.

Bei der Analyse von HEp-2 Zellen mit zerstörten Lipid Rafts konnte kein Unterschied in der Bandenintensität von rYaa1<sub>10xHis</sub> zu HEp-2 Zellen mit intakten Lipid Rafts festgestellt werden. Diese Experimente zeigten, dass rYaa1<sub>10xHis</sub> spezifisch mit Lipid Raft positiven Strukturen der Humanzellenmembran assoziierte, die Bindung des Proteins an die humane Plasmamembran jedoch unabhängig von der Integrität der Lipid Rafts war.

#### 4.3.8.2 Chlamydien internalisieren an Lipid Raft Mikrodomänen

Da die Integrität von Lipid Rafts für die Internalisierung der chlamydialen EBs essentiell war (Abbildung 4.21 B, (Korhonen, Puolakkainen et al. 2012)) und rYaa1<sub>10xHis</sub> spezifisch an Lipid Rafts der Humanzelle nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4.23), sollte die Assoziation von Lipid Rafts mit dem frühen Einschluss mikroskopisch untersucht werden. Hierzu wurden mit *C. pneumoniae* infizierte HEp-2 Zellen 15 min und 60 min nach Infektion fixiert. Die chlamydialen EBs wurden mit DAPI gefärbt und die Lipid Raft-positiven Mikrodomänen mit FITC-CT-B. Bereits nach 15 min zeigte sich eine Kolo-kalisation von Lipid Raft-positiven Membranstrukturen und chlamydialen EBs (Abbildung 4.24 A). Nach 60 min wurden alle internalisierten EBs von Lipid Raft-angereicherten Strukturen umrundet (Abbildung 4.24 B). Daher konnte erstmals mikroskopisch nachgewiesen werden, dass die frühe Einschlussmembran bei *C. pneumoniae* stark angereichert mit Lipid Rafts ist und EBs Lipid Rafts als Eintrittsporte in die Humanzelle nutzen.

Da Lipid Rafts angereichert sind mit Rezeptoren wie dem Epidermal growth factor Rezeptor (EGFR), der den humanen Interaktionspartner des chlamydialen Adhäsins Pmp21 darstellt (Moelleken, Becker et al. unveröffentlicht), wurde folgend überprüft, ob die Lipid Raft-positiven Strukturen mit EGFR-positiven Strukturen kolo-kalisieren.



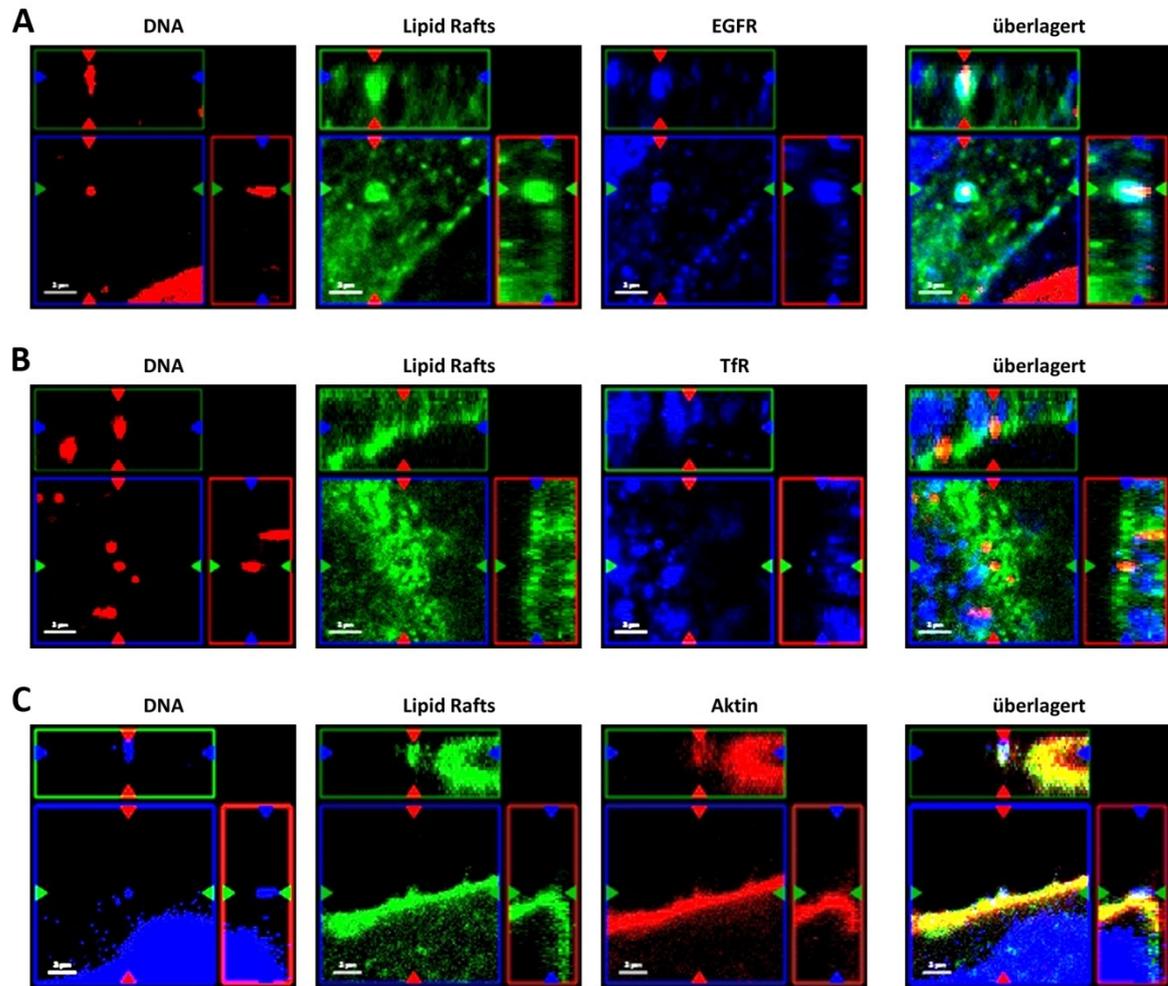
**Abbildung 4.24: Bedeutung von Lipid Rafts für die Internalisierung der EBs**

$5 \times 10^5$  humane HEP-2 Zellen wurden 15 min bei 4 °C gekühlt und anschließend mit *C. pneumoniae* EBs infiziert. Die EBs wurden zunächst bei 4 °C für 15 min bei 2800 Upm an zentrifugiert. Die Infektion erfolgte für 15 min (A) oder 60 min (B) bei 37 °C. Die infizierten Zellen wurden mit PFA fixiert und mit 2 % Saponin permeabilisiert. EBs wurden mit DAPI (1:1000) gefärbt, Lipid Rafts mit 10 μg/ml FITC-markiertem CT-B. Zur besseren Veranschaulichung wurde der DAPI-Färbung die Fehlfarbe rot zugeordnet. Längensmarker: 2 μm

Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die frühe Einschussmembran (60 min nach Infektion) sowohl stark angereichert für Lipid Rafts als auch für EGFR ist (Abbildung 4.25 A). Hierbei überlagerte das Lipid Raft-Signal perfekt mit dem EGFR-Signal. Hingegen konnte keine Anreicherung des Transferrin Rezeptors (TfR) beobachtet werden, der bisher auch nicht mit der *C. pneumoniae* Infektion in Verbindung gebracht wurde (Abbildung 4.25 B). Diese Beobachtungen untermauern somit die Bedeutung von Lipid Rafts und dem EGFR für die Internalisierung der chlamydialen EBs.

Da Aktin für die Internalisierung essentiell war (Abbildung 4.21 D, (Majeed and Kihlstrom 1991)) und Chlamydien über die Sekretion von Typ-III-sekretierten Effektorproteinen Aktin direkt an der Bindestelle polymerisieren (Clifton, Fields et al. 2004), sollte die EB-induzierte Aktinpolymerisation mit Lipid Rafts in Verbindung gebracht werden. Hierzu wurden 15 min nach Infektion adhärenzte EBs, Lipid Rafts und Aktin gefärbt. An der Stelle des adhärenzten

EBs konnten leichte Auswüchse von Aktin beobachtet werden, die ebenfalls angereichert an Lipid Rafts waren (Abbildung 4.25 C).



**Abbildung 4.25: Kolokalisation von Lipid Rafts und Rezeptoren in frühen Einschlüssen**

$5 \times 10^5$  humane HEp-2 Zellen wurden 15 min bei 4 °C gekühlt und anschließend mit *C. pneumoniae* EBs infiziert. Die EBs wurden zunächst bei 4 °C für 15 min bei 2800 Upm an zentrifugiert. Die Infektion erfolgte für 60 min (**A**, **B**) oder 15 min (**C**) bei 37 °C. EBs wurden mit DAPI (1:1000) gefärbt, Lipid Rafts mit 10 µg/ml FITC-markiertem CT-B. **A**,**B**: Zur besseren Veranschaulichung wurde der DAPI-Färbung die Fehlfarbe rot zugeordnet, der Rezeptorfärbung die Fehlfarbe blau.

**A**: Färbung mit primärem Maus-anti-EGFR (1:50) und sekundärem Alexa594-gekoppeltem anti-Maus Antikörper (1:200). **B**: Färbung mit primärem Maus-anti-hTfR (1:100) und sekundärem Alexa594-gekoppeltem anti-Maus Antikörper (1:200). **C**: Färbung mit Rhodamine Phalloidin. Längensmarker: 2 µm

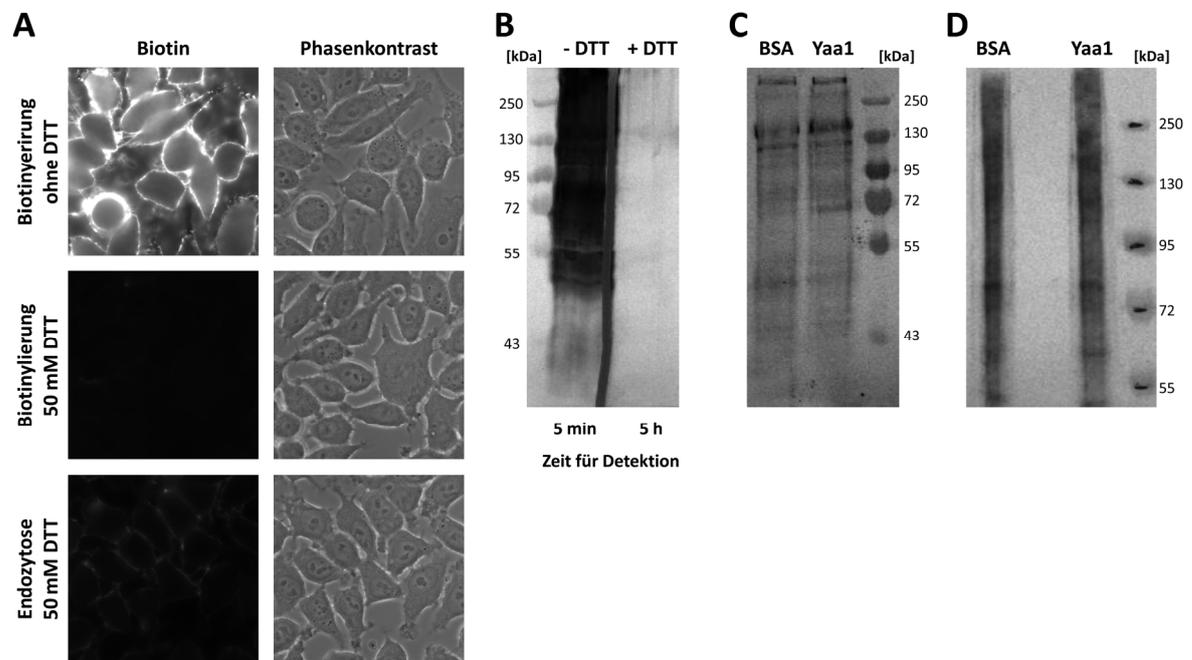
Zusammenfassend zeigte die Mikroskopie, dass *C. pneumoniae* EBs an Lipid Rafts internalisierten. Der frühe Einschluss war zudem angereichert mit Lipid Rafts und EGFR, der ein spezifischer Rezeptor für *C. pneumoniae* ist. Zudem konnte rYaa1<sub>10xHis</sub> direkt mit Lipid Rafts in Verbindung gebracht werden, was die Wirkung von Yaa1 auf Lipid Raft-abhängige, frühe Prozesse der Endozytose untermauerte. Jedoch war die Bindung von rYaa1 an Humanzellen nicht abhängig von der Integrität von Lipid Rafts.

### 4.3.9 Der Einfluss von Yaa1 auf Endozytoseprozesse

Da gezeigt werden konnte, dass Yaa1 an frühen Endozytoseprozessen der chlamydialen EBs beteiligt ist, die an Lipid Rafts stattfinden, sollte untersucht werden, ob Yaa1 selber endozytiert wird, oder bestimmte Endozytoseprozesse spezifisch begünstigt.

#### 4.3.9.1 rYaa1 steigert die allgemeine Endozytose nicht

Zunächst wurde überprüft, ob lösliches rYaa1<sub>10xHis</sub> einen stimulierenden Effekt auf die allgemeine Endozytose von Humanzellen hat. Hierzu wurde die Oberfläche humaner HEp-2 Zellen reversibel biotinyliert und Endozytose unter der Einwirkung von rYaa1<sub>10xHis</sub> erlaubt. Anschließend wurde die Oberfläche der HEp-2 Zellen wieder debiotinyliert, um ausschließlich internalisierte Biotinsignale zu detektieren.



**Abbildung 4.26: Einfluss von rYaa1 auf die allgemeine Endozytose der Humanzelle**

**A:** Mikroskopische Überprüfung der experimentellen Durchführbarkeit. Vorgekühlte HEp-2 Zellen wurden für 30 min bei 4 °C mit 0,25 mg/ml Sulfo-NHS-SS-Biotin biotinyliert (oben) und mit 50 µM DTT für 30 min bei 4 °C debiotinyliert (Mitte). Nach der Biotinylierung wurde für 30 min bei 37 °C Endozytose zugelassen und anschließend bei 4 °C debiotinyliert (unten). Biotin wurde mit 20 nM fluoreszierenden Streptavidin-Qdot605 detektiert.

**B:** Westernblot zur Überprüfung der experimentellen Durchführbarkeit. Eine 80 % konfluent mit HEp-2 Zellen bewachsene 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche wurde 20 min bei 4 °C vorgekühlt und 30 min bei 4 °C mit 0,25 mg/ml Sulfo-NHS-SS-Biotin biotinyliert. Die Reaktion wurde mit 50 mM Tris-HCl pH 7,8 für 30 min bei 4 °C abgestoppt. Die Zellen wurden anschließend mit PBS oder zur Debiotinylierung mit 50 mM DTT für 30 min bei 4 °C behandelt. Die Detektion erfolgte mit AP-gekoppeltem Streptavidin (1:2000).

**C:** Die Biotinylierung der HEp-2 Zellen erfolgte wie unter B beschrieben. Die HEp-2 Zellen wurden folgend mit 2 ml 100 µg/ml BSA oder rYaa1<sub>10xHis</sub> für 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Temperatur für 20 min auf 37 °C erhöht und die Zellen folgend mit kaltem HBSS gewaschen. Oberflächenzugängliches Biotin wurde mit 50 µM DTT für 30 min bei 4 °C entfernt. Die Detektion erfolgte mit AP-gekoppeltem Streptavidin (1:2000).

Zunächst wurden die einzelnen Schritte des Experimentes mikroskopisch überprüft (Abbildung 4.13 A). Nach dem Biotinylierungsschritt bei 4 °C zeigten die humanen Zellen ein deutliches Signal an den Rändern, was die erfolgreiche Biotinylierung der oberflächenzugänglichen Moleküle bestätigte. Durch die Zugabe von 50 µM DTT zur Debiotinylierung bei 4 °C konnten die Signale vollständig entfernt werden. Erlaubte man vor der Debiotinylierung die Endozytose, so waren immer noch schwache Biotin-Signale an der Zellmembran zu erkennen, was bedeutete, dass biotinylierte Rezeptoren endozytiert worden waren. In Westernblots wurden Zellysate biotinylierter HEp-2 Zellen (-DTT) und Zellysate erst biotinylierter und dann debiotinylierter HEp-2 Zellen (+DTT) verglichen (Abbildung 4.26 B). Während bei biotinylierten Zellen starke biotinmarkierte Proteinbanden zu sehen waren, konnten in Zellysaten debiotinylierter Zellen keine Banden detektiert werden. Zudem ist hier anzumerken, dass der Blot der Debiotinylierungsprobe 60-mal so lange inkubiert wurde wie der Blot der Biotinylierungsprobe um eventuelle sehr schwache Biotinsignale detektieren zu können. Da die Westernblotanalyse die eindeutig besseren Signale lieferte, wurde das Endozytoseexperiment in Gegenwart von löslichem BSA oder rYaa1<sub>10xHis</sub> mittels Westernblot analysiert.

Der Vergleich der humanen Endozytose biotinmarkierter Oberflächenproteine unter BSA und rYaa1<sub>10xHis</sub>-Einwirkung zeigte keine auffallenden Unterschiede (Abbildung 4.26 C). In beiden Proben waren mehrere spezifische Banden sichtbar, die endozytierte Moleküle repräsentierten. Die Intensitäten dieser Banden waren, bis auf eine Ausnahme, zwischen den beiden Proben vergleichbar. Bei der Behandlung der Zellen mit rYaa1<sub>10xHis</sub> war eine spezifische Bande bei 72 kDa erkennbar, welche vermutlich rYaa1<sub>10xHis</sub> repräsentiert, welches aufgrund von nicht entfernten NHS-SS-Biotin-Molekülen biotinyliert und anschließend endozytiert wurde. Diese Vermutung konnte in Westernblots jedoch nicht überprüft werden, da rYaa1<sub>10xHis</sub> unabhängig von der Endozytose an die Humanzellen bindet und daher in jedem Fall ein Signal für rYaa1<sub>10xHis</sub> detektiert werden kann.

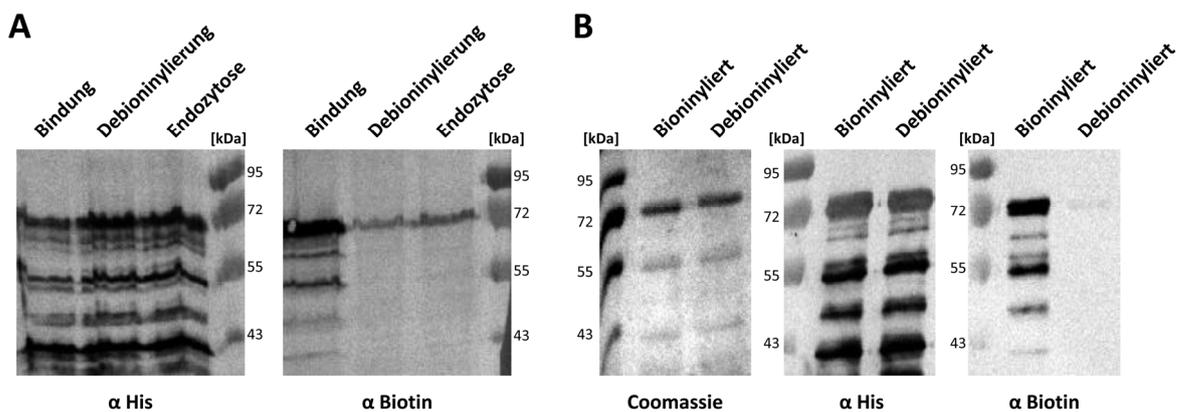
In einem weiteren Westernblot wurde mehr Probe geladen, um die Signalintensität zu erhöhen (Abbildung 4.26 D). Auch hier zeigte der Vergleich der humanen Endozytose unter BSA und rYaa1<sub>10xHis</sub>-Einwirkung keine auffallenden Unterschiede. Aufgrund der Menge geladener Probe war ein starkes Hintergrundsignal zu beobachten, in dem einzelne Banden nur sehr schwer auszumachen waren. Sollte rYaa1<sub>10xHis</sub> jedoch die Endozytose eines oder mehrerer spezifischer Rezeptoren stark begünstigen, so sollte(n) diese Bande(n) trotz des starken Hintergrunds sichtbar sein.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass rYaa1<sub>10xHis</sub> die allgemeine Endozytose der Humanzelle sehr wahrscheinlich nicht erhöht. Lediglich eine 72 kDa Bande konnte in den

rYaa1-stimulierten Zellen spezifisch detektiert werden, die allerdings wahrscheinlich rYaa1<sub>10xHis</sub> repräsentiert.

#### 4.3.9.2 Endozytose von löslichem rYaa1

Daher wurde im nächsten Schritt die Endozytose von löslichem, rYaa1<sub>10xHis</sub> überprüft. Der experimentelle Ansatz war hierbei identisch zu dem des Tests auf allgemeine Endozytose, jedoch wurde in diesem Fall das rekombinante Protein mit Sulfo-HHS-SS-Biotin biotinyliert. Zur Überprüfung, ob lösliches rYaa1<sub>10xHis</sub> endozytiert wurde, wurden die Bandenintensitäten des Biotinsignals von Bindung, Debiotinylierung und Endozytose miteinander verglichen (Abbildung 4.27 A links). Die Menge an Humanzellen-gebundenem rYaa1<sub>10xHis</sub> war in allen drei Proben ungefähr vergleichbar, so dass die Stärke der Biotinsignale annähernd vergleichbar war. Hierbei war nicht nur die spezifische 72 kDa rYaa1-Vollängenbande sichtbar, sondern ebenfalls die in vorangegangenen Experimenten beobachteten Yaa1-Fragmente.



**Abbildung 4.27: Endozytose von löslichem rYaa1**

**A:** Rekombinantes Yaa1<sub>10xHis</sub> wurde mit 20-fachem Überschuss Sulfo-NHS-SS-Biotin für 1 h auf Eis biotinyliert. Die Reaktion wurde anschließend über Nacht mit 50 mM Tris-HCl pH 7,5 abgestoppt. Eine 80 % konfluent mit HEp-2 Zellen bewachsene 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche wurde für 20 min bei 4 °C vorgekühlt. Die HEp-2 Zellen wurden mit 2 ml 100 µg/ml biotinyliertem Yaa1<sub>10xHis</sub> für 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte Endozytose für 20 min bei 37 °C oder für Bindung und Debiotinylierung eine weitere Inkubation bei 4 °C. Die Zellen wurden mit HBSS gewaschen und oberflächenzugängliches Biotin mit 50 mM DTT für 30 min bei 4 °C entfernt. Für die Bindungskontrolle wurde kein DTT eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit AP-gekoppeltem Streptavidin (1:2000) oder mit primärem Maus-anti-His Antikörper (1:2000) und sekundärem AP-gekoppeltem anti-Maus Antikörper (1:7500). Yaa1<sub>10xHis</sub> (55 kDa), Proteinmarker: PageRuler

**B:** Überprüfung der Debiotinylierung von rYaa1. rYaa1<sub>10xHis</sub> wurde mit 20-fachem Überschuss Sulfo-NHS-SS-Biotin für 1 h auf Eis biotinyliert. Die Reaktion wurde anschließend über Nacht mit 50 mM Tris-HCl pH 7,5 abgestoppt. Anschließend wurde die Probe mit oder ohne 50 µM DTT für 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Detektion erfolgte mit AP-gekoppeltem Streptavidin (1:2000) oder mit primärem Maus-anti-His Antikörper (1:2000) und sekundärem AP-gekoppeltem anti-Maus Antikörper (1:7500).

Bei der Bindungskontrolle war ein starkes Biotinsignal bei 72 kDa sichtbar, was die Bindung von biotinyliertem rYaa1<sub>10xHis</sub> an die HEp-2 Zellen zeigt (Abbildung 4.27 A rechts). Hierbei waren verschiedene Yaa1-Fragmente detektierbar, jedoch weniger als bei der Detektion über

den anti-His Antikörper. Die prominenteste Bande war das 55 kDa Fragment und die Fragmente geringerer Größe konnten kaum noch detektiert werden. In der Endozytoseprobe konnte ebenfalls ein Biotinsignal bei 72 kDa detektiert werden, auch wenn dessen Intensität im Vergleich zur Bindungskontrolle in etwa um das Fünffache reduziert war. Interessanterweise konnte hier nur biotinyliertes rYaa1<sub>10xHis</sub> Volllängenprotein nachgewiesen werden. Die prominenten rYaa1<sub>10xHis</sub> Fragmente und das 55 kDa Fragment im Besonderen waren nicht nachweisbar. Demnach konnte angenommen werden, dass ein Teil des gebundenen rYaa1<sub>10xHis</sub> vor der Debiotinylierung geschützt war.

Überraschenderweise konnte auch in der Debiotinylierungskontrolle eine Biotinsignal ähnlicher Intensität bei 72 kDa detektiert werden. Auch hier konnten keine rYaa1-Fragmente detektiert werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Debiotinylierung von rYaa1<sub>10xHis</sub> nicht erfolgreich war.

Daher wurde kontrolliert, ob biotinyliertes rYaa1<sub>10xHis</sub> in Lösung unter den gegebenen Versuchsbedingungen erfolgreich debiotinyliert werden kann. Die Ladekontrollen im Coomassie und Westernblot zeigten, dass jeweils gleiche Mengen an biotinyliertem und debiotinyliertem rYaa1<sub>10xHis</sub> geladen wurden (Abbildung 4.27 B). Ein Biotinsignal konnte jedoch nur in der biotinylierten rYaa1<sub>10xHis</sub> Probe nachgewiesen werden. In der Debiotinylierungsprobe war lediglich ein sehr schwaches Signal bei 72 kDa zu erahnen.

Somit war sehr wahrscheinlich, dass das Biotinsignal im Endozytoseexperiment unter Debiotinylierungsbedingungen nicht auf ein unvollständiges Entfernen des Biotins zurückzuführen war, sondern dass ein Teil des Proteins, trotz inhibierter Endozytose, vor der Debiotinylierung geschützt war.

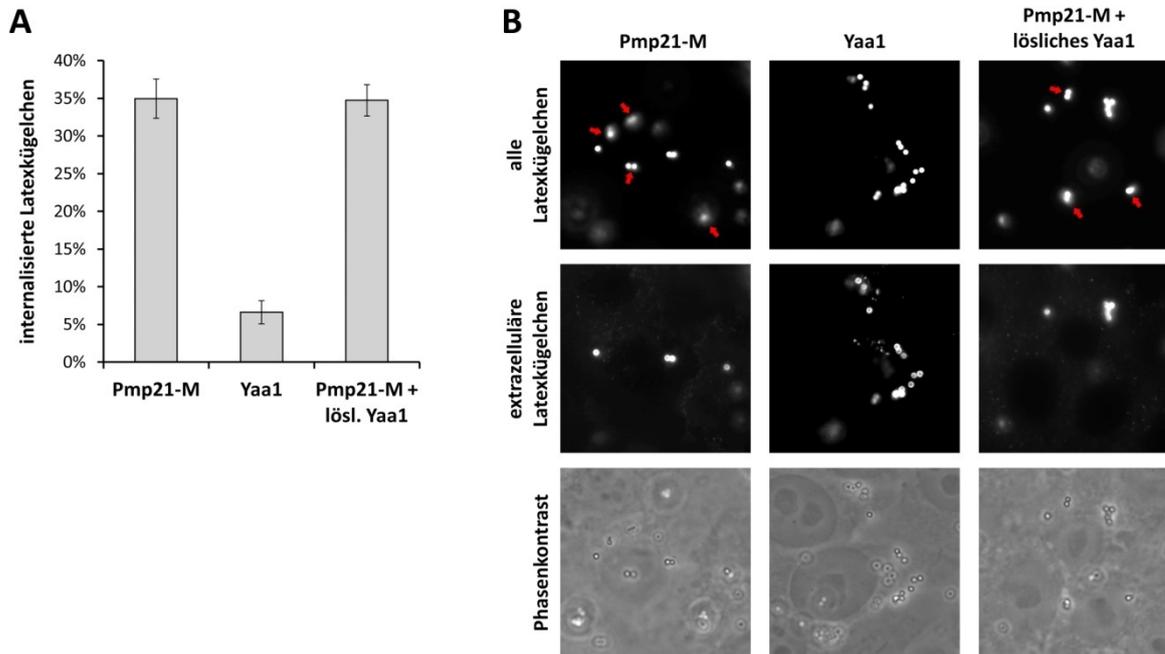
Demnach konnte vermutet werden, dass gebundenes rYaa1<sub>10xHis</sub> zumindest teilweise in die Membran der Humanzelle reicht und dadurch teilweise vor der Debiotinylierung geschützt wurde. Da die Biotinylierung von rYaa1<sub>10xHis</sub> an basischen Aminosäuren erfolgt und diese über das gesamte Protein verteilt sind, kann nicht gemutmaßt werden, welcher Teil des Proteins potentiell in die Membran der Humanzelle reicht.

#### **4.3.9.3 Yaa1 gekoppelte Latexkugeln werden nicht endozytiert**

Da rYaa1<sub>10xHis</sub> eventuell endozytiert wird, wurde folgend überprüft, ob rYaa1 die Endozytose von Protein-beschichteten Latexkugeln stimuliert.

Als Positivkontrolle dienten mit rPmp21M<sub>6xHis</sub>-beschichtete Latexkugeln, die an den humanen EGF-Rezeptor binden und zu etwa 30 % internalisiert werden (Becker unveröffentlicht). Diese Internalisierungsrate konnte experimentell mit  $35,0 \pm 2,6$  % internalisierten Latexkugeln bestätigt werden (Abbildung 4.28). Die mit rYaa1<sub>10xHis</sub>

beschichteten Latexkügelchen zeigten hingegen lediglich eine unspezifische Internalisierungsrate von  $6,6 \pm 1,5 \%$ . Damit vermittelte rYaa1<sub>10xHis</sub> die Endozytose von 1,1  $\mu\text{m}$  großen Latexkügelchen nicht.



**Abbildung 4.28: Wirkung von rYaa1 auf die Internalisierung von Protein-beschichteten Latexkügelchen**

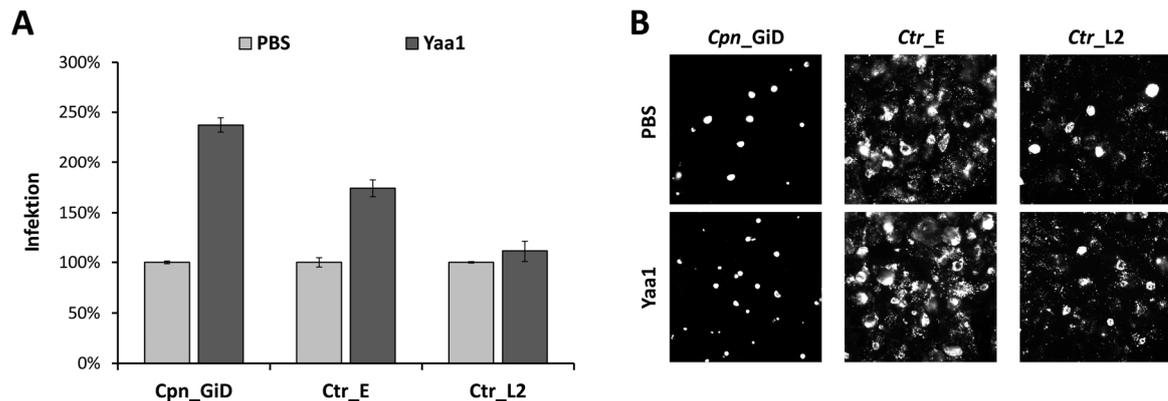
**A:**  $1 \times 10^6$  humane HEP-2 Zellen wurden mit 5-fachem Überschuss an Protein-beschichteten, 1,1  $\mu\text{m}$  großen, grün fluoreszierenden Latexkügelchen für 4 h bei 37 °C inkubiert und anschließend unter mikroskopischer Beobachtung mit PBS gewaschen. Optional wurden HEP-2 Zellen zuvor mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  rYaa1<sub>10xHis</sub> für 1 h bei 37 °C vorbehandelt. Die Fixierung erfolgte mit 3 % PFA für 10 min bei RT, um die Färbung von intrazellulären Latexkügelchen zu verhindern. Extrazelluläre Latexkügelchen wurden mit primärem Kaninchen-anti-Pmp21M oder Kaninchen anti-Yaa1 Antikörper (1:50) und sekundärem Alexa594-gekoppeltem anti-Kaninchen Antikörper detektiert. Die Bestimmung der Internalisierungsrate erfolgte mikroskopisch durch Auszählung der intra- und extrazellulären Latexkügelchen in 10 Gesichtsfeldern unter 63-facher Objektvergrößerung. Die Experimente wurden in Dubletten durchgeführt (n=2).

**B:** Repräsentative mikroskopische Bilder des Internalisierungsexperiments unter 63-facher Objektvergrößerung.

Da jedoch lösliches rYaa1<sub>10xHis</sub>-Protein in der Lag war die chlamydiale Internalisierung zu erhöhen (Abbildung 4.7), wurde nun überprüft, ob die Vorbehandlung der humanen HEP-2 Zellen mit rYaa1<sub>10xHis</sub> die Internalisierung von Pmp21<sub>6xHis</sub>-beschichteten Latexkügelchen erhöhte. Diese Behandlung führte jedoch nicht zu einer Steigerung der Internalisierungsrate der Pmp21M-gekoppelten Latexkügelchen ( $34,7 \pm 2,1 \%$ ). Daher kann festgehalten werden, dass rYaa1<sub>10xHis</sub> die Endozytose von adhärennten 1,1  $\mu\text{m}$  großen Latexkügelchen nicht begünstigte.

#### 4.3.9.4 Wirkung von Yaa1 auf die *C. trachomatis* Infektion

Da in den zuvor durchgeführten Experimenten gezeigt werden konnte, dass rYaa1 weder die allgemeine Endozytose der Humanzelle stimuliert, noch die Internalisierung von 1,1  $\mu\text{m}$  Latexkugeln fördert, konnte spekuliert werden, dass rYaa1 spezifisch die Internalisierung von Chlamydien begünstigt. Daher wurde nun überprüft, ob das *C. pneumoniae*-spezifische Yaa1-Protein nur die Internalisierung von *C. pneumoniae* erhöhte, oder auch die einer anderen humanpathogenen Art (*C. trachomatis*).



**Abbildung 4.29: Wirkung von rYaa1 auf die *C. trachomatis* Infektion**

**A:**  $1 \times 10^6$  humane HEp-2 Zellen wurden für 2 h bei 37 °C mit PBS oder 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  rYaa1<sub>10xHis</sub> inkubiert und mit *C. pneumoniae* (Cpn\_GiD), *C. trachomatis* Serovar E (Ctr\_E) oder *C. trachomatis* Serovar L2 (Ctr\_L2) infiziert. Nach 2 h erfolgte ein Medienwechsel. Die Infektiosität wurde für *C. pneumoniae* 50 hpi, für *C. trachomatis* 24 hpi bestimmt, indem mikroskopisch die Anzahl der gebildeten Einschlüsse in 10 Gesichtsfeldern unter 63-facher Objektvergrößerung gezählt wurde. Die Vorbehandlung der Humanzellen mit PBS wurde auf 100 % Infektion gesetzt. Die Experimente wurden in Dubletten durchgeführt (n=3).

**B:** Repräsentative mikroskopische Bilder der Infektion. Die Einschlüsse wurden mit Pathfinder (1:6) gefärbt.

Die *C. pneumoniae*-Infektion mit rYaa1<sub>10xHis</sub> konnte auf (237,5 ± 7 %) gesteigert werden (Abbildung 4.29). Interessanterweise ließ sich auch die Infektion mit *C. trachomatis* Serovar E durch rYaa1<sub>10xHis</sub> auf 174,0 ± 8,3 % steigern, wobei die Steigerung der Infektion deutlich geringer als bei *C. pneumoniae* ausfiel. Die Infektion mit *C. trachomatis* Serovar L2 hingegen blieb durch rYaa1<sub>10xHis</sub> unbeeinflusst (111,3 ± 10,5 %).

Dies könnte bedeuten, dass *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* Serovar E den gleichen Internalisierungsweg benutzen, hingegen *C. trachomatis* Serovar L2 auf einem anderen Weg internalisiert wird.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass rYaa1 keinen positiven Effekt auf die Endozytose der Humanzellen im Allgemeinen zu haben schien. Auch die Internalisierung von 1,1  $\mu\text{m}$  großen Latexkugeln konnte durch rYaa1<sub>10xHis</sub> nicht verbessert werden. Allerdings war rYaa1<sub>10xHis</sub> in der Lage die Infektion von *C. trachomatis* Serovar E, nicht jedoch die von Serovar L2, zu verbessern.

### 4.3.10 Domänenanalyse von Yaa1

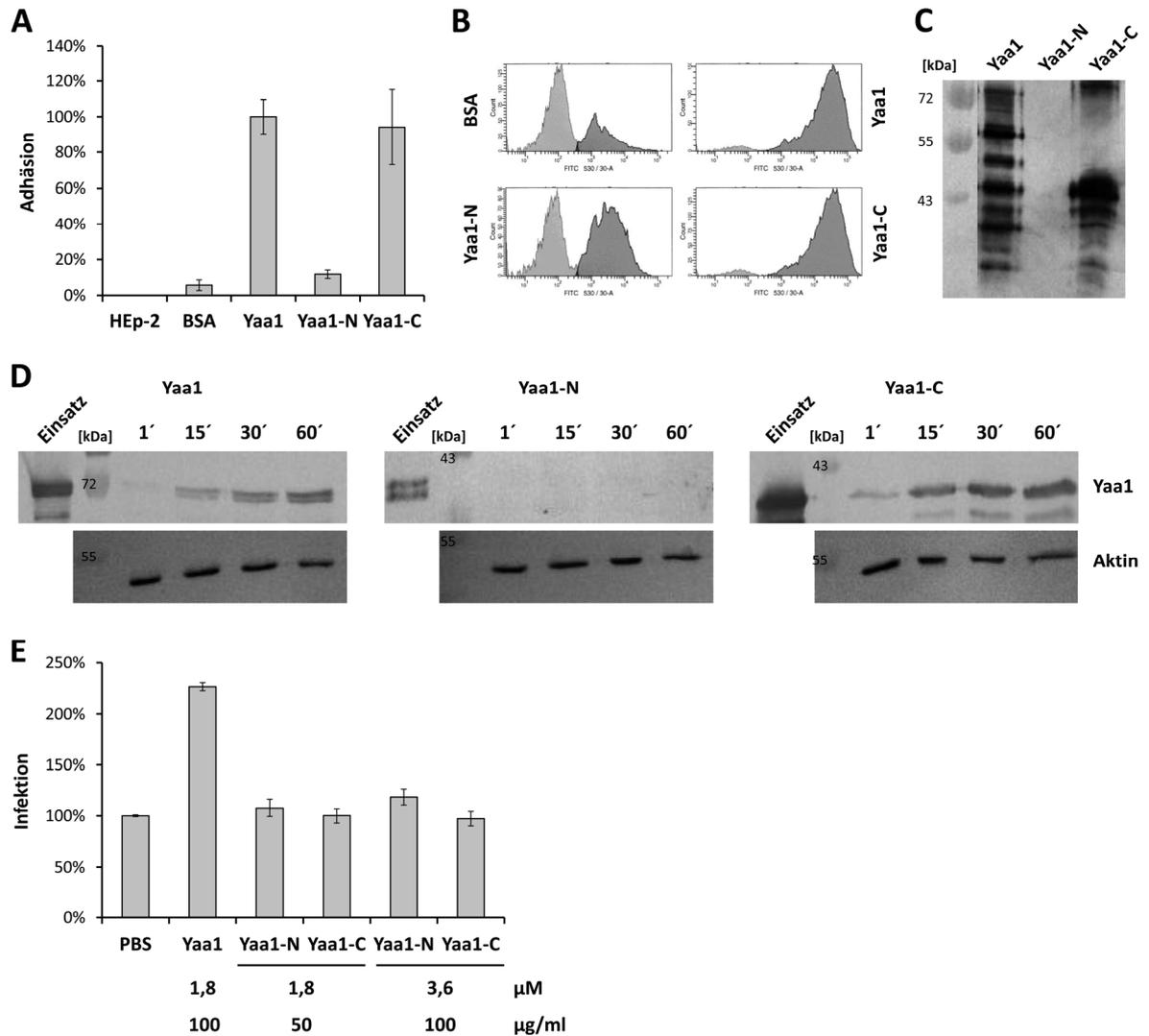
Neben der Funktionsanalyse des Yaa1-Vollängenproteins sollte auch eine Domänenanalyse durchgeführt werden. Dazu wurde das Protein in einen gleich großen N-terminalen (AS 1 - 254) und C-terminalen (AS 255 – 508) Teil unterteilt.

#### 4.3.10.1 Der C-Terminus vermittelt die Bindung an humane Zellen während der N-Terminus essentiell für die infektionssteigernde Wirkung ist

Zunächst wurde untersucht welcher Teil des Proteins für die Adhäsion an die Humanzelle verantwortlich ist. Hierzu wurden Adhäsionsexperimente mit grün fluoreszierenden Latexkugeln und mit löslichem Protein durchgeführt (4.3.5, S. 112).

Bei der Beschichtung der Latexkugeln mit rYaa1<sub>10xHis</sub> war die 72 kDa Vollängenbande deutlich unterrepräsentiert und primär die bekannten Yaa1-Fragmente detektierbar (Abbildung 4.30 C). Bei der Beschichtung mit rYaa1-C<sub>10xHis</sub> (28 kDa) war die Hauptbande bei 43 kDa detektierbar. Somit läuft auch der C-Terminus, wie das rYaa1-Vollängenprotein, deutlich höher als nach dem berechneten Molekulargewicht vermutet. Auch beim rYaa1-C<sub>10xHis</sub> waren verschiedene Degradationsbanden auf den Latexkugeln nachweisbar. Zudem konnte eine Bande bei etwa 80 kDa, in etwa der doppelten Laufhöhe von rYaa1-C<sub>10xHis</sub>, detektiert werden. Die generelle Beschichtung der Latexkugeln mit rYaa1<sub>10xHis</sub> und rYaa1-C<sub>10xHis</sub> war in etwa vergleichbar. Hingegen konnte rYaa1-N<sub>10xHis</sub> nicht detektiert werden. Allerdings war die Detektion von rYaa1-N<sub>10xHis</sub> über den His-Tag aus unbekanntem Grund sehr schwierig. Die Auswertung des Bindeassays ergab, dass mit dem C-terminalen Fragment-beschichtete Latexkugeln ebenso gut an humane HEP-2 Zellen adhärten wie mit Vollängenprotein-beschichtete Latexkugeln (Abbildung 4.30 A, B). Kugeln, bei denen das N-terminale Fragment zur Beschichtung eingesetzt wurde, zeigten hingegen keine Adhäsion ( $11,9 \pm 2,4$  %). Jedoch war zu berücksichtigen, dass eine erfolgreiche Beschichtung der Kugeln mit rYaa1-N<sub>10xHis</sub> nicht nachgewiesen werden konnte.

Daher wurden die adhäsiven Eigenschaften auch im Bindeassay mit löslichem Protein überprüft. Auch hier konnte rYaa1-C<sub>10xHis</sub> ebenso wie rYaa1<sub>10xHis</sub> bereits nach 15 min an die Humanzellen gebunden detektiert werden (Abbildung 4.30 D). Die Bindungskinetiken des Vollängenproteins und des C-terminalen Fragments unterschieden sich hierbei nicht signifikant. Auch in diesem experimentellen Ansatz konnte keine Bindung von rYaa1-N<sub>10xHis</sub> an HEP-2 Zellen nachgewiesen werden, obgleich rYaa1-N<sub>10xHis</sub> in der Ladekontrolle detektiert werden konnte. Somit konnte gezeigt werden, dass rYaa1 über den C-terminalen Bereich an Humanzellen adhärnt.



#### Abbildung 4.30: Domänenanalyse von rYaa1

**A-C:** Bindung von rYaa1-beschichteten Latexkugeln an humane Zellen.  $1 \times 10^9$  grün fluoreszierende,  $1,1 \mu\text{m}$  Latexkugeln wurden mit  $100 \mu\text{g/ml}$  rekombinantem Protein gekoppelt und im 10-fachen Überschuss mit  $1 \times 10^6$  HEp-2 Zellen für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, anschließend unter mikroskopischer Beobachtung gewaschen, abgelöst und PFA-fixiert. Die Adhäsionsanalyse erfolgte durch Bestimmung der mittleren Fluoreszenz von 10000 HEp-2 Zellen mittels FACS-Aria. Die Experimente wurden in Triplets durchgeführt ( $n=4$ ).

**A:** Quantitative Auswertung der Bindung grün fluoreszierender Latexkugeln an 10000 HEp-2 Zellen. Die Bindung der  $\text{Yaa1}_{10 \times \text{His}}$ -gekoppelten Latexkugeln wurde auf 100 % Adhäsion gesetzt.

**B:** Repräsentative Darstellungen der FACS-Ausgabedatei mit Gegenüberstellung der Intensität der Fluoreszenz (X-Achse) gegen die Zellzahl (Y-Achse) der HEp-2 Zellen.

**C:** Westernblot zur Bestimmung der Beschichtung von  $5 \times 10^7$  Latexkugeln detektiert mit primärem Maus-anti-His-Antikörper (1:2000) und sekundärem AP-gekoppelten anti-Maus-Antikörper (1:7500).  $\text{Yaa1}_{10 \times \text{His}}$  (55 kDa),  $\text{Yaa1-N}_{10 \times \text{His}}$  (28 kDa),  $\text{Yaa1-C}_{10 \times \text{His}}$  (28 kDa), Proteinmarker: PageRuler

**D:** Repräsentative Westernblots der Bindung von rekombinantem Protein an HEp-2 Zellen.  $1 \times 10^6$  humane HEp-2 Zellen wurden 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  vorgekühlt und anschließend mit  $250 \mu\text{l}$  Medium mit  $100 \mu\text{g/ml}$  rekombinantem Protein bei  $37^\circ\text{C}$  für unterschiedliche Zeitpunkte inkubiert und anschließend intensiv gewaschen. Die Bestimmung des Bindeverhaltens erfolgte über Westernblotanalyse durch Detektion mit primärem Maus-anti-His Antikörper (1:2000) und sekundärem AP-gekoppelten anti-Maus Antikörper (1:7500).

**E:** Humane HEp-2 Zellen wurden 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  mit  $100 \mu\text{g/ml}$  oder  $1,8 \mu\text{M}$  rekombinantem Protein inkubiert und infiziert (MOI=20). Nach 2 h erfolgte ein Medienwechsel. Die Infektiosität wurde 50 hpi bestimmt, indem

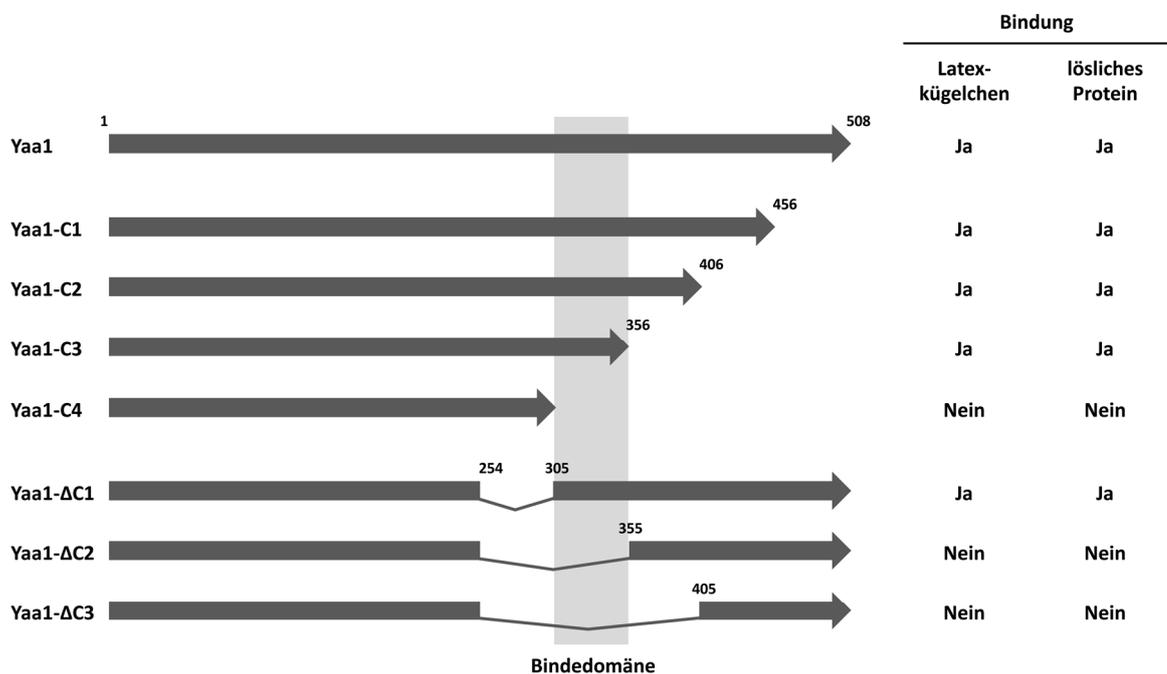
mikroskopisch die Anzahl der gebildeten Einschlüsse in 10 Gesichtsfeldern unter 63-facher Objektvergrößerung gezählt wurden. Die Vorbehandlung der Humanzellen mit PBS wurde auf 100 % Infektion gesetzt. Die Experimente wurden in Dubletten durchgeführt (n=3).

Schließlich wurde untersucht, ob die Adhäsion des C-Terminus für die infektionssteigernde Wirkung von rYaa1 ausreichend ist.

Die Vorbehandlung der HEp-2 Zellen mit 100 µg/ml (1,8 µM) rYaa1<sub>10xHis</sub> steigerte die Infektion auf  $226,6 \pm 3,8$  % (Abbildung 4.30 E). Weder die Vorbehandlung der Humanzellen mit 1,8 µM rYaa1-C<sub>10xHis</sub> noch mit 100 µg/ml rYaa1-C<sub>10xHis</sub> konnte die Infektion beeinflussen ( $100,2 \pm 7,3$  % respektive  $97,1 \pm 7,1$  %). Auch die Vorbehandlung mit 1,8 µM rYaa1-N<sub>10xHis</sub> oder 100 µg/ml rYaa1-N<sub>10xHis</sub> hatte keinen signifikanten Effekt auf die Infektion ( $118,9 \pm 7,6$  % respektive  $108,1 \pm 8,7$  %)

Dies bedeutet, dass rYaa1 zwar über den C-Terminus an die Humanzelle adhärert, diese Adhäsion jedoch nicht ausreichend für die infektionssteigernde Wirkung von rYaa1 ist und der N-Terminus für die infektionssteigernde Wirkung essentiell ist.

#### 4.3.10.2 Bestimmung der Bindedomäne von Yaa1



**Abbildung 4.31: Analyse der Bindedomäne von Yaa1**

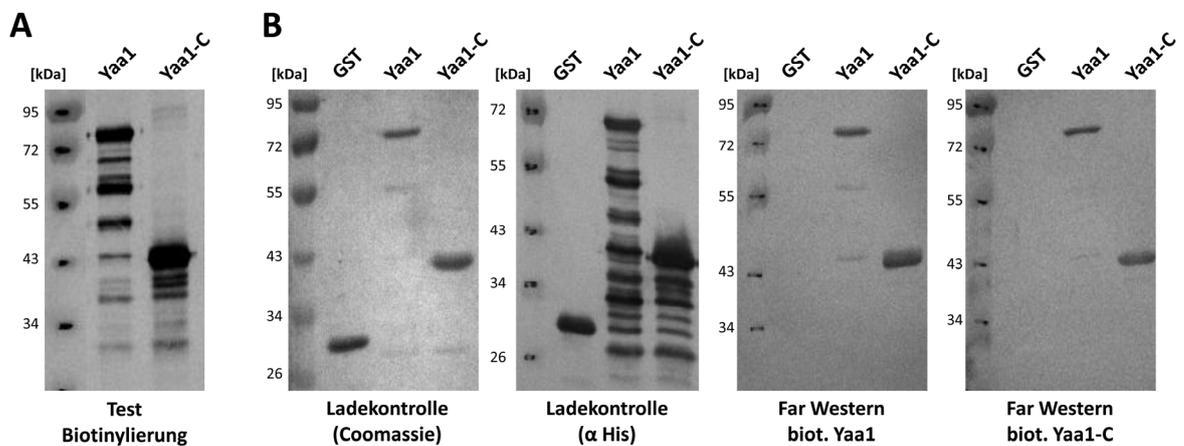
Schematische Darstellung der Analyse der Bindedomäne von Yaa1. Die Adhäsionsfähigkeit der Proteinvarianten wurde in zwei verschiedenen experimentellen Ansätzen überprüft (Galle 2012).

Die genaue Bestimmung der Bindedomäne von Yaa1 wurde als Bachelorarbeit im Zuge dieser Arbeit durchgeführt. Hierzu wurde Yaa1 C-terminal um jeweils 50 Aminosäuren verkürzt.

Ebenso wurde der N-Terminus des C-terminalen Bereichs von Yaa1 um jeweils weitere 50 Aminosäuren deletiert (Abbildung 4.31). Die rekombinanten Proteine wurden aufgereinigt und mit Protein-gekoppelten Latexkügelchen und löslichem Protein auf Adhäsion getestet. Die Bindedomäne von Yaa1 konnte hierdurch auf 50 Aminosäuren genau bestimmt werden und liegt zwischen Aminosäure 305 und 355 (Galle 2012).

#### 4.3.10.3 Yaa1 interagiert über den C-Terminus mit sich selbst

Da bereits die Oberflächenplasmonenresonanz erste Hinweise auf eine Selbstinteraktion von Yaa1 geliefert hatte (Abbildung 4.18 C), sollte dies mittels Far Western Analyse weiter analysiert werden.



**Abbildung 4.32: Selbstinteraktionsanalyse von rYaa1**

**A:** Westernblot zur Überprüfung der Biotinylierung von Yaa1 und Yaa1-C. Rekombinantes Protein wurde für 2 h auf Eis mit 20-fachem Überschuss von Sulfo-NHS-Biotin biotinyliert. Die Reaktion wurde über Nacht mit 50 mM Tris gestoppt. Die Detektion erfolgte mit AP-gekoppeltem Streptavidin (1:1000). Yaa1<sub>10xHis</sub> (55 kDa), Yaa1-C<sub>10xHis</sub> (28 kDa) Proteinmarker: PageRuler

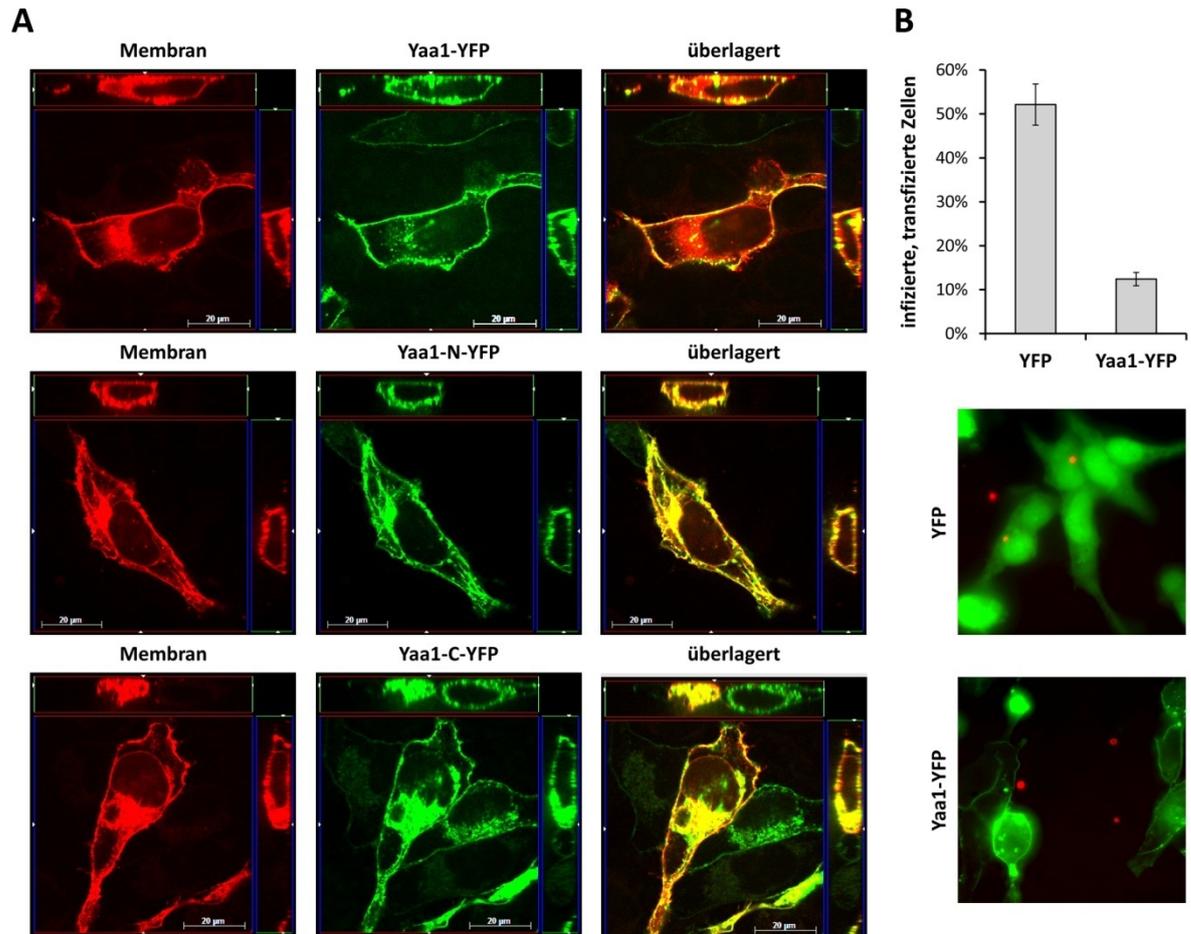
**B:** Far Westernblot zur Analyse der Selbstinteraktion. 1 µg rekombinantes Protein wurde geblottet, mittels abnehmenden Guanidin-HCl-Gradienten renaturiert und mit 3 ml 2 µg/ml biotinyliertem Protein für 2 h bei RT inkubiert. Die Detektion der Ladekontrolle erfolgte mit Coomassie oder primärem Maus-anti-His-Antikörper (1:2000) und sekundärem AP-gekoppeltem anti-Maus-Antikörper (1:7500). Die Detektion des Far Westernblots erfolgte mit AP-gekoppeltem Streptavidin (1:1000). GST<sub>6xHis</sub> (26 kDa), Yaa1<sub>10xHis</sub> (55 kDa), Yaa1-C<sub>10xHis</sub> (28 kDa), Proteinmarker: PageRuler

Da der N-Terminus von rYaa1<sub>10xHis</sub> sehr instabil ist, wurden die Experimente in dieser Arbeit nur mit dem C-Terminus durchgeführt. Die Ladekontrollen zeigten für alle drei getesteten Proteine (GST als Negativkontrolle, rYaa1<sub>10xHis</sub> und rYaa1-C<sub>10xHis</sub>) vergleichbare Bandenintensitäten im Coomassie-gefärbten SDS-Gel (Abbildung 4.32 B). Für rYaa1<sub>10xHis</sub> und Yaa1-C<sub>10xHis</sub> waren im Westernblot wiederum die spezifischen Fragmente nachweisbar.

Sowohl mit biotinyliertem rYaa1<sub>10xHis</sub> als auch mit biotinyliertem rYaa1-C<sub>10xHis</sub> konnten Banden auf Laufhöhe von 72 kDa (rYaa1) und etwa 43 kDa (rYaa1-C) detektiert werden. Bei

rYaa1<sub>10xHis</sub> war zudem eine Interaktion mit einem 55 kDa Fragment zu erkennen. In der GST-Kontrollspur waren keine Banden sichtbar. Das bedeutet, dass rYaa1 in der Lage ist über den C-Terminus mit sich selbst zu interagieren.

#### 4.3.11 Transfiziertes Yaa1 lokalisiert an der Plasmamembran der humanen Zelle und vermindert die Infizierbarkeit durch *Cpn*



#### Abbildung 4.33: Lokalisation von transfiziertem Yaa1

**A:** Humane HEp-2 Zellen wurden mit Yaa1-YFP, Yaa1-N-YFP oder Yaa1-C-YFP mittels TurboFect transfiziert und 24 h nach der Transfektion PFA-fixiert. Die Färbung der Membran erfolgt durch Koftransfektion mit einem selbst generierten Membranmarker (mCherry fusioniert an die Transmembrandomäne des PDGFR, welche mittels einer IgK-Domäne an der Plasmamembran lokalisiert). Längenmarker: 20 µm

**B:** Infektion transfizierter Zellen. HEp-2 Zellen wurden mit YFP oder Yaa1-YFP mittels TurboFect transfiziert und 24 h nach der Transfektion mit *C. pneumoniae* infiziert. Die Infektion wurde 24 hpi mit PFA fixiert und mit 2 % Saponin permeabilisiert. Die Einschlüsse wurden mit primärem Kaninchen-anti-Cpn0147 Antiserum (1:50) und sekundärem Alexa594-gekoppeltem anti-Kaninchen Antikörper gefärbt. Zu Analyse wurde die beobachtete Anzahl infizierter, transfizierter Zellen in Relation zur erwarteten Anzahl infizierter, transfizierter Zellen gesetzt, die sich aus der Transfektionseffizienz und der Infektionsrate ergaben (n = 3).

**C:** Repräsentative mikroskopische Bilder der Infektion der transfizierten HEp-2 Zellen.

Da bei der Suche nach einem proteinösen Interaktionspartner lediglich intrazelluläre Proteine gefunden wurden, die direkt unter der Plasmamembran der humanen Zelle lokalisieren (Abbildung 4.16 D, Tabelle 4.1). wurde nun überprüfen, ob Yaa1 an spezifischen Stellen in der Humanzelle lokalisiert.

Sowohl das Yaa1-YFP Vollängenprotein als auch Yaa1-C-YFP lokalisierten an der Plasmamembran der Humanzelle (Abbildung 4.33 A). Erstaunlicherweise lokalisierte auch das N-terminale Fragment von Yaa1 (Yaa1-N-YFP) an der Plasmamembran der humanen Zelle (Abbildung 4.30 A, D). Dies könnte bedeuten, dass Yaa1 über den N-Terminus mit spezifischen intrazellulären Proteinen an der Plasmamembran interagiert. Sowohl Yaa1-YFP als auch Yaa1-N-YFP und Yaa1-C-YFP zeigten eine starke Akkumulation an einer Seite des Zellkerns.

Nun wurde überprüft, ob transfiziertes Yaa1 einen Einfluss auf die chlamydiale Infektion hat (Abbildung 4.33 B, C). Mit Yaa1 transfizierte Zellen wiesen eine Infektionsrate von  $52,1 \pm 4,7$  % vom erwarteten Wert auf. Hingegen zeigten mit Yaa1-YFP transfizierte HEp-2 Zellen lediglich eine Infektionsrate von  $12,4 \pm 1,5$  % vom erwarteten Wert. Die Transfektionseffizienzen waren mit  $43,2 \pm 1,1$  für YFP und  $44,2 \pm 2,1$  % für Yaa1-YFP ebenso vergleichbar wie die Infektionsraten mit  $24,0 \pm 1,2$  %, respektive  $30,2 \pm 1,5$  %. Erstaunlicherweise reduzierte transfiziertes Yaa1-YFP somit die *C. pneumoniae* Infektion, während extrazelluläres Yaa1 die Infektion stark verstärkte (Abbildung 4.19).

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit das hypothetische chlamydiale Protein Yaa1 weitreichend charakterisiert werden. Yaa1 war auf der Oberfläche von chlamydialen EBs detektierbar und in der Lage die Phospholipidmembran der Humanzelle zu binden. Die Bindung erfolgte hierbei über den C-terminalen Bereich des Proteins. Dabei interagiert es direkt mit der Plasmamembran der Humanzelle. Zudem neutralisierten anti-Yaa1 Antikörper die Infektion signifikant. Jedoch steigerte rYaa1, ungewöhnlich für ein klassisches Adhäsion, die chlamydiale Infektion deutlich. Für die infektionssteigernde Wirkung war zum einen die Bindung über den C-Terminus, zum anderen die Anwesenheit des N-Terminus nötig. Diese infektionssteigernde Wirkung beruhte nicht auf einer verbesserten Adhäsion sondern einer verbesserten Internalisierung der EBs.

Zudem konnte gezeigt werden, dass rYaa1 auf frühe Prozesse der Internalisierung wirkt und diese Wirkung abhängig von der Integrität von Lipid Rafts und dem Aktinzytoskelett ist. Die Bedeutung von Lipid Rafts für die chlamydiale Infektion wurde mikroskopisch bestätigt. So konnte gezeigt werden, dass EBs an Lipid Rafts internalisieren und die frühe Einschlussmembran angereichert an Lipid Rafts ist. Ebenso zeigte sich hier eine Anreicherung

---

des *C. pneumoniae*-spezifischen Rezeptors EGFR. Auch konnte gezeigt werden, dass rYaa1 spezifisch an Lipid Rafts lokalisiert, die Integrität der Lipid Rafts jedoch für die Bindung von rYaa1 irrelevant ist. Abschließend konnte gezeigt werden, dass rYaa1 die allgemeine Endozytose der Humanzelle nicht erhöht, allerdings die Infektion von *C. trachomatis* Serovar E steigert.

## 5 Diskussion

Die Adhäsion und Internalisierung des EBs sind die initialen und daher kritischen Schritte der chlamydialen Infektion. Die *C. pneumoniae* EBs interagieren zunächst über das Adhäsin OmcB mit Glykosaminoglykanen der Wirtszelle (Moelleken and Hegemann 2008). Da diese Interaktion sehr wahrscheinlich reversibel ist (Carabeo and Hackstadt 2001), könnten die EBs entlang der polymeren GAG-Strukturen auf der Oberfläche der Humanzelle „surfen“ um zu ihrer spezifischen Eintrittspforte zu gelangen. Hier würde dann die Adhäsion des EBs über die Interaktion der Pmp-Proteine mit humanen Rezeptoren stattfinden (Moelleken, Schmidt et al. 2010). In jüngsten Studien wurde der EGF-Rezeptor als Interaktionspartner von Pmp21 identifiziert (Moelleken, Becker et al. unveröffentlicht). Werden sowohl die OmcB-GAG-Interaktion als auch die Pmp21-EGFR-Interaktion gleichzeitig durch Antikörper oder rekombinantes Protein blockiert, so wird die Infektionsrate auf um 60 % reduziert (Becker unveröffentlicht). Dies lässt vermuten, dass weitere chlamydiale Proteine an der Adhäsion beteiligt sind. Daher wurde nach weiteren Faktoren gesucht, die für die Adhäsion des EBs an die Wirtszelle benötigt werden. Mittels Hefe-Oberflächenexpressionssystem wurden Yaa1, Yaa2 und Yaa3 (yet another adhesin) als potentielle neue *C. pneumoniae* Adhäsine identifiziert (Fechtner 2009). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die adhäsiven Eigenschaften der Yaa-Proteine zu verifizieren und ihre Funktion zu charakterisieren.

### 5.1 Yaa1 – Adhäsion oder Türöffner für die Infektion?

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Yaa1 auf der Oberfläche von EBs zugänglich ist, adhäsive Eigenschaften besitzt und in frühen Schritten der Infektion eine essentielle Rolle spielt. Dennoch handelt es sich bei Yaa1 nicht um ein Adhäsion, da es an der Internalisierung des EBs und nicht an der Adhäsion beteiligt ist. Hierbei interagiert Yaa1 mit Phospholipidmembranen und lokalisiert spezifisch an Lipid Raft-Mikrodomänen der Plasmamembran der Humanzelle, die sehr wahrscheinlich die Eintrittspforte der EBs darstellen und essentiell für die Internalisierung sind. Yaa1 weist funktionell zwei Domänen auf. Dabei vermittelt der C-terminale Teil die Adhäsion, während die Funktion des N-terminalen Fragments noch aufzuklären ist. Da die infektionssteigernde Wirkung von rYaa1 nicht alleine durch den C-Terminus vermittelt werden kann ist es wahrscheinlich, dass das auch der N-Terminus für eine effiziente Internalisierung des EBs benötigt wird.

### 5.1.1 Yaa1 lokalisiert auf der Oberfläche infektiöser EBs

Yaa1 konnte in SDS-Gelen bei einer Lauflänge von 72 kDa detektiert werden und somit höher als nach dem berechneten Molekulargewicht von 55 kDa vermutet (Abbildung 4.9). Auch das rekombinante Yaa1 Protein läuft in SDS-Gelen auf dieser Höhe (Abbildung 4.8). Die Expressionsanalyse zeigte, dass Yaa1 etwa ab 36 hpi stark exprimiert wird (Abbildung 4.9. A, C). Dabei ist der starke Anstieg der Bandenintensität zum einen durch die Expression von Yaa1, zum anderen durch die starke Vermehrung der RBs begründet. Die Expressionsanalyse entspricht damit nicht genau den zuvor ermittelten Transkriptionsdaten, wo ein Anstieg der Yaa1 mRNA erst zwischen 36 hpi und 48 hpi ermittelt wurde (Murra unveröffentlicht).

Wurden die infizierten Zellen mit 2 % SDS und 2 % Sarkosyl lysiert, konnten neben der 72 kDa Yaa1-Volllängenbande weitere prominente Yaa1-Fragmente bei 68 kDa, 60 kDa, 45 kDa, 40 kDa und 35 kDa detektiert werden (Abbildung 4.9 C). Das 45 kDa-Fragment war zudem deutlich auf gradientengereinigten RBs detektierbar wobei das Volllängenprotein auf RBs unterrepräsentiert war (Abbildung 4.9 B). Auf gradientengereinigten EBs konnte ausschließlich das Yaa1-Volllängenprotein detektiert werden. Ob die Yaa1-Fragmente eine spezifische Rolle im Infektionszyklus haben, muss noch geklärt werden.

Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass Yaa1 während des gesamten Infektionszyklus ausschließlich im Einschluss nachweisbar ist und hier mit den EBs assoziiert (Abbildung 4.10 C). 72 Stunden nach Infektionsbeginn, wenn der Einschluss fast ausschließlich mit EBs angereichert ist, sind unter PFA-Fixierung ringartige Yaa1-Strukturen zu erkennen, die die DNA umrunden und mit MOMP, einer Komponente des cOMC, kolokalisieren (Abbildung 4.11 A). Unter PFA-Fixierung mit anschließender Permeabilisierung der Zelle und der Inklusionsmembran durch 0,2 % Triton X-100 können ausschließlich chlamydiale, oberflächenzugängliche, nicht jedoch intra-chlamydiale Proteine angefärbt werden (Knudsen, Madsen et al. 1999; Moelleken and Hegemann 2008; Wuppermann, Molleken et al. 2008; Moelleken, Schmidt et al. 2010). Daher weist die Detektion von Yaa1 unter PFA-Fixierung auf eine zumindest partielle Oberflächenlokalisierung von Yaa1 hin. Mit Hilfe dieser differentiellen Fixiermethode wurde unter anderem bereits die Oberflächenlokalisierung der *C. pneumoniae* Adhäsine OmcB und Pmp21 gezeigt (Moelleken and Hegemann 2008; Moelleken, Schmidt et al. 2010).

Die Oberflächenlokalisierung von Yaa1 wurde mit Löslichkeitsexperimenten bestätigt (Abbildung 4.11 B). Mit 2 % Sarkosyl konnte Yaa1 größtenteils in den Überstand überführt werden. Proteine des cOMC, wie MOMP, sind Sarkosyl-unlöslich und daher nicht oder nur in ganz geringen Mengen mit Sarkosyl in den Überstand zu bringen (Caldwell, Kromhout et al. 1981) (Abbildung 4.11 B). Daher handelt es sich bei Yaa1 wahrscheinlich nicht um eine

Komponente des stark über Disulfidbrücken quervernetzten cOMC. Yaa1 war, im Gegensatz zu intra-chlamydialen Proteinen, mit nicht-ionischen Detergenzien, die häufig zur Isolation von nativen Membranproteinen verwendet werden (1 % Triton oder 1 % NP-40), von der Oberfläche der EBs lösbar. Interessanterweise wurde bei der Triton X-100 und NP-40 Behandlung nicht Yaa1-Volllängenprotein von der Oberfläche der EBs gelöst, sondern nur verschiedene Fragmente mit Größen von etwa 60 kDa, 48 kDa, 40 kDa und 35 kDa. Yaa1-Volllängenprotein blieb nach der Behandlung immer noch mit den EBs assoziiert (Pellet). Dies deutet darauf hin, dass Yaa1 potentiell von einer oberflächenlokalisierten, chlamydialen Protease gespalten werden kann, nachdem die Integrität des cOMC durch die Detergenzien zumindest teilweise aufgelockert wurde. Dieser Umstand könnte daher ebenfalls die Degradationsbanden in der Expressionskinetik erklären. Der Prozess der proteolytischen Adhäsinspaltung ist unter anderem für das Adhäsin FHA von *Bordetella pertussis* bekannt (Coutte, Antoine et al. 2001). Die Freisetzung von Adhäsinen in den extrazellulären Raum scheint ein weit verbreiteter Mechanismus zu sein, dessen Bedeutung bislang unverstanden ist (Gerlach and Hensel 2007). In der chlamydialen Infektion könnte die humane Disulfid-Isomerase PDI für die Auflockerung des cOMC verantwortlich sein und die proteolytische Spaltung von Yaa1 ermöglichen. Eine Beteiligung von PDI am Adhäsions- und Internalisierungsprozess wurde für *C. trachomatis* bereits beschrieben. Hierbei interagieren die EBs nicht direkt mit PDI, sondern die Enzymaktivität von PDI fördert den Eintritt in die Wirtszelle (Abromaitis and Stephens 2009). Daher stellt sich die Frage, warum die Yaa1-Fragmente nicht beim Zeitpunkt 0 hpi, sprich der Adhäsion, in der Zeitkinetik der Expressionskontrolle zu sehen sind. Dies liegt möglicherweise im experimentellen Ansatz begründet, da die EBs zur Adhäsion bei 4 °C auf die Humanzelle zentrifugiert wurden und somit biologische Prozesse deutlich verlangsamt ablaufen. Zwischen 2 hpi und 30 hpi ist das Yaa1-Signal generell nur sehr schwach detektierbar, weshalb die Yaa1-Fragmente möglicherweise vorhanden, jedoch nicht nachweisbar sind.

Oberflächenlokalisierte Proteine stellen gute Ziele für die Immunantwort auf eine Infektion dar. In der serologischen Analyse von sechs Patientenseren mit nachgewiesener *C. pneumoniae* Infektion konnten in allen Seren Antikörper gegen Yaa1 nachgewiesen werden. Wie erwartet waren auch alle getesteten Patientenseren positiv für anti-OmcB Antikörper (Abbildung 4.12 B), da das Adhäsin OmcB bereits als immundominantes Antigen beschrieben wurde (Campbell, Kuo et al. 1990; Portig, Goodall et al. 2003). Das bedeutet, dass auch Yaa1 als immundominantes Antigen eingestuft werden kann.

Zusammenfassend deuten die ringartigen Yaa1-Strukturen unter PFA-Fixierung, die Löslichkeit unter Triton X-100- und NP-40-Behandlung so wie die Immundominanz deutlich

darauf hin, dass Yaa1 oberflächenlokalisiert ist. Dies wird durch einen, im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) auf intakten EBs unterstützt (Abbildung 5.4, S. XVIII). Aufgrund nicht ausreichender Kontrollen und zu geringen experimentellen Wiederholungen wurde der Test nicht in den Ergebnisteil aufgenommen. Im Kontrollexperiment zeigten Antikörper gegen das Adhäsın Pmp21 (Pmp21N) eine deutliche Bindung an die Oberfläche intakter EBs. Antikörper gegen das intrachlamydiale Protein EFTu hingegen konnten intakte EBs nicht binden. Auch anti-Yaa1 Antikörper erkannten Yaa1 auf intakten EBs, was bedeutet, dass Yaa1 oberflächenlokalisiert ist.

Mit dem Nachweis der Oberflächenlokalisierung von Yaa1 erfüllt Yaa1 somit eine Grundvoraussetzung für ein potentielles Adhäsın. Dennoch bleibt die Frage zu klären, wie Yaa1 auf die Oberfläche der EBs gelangt und wie es dort verankert ist. Die bioinformatischen Analysen identifizierten in Yaa1 weder eine bekannte Signalsequenz (SignalP 4.0, Phobius) noch eine Transmembrandomäne (Phobius) (Kall, Krogh et al. 2004; Petersen, Brunak et al. 2011). Auch ein Vorhersageprogramm für beta-Barrel-verankerte Proteine in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien (BOMP) lieferte keinen Treffer für Yaa1 (Berven, Flikka et al. 2004). Aber auch für das Adhäsın OmcB wird keine Transmembrandomäne vorhergesagt. Die biochemischen und immunbiologischen Untersuchungen belegen jedoch, dass der C-Terminus von OmcB im Periplasma, der N-Terminus von OmcB jedoch oberflächenlokalisiert ist und OmcB daher die äußere Membran durchspannen muss (Everett and Hatch 1995; Ting, Hsia et al. 1995; Mygind, Christiansen et al. 1998; Stephens, Koshiyama et al. 2001; Montigiani, Falugi et al. 2002; Fadel and Eley 2007; Moelleken and Hegemann 2008). Auch das trimere Autotransporteradhäsın Pmp21, das höchstwahrscheinlich mittels C terminalem beta-Barrel die Translokation der adhäsionsvermittelnden „Passgierdomäne“ ermöglicht, lieferte keinen Treffer in der BOMP-Suche. Im Gegensatz dazu wurden die Adhäsine Intimin von EPEC/EHEC und YadA von *Y. pseudotuberculosis* zuverlässig gefunden. Ein Abgleich mit der COMP-Datenbank (chlamydia outer membrane protein) hingegen ergab einen Treffer für Yaa1 von *C. pneumoniae* AR39 und sagt es als integriert in die äußere Membran voraus (<http://131.130.66.201/pcomp>). Yaa1 könnte demnach über ein Chlamydien-spezifisches Signal auf die Oberfläche der EBs sekretiert und dort verankert werden, ähnlich dem Adhäsın InlB des Gram-positiven Bakteriums *L. monocytogenes*, das nicht-kovalent an die Bakterienmembran gebunden ist (Jonquieres, Pizarro-Cerda et al. 2001).

### **5.1.2 Yaa1 besitzt alle nötigen Eigenschaften eines Adhäsins**

Neben der Oberflächenlokalisation gilt für Adhäsine zudem, dass das Adhäsins selber in der Lage ist an die Wirtszelle zu binden und Antikörper, gerichtet gegen das Adhäsins, die Bindung des Bakteriums an die Wirtszelle und damit die Infektion reduzieren.

#### **5.1.2.1 Anti-Yaa1 Antikörper neutralisieren die chlamydiale Infektion**

Im Antikörperneutralisationsexperimente reduzierte Antiserum gerichtet gegen Yaa1 die Infektion, wobei ein Plateau von 30 % Reduktion bereits bei einer Verdünnung von 1:100 erreicht wurde (Abbildung 4.13). Dies könnte bedeuten, dass bei einer Verdünnung von 1:100 bereits alle Yaa1-Moleküle auf der Oberfläche der EBs abgeschirmt sind. Das Kontroll-Antiserum gegen OmcB zeigte wie erwartet eine dosisabhängige Reduktion der Infektion um maximal 50 % bei der höchsten getesteten Antikörperkonzentration (1:10). Daher scheint der Einfluss von OmcB auf die Adhäsion stärker zu sein als der von Yaa1.

Bei der Auswertung des Experiments muss jedoch berücksichtigt werden, dass bereits die Prä-Immunsere von OmcB und Yaa1, nicht jedoch von EFTu, einen negativen Effekt auf die chlamydiale Infektion hatten (nicht gezeigt). Da die Seren von OmcB und Yaa1 aus Kaninchen stammen, das Serum von EFTu hingegen aus einer Ziege, lässt sich vermuten, dass die Kaninchenseren bereits Moleküle enthalten, die sich negativ auf die chlamydiale Infektion auswirkten. Dies könnte erklären, warum die reduzierende Wirkung der anti-Yaa1 Antikörper bei einer Verdünnung von 1:10 leicht geringer ausfiel, als bei einer Verdünnung von 1:100. Die negative Auswirkung des Prä-Immunsere könnte so stark sein, dass die Auswirkung des anti-Yaa1 Antiserums teilweise überdeckt wird.

Das Antikörperneutralisationsexperiment zeigt eindeutig, dass Yaa1 eine essentielle Funktion in einem frühen Stadium der Infektion hat. Der gebundene Antikörper schirmt Yaa1 auf der Oberfläche der EBs ab, so dass Yaa1 nicht mehr an der Infektion beteiligt ist, was zu einer verminderten Infektion führt. Zudem erkennen anti-Yaa1 Antikörper Yaa1 auf intakten, infektiösen EBs, was wiederum die Oberflächenlokalisation von Yaa1 bestätigt. Auf diese Weise konnte auch bereits für die bekannten Adhäsine OmcB und Pmp21 eine Beteiligung an frühen Prozessen der Infektion nachgewiesen werden (Moelleken and Hegemann 2008; Moelleken, Schmidt et al. 2010).

#### **5.1.2.2 Der C-Terminus von rekombinantem Yaa1 vermittelt die Adhäsion**

Die im Hefe-System beschriebenen (Fechtner 2009) adhäsiven Eigenschaften von Yaa1 konnten mit rekombinantem Protein bestätigt werden

Rekombinantes Yaa1 vermittelte die Bindung grün fluorszierender Latexkügelchen an die Humanzelle (Abbildung 4.14 B, C). Dabei konnte festgestellt werden, dass die Adhäsionsstärke direkt abhängig von der Beschichtungsqualität der Latexkügelchen ist (Abbildung 4.14 D - F). Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Beschichtungseffizienz der Kügelchen mit rYaa1 deutlich stärker war als die der Kontrollen (Abbildung 4.14 A). Zudem waren neben der Yaa1-Vollängenbande mehrere intensive Degradationsbanden auf den Latexkügelchen zu detektieren. Daher war eine vergleichende Analyse der Bindestärke von Yaa1 mit den bekannten Adhäsinen Invasin und OmcB nicht möglich.

Auch in einem zweiten Adhäsionsexperiment, das zudem eine Analyse der Zeitkinetik der Bindung erlaubt, konnte die Bindung von löslichem rYaa1 bestätigt werden. Hierbei war 15 min nach Inkubationsstart eine deutliche Bindung von rYaa1 an die Humanzellen sichtbar (Abbildung 4.15.). Zudem konnte ein Anstieg der Bandenintensität über die Zeit beobachtet werden. Invasin als Positivkontrolle war ebenfalls 15 min nach Inkubationsstart detektierbar, jedoch nahm die Bandenintensität über die Zeit nicht zu. Somit scheinen für Yaa1, im Gegensatz zu Invasin, auch 1 h nach Inkubationsstart noch Interaktionspartner auf der Oberfläche der Humanzellen vorhanden zu sein, die mit löslichem rYaa1 interagieren können. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass rYaa1 mit einer Struktur der Humanzelle interagiert, die in hohen Molekülzahlen auf der Oberfläche präsentiert wird.

Die Bindung von löslichem rYaa1 an die Humanzelle konnte auch mikroskopisch bestätigt werden. So konnte rYaa1 sowohl indirekt über den His-Tag als auch direkt als FITC-markiertes Protein mit der Plasmamembran der Humanzelle assoziiert vorgefunden werden (Abbildung 4.22). Dabei zeigte sich jedoch keine homogene Verteilung der Signale über die Membran, sondern vielmehr eine punktuelle Verteilung. Dies lässt Rückschlüsse auf eine spezifische Lokalisation des Interaktionspartners zu.

Zur Bestimmung der Bindedomäne wurde Yaa1 zunächst in zwei gleich große Fragmente unterteilt. Die Adhäsionsanalysen zeigten für das C-terminale Yaa1-Fragment (AS 255 – 508) eine Bindestärke und eine Bindekinetik vergleichbar zum Vollängenprotein (Abbildung 4.30 A – D). Für das N-terminale Yaa1-Fragment (AS 1 – 254) konnte keine Adhäsion nachgewiesen werden. Interessanterweise weist der N-Terminus von Yaa1 eine repetitive Sequenz von 14 Aminosäuren (SSKSSSFLSGVRGA) auf, die reich an Serinen ist. Serinreiche Proteine (SRRP: serin-rich repeat proteins) stellen bei Gram-positiven Bakterien eine Familie von Proteinen dar, die die Bindung an die Wirtszelle und bakterielle Oberflächen vermitteln und somit die Adhäsion und Kolonialisierung ermöglichen (Lizcano, Sanchez et al. 2012). Die Adhäsion der SRRP-Adhäsine wird jedoch nicht durch die SRR-Domänen (serin-rich repeat), sondern durch NR-Domänen (non-repeat) vermittelt, die im Durchschnitt etwa 250 – 500

Aminosäuren groß sind (Lizcano, Sanchez et al. 2012). Bei Yaa1 haben die beiden Serin-Motive keinen Einfluss auf die Adhäsion und ihre biologische Funktion muss zukünftig aufgeklärt werden.

Eine detaillierte Analyse der Bindedomäne erfolgte im Rahmen einer Bachelorarbeit, die parallel zu dieser Arbeit betreut wurde. Hierzu wurde zum einen der C-Terminus von Yaa1 sukzessive um 50 Aminosäuren verkürzt, zum anderen der C-Terminus ausgehend von AS 254 N-terminal 50, 100 und 150 Aminosäuren deletiert. In beiden Fällen blieb der Yaa1 N-Terminus intakt (Abbildung 4.31). Die Adhäsionsanalysen zeigten, dass die Bindedomäne von Yaa1 auf die Aminosäuren 305 bis 355 eingegrenzt werden kann (Galle 2012).

Zusammenfassend konnte die adhäsive Eigenschaft von Yaa1 mit rekombinantem Protein in zwei verschiedenen Testsystemen sowie mikroskopisch bestätigt werden. Dabei wird die Adhäsion über eine 50 Aminosäure große Domäne im C-Terminus von Yaa1 (AS 305 - 356) vermittelt.

Mit der nachgewiesenen Oberflächenlokalisierung, der neutralisierenden Wirkung anti-Yaa1 Antikörper und der adhäsiven Eigenschaft erfüllt Yaa1 demnach die wesentlichen Eigenschaften eines Adhäsins.

### 5.1.3 Yaa1 interagiert mit Phospholipidmembranen

Der Interaktionspartner von Yaa1 musste, wie zuvor erwähnt, zum einen in großer Menge auf der Humanzelle exponiert sein und zum anderen eine punktuelle Lokalisation in der Plasmamembran aufweisen. Da *C. pneumoniae* bereits über das Adhäsin OmcB mit Zuckerstrukturen der Humanzelle interagiert und so den ersten Kontakt etabliert (Moelleken and Hegemann 2008), wurde zunächst vermutet, dass Yaa1 an der nicht-reversiblen Adhäsion beteiligt ist, die durch Protein-Protein-Interaktionen vermittelt wird.

Im Hefe-2-Hybrid-Screening konnte jedoch kein potentieller Interaktionspartner von Yaa1 identifiziert werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass Yaa1 keinen proteinösen Interaktionspartner besitzt oder das Hefe-2-Hybrid-Screening mit Yaa1 aus verschiedenen Gründen nicht möglich ist. So verursacht Yaa1 in der Hefe *S. cerevisiae* einen Wachstumsdefekt (Herbst 2011). Obwohl die Selektion potentieller Interaktionspartner unter niedrigem Selektionsdruck erfolgte und eine ausreichende Anzahl an Hefekolonien gescreent wurde, könnte der Wachstumsdefekt die Identifikation einer Interaktion erschweren. Zum anderen beruht das System auf der Wiederherstellung eines Transkriptionsfaktors, weshalb sowohl das Beute- als auch das Köderprotein in den Zellkern transportiert werden müssen. Zwar besitzen beide ein Kernlokalisierungssignal (NLS = nuclear localization signal) jedoch kann der Screen nicht bei integralen Membranproteinen eingesetzt werden. Yaa1 ist allerdings wie zuvor

beschrieben als solches vorhergesagt und lokalisierte nach Transfektion in Humanzellen an der Plasmamembran (Abbildung 4.33). Auch in der Hefe lokalisierte Yaa1 an der Zellmembran (Herbst 2011), weshalb es denkbar ist, dass das Gal4pBD-Yaa1 Fusionsprotein trotz NLS nicht in den Kern gelangt.

Jedoch lieferten auch „Pull Down“ Experimente mit biotinyliertem rYaa1 keine Hinweis auf einen proteinösen, oberflächenlokalisierten Interaktionspartner. Somit bindet Yaa1 wahrscheinlich kein spezifisches Protein auf der Humanzelle.

Im „Pull Down“ Experiment mit biotinyliertem rYaa1 waren überraschenderweise bei der Verwendung des zellimpermeablen Vernetzers DTSSP nach der Isolation potentieller Interaktionspartner keine Banden im Coomassie-gefärbten SDS-Gel erkennbar. Hingegen wies die Elutionsfraktion bei Verwendung des zellpermeablen Vernetzers DSP einige spezifische Banden auf (Abbildung 4.16 E). Die Identifikation dieser Proteinbanden über massenspektrometrische Analyse ergab die besten Treffer mit den höchsten „Scores“ ausschließlich für intrazelluläre Proteine (Tabelle 4.1). Der beste Treffer für ein oberflächenzugängliches Protein war das 4F2-Oberflächenantigen (schwere Kette), jedoch lediglich mit einem „Score“ von 375 bei einem Maximum von 4726 Punkten für intrazelluläres Plectin. Die Tatsache, dass keine signifikanten Treffer für oberflächenexponierte Proteine gefunden wurden, könnte erklären, warum mit dem zellimpermeablen Vernetzer keine potentiellen Interaktionspartner identifiziert werden konnten. Es könnte jedoch auch sein, dass die Vernetzung durch DSP die identifizierten intrazellulären Proteine an den Interaktionspartner von rYaa1 koppelte und diese somit ebenfalls aufgereinigt wurden und das Signal des tatsächlichen Interaktionspartners überdeckten. Gegen diese Hypothese spricht, dass aufgrund der Bindungskinetik der humane Interaktionspartner in großen Mengen auf der Zelloberfläche präsent sein muss und daher auch zu identifizieren sein sollte.

Eine potentielle Interaktion von Yaa1 mit intrazellulären humanen Proteinen impliziert jedoch, dass Yaa1 nach der Bindung ins Zytoplasma der Humanzelle reicht. Auf die Möglichkeit der Interaktion mit intrazellulären Proteinen und die Tatsache, dass die besten Treffer Proteine sind, die das Zytoskelett der Zelle mit der Plasmamembran vernetzen, wird zu einem späteren Zeitpunkt in der Diskussion eingegangen (5.1.7, Hat Yaa1 auch eine Funktion im Zytoplasma der Wirtszelle?, S 169).

Im „Pull Down“ Experiment konnte der Yaa1-Interaktionspartner-Komplex nach der Lyse der Humanzelle nur schwerlich in den löslichen Überstand gebracht werden und verblieb trotz Verwendung unterschiedlicher Lysispuffer zu großen Teilen im unlöslichen Pellet (Abbildung 4.16 D). Da die Pelletfraktion die unlöslichen Membranen enthält, wurde vermutet, dass Yaa1 potentiell direkt mit der Phospholipidmembran der Humanzelle interagiert.

Die Interaktion von rYaa1 mit Phospholipidmembranen wurde über ein Liposomen-Zentrifugationsexperiment (liposome pulldown) bestätigt, mit dem bereits vielfach die Interaktion von Proteinen mit Phospholipiden und Phospholipidmembranen nachgewiesen wurde (u.a. (Elkin, Ivanov et al. 2005; Radhakrishnan, Yu et al. 2009; Nomikos, Elgmati et al. 2011)). So konnte rYaa1 im Liposomen-haltigen Pellet nachgewiesen werden und interagiert demnach direkt mit atypischen Phospholipidmembranen aus Phosphatidylcholin (PC) (Abbildung 4.18 A). Hierdurch könnte zudem die Bindekinetik von Yaa1 erklärt werden, in der auch nach einer Stunde Inkubation noch freie Bindestellen für rYaa1 auf der Humanzelle existieren, während die Integrin-Rezeptoren für Invasin von *Y. pseudotuberculosis* bereits nach 15 min abgesättigt waren (Abbildung 4.15).

Auch mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR = surface plasmon resonance), welche im Forschungszentrum Jülich im „Institute of Complex Systems“, Strukturbiochemie (ICS-6) unter Anleitung von Dr. Bernd König und Herrn Yu-Fu Hung durchgeführt wurde, konnte die Interaktion von rYaa1 mit der atypischen Phospholipidmembran aus POPC (1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholin) nachgewiesen werden (Abbildung 4.18 B - D).

Um zu überprüfen, mit welchen Phospholipiden rYaa1 interagiert, wurden Interaktionsstudien mit Membran-Lipid-Streifen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass rYaa1 mit mehreren Lipiden der Plasmamembran interagieren kann, wobei die stärkste Interaktion mit Phosphatidylinositolvarianten zu beobachten war (Abbildung 4.18 E). Interessanterweise konnte keine Interaktion mit PC nachgewiesen werden, welches das verwendete Phospholipid in den Membran-Bindeexperimenten war. Daraus kann abgeleitet werden, dass Yaa1 nicht dominant mit einem spezifischen Phospholipid interagiert. Möglicherweise erkennt Yaa1 die Membranstruktur als solche. Da die Membran-Interaktionsstudien mit atypischen, lediglich aus PC bestehenden Membranen durchgeführt wurden, wäre es interessant zu testen, ob die Interaktion mit rYaa1 durch die Integration andere Phospholipide erhöht werden kann. Für *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* wurde bereits eine Interaktion mit PE vorgeschlagen (Krivan, Nilsson et al. 1991). Zwar ist PC mit circa 40 % das dominante Phospholipid in Plasmamembranen eukaryotischer Zellen und macht einen Großteil der äußeren Schicht aus, jedoch spielen weitere Lipide wie Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol und Cholesterol sowie Sphingolipide ebenfalls eine entscheidende Rolle (Boesze-Battaglia and Schimmel 1997; van Meer, Voelker et al. 2008).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass rYaa1 direkt mit der Plasmamembran der Humanzelle interagiert und keinen oberflächenlokalisierten Rezeptor für diese Interaktion benötigt. Die direkte Interaktion mit der Phospholipidmembran schließt jedoch zusätzliche Interaktionen mit einem noch zu identifizierendem, oberflächenlokalisierten humanem

Protein nicht aus. Allerdings konnte in dieser Arbeit weder biochemisch noch mittels Hefe-2-Hybrid-Screening ein extrazellulärer, proteinöser Interaktionspartner identifiziert werden. Für *C. pneumoniae* sind neben der Yaa1-Membran-Interaktion bereits zwei weitere spezifische Adhäsion-Rezeptor-Paare identifiziert worden. OmcB bindet GAG-Strukturen und Pmp21 bindet an den EGF-Rezeptor (Moelleken and Hegemann 2008; Moelleken, Becker et al. unveröffentlicht). Somit nutzt *C. pneumoniae*, der als obligat intrazellulärer Erreger nur innerhalb der Wirtszelle überlebensfähig ist, die ganze Bandbreite möglicher Strukturen der Humanzelloberfläche (Membran, Zucker, Protein) aus, um bestmöglich an die Wirtszelle zu adhären und folgend die Internalisierung zu induzieren.

Phospholipide und damit Phospholipidmembranen sind kein exklusives Ziel zur Adhäsion von Chlamydien. Auch andere Gram-negative Bakterien wie *Helicobacter pylori* und *H. mustelae*, sowie *Haemophilus influenzae*, EPEC und EHEC, als auch *Actinobacillus pleuropneumoniae* binden Phospholipide (Lingwood, Huesca et al. 1992; Gold, Huesca et al. 1993; Busse, Hartmann et al. 1997; Barnett Foster, Philpott et al. 1999; Jeannotte, Abul-Milh et al. 2003). Hierbei wird, wie für *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* postuliert (Krivan, Nilsson et al. 1991), spezifisch das Phospholipid Phosphatidylethanolamin (PE) erkannt, während andere Phospholipide wie Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidsäure (PA) keine Rolle bei der Interaktion spielen. Das Adhäsion MAM7 (multivalent adhesion molecule 7) von *Vibrio parahaemolyticus* hingegen bindet sowohl PA als auch Fibronectin, was zur Ausbildung eines Komplexes auf der Oberfläche der Wirtszelle führt und somit die Aufnahme unterstützt (Krachler, Ham et al. 2011; Krachler and Orth 2011). Homologe von MAM7 werden unter anderen auch in *Yersinia*, *Salmonella* und EPEC gefunden (Krachler, Ham et al. 2011; Krachler and Orth 2011), nicht jedoch in *Chlamydia* (pblast, NCBI).

Während in Yaa1 bioinformatisch mittels Pfam-Suche (Finn, Mistry et al. 2010), wie bereits beschrieben, keine signifikante Domäne gefunden wurde, identifizierte eine, am Ende dieser Arbeit durchgeführte, Domänenanalyse mit Phyre<sup>2</sup> interessanterweise eine homologe Domäne in Yaa1 zu einer 54 Aminosäure großen Domäne in Metavinculin (Abbildung 5.1 A) (Kelley and Sternberg 2009; Wass, Kelley et al. 2010). Phyre<sup>2</sup> bestimmt aufgrund von Sequenz- und vorhergesagter Sekundärstruktur-Ähnlichkeit homologe Domänen in Proteinen. Der Treffer wurde mit einer relativ hohen Zuversicht von 75,2 % bei einer Sequenzidentität von 10 % vorhergesagt.

Metavinculin (1134 AS) wird spezifisch im Muskelgewebe exprimiert, ist eine Spleißvariante von Vinculin (1066 AS) und trägt eine 68 Aminosäure große Insertion zwischen Aminosäure 915 und 916 (Belkin, Ornatsky et al. 1988; Gimona, Small et al. 1988). Vinculin ist ein ubiquitär exprimiertes Protein fokaler Adhäsionen und an der Kopplung der extrazellulären

Matrix an das Aktinzytoskelett beteiligt, wodurch es die mechanischen Eigenschaften der Zelle reguliert (Mierke 2009).



**Abbildung 5.1: Alignment von Yaa1 mit einer potentiell homologen Domäne von (Meta)Vinculin**

**A:** Alignment einer homologen Domäne in Yaa1 (AS 300 – 352) zu Metavinculin (AS 963 – 1016) nach Phyre<sup>2</sup> (Kelley and Sternberg 2009; Wass, Kelley et al. 2010). Sekundärstruktur: grün: alpha Helix, Strich: Coil

**B:** Alignment der vorhergesagten homologen Domänen von Yaa1 und Metavinculin aus A mit Vinculin (AS 916 - 949) und der C-terminalen Lipid-Bindedomäne von Vinculin (Lipid BD) (AS 916 – 970) (Johnson, Niggli et al. 1998). Identische Aminosäuren sind fett dargestellt.

Vinculin bindet neben einer Reihe von Proteinen wie Aktin auch saure Phospholipide wie PI, PS und PA, jedoch mit einer Präferenz für PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat) (Johnson and Craig 1995; Palmer, Playford et al. 2009). Die Bindung wird hierbei über eine Lipid-Bindedomäne (AS 916 – 970) und einen Lipid-Anker (AS 1053 – 1066) im C-terminalen Teil von Vinculin vermittelt (Johnson, Niggli et al. 1998; Bakolitsa, de Pereda et al. 1999; Saunders, Holt et al. 2006; Diez, List et al. 2008). Interessanterweise überlagert die homologe Domäne in Yaa1 teilweise mit der Lipid-Bindedomäne von Vinculin und teilweise mit der Metavinculin-spezifischen Insertion (Abbildung 5.1 B). Im Gegensatz zu Vinculin bindet Metavinculin jedoch keine sauren Phospholipide, was auf die negativ geladenen Aminosäuren in der Insertion zurückgeführt wird (Witt, Ziesenis et al. 2004). Der Austausch der sauren Aminosäuren gegen unpolare Aminosäuren hingegen ermöglichte die Bindung von Metavinculin an saure Phospholipidmembranen (Witt, Ziesenis et al. 2004). Interessanterweise erstreckt sich die homologe Domäne von Yaa1 über den Bereich von Aminosäure 300 bis 352 und stimmt damit exakt mit der identifizierten Adhäsionsdomäne von Yaa1 (AS 305 – 355) überein (Abbildung 4.31). Da Yaa1 zudem im Bereich der Metavinculin-Insertion keine sauren Aminosäuren, sondern eher basische Aminosäuren trägt, könnte es sein, dass die Vinculin-ähnliche Lipidbindedomäne in Yaa1, anders als bei Metavinculin, nicht inhibiert wird. Bei Vinculin wird die Interaktion mit PIP<sub>2</sub> über basische AS in der Lipid-Bindedomäne vermittelt (Chandrasekar, Stradal et al. 2005). Die Überlagerung der

Yaa1-Adhäsionsdomäne und der Vinculin-Lipidbindedomäne schließt die essentiellen, basischen Aminosäuren jedoch nicht ein, so dass Yaa1 über diese Bindedomäne, anders als Vinculin, Lipide wie PC binden könnte, aber nicht spezifisch auf saure Phospholipide angewiesen wäre.

Neben der beschriebenen Domäne wird in Yaa1 bioinformatisch mittels Pfam-Suche auch eine nicht signifikante ApoLp-III Domäne gefunden (Finn, Mistry et al. 2010). Diese Domäne ist insofern interessant, als dass sie eine Domäne in Apolipoprotein III darstellt, welches zu einer Familie von Proteinen gehört, die an dem Transport von Lipiden und dem Metabolismus von Lipoproteinen beteiligt sind (Breslow 1991; Wang, Sykes et al. 2002). Apolipoprotein III wird in vielen Insekten exprimiert und ist am Transport von Diacylglycerin (DAG) beteiligt (Wang, Sykes et al. 2002). In Yaa1 erstreckt sich diese Domäne von Aminosäure 295 bis 342 und damit über denselben Bereich wie die zuvor beschriebene homologe Domäne zu Metavinculin.

Diese bioinformatische Analyse unterstützt die Daten zur Bindefähigkeit von Yaa1 an Phospholipidmembranen. Da Vinculin spezifisch saure Phospholipide bindet, wäre, wie zuvor bereits geschrieben, eine detaillierte Bindeanalyse von rYaa1 an Membranen aus verschiedenen Phospholipiden interessant.

#### **5.1.4 Yaa1 ist kein „klassisches“ Adhäsins**

In Neutralisationsexperimenten mit rekombinantem Protein schirmt dieses den spezifischen Rezeptor des Adhäsins gegen das Adhäsins auf der Oberfläche des EBs ab. Somit ist diese Interaktion nicht mehr an der Adhäsion beteiligt und führt demnach zu einer Reduktion der Bindung des EBs und folglich auch zu einer reduzierten Infektion. Auf diese Weise konnte bereits für die *C. pneumoniae* Adhäsine OmcB, Pmp21, Pmp20 und Pmp6 gezeigt werden, dass sie für die Infektion essentiell sind (Moelleken and Hegemann 2008; Moelleken, Schmidt et al. 2010). Überraschenderweise führte die Vorbehandlung der Humanzellen mit rYaa1 jedoch nicht zu der erwarteten Reduktion der Infektion. Vielmehr wurde die Infektion durch rYaa1 konzentrationsabhängig, bis zu einem Maximum von etwa 300 % bei Verwendung von 200 µg/ml verstärkt (Abbildung 4.19 A). Selbst relativ geringe Konzentrationen von 12,5 µg/ml rYaa1 verstärkten die Infektion noch auf 138 %, während die Behandlung von Humanzellen mit 12,5 µg/ml rPmp21-PD („Passagierdomäne“) noch keinen negativen Einfluss auf die Infektion hatte (Moelleken, Schmidt et al. 2010). Die Verstärkung der Infektion ist dabei auf den Zeitraum der Adhäsion und Internalisierung begrenzt, da die Zugabe von rYaa1 nach der Internalisierung (2 hpi und 6 hpi) keinen positiven Einfluss mehr auf die Infektion hatte (Abbildung 4.19 D). Zudem zeigte die gleichzeitige Applikation von

rYaa1 und EBs dieselbe infektionssteigernde Wirkung wie die Vorinkubation (2 h, 1 h, 30 min) der Zellen mit rYaa1 (Abbildung 4.19 A, C). Nun stellt sich die Frage wie rYaa1 die Infektion verstärken kann. Theoretisch wären drei Szenarien möglich.

Erstens könnte rYaa1 als „Brückenprotein“ zwischen der Humanzelle und dem EB wirken. Die Analyse der Bindung von rYaa1 an Membranen mittels SPR lieferte erste Hinweise auf eine Selbstinteraktion von Yaa1 (Abbildung 4.18 C), welche mittels Far Western bestätigt werden konnte (Abbildung 4.32). So würde rYaa1 die Phospholipidmembran der Humanzelle binden und mit Yaa1 auf der Oberfläche der EBs interagieren und die Adhäsion somit unterstützen. Da im Löslichkeitsexperiment ein Yaa1-Fragment durch Triton X-100- und NP-40-Behandlung von der Oberfläche der EBs gelöst werden konnte, wäre dieses Szenario auch in der Infektion denkbar (vgl. 5.1.1, S 149). Dieses Prinzip würde der Tir-Intimin-Interaktion von *E. coli* ähneln oder der Interaktion von Adhäsinen, die in den extrazellulären Raum entlassen werden. Bei *E. coli* wird das Tir-Protein jedoch in die Wirtszelle sekretiert, wo es intrazellulär in die Membran integriert wird und dann die Adhäsion über die Interaktion mit dem *E. coli* Oberflächenprotein Intimin vermittelt (Kenny, DeVinney et al. 1997). Über Adhäsine, welche in den extrazellulären Raum entlassen werden, ist bislang wenig bekannt, jedoch wird in Betracht gezogen, dass Adhäsine teilweise von der Oberfläche gelöst werden können und dann die Adhäsion durch Interaktion mit dem gleichen oder einem weiteren Bakterien-oberflächengebundenem Protein vermitteln (Gerlach and Hensel 2007). Gegen dieses Szenario für Yaa1 spricht jedoch eindeutig, dass ein Waschschriff der mit rYaa1-vorinkubierten Humanzellen mit PBS die infektionssteigernde Wirkung von rYaa1 aufhob (Abbildung 4.19 C). Hierbei wird das lösliche Protein im Medium entfernt, jedoch wird das bereits an die Humanzellen gebundene rYaa1 nicht entfernt (Abbildung 4.15). Sollte rYaa1 die Infektion über die beschriebene „Brückenfunktion“ verstärken, so hätte man auch hier eine gesteigerte Infektion erwartet.

Im zweiten Szenario wirkt rYaa1 ebenfalls als eine Art „Brückenprotein“. Jedoch bindet rYaa1 hier zuerst Yaa1 auf den EBs und erhöht somit die Molekülzahl von Yaa1 Adhäsinen auf der EB-Oberfläche. Diese ermöglichen dann wiederum eine effizientere Bindung an die Humanzelle. Für dieses Szenario spricht, dass die Humanzellen für die maximal gesteigerte Infektion nicht vorinkubiert werden müssen, sondern eine gleichzeitige Applikation von rYaa1 und EBs ausreicht. Zudem verbleibt nach der Waschung der Humanzelle zwar rYaa1 auf deren Oberfläche, nicht jedoch im Medium, so dass lösliches rYaa1 folgend nicht an der Oberfläche des EBs „haften“ kann um die Adhäsion zu unterstützen. Gegen dieses Szenario spricht jedoch, dass auch die Zugabe von rYaa1 1 h nach den EBs die Infektion noch auf 133 % steigerte (Abbildung 4.19 C). Da zu diesem Zeitpunkt die meisten EBs bereits an die

Wirtszelle adhärirt sind, dürfte rYaa1 nach diesem Szenario keine infektionssteigernde Wirkung mehr besitzen.

Gegen beide Szenarien, in denen rYaa1 als reines „Brückenprotein“ wirkt, spricht weiterhin, dass sowohl die Bindedomäne im C-Terminus von Yaa1 liegt, als auch die Selbstinteraktion durch den C-Terminus erfolgen kann (Abbildung 4.32). Somit müsste die Inkubation der Humanzelle mit dem C-Terminus ebenfalls zu einer gesteigerten Infektion führen, was jedoch nicht der Fall ist (Abbildung 4.30 E). Weder das C-terminale noch das N-terminale Fragment von rYaa1 alleine waren in der Lage die Infektion zu steigern. Dies bedeutet, dass die Bindung alleine nicht ausreicht, jedoch die Bedingung für die infektionssteigernde Wirkung ist. Die Prozesse, die zur Steigerung der Infektion führen, werden daher wahrscheinlich durch den N-Terminus vermittelt. Die genaue Funktion des N-Terminus muss allerdings noch beschrieben werden.

Im dritten denkbaren Szenario bindet rYaa1 daher über den C-Terminus an die Membran der Humanzelle und löst dort über den N-Terminus einen unbekanntem Prozess aus, der die Bindung oder die Aufnahme des EBs begünstigt. Dieser Prozess muss dabei zeitlich begrenzt sein und stattfinden, wenn sich das EB in relativer Nähe zur Humanzelle befindet und möglicherweise bereits über OmcB und/oder die Pmp-Proteine an diese gebunden hat. In diesem Szenario wäre es somit möglich, dass Yaa1 nicht als Adhäsion wirkt, sondern direkt die Aufnahme der EBs begünstigt. Eine genaue zeitliche Eingrenzung der Funktion von Yaa1 im Vergleich zu der OmcB- und Pmp21- Interaktion muss noch erfolgen. Dabei ist zu testen, wie sich die infektionssteigernde Wirkung von rYaa1 auf die Infektion auswirkt, wo die Interaktion von OmcB und GAGs und/oder Pmp21 und EGFR inhibiert wurde. Dies könnte zum einen über die Vorbehandlung der Humanzellen mit rekombinantem OmcB und/oder Pmp21 erfolgen, oder über die Vorbehandlung der EBs mit anti-OmcB und/oder anti-Pmp21 Antikörpern.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Yaa1 kein klassisches Adhäsion ist, da rekombinantes Protein die Infektion verstärkt. Die Verstärkung beruht hierbei nicht auf einer reinen „Brückenfunktion“ des rekombinanten Proteins. Zudem kann die Funktion von Yaa1 auf die frühen Schritte der Infektion eingegrenzt werden.

### **5.1.5 Yaa1 ist an der Lipid Raft-abhängigen Aufnahme der EBs beteiligt**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass rYaa1 eine infektionssteigernde Wirkung auf die frühen Schritte der Infektion hat, wurde durch weitere Experimente gezeigt, dass diese Wirkung auf einer Steigerung der Internalisierung und nicht der Adhäsion beruht.

### 5.1.5.1 rYaa1 steigert die Internalisierung und nicht die Adhäsion der EBs

Eine potentielle Steigerung der Adhäsion durch rYaa1 wurde durch Adhäsionsexperimente mit fluoreszenzmarkierten (CFSE) EB ausgeschlossen. Eine verbesserte Adhäsion der EBs an rYaa1-vorbehandelte Zellen konnte bei keiner der verwendeten IFUs beobachtet werden (Abbildung 4.20 C, D). Da die Zunahme der gemessenen Fluoreszenz und damit die Anzahl an gebundenen EBs direkt proportional zur Menge eingesetzter CFSE-EBs (IFU) war, ist es ausgeschlossen, dass eine potentiell verbesserte Adhäsion durch rYaa1 aufgrund unzureichender Bindestellen nicht möglich war. Erfolgte die Vorbehandlung der Zellen bei 4 °C, so waren keine signifikanten Unterschiede zwischen der PBS-Kontrollbehandlung und der Behandlung mit rYaa1 zu beobachten. Erfolgte die Vorbehandlung der Humanzellen hingegen bei 37 °C, wie es in den Infektionsexperimenten der Fall war, und die Inkubation mit den EBs bei 4 °C, so konnte erstaunlicherweise bei hohen IFUs eine Reduktion der Adhäsion beobachtet werden. Dies bestärkt zum einen die Beobachtung, dass die infektionssteigernde Wirkung von rYaa1 nicht auf eine verbesserte Adhäsion zurückzuführen ist. Zum anderen erhärtet es die Vermutung, dass rYaa1 bei 37 °C einen Prozess an der Bindestelle auslöst, der die Aufnahme in direkter Nähe befindlicher EBs verstärkt. Dieser Prozess muss jedoch zeitlich begrenzt sein und hat möglicherweise später einen negativen Effekt auf die Adhäsion der EBs.

Das Adhäsionsexperiment mit CFSE-markierten EBs lies die Schlussfolgerung zu, dass die infektionssteigernde Wirkung von rYaa1 aus einer verbesserten Aufnahme der EBs resultiert. Diese Vermutung konnte in Internalisierungsexperimenten direkt bestätigt werden (Abbildung 4.20 E).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass rYaa1 nicht die Adhäsion, sondern die Internalisierung der EBs verstärkt und Yaa1 daher, wie bereits erwähnt, nicht als Adhäsine einzuordnen ist.

Auch andere pathogene Bakterien besitzen „Adhäsine“, die die Aufnahme in die Wirtszelle fördern (=Invasine), also selbst ihre eigene Internalisierung initiieren und so die Internalisierung über den „Zipper“-Mechanismus ermöglichen. So bindet Invasin von *Yersinia pseudotuberculosis* humanes Integrin und induziert somit eine Signalkaskade, die direkt zur Internalisierung des Bakteriums und auch des rekombinanten Proteins führt (Isberg and Leong 1990; Dersch and Isberg 1999; Alrutz, Srivastava et al. 2001; Isberg and Barnes 2001). Auch chlamydiales Pmp21 bindet und aktiviert den humanen EGF-Rezeptor, was zur Rekrutierung der natürlichen EGFR-vermittelten Endozytosemaschinerie führt (Moelleken, Becker et al. unveröffentlicht). Zudem vermittelt Pmp21 direkt die Endozytose von Latexkügelchen (Moelleken, Becker et al. unveröffentlicht), (Abbildung 4.28). Jedoch hat

rekombinantes Pmp21 in Neutralisationsexperimenten, anders als rYaa1, einen reduzierenden Effekt (Moelleken, Schmidt et al. 2010). Diese Proteine haben jedoch alle einen humanen Rezeptor als Interaktionspartner und interagieren nicht wie Yaa1 direkt mit der Phospholipidmembran der Wirtszelle.

### 5.1.5.2 Die Funktion von Yaa1 ist abhängig von Lipid Rafts und Aktin

Wie gezeigt werden konnte, ist die Internalisierung, nicht aber die Adhäsion von *C. pneumoniae* abhängig von Lipid Rafts (Stuart, Webley et al. 2003; Korhonen, Puolakkainen et al. 2012). Hierbei führt die Zerstörung der Integrität von Lipid Rafts durch die Depletion von Cholesterol mittels Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (M $\beta$ CD) zu einer verminderten Aufnahme der EBs (Korhonen, Puolakkainen et al. 2012). Auch die cholesterolbindenden Agenzien Nystatin und Filipin stören die laterale Organisation der Lipid Rafts und haben einen negativen Einfluss auf die *C. pneumoniae* Internalisierung (Korhonen, Puolakkainen et al. 2012). Wurden die Lipid Rafts in dieser Arbeit durch M $\beta$ CD zerstört, so wurde die Infektion auf 4 % reduziert und damit deutlich stärker als aus der Literatur bekannt (Abbildung 4.21 B) (Korhonen, Puolakkainen et al. 2012). Da die Reduktion so stark ausfiel und M $\beta$ CD auch Lipid Rafts-unabhängige Prozesse wie die Endozytose von humanem Transferrin negativ beeinflusst, wurde ebenfalls Nystatin als Lipid Raft zerstörendes Reagenz eingesetzt. Die Reduktion der Infektion durch Nystatin um 30 % hingegen entsprach den aus der Literatur bekannten Werten (Abbildung 4.21 C) (Korhonen, Puolakkainen et al. 2012). In beiden Fällen konnte die infektionsteigende Wirkung von rYaa1 nicht mehr beobachtet werden. Damit ist die Funktion von Yaa1 abhängig von der Integrität von Lipid Rafts.

Die Zerstörung des Aktinzytoskeletts der Humanzellen mit Cytochalasin D reduzierte die Infektion wie erwartet ebenfalls, jedoch zu einem geringeren Anteil als in der Literatur angegeben (Abbildung 4.21 D), (Majeed and Kihlstrom 1991; Boleti, Benmerah et al. 1999). Dies könnte daraus resultieren, dass in diesem experimentellen Ansatz Cytochalasin D direkt nach der Internalisierung entfernt wurde und sich das Aktinzytoskelett daher schnell wieder reorganisierte. Somit wäre es möglich, dass die Internalisierung einiger EBs nicht verhindert, sondern nur verzögert wurde. Dennoch konnte auch hier der infektionssteigernde Effekt von rYaa1 nicht mehr beobachtet werden. Somit ist die Funktion von rYaa1 nicht nur abhängig von Lipid Rafts, sondern ebenfalls von einem intakten Aktinzytoskelett.

Die Inhibierung von Dynamin I und Dynamin II, welche Schlüsselproteine vieler Endozytoseprozesse darstellen, durch Dynasore, hatte wider Erwarten ebenfalls einen negativen Effekt auf die *C. pneumoniae* Infektion und führte zu einer Reduktion der Infektion auf 14 % (Abbildung 4.21 A). Dies steht im Kontrast zu bereits publizierten Daten. Für die *C. pneumoniae* Infektion wurde eine Beteiligung von Dynamin I und Dynamin II an der

Internalisierung ausgeschlossen, da Zellen mit dominant-negativen Dynamin I- und Dynamin II-Mutationen normal infiziert werden konnten (Dautry-Varsat, Subtil et al. 2005). In beiden Fällen wurde jedoch nur eine Komponente mutiert und eine Dynamin I und Dynamin II Doppelmutante wurde nicht getestet. Mit Dynasore werden jedoch sowohl Dynamin I als auch Dynamin II inhibiert (Macia, Ehrlich et al. 2006; Kirchhausen, Macia et al. 2008). Damit wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt, dass die Internalisierung der *C. pneumoniae* EBs abhängig von Dynamin ist. Im Gegensatz zu den vorherigen Inhibitoren konnte der infektionssteigernde Effekt von rYaa1 unter Dynasorebehandlung weiterhin beobachtet werden. Da Dynamin für die Abschnürung der Endozytosevesikel wichtig ist, wird es spät in der Endozytose benötigt (McMahon and Boucrot 2011). Somit muss rYaa1 Ereignisse verstärken, die vor der Funktion von Dynamin stattfinden und wirkt dementsprechend auf frühe Prozesse der Endozytose von *C. pneumoniae* EBs.

### 5.1.5.3 EBs und rYaa1 kolokalisieren mit Lipid Rafts

Die Bedeutung von Lipid Rafts in der chlamydialen Aufnahme in die Zelle wird kontrovers diskutiert und mikroskopische Daten existieren kaum. So wurde lediglich für *C. caviae* GPIC 5 min pi eine Akkumulation von Lipid Rafts an der Eintrittsstelle mikroskopisch gezeigt, die mit der Akkumulation von Aktin kolokalisierte (Subtil, Wyplosz et al. 2004). Zudem zeigte eine biochemische Studie, dass bei *C. trachomatis* Serovar L2 der Einschluss 5 hpi mit Lipid Rafts angereichert ist (Jutras, Abrami et al. 2003). Dies könnte jedoch auch durch eine Rekrutierung von Lipid Raft-haltigen Endozytosevesikeln zum chlamydialen Einschluss begründet sein. Da die Integrität von Lipid Rafts essentiell für die *C. pneumoniae* Internalisierung und die Funktion von Yaa1 sind (Korhonen, Puolakkainen et al. 2012), (Abbildung 4.21 B, C), wurde folgend die Assoziation von *C. pneumoniae* EBs mit Lipid Rafts früh in der Infektion (15 min pi und 1 hpi) überprüft. Bereits 15 min pi konnte eine Anreicherung von Lipid Raft-positiven Strukturen am adhären EB nachgewiesen werden (Abbildung 4.24 A). Damit akkumulieren Lipid Rafts bei *C. pneumoniae*, ebenso wie bei *C. caviae* GPIC, früh an der EB-Eintrittsstelle. Zudem ist die frühe Einschlussmembran direkt nach dem Eintritt des EBs (1 hpi) angereichert mit Lipid Rafts. Das internalisierte EB wird hierbei komplett von Lipid Raft-positiven Strukturen umrundet (Abbildung 4.24 B).

Die Akkumulation von Lipid Rafts an der Eintrittsstelle wurde bei vielen pathogenen Bakterien beobachtet und ist wichtig für die Internalisierung des Bakteriums in die Wirtszelle (Manes, del Real et al. 2003; Lafont and van der Goot 2005; Riethmüller, Riehle et al. 2006; Vieira, Correa et al. 2010). So konnte ebenfalls für FimH-exprimierende *E. coli* Bakterien mikroskopisch gezeigt werden, dass sie nach dem Eintritt in BMMCs (mouse bone marrow-derived mast cells) von Cholesterol- und GM1-positiven Lipid Raft Strukturen umrandet sind

(Shin, Gao et al. 2000). Die Infektion von *Pseudomonas aeruginosa* induziert, mikroskopisch nachgewiesen, die Formation von großen Lipid Raft Signalplattformen an der Eintrittsstelle (Grassme, Jendrossek et al. 2003). Die Formation solcher Lipid Raft-positiven Strukturen an der Eintrittsstelle ermöglicht somit das Clustern von Pathogen-spezifischen Rezeptoren und erleichtert die Signaltransduktion, die zur Aufnahme des Pathogens führt (Simons and Toomre 2000; Lafont, Abrami et al. 2004). Auch der *C. pneumoniae*-spezifische Rezeptor des Adhäsins Pmp21, EGFR, lokalisiert hauptsächlich in Lipid Rafts (Mineo, James et al. 1996; Pike and Casey 2002; Macdonald and Pike 2005; Pike, Han et al. 2005). Dabei internalisiert EGFR, wenn die Stimulation über geringe Konzentrationen des Liganden EGF erfolgt, über Clathrin-abhängige Endozytose (Sigismund, Woelk et al. 2005). Hingegen wird EGFR bei hohen EGF-Konzentrationen ubiquitiniert und hauptsächlich über Lipid Raft-abhängige, Clathrin-unabhängige Endozytose aufgenommen (Sigismund, Woelk et al. 2005). Da EGFR früh in der Infektion ebenfalls kugelartige Strukturen um das internalisierte EB formt (Moelleken, Becker et al. unveröffentlicht), wurde überprüft, ob diese Strukturen mit den Lipid Raft-positiven Strukturen koloalisieren. Bemerkenswerterweise sind die Lipid Raft-positiven Strukturen 1 hpi ebenfalls positiv für den Pmp21-spezifischen Rezeptor EGFR (Abbildung 4.25 A). Keine Akkumulation war hingegen für den humanen Transferrin-Rezeptor (hTfR) zu beobachten (Abbildung 4.25 B), der auch nicht mit der chlamydialen Infektion in Verbindung gebracht wurde. Auch lokalisiert hTfR nicht spezifisch in Lipid Rafts (Macdonald and Pike 2005). Damit wurde eindeutig gezeigt, dass die Akkumulation von Lipid Rafts an der Eintrittsstelle der *C. pneumoniae* EBs mit einer Akkumulation von EGFR, dem spezifischen Rezeptor für *C. pneumoniae*, einhergeht. Zudem lokalisieren weitere bekannte humane Rezeptoren der Chlamydien hauptsächlich in Lipid Rafts. So lokalisiert der *C. trachomatis* Rezeptor FGFR2, für den eine Funktion an frühen Prozessen der Adhäsion über das „Brückenprotein“ FGF2 beschrieben wurde (Kim, Jiang et al. 2011), in Lipid Raft Mikrodomänen von Oligodendrozyten (Bryant, Marta et al. 2009). Die Signalweitergabe über FRS2 und die Cbl-vermittelte Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs sind hierbei abhängig von Lipid Rafts (Dufour, Guenou et al. 2008; Bryant, Marta et al. 2009). Auch der *C. pneumoniae*-spezifische Interaktionspartner LOX-1 lokalisiert in Lipid Rafts und die Aktivität von LOX-1 ist Lipid Raft-abhängig (Campbell, Puolakkainen et al. 2012; Matarazzo, Quitadamo et al. 2012). Lipid Rafts koordinieren weiterhin die Funktion von membrangebundenem Östrogenrezeptor (mER) (Marquez, Chen et al. 2006; Reineri, Bertoni et al. 2007), einem weiteren Interaktionspartner im Komplex mit PDI von *C. trachomatis* (Davis, Raulston et al. 2002; Hall, Schell et al. 2011). PDGFR $\beta$  besitzt in der *C. trachomatis* Infektion wahrscheinlich eine Doppelfunktion. Zum einen ist PDGFR $\beta$  auf ungeklärte Weise

an der Adhäsion beteiligt, zum anderen scheint aktivierter PDGFR $\beta$  auch für den Eintritt in die Humanzelle eine Rolle zu spielen (Elwell, Ceesay et al. 2008; Wang, Johnston et al. 2010). Auch PDGFR $\beta$  lokalisiert in Lipid Rafts und die Signaltransduktion über PDGFR $\beta$  ist abhängig von Lipid Rafts (Wu and Gonias 2005; Callera, Yogi et al. 2011).

Bereits bei der Adhäsion des EBs 15 min pi kommt es zur Akkumulation von Lipid Rafts, die mit der Polymerisation von Aktin einhergeht (Abbildung 4.25 C). Aufgrund der massiven Aktinstrukturen unterhalb der humanen Plasmamembran war letzteres jedoch schwierig experimentell zu dokumentieren und muss durch weitere Experimente bestätigt werden.

Da EBs früh in der Infektion mit Lipid Rafts assoziiert sind (siehe oben) und rYaa1 direkt mit Phospholipidmembranen interagiert (5.1.3, S. 154) und die infektionssteigernde Wirkung von rYaa1 abhängig von der Integrität von Lipid Rafts ist (5.1.5.2, S. 163) stellte sich die Frage, ob rYaa1 spezifisch an Lipid Rafts lokalisiert. Interessanterweise zeigte bereits die mikroskopische Analyse der Interaktion von rYaa1 und FITC-markiertem rYaa1 mit der Humanzelle ein punktuell verteiltes Verteilungsmuster an der humanen Plasmamembran (Abbildung 4.22). Für die Kollokalisierung mit rYaa1 wurden die Lipid Rafts mit FITC-markiertem CT-B angefärbt. Hierbei zeigte sich, dass solche Domänen der Plasmamembran, die eine starke Färbung für Lipid Rafts aufwiesen, ebenfalls mit rYaa1 assoziiert waren. Entsprechend wiesen solche Bereiche, die eine schwache FITC-CT-B Färbung zeigten, kaum gebundenes rYaa1 auf (Abbildung 4.23 A). Deutlicher wurde dies in solchen Zellen, in denen Lipid Raft-positive und -negative Bereiche deutlich voneinander abgegrenzt waren (Abbildung 4.23 B). Hier war deutlich sichtbar, dass rYaa1 hauptsächlich mit Lipid Raft-positiven Domänen assoziiert und kaum an Bereichen der Zelle lokalisierte, die negativ für die CT-B-Färbung waren. Eine solche deutliche Abgrenzung zwischen Lipid Raft-positiven und -negativen Bereichen konnte in BSA-behandelten Zellen im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet werden, muss jedoch experimentell noch genauer untersucht werden. Ob die starke Trennung zwischen Lipid Raft-positiven und -negativen Bereichen in den rYaa1-behandelten Zellen auf ein rYaa1-induziertes Clustern der Lipid Rafts zurückzuführen war, bleibt Spekulation und muss ebenfalls in zukünftigen Experimenten analysiert werden. Hierbei wäre interessant zu testen, ob die, mit anti-Yaa1 Antikörpern vorbehandelten EBs, immer noch eine starke Akkumulation von Lipid Rafts an der Eintrittsstelle induzieren. Theoretisch könnte die Möglichkeit der Selbstinteraktion von Yaa1 das Clustern der Lipid Rafts induzieren und somit die spezifischen Rezeptoren, die für die Internalisierung benötigt werden und hauptsächlich in Lipid Rafts lokalisieren, an der Eintrittsstelle akkumulieren. Neben den Rezeptoren akkumulieren an den Lipid Raft-Signalplattformen zudem Signalmoleküle, die an der bakteriellen Aufnahme beteiligt sind (Dautry-Varsat, Subtil et al. 2005). Somit kann die infektionssteigernde Wirkung

von rYaa1 durch das Clustern von Lipid Raft-assoziierten Rezeptoren und Signalmolekülen begründet werden, die über die verschiedenen Signalwege folgend die Aufnahme des Bakteriums induzieren. Die Bindung der chlamydialen EBs wird dabei vermutlich durch rYaa1 nicht verbessert, da die EBs bereits über die OmcB-GAG-Interaktion und/oder Pmp21-EGFR-Interaktion an der Humanzelle adhären. Die Depletion von Cholesterol durch M $\beta$ CD und damit die Zerstörung der Integrität von Lipid Rafts hatte interessanterweise keine Einfluss auf die Bindefähigkeit von rYaa1 (Abbildung 4.23 C). Damit wird die Bindung von rYaa1 an die Membran und die spezifische Lokalisation an Lipid Rafts eventuell durch zwei unterschiedliche Domänen in Yaa1 vermittelt. Da die Bindedomäne von Yaa1 im C-Terminus liegt, könnte es sein, dass die Lipid Raft-Spezifität durch den N-terminalen Teil von Yaa1 vermittelt wird. Dies könnte getestet werden, indem überprüft würde, ob der C-Terminus von Yaa1 noch spezifisch an Lipid Rafts lokalisiert.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Yaa1 an frühen Prozessen der Endozytose des *C. pneumoniae* EBs und nicht an der EB-Adhäsion beteiligt ist. Weiterhin ist die Funktion von Yaa1 abhängig von der Integrität von Lipid Rafts und rYaa1 bindet spezifisch Lipid Rafts. Desweiteren spielen Lipid Rafts eine entscheidende Rolle in der Internalisierung der EBs und akkumulieren an der Eintrittsstelle so wie in der frühen Einschlussmembran. Diese Akkumulation kann zudem auch für den Pmp21-spezifischen Interaktionspartner EGFR beobachtet werden.

### 5.1.6 Yaa1 und Endozytose

In Internalisierungsexperimenten mit 1,1  $\mu$ m Latexkügelchen konnte gezeigt werden, dass rYaa1 alleine deren Internalisierung nicht ermöglichte (Abbildung 4.28). Auch die Endozytose von Pmp21-beschichteten Latexkügelchen, welche zu etwa 30 % endozytiert werden (Abbildung 4.28), (Moelleken, Becker et al. unveröffentlicht), konnte durch lösliches rYaa1 nicht verbessert werden. Daher kann rYaa1 alleine die Endozytose von großen Partikeln nicht induzieren oder verbessern. Für die Funktion von Yaa1 in der Infektion sind somit weitere Komponenten nötig. Eine wichtige Rolle könnte dabei das Aktinzytoskelett der Zelle spielen, da gezeigt werden konnte, dass die Zerstörung des Aktinzytoskeletts durch Cytochalasin D die infektionssteigernde Wirkung von rYaa1 aufhebt (Abbildung 4.21 D). Zudem ist das Aktinzytoskelett eine entscheidende Komponente bei der Endozytose großer Partikel wie Bakterien, um genügend Zugkraft für die Einstülpung der Membran aufzubauen (Doherty and McMahon 2009; McMahon and Boucrot 2011).

Auch die allgemeine Endozytose von Humanzellen wurde durch rYaa1 nicht erhöht (Abbildung 4.26 C, D). Jedoch war in manchen experimentellen Wiederholungen eine

spezifische Bande internalisierter Proteine bei etwa 72 kDa detektierbar, die damit exakt auf der Laufröhre von rYaa1 lief (Abbildung 4.26 C). Es liegt nahe, dass es sich bei dieser Bande tatsächlich um rYaa1 handelt und das Biotinsignal lediglich auf einen unzureichenden Stopp des Biotinylierungsschrittes zurückzuführen ist. Das würde wiederum bedeuten, dass gebundenes rYaa1 vor der Debiotinylierung geschützt war, indem es endozytiert wurde. Daher wurde die Endozytose von löslichem rYaa1 überprüft. Interessanterweise war ein Teil des zellassozierten, biotinylierten rYaa1 vor der Debiotinylierung geschützt, was darauf hindeuten könnte, dass rYaa1 tatsächlich endozytiert wurde (Abbildung 4.27 A). Überraschenderweise war aber auch in der Debiotinylierungskontrolle biotinyliertes rYaa1 nachweisbar (Abbildung 4.27 A), obwohl lösliches rYaa1 im Kontrollexperiment erfolgreich debiotinyliert werden konnte (Abbildung 4.27 B). Da die Debiotinylierungskontrolle bei 4 °C durchgeführt wurde um Endozytose zu inhibieren, könnte spekuliert werden, dass rYaa1, zumindest teilweise, in die Membran der Humanzelle integriert und somit teilweise vor der Debiotinylierung geschützt ist. Jedoch muss festgehalten werden, dass dieser experimentelle Ansatz keine „richtige“ Negativkontrolle enthält. Als Negativkontrolle müsste ein Protein dienen, das zwar an die Humanzelle bindet, jedoch nicht internalisiert wird. Bei der Adhäsionskontrolle wäre so ein Biotinsignal zu sehen, welches durch die Debiotinylierung vollständig entfernt werden kann. Ein solches Protein stand jedoch aus unterschiedlichen Gründen nicht zur Verfügung. Daher ist die These, dass rYaa1 in die Membran der Humanzelle integriert rein hypothetisch und muss durch weitere Experimente überprüft werden.

Die Integration von rYaa1 in die Membran der Humanzelle könnte jedoch erklären, warum in der SPR rYaa1 weder durch hohe Salzkonzentrationen noch durch basische oder saure Waschschriffe von der Membran gelöst werden konnte (4.3.6.2, S 118). Zudem sagt ein Vorhersageprogramm für membrandurchspannende Regionen (TMpred) eine solche zwischen Aminosäure 400 und 420 in Yaa1 voraus. Diese befände sich allerdings C-terminal der Bindedomäne von Yaa1. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass rYaa1 alleine die Endozytose nicht verstärkt, jedoch eventuell in löslicher Form endozytiert wird, oder in die Membran der Humanzelle integriert.

Die Vorbehandlung der Humanzellen mit dem *C. pneumoniae*-spezifischen rYaa1-Protein führte interessanterweise ebenfalls zu einer, wenn auch nicht so starken, Steigerung der *C. trachomatis* Serovar E Infektion (Abbildung 4.29). Die *C. trachomatis* Serovar L2 Infektion hingegen konnte durch rYaa1 nicht gesteigert werden. Dies könnte darin begründet sein, dass *C. trachomatis* Serovar L2 hoch infektiös ist und die Infektion daher nicht weiter verstärkt werden kann. Andererseits könnte dies auch auf unterschiedliche Invasionsmechanismen der beiden *C. trachomatis* Serovare hindeuten. Interessanterweise zeigten einige Studien, dass die

Internalisierung von Serovar L2 im Gegensatz zu Serovar E und *C. pneumoniae* unabhängig von der Integrität von Lipid Rafts ist (Stuart, Webley et al. 2003; Korhonen, Puolakkainen et al. 2012). Da rYaa1 die Infektion Lipid Raft-abhängig steigert, würde dies erklären, warum die Infektion von *C. trachomatis* Serovar E, nicht aber Serovar L2 verstärkt war. Zudem konnte die *C. trachomatis* Serovar L2, nicht aber die *C. pneumoniae* Internalisierung und Infektion durch Depletion von Clathrin mittels RNA-Interferenz deutlich reduziert werden (Hybiske and Stephens 2007; Korhonen, Puolakkainen et al. 2012).

Damit ist die infektionssteigernde Wirkung von rYaa1 nicht nur *C. pneumoniae*-spezifisch, sondern kann auch, möglicherweise aufgrund gleicher Eintrittspforten, die Infektion von *C. trachomatis* Serovar E verbessern.

### 5.1.7 Hat Yaa1 auch eine Funktion im Zytoplasma der Wirtszelle?

Das „Pull Down“-Experiment zur Identifikation eines proteinösen Interaktionspartners von Yaa1 (5.1.3, S 154) lieferte Hinweise, dass Yaa1 ins Zytoplasma der Humanzelle reicht und dort mit proteinösen Interaktionspartnern interagiert. Daher wurde Yaa1 in Humanzellen exprimiert und die Auswirkung auf die *C. pneumoniae* Infektion überprüft.

Transfiziertes Yaa1-YFP lokalisierte hauptsächlich spezifisch an der Plasmamembran der Humanzelle (Abbildung 4.33 A). Ebenso konnte der C-Terminus von Yaa1 in direkter Assoziation mit der Plasmamembran gefunden werden (Abbildung 4.33 A). Die spezifische Lokalisation von transfiziertem Yaa1-YFP und Yaa1-C-YFP an der Plasmamembran könnte durch die nachgewiesene, direkte Interaktion mit der Phospholipidmembran über die C-terminalen Bindedomäne von Yaa1 erklärt werden. Interessanterweise zeigte aber auch der N-Terminus von Yaa1, der keine Bindefähigkeit an Phospholipidmembranen besitzt, eine spezifische Lokalisation an der Plasmamembran (Abbildung 4.33 A). Die außerdem sichtbare Akkumulation von Yaa1-YFP, Yaa1-C-YFP und Yaa1-N-YFP in der Peripherie des Zellkerns könnte eine Assoziation mit dem Golgi-Komplex oder dem endoplasmatischen Retikulum darstellen, wurde aber nicht überprüft. Daher ist es möglich, dass Yaa1 einen weiteren intrazellulären Interaktionspartner hat, der zytoplasmatisch direkt mit der Plasmamembran der Humanzelle assoziiert. Dies könnte erklären, warum bei der Suche nach einem proteinösen Interaktionspartner von Yaa1 lediglich mittels zellpermeablen Vernetzers (DSP) und nicht mittels zellimpermeablen Vernetzers (DTSSP) potentielle Interaktionspartner isoliert werden konnten. Es würde auch erklären, warum ausschließlich intrazelluläre Proteine mit hoher Trefferwahrscheinlichkeit gefunden wurden, die zudem größtenteils direkt mit der Plasmamembran und dem darunter liegenden Zytoskelett assoziiert sind (Abbildung 4.17, Tabelle 4.1). Hierbei handelt es sich um die Proteine Plectin (bester Treffer), Desmoplakin,

Filamin A und Filamin B, sowie Spektrin (alpha und beta Kette). Plectin spielt bei der Organisation des zytoskelettalen Netzwerks eine entscheidende Rolle, indem es mit Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten sowie mit weiteren Proteinen direkt an der Plasmamembran interagiert (Wiche 1998). Plectin spielt in der HIV-Infektion eine Rolle, indem es mit dem Korezeptor CXCR4 interagiert und an der CXCR4-vermittelten Signalweiterleitung beteiligt ist (Ding, Zhang et al. 2008). Desmoplakin ist eine zytoskelettale Komponente von Desmosomen und verknüpft desmosomale Proteine mit Intermediärfilamenten (Delva, Tucker et al. 2009). Interessanterweise identifizierte die massenspektrometrische Analyse mit Desmoglein-1, Plakoglobin und Plakophilin drei weitere desmosomale Proteine, allerdings mit geringeren „Scores“. Plakoglobin und Plakophilin interagieren direkt mit Desmoplakin, während Desmoglein-1 die Zell-Zell-Adhäsion von Desmosomen vermittelt (Delva, Tucker et al. 2009). Filamin A und Filamin B sind aktinbindende Proteine und spielen in der Organisation der Zellstruktur und Funktion eine entscheidende Rolle, indem sie zusätzlich mit über 90 weiteren Bindepartnern interagieren können (Nakamura, Stossel et al. 2011). Das Spektrin-basierte Netzwerk ist direkt submembranös organisiert und bindet eine Reihe von verschiedenen Proteinen einschließlich Aktinfilamenten. Hierdurch spielt es eine entscheidende Rolle in zellulären Signaltransduktionsprozessen und kann als Proteinsortierungsmaschine fungieren (Beck and Nelson 1996; Machnicka, Grochowalska et al. 2011). Kürzlich konnte das Spektrinzytoskelett als eine entscheidende Komponente bei bakteriellen Infektionen durch EPEC, *Salmonella typhimurium* und *Listeria monocytogenes* identifiziert werden (Ruetz, Cornick et al. 2011).

Da die identifizierten Proteine alle direkt oder indirekt mit dem Zytoskelett der Zelle verknüpft sind, könnten sie auch durch die starke Vernetzung mittels DSP unspezifisch eluiert worden sein. Daher muss zukünftig, beispielsweise mittels Mikroskopie, überprüft werden, ob eine oder mehrere dieser Proteine an der Eintrittsstelle des chlamydialen EBs zu finden sind. Da der N-Terminus von Yaa1 hier der potentielle Interaktionspartner ist, könnte die Spezifität der Interaktion zum Beispiel mittels Koimmunopräzipitation mit dem transfizierten Yaa1-N-YFP Konstrukt überprüft werden.

Die Treffer DNA-abhängige Proteinkinase Katalytische Untereinheit und U5 kleines Zellkernribonukleoprotein 200 kDa Helikase hingegen sind im Zellkern lokalisiert (UniProt). Da Yaa1 zu keinem Zeitpunkt im Zellkern der Humanzelle nachgewiesen wurde, handelt es sich hierbei wahrscheinlich um unspezifische Treffer.

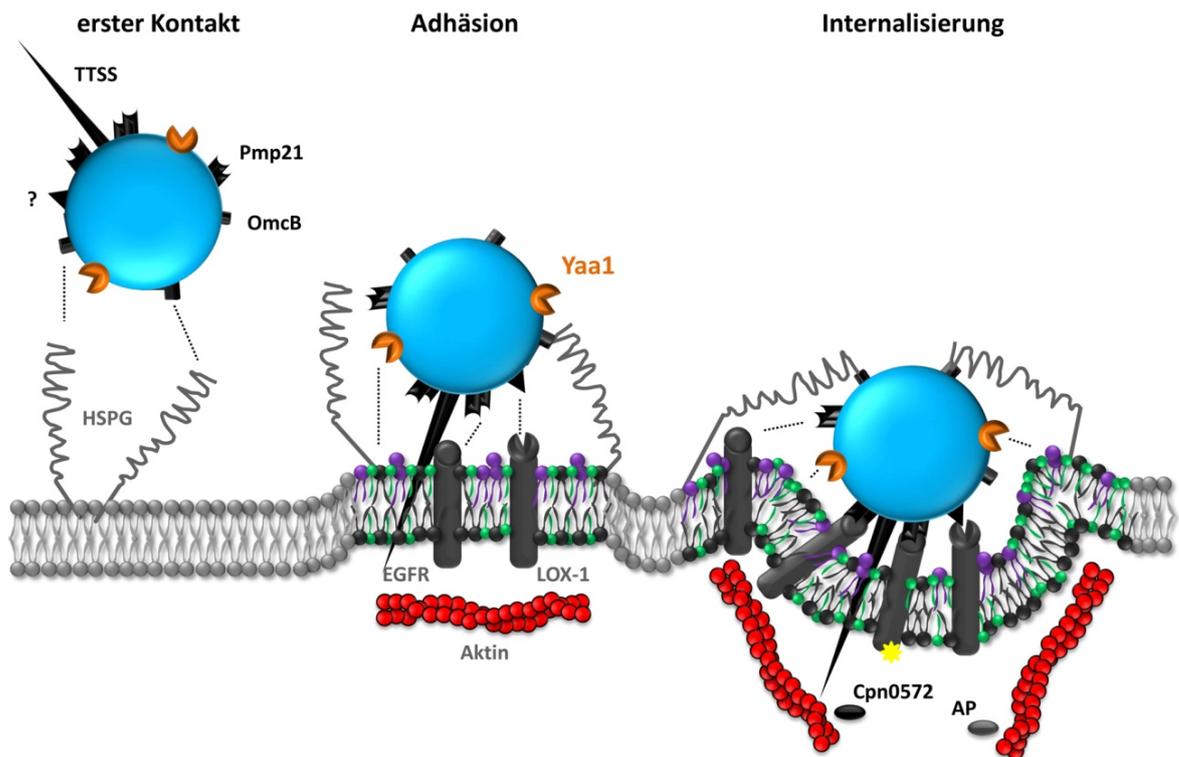
Einen weiteren Hinweis auf eine Interaktion von Yaa1 mit zytoplasmatischen Proteinen der Humanzelle weist die Infektion von Yaa1-YFP transfizierten Zellen auf. Im Gegensatz zu

YFP transfizierten Kontrollzellen konnten Yaa1-YFP transfizierte Zellen signifikant schlechter infiziert werden (Abbildung 4.33 B). Dies steht im direkten Gegensatz zur infektionssteigernden Wirkung von löslichem, extrazellulärem rYaa1. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass der transfizierte N-Terminus eventuell mit zytoplasmatischen Proteinen interagieren könnte und diese somit für eine Interaktion mit dem infektiösen EB blockiert. Eine Funktion von Yaa1 im Zytoplasma der Wirtszelle bleibt dennoch rein spekulativ, da eine direkte Interaktion mit intrazellulären, humanen Proteinen nicht gezeigt wurde.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es einige Hinweise gibt, dass Yaa1 auch eine Funktion im Zytoplasma der Wirtszelle hat und dadurch die Infektion beeinflusst. Ein definitiver Nachweis dieser Funktion muss allerdings noch erfolgen.

### 5.1.8 Die postulierte(n) Funktion(en) von Yaa1

Aufgrund der experimentellen Daten wird folgende Funktion von Yaa1 in der *C. pneumoniae* Infektion vorgeschlagen (Abbildung 5.2, Abbildung 5.3).



**Abbildung 5.2: Funktion von Yaa1 im Kontext der chlamydialen Infektion**

Schematische Darstellung der Adhäsion und Internalisierung von *C. pneumoniae*.

Farbige Membran: Lipid Rafts, Grün: Cholesterol, Lila: Sphingolipide, Blau: EB, gelber Stern: Aktivierung, AP = Adapterproteine

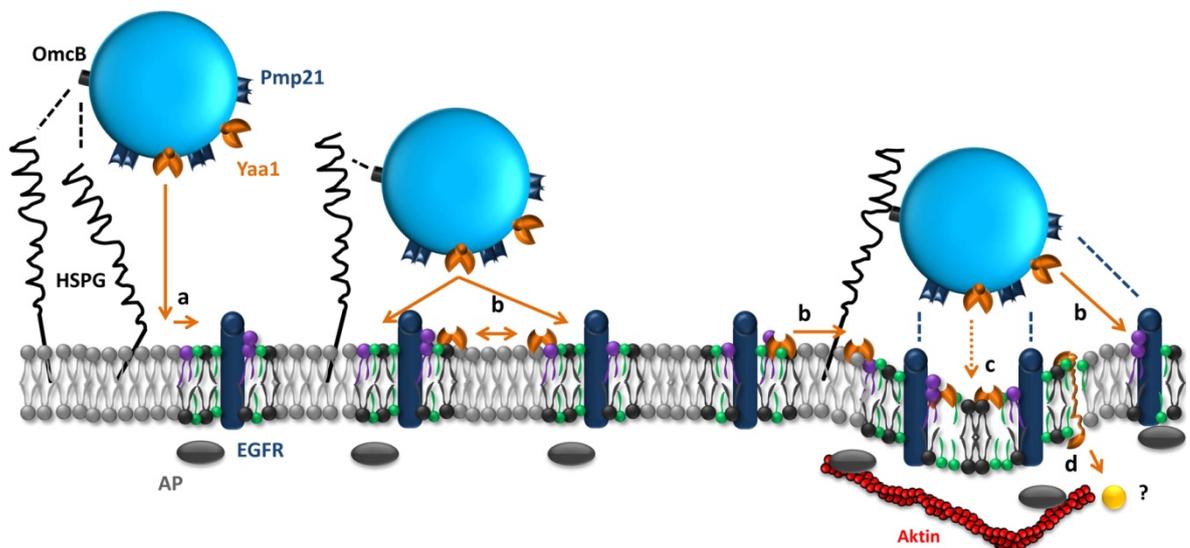
Die chlamydialen EBs binden zunächst über das Adhäsion OmcB an die in den extrazellulären Raum reichenden Heparansulfat-ähnlichen Glykosaminoglykane der Humanzelle (Moelleken and Hegemann 2008). Da diese Interaktion reversibel ist (Carabeo and Hackstadt 2001), erlaubt sie es den EBs über die Oberfläche der Wirtszelle zu „surfen“ um zu der spezifischen Eintrittsstelle, den Lipid Rafts, zu gelangen. Hier wird folgend die nicht-reversible Adhäsion über die Interaktion von Pmp21 und vermutlich anderer Pmp-Proteine mit humanem EGFR vermittelt (Moelleken, Schmidt et al. 2010; Moelleken, Becker et al. unveröffentlicht), der spezifisch in Lipid Rafts lokalisiert (Mineo, James et al. 1996; Pike and Casey 2002; Macdonald and Pike 2005; Pike, Han et al. 2005). Die an den Lipid Rafts lokalisierten Rezeptoren und die Lipid Raft-assoziierten intrazellulären Adaptermoleküle (AP) sowie das chlamydiale TTSS-sekretierte Effektorprotein Cpn0572 (Tarp-Homolog) sind dann für die Internalisierung des EBs verantwortlich. Die Zerstörung der Lipid Rafts führt zwar zu einer verminderten Internalisierung, nicht jedoch zu einer verminderten Adhäsion der EBs (Korhonen, Puolakkainen et al. 2012).

Da rYaa1 direkt an die Phospholipidmembran der Humanzelle bindet und spezifisch an Lipid Rafts lokalisiert, könnte Yaa1 nach der Kontaktaufnahme über OmcB das über die humane Oberfläche „surfende“ EB spezifisch zu den Lipid Rafts „dirigieren“ (Abbildung 5.3 a), wo die EBs über Pmp21 mit EGFR interagieren könnten. Experimente zum zeitlichen Ablauf der einzelnen Schritte wurden nicht durchgeführt, so dass hierüber nur gemutmaßt werden kann. Der Kontakt zwischen EB und der Humanzelle müsste jedoch bereits relativ eng sein, sodass eine Pmp21-EGFR-Interaktion auch parallel zur oder vor der Yaa1-Membran-Interaktion denkbar wäre. Die Bindung von Yaa1, vermittelt durch die C-terminale Bindedomäne, ist nicht ausreichend um die Infektion positiv zu beeinflussen. Daher ist es denkbar, dass das „surfende“ EB bereits über den C-Terminus von Yaa1 mit der Phospholipidmembran interagiert, die spezifische Lipid Raft-Interaktion jedoch durch eine noch unbekannte Funktion des N-Terminus vermittelt wird. Da die EBs in diesem Fall bereits über OmcB und eventuell Pmp21 an die Humanzelle binden und die Lipid Rafts an der Internalisierung beteiligt sind, wirkt Yaa1 damit indirekt auf die Internalisierung des EBs und nicht auf die Adhäsion. An der Eintrittsstelle des EBs ist eine starke Akkumulation von Lipid Rafts und den Lipid Raft-lokalisiertem Pmp21-Rezeptor EGFR zu beobachten. Da Yaa1-Fragmente von der Oberfläche des EBs gelöst werden können, könnte Yaa1, gebunden an die EBs oder in löslicher Form, durch die Selbstinteraktion oder durch den N-Terminus das Clustern der Lipid Rafts vermitteln (Abbildung 5.3 b). Das Clustern der Lipid Rafts führt zur Akkumulation der spezifischen, Lipid Raft-assoziierten Rezeptoren und intrazellulären Adaptermoleküle und somit zur verbesserten Signaltransduktion für die Aufnahme des EBs.

Die Yaa1-vermittelte Akkumulation der Lipid Rafts würde hierbei während des gesamten Internalisierungsprozesses stattfinden, so dass das aufgenommene EB vollständig von einer Lipid Raft-angereicherten Membran umschlossen ist. Somit würde Yaa1 die Akkumulation der spezifischen Rezeptoren und Adaptermoleküle induzieren und daher die Internalisierung des EBs maßgeblich fördern. Die Funktion von Yaa1 ist Abhängig vom Aktinzytoskelett der Humanzelle, was darauf zurückgeführt werden kann, dass die Endozytose von großen Partikeln, wie dem EB, abhängig vom Aktinzytoskelett der Zelle ist.

Zudem kann über weitere Funktionen von Yaa1 spekuliert werden. So könnte die Interaktion von Yaa1 mit der Plasmamembran die Membranspannung reduzieren und somit die Endozytose von großen Partikeln direkt fördern (Abbildung 5.3 c). Einige Daten deuten zudem darauf hin, dass Yaa1, wahrscheinlich über den N-Terminus, mit zytoplasmatischen humanen Proteinen interagiert (Abbildung 5.3 d). Diese Interaktion könnte zum einen das Clustern der Lipid Rafts induzieren oder, durch die Interaktion mit essentiellen Proteinen des Zytoskeletts der Zelle, direkt die Endozytose des EBs verbessern.

Aufgrund der experimentellen Daten sind die beiden letztgenannten Yaa1-Funktionsaspekte jedoch rein spekulativ (Abbildung 5.3 c, d).



**Abbildung 5.3: Postulierte Funktion(en) von Yaa1 im Detail**

Schematische Darstellung der postulierten Funktionen von Yaa1 in frühen Schritten der *C. pneumoniae* Infektion. a) Direktion zu Lipid Rafts, b) Clustern von Lipid Rafts durch lösliches oder EB-gebundenes Yaa1, c) Entspannung der Plasmamembran, d) Interaktion mit humanen, zytoplasmatischen Interaktionspartnern. Farbige Membran: Lipid Rafts, Grün: Cholesterin, Lila: Sphingolipide, Blau: EB

## 5.2 Yaa2 – eventuell nur eine strukturelle Komponente

Der Transkriptionsanalyse nach wird die Transkription von Yaa2 zwischen 24 hpi und 36 hpi hochreguliert (Murra unveröffentlicht). Entsprechend war Yaa2 in der Expressionsanalyse tatsächlich erstmals 48 hpi nachweisbar (Abbildung 4.4 A). Da die asynchrone Redifferenzierung der RBs in die infektiösen aber metabolisch inaktiven EBs ebenfalls 48 hpi beginnt, wird Yaa2 spät in der Infektion exprimiert. Bemerkenswert ist hier, dass das anti-Yaa2 Antiserum das Yaa2-Antigen deutlich besser detektierte, wenn die geblotteten Proteine mittels Guanidin/HCl-Gradienten auf der Membran renaturiert wurden. Die anti-Yaa2 Antikörper erkennen somit das native Protein besser als das denaturierte Protein.

Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass Yaa2 sowohl früh (24 hpi), als auch spät in der Infektion (72 hpi) punktiert im chlamydialen Einschluss nachweisbar ist (Abbildung 4.4 C). Im Westernblot konnte 24 hpi jedoch noch kein Yaa2-Signal detektiert werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass für die Expressionsanalyse anti-Yaa2 Antiserum verwendet wurde, zur mikroskopischen Analyse allerdings antigengereinigter Antikörper. Da die Fixierung der Zellen mit PFA erfolgte, was die Detektion von intrachlamydialen Proteinen verhindert, kann davon ausgegangen werden, dass Yaa2 kein intrachlamydiales Protein ist. Der generierte polyklonale anti-Yaa2 Antikörper war nicht gut genug um zu klären, ob Yaa2 chlamydienassoziiert ist, oder ins Lumen des Einschlusses sekretiert wird. Die Oberflächenlokalisierung von Yaa2 wurde allerdings bereits mittels Antikörperdetektion auf infektiösen, lebenden EBs nachgewiesen (Montigiani, Falugi et al. 2002). Dies wird durch den bereits erläuterten, in dieser Arbeit durchgeführten ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) auf intakten EBs unterstützt, der jedoch aufgrund nicht ausreichender Kontrollen und experimentellen Wiederholungen nicht in den Ergebnisteil aufgenommen wurde (5.1.1, S 149, Abbildung 5.4. S. XVIII).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Yaa2 bereits als oberflächenlokalisiert beschrieben wurde und die in dieser Arbeit generierten experimentellen Daten diese Beobachtung unterstützen. Die, für die chlamydialen Adhäsine OmcB und Pmp21 typischen ringartigen Strukturen (Moelleken and Hegemann 2008; Moelleken, Schmidt et al. 2010), konnten nicht nachgewiesen werden.

Bioinformatische Analysen von Yaa2 deuten auf das Vorhandensein einer N-terminalen Signalsequenz von Aminosäure 1 bis 29 hin (SignalP4.0) (Petersen, Brunak et al. 2011). Ein Programm zur Identifikation von Transmembrandomänen (HMMTop) sagt eine Transmembranhelix von Aminosäure 8 bis 24 voraus (Tusnady and Simon 2001). Somit könnte Yaa2 über die Transmembrandomäne in der äußeren Membran der EBs verankert werden und über die extrazelluläre Domäne die Adhäsion an die Humanzelle vermitteln.

Eine Neutralisation der chlamydialen Infektion mit anti-Yaa2 Antiserum war jedoch kaum möglich (Abbildung 4.5). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass das anti-Yaa2 Antiserum das Yaa2-Antigen nur schwer detektiert und immunfluoreszenzmikroskopische Analysen mit antigengereinigtem Antikörper durchgeführt werden mussten. Zudem ist es möglich, dass die generierten anti-Yaa2 Antikörper Epitope von Yaa2 erkennen, die nicht essentiell für die Funktion von Yaa2 sind, sodass die anti-Yaa2 Antikörper nicht neutralisierend wären. Die Bindung der polyklonalen anti-Yaa2 Antikörper an infektiöse EBs war im ELISA bei einer Verdünnung von (1:200) nachweisbar (Abbildung 5.4, S. XVIII). Falls neutralisierende anti-Yaa2 Antikörper im Serum vorlägen und es sich bei Yaa2 tatsächlich um ein neues, für die Infektion essentielles, chlamydiales Adhäsion handelt, sollte daher zumindest bei der niedrigsten getesteten Verdünnung des polyklonalen Antiserums (1:10) ein starker reduzierender Effekt zu sehen. Das Antikörperneutralisationsexperiment deutet daher eher darauf hin, dass Yaa2 wahrscheinlich keine essentielle Rolle während der Adhäsion der chlamydialen EBs spielt.

In Adhäsionsexperimenten konnte rekombinantes Yaa2, das ohne die vorhergesagte Transmembrandomäne exprimiert wurde, weder die Adhäsion von fluoreszierenden Latexkügelchen an die Humanzelle vermitteln, noch konnte lösliches rYaa2 in Westernblotanalysen an Humanzellen assoziiert vorgefunden werden (Abbildung 4.6 B, D). Demnach konnte die adhäsive Eigenschaft von Yaa2, die in Adhäsionsexperimenten mittels Hefe-Oberflächenexpressionssystem beschrieben wurde (Fechtner 2009), mit rekombinatem Protein nicht bestätigt werden.

Es ist jedoch möglich, dass Yaa2 dennoch eine adhäsive Eigenschaft besitzt. So könnte das rekombinant hergestellte Yaa2 nicht korrekt gefaltet sein. Auch eine essentielle Modifikation von Yaa2 in der chlamydialen Infektion wäre denkbar, die dem rYaa2 fehlt, jedoch in der Hefe vorhanden sein muss. Ein Hinweis auf eine posttranslationale Modifikation von Yaa2 in der chlamydialen Infektion lieferte die Expressionsanalyse, in der Yaa2 in SDS-Gelen deutlich höher als nach dem berechneten Molekulargewicht lief (Abbildung 4.4 A). Das rekombinant hergestellte Yaa2 lief hingegen auf der erwarteten Höhe (Abbildung 4.3). Eine für die Adhäsion essentielle Modifikation wurde für MOMP von *C. trachomatis* beschrieben. MOMP wird über ein N-verknüpftes Oligosaccharid vom Mannosetyp glykosyliert und bindet über diese Zuckerstruktur an die humane Zelle (Swanson and Kuo 1994; Kuo, Takahashi et al. 1996; Kuo, Lee et al. 2004). Auch bei *C. pneumoniae* führte die Entfernung N-verknüpfter Oligosaccharide auf der Oberfläche der Humanzelle zu einer verminderten Adhäsion und Infektion (Kuo, Lee et al. 2004). Diese essentielle Modifikation scheint in Hefe und in *E. coli* nicht zu erfolgen, da MOMP weder im Hefe-Oberflächenexpressionssystem noch als

rekombinantes Protein die Adhäsion an Humanzellen vermittelte (Wuppermann 2001; Mölleken 2005).

Die Vorbehandlung der humanen Zellen mit rYaa2 zeigte einen schwachen, aber signifikanten neutralisierenden Effekt, wenn hohe Konzentrationen von rYaa2 eingesetzt wurden (Abbildung 4.7). So konnte die Infektion um maximal 30 % reduziert werden. Zum Vergleich konnte in vorangegangenen Studien gezeigt werden, dass die Vorbehandlung der Humanzellen mit den rekombinanten Adhäsinen OmcB und Pmp21 zu einer Reduktion der Infektion von bis zu 80 % führte (Moelleken and Hegemann 2008; Moelleken, Schmidt et al. 2010). Dennoch könnte die schwache, aber spezifische Reduktion der Infektion, vermittelt durch rYaa2, auf eine Funktion von Yaa2 an der Adhäsion hindeuten, wäre aber ebenfalls durch eine mögliche Selbstinteraktion von Yaa2 begründbar. Hierbei könnte rYaa2 in hohen Konzentrationen verstärkt an Yaa2 auf der Oberfläche der EBs binden und somit potentiell die Adhäsine OmcB und Pmp21 oder weitere Proteine, die an der Adhäsion oder Internalisierung beteiligt sind, abschirmen, was zu einer reduzierten Infektion führen würde.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Yaa2 zwar als oberflächenlokalisiert beschrieben ist, jedoch Antikörper gegen Yaa2 die Infektion kaum negativ beeinflussen. Zudem konnte die adhäsive Eigenschaft von Yaa2 mit rekombinantem Protein nicht bestätigt werden. Nach diesen experimentellen Daten ist eine Funktion von Yaa2 als Adhäsine unwahrscheinlich. Da jedoch rYaa2 die Infektion schwach neutralisierte, Yaa2 eventuell posttranslational modifiziert wird und die adhäsive Eigenschaft von Yaa2 im Hefe-Oberflächenexpressionssystem gezeigt werden konnte (Fechtner 2009), ist es dennoch nicht ausgeschlossen, dass Yaa2 ein chlamydiales Adhäsine ist.

Interessanterweise war Yaa2 in Immunisierungsversuchen von Hamstern in der Lage eine schützende Immunreaktion zu induzieren und könnte demnach als ein potentielles Antigen in Vakzinen verwendet werden (Sambri, Donati et al. 2004). Da homologe Proteine jedoch ausschließlich in *C. caviae*, *C. felis* und *C. abortus* existieren eignet sich Yaa2 nicht für die Immunisierung gegen eine *C. trachomatis* Infektion.

### 5.3 Yaa3 – weiterhin ein potentielles Adhäsine

Das Protein Yaa3 zeigte im vorangegangenen Screen nach potentiellen neuen Adhäsinen die stärkste Bindeeigenschaft der drei Yaa-Proteine und ist zudem als einziges Protein zwischen den chlamydialen Spezies hoch konserviert (Fechtner 2009). Außerhalb der Ordnung *Chlamydiales* besitzt Yaa3 (Homolog von CT849) keine homologen Proteine und ist somit ein

sehr spezifisches Protein (Griffiths, Ventresca et al. 2006). Daher war es, auch im Hinblick auf die Entwicklung eines Vakzins, das anfänglich vielversprechendste Protein der drei Kandidaten. Yaa3 ist mit 18 kDa relativ klein und besitzt einen variablen N-Terminus (AS 1 - 25) sowie einen stark konservierten C-Terminus mit Identitäten zwischen 83 % und 91 % innerhalb der Gattung *Chlamydia*. Dabei ähnelt Yaa3 vom Aufbau her dem Adhäsin OmcB. Das Yaa3-Protein konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht rekombinant in *E. coli* exprimiert und anschließend aufgereinigt werden. Das Fusionsprotein mit einem N-terminalen oder C-terminalen His-Tag konnte weder in unterschiedlichen *E. coli* Expressionsstämmen noch unter verschiedenen Expressionsbedingungen exprimiert werden (Abbildung 4.1 A - C). Erst durch die Koexpression mit Chaperonen, die die Faltung von Proteinen unterstützen, war eine Expression von rYaa3 in *E. coli* möglich (Abbildung 4.1 D). Jedoch war die anschließende Isolation von löslichem rYaa3 aus dem *E. coli* Lysat über den His-Tag nicht erfolgreich (Abbildung 4.1 E). Möglicherweise war der His-Tag hierbei durch das Chaperon abgedeckt, so dass eine Interaktion mit dem Trägermaterial aus Ni-NTA-Agarose nicht möglich war. Daher wurde ein GST-Yaa3-His-Fusionsprotein kloniert, das die sehr spezifische Isolation über den GST-Tag erlaubt. Zwischen dem GST-Tag und Yaa3 liegt eine spezifische Proteaseschnittstelle, über die der, im Vergleich zum Yaa3 (18 kDa), sehr große GST-Tag (26 kDa) abgetrennt werden kann. Die Expression des GST-Fusionsproteins in *E. coli* war zwar erfolgreich, jedoch konnte anschließend das GST-Yaa3<sub>6xHis</sub> Fusionsprotein nur in geringen Mengen aufgereinigt werden und enthielt zudem sehr viel Kontamination (Abbildung 4.2 A, B). Eine Abspaltung des Yaa3<sub>6xHis</sub> über die PreScission-Protease mit anschließender Aufreinigung über den His-Tag war nicht erfolgreich (Abbildung 4.2 C).

Auch die Expression und Aufreinigung des *C. trachomatis* Homologs von Yaa3, CT849, erwies sich im Rahmen einer anderen Arbeit als sehr schwierig. Da somit aller Versuche der Herstellung von rekombinantem Yaa3 scheiterten, wurde die Analyse von Yaa3 im Rahmen dieser Arbeit aufgegeben.

Um die Funktion von Yaa3 dennoch zu beschreiben, könnte versucht werden das rekombinante Protein in einem anderen Expressionssystem, wie beispielsweise der Hefe *S. cerevisiae*, zu exprimieren. Auch besteht die Möglichkeit über ein synthetisches Peptid einen spezifischen Peptidantikörper zu generieren.

Yaa3 besitzt eine bioinformatisch vorhergesagte DUF720-Domäne, die ausschließlich in chlamydialen Proteinen gefunden wird (Finn, Mistry et al. 2010). Bei *C. pneumoniae* gehören Cpn1004, Cpn1005 und Yaa3 zu diesen Proteinen. Für die homologen Proteine zu Cpn1004 und Yaa3 in *C. trachomatis* (CT847 und CT849) wurde bioinformatisch vorhergesagt, dass sie über das Typ III Sekretionssystem sekretiert werden (Samudrala, Heffron et al. 2009).

---

Transkriptionsanalysen beschreiben CT847 (Homolog von Cpn1004) als früh im Infektionszyklus hochreguliert (Belland, Zhong et al. 2003). In einer neueren Studie hingegen wird eine Transkription von CT847 für die mittlere Phase des Infektionszyklus beschrieben. Zudem war CT847 in RBs, jedoch nicht in EBs nachweisbar (Chellas-Gery, Linton et al. 2007). Auch wurde gezeigt, dass CT847 im heterologen System von *Yersinia* über den Typ III Sekretionsapparat sekretiert wird und in der Humanzelle mit humanem GCIP (Grap2 cyclin D-interacting protein) interagiert (Chellas-Gery, Linton et al. 2007). Sollte die DUF720-Domäne tatsächlich eine bestimmte Funktion vermitteln, so ist es aufgrund dieser Daten unwahrscheinlich, dass sie an der Adhäsion beteiligt ist. In einem Screen nach dominanten *C. trachomatis* Antigenen wurde auch auf das Yaa3-Homolog CT849 getestet (Sharma, Zhong et al. 2006). CT849 erwies sich hierbei nicht als immundominant, weshalb infrage gestellt werden muss, ob sich CT849 und damit auch Yaa3 als Bestandteil eines möglichen Vakzins zur Immunisierung eignet.

## Literaturverzeichnis

- Abdelrahman, Y. M. and R. J. Belland (2005). "The chlamydial developmental cycle." FEMS Microbiol Rev **29**(5): 949-59.
- 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.
- Ajonuma, L. C., K. L. Fok, et al. (2010). "CFTR is required for cellular entry and internalization of Chlamydia trachomatis." Cell Biol Int **34**(6): 593-600.
- Alrutz, M. A. and R. R. Isberg (1998). "Involvement of focal adhesion kinase in invasion-mediated uptake." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13658-63.
- Alrutz, M. A., A. Srivastava, et al. (2001). "Efficient uptake of Yersinia pseudotuberculosis via integrin receptors involves a Rac1-Arp 2/3 pathway that bypasses N-WASP function." Mol Microbiol **42**(3): 689-703.
- Bakolitsa, C., J. M. de Pereda, et al. (1999). "Crystal structure of the vinculin tail suggests a pathway for activation." Cell **99**(6): 603-13.
- Balana, M. E., F. Niedergang, et al. (2005). "ARF6 GTPase controls bacterial invasion by actin remodelling." J Cell Sci **118**(Pt 10): 2201-10.
- Barbour, A. G., K. Amano, et al. (1982). "Chlamydia trachomatis has penicillin-binding proteins but not detectable muramic acid." J Bacteriol **151**(1): 420-8.
- Barnett Foster, D., D. Philpott, et al. (1999). "Phosphatidylethanolamine recognition promotes enteropathogenic E. coli and enterohemorrhagic E. coli host cell attachment." Microb Pathog **27**(5): 289-301.
- Baud, D., G. Goy, et al. (2011). "Role of Chlamydia trachomatis in miscarriage." Emerg Infect Dis **17**(9): 1630-5.
- Bavoil, P. M., R. Hsia, et al. (2000). "Closing in on Chlamydia and its intracellular bag of tricks." Microbiology **146** ( Pt 11): 2723-31.
- Bebear, C. and B. de Barbeyrac (2009). "Genital Chlamydia trachomatis infections." Clin Microbiol Infect **15**(1): 4-10.
- Beck, K. A. and W. J. Nelson (1996). "The spectrin-based membrane skeleton as a membrane protein-sorting machine." Am J Physiol **270**(5 Pt 1): C1263-70.
- Becker, E. (unveröffentlicht). Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität. **Dissertation**.
- Belkin, A. M., O. I. Ornatsky, et al. (1988). "Diversity of vinculin/meta-vinculin in human tissues and cultivated cells. Expression of muscle specific variants of vinculin in human aorta smooth muscle cells." J Biol Chem **263**(14): 6631-5.
- Belland, R. J., S. P. Ouellette, et al. (2004). "Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis." Cell Microbiol **6**(2): 117-27.
- Belland, R. J., G. Zhong, et al. (2003). "Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of Chlamydia trachomatis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8478-83.
- Bern, M. and D. Goldberg (2005). "Automatic selection of representative proteins for bacterial phylogeny." BMC Evol Biol **5**: 34.
- Bernfield, M., M. Gotte, et al. (1999). "Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans." Annu Rev Biochem **68**: 729-77.
- Berven, F. S., K. Flikka, et al. (2004). "BOMP: a program to predict integral beta-barrel outer membrane proteins encoded within genomes of Gram-negative bacteria." Nucleic Acids Res **32**(Web Server issue): W394-9.
- Beswick, E. J., A. Travelstead, et al. (2003). "Comparative studies of glycosaminoglycan involvement in Chlamydia pneumoniae and C. trachomatis invasion of host cells." J Infect Dis **187**(8): 1291-300.
- Bevers, E. M., P. Comfurius, et al. (1999). "Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells." Biochim Biophys Acta **1439**(3): 317-30.

- Bierne, H. and P. Cossart (2002). "InlB, a surface protein of *Listeria monocytogenes* that behaves as an invasin and a growth factor." *J Cell Sci* **115**(Pt 17): 3357-67.
- Bierne, H., E. Gouin, et al. (2001). "A role for cofilin and LIM kinase in *Listeria*-induced phagocytosis." *J Cell Biol* **155**(1): 101-12.
- Bierne, H., H. Miki, et al. (2005). "WASP-related proteins, Abi1 and Ena/VASP are required for *Listeria* invasion induced by the Met receptor." *J Cell Sci* **118**(Pt 7): 1537-47.
- Blasi, F., P. Tarsia, et al. (2009). "*Chlamydia pneumoniae*." *Clin Microbiol Infect* **15**(1): 29-35.
- Boesze-Battaglia, K. and R. Schimmel (1997). "Cell membrane lipid composition and distribution: implications for cell function and lessons learned from photoreceptors and platelets." *J Exp Biol* **200**(Pt 23): 2927-36.
- Boleti, H., A. Benmerah, et al. (1999). "Chlamydia infection of epithelial cells expressing dynamin and Eps15 mutants: clathrin-independent entry into cells and dynamin-dependent productive growth." *J Cell Sci* **112**(Pt 10): 1487-96.
- Bonazzi, M., E. Veiga, et al. (2008). "Successive post-translational modifications of E-cadherin are required for InlA-mediated internalization of *Listeria monocytogenes*." *Cell Microbiol* **10**(11): 2208-22.
- Bougneres, L., S. E. Girardin, et al. (2004). "Cortactin and Crk cooperate to trigger actin polymerization during *Shigella* invasion of epithelial cells." *J Cell Biol* **166**(2): 225-35.
- Bourdet-Sicard, R., M. Rudiger, et al. (1999). "Binding of the *Shigella* protein IpaA to vinculin induces F-actin depolymerization." *Embo J* **18**(21): 5853-62.
- Braun, L., B. Ghebrehwet, et al. (2000). "gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*." *Embo J* **19**(7): 1458-66.
- Breslow, J. L. (1991). "Lipoprotein transport gene abnormalities underlying coronary heart disease susceptibility." *Annu Rev Med* **42**: 357-71.
- Bryant, M. R., C. B. Marta, et al. (2009). "Phosphorylation and lipid raft association of fibroblast growth factor receptor-2 in oligodendrocytes." *Glia* **57**(9): 935-46.
- Bunk, S., I. Susnea, et al. (2008). "Immunoproteomic identification and serological responses to novel *Chlamydia pneumoniae* antigens that are associated with persistent *C. pneumoniae* infections." *J Immunol* **180**(8): 5490-8.
- Burton, E. A., R. Plattner, et al. (2003). "Abl tyrosine kinases are required for infection by *Shigella flexneri*." *Embo J* **22**(20): 5471-9.
- Busse, J., E. Hartmann, et al. (1997). "Receptor affinity purification of a lipid-binding adhesin from *Haemophilus influenzae*." *J Infect Dis* **175**(1): 77-83.
- Caldwell, H. D., J. Kromhout, et al. (1981). "Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*." *Infect Immun* **31**(3): 1161-76.
- Callera, G. E., A. Yogi, et al. (2011). "Vascular proinflammatory responses by aldosterone are mediated via c-Src trafficking to cholesterol-rich microdomains: role of PDGFR." *Cardiovasc Res* **91**(4): 720-31.
- Campbell, L. A., C. C. Kuo, et al. (1990). "Serological response to *Chlamydia pneumoniae* infection." *J Clin Microbiol* **28**(6): 1261-4.
- Campbell, L. A., M. Puolakkainen, et al. (2012). "*Chlamydia pneumoniae* binds to the lectin-like oxidized LDL receptor for infection of endothelial cells." *Microbes Infect* **14**(1): 43-9.
- Capila, I. and R. J. Linhardt (2002). "Heparin-protein interactions." *Angew Chem Int Ed Engl* **41**(3): 391-412.
- Carabeo, R. A., C. A. Dooley, et al. (2007). "Rac interacts with Abi-1 and WAVE2 to promote an Arp2/3-dependent actin recruitment during chlamydial invasion." *Cell Microbiol* **9**(9): 2278-88.

- Carabeo, R. A., S. S. Grieshaber, et al. (2002). "Chlamydia trachomatis induces remodeling of the actin cytoskeleton during attachment and entry into HeLa cells." *Infect Immun* **70**(7): 3793-803.
- Carabeo, R. A., S. S. Grieshaber, et al. (2004). "Requirement for the Rac GTPase in Chlamydia trachomatis invasion of non-phagocytic cells." *Traffic* **5**(6): 418-25.
- Carabeo, R. A. and T. Hackstadt (2001). "Isolation and characterization of a mutant Chinese hamster ovary cell line that is resistant to Chlamydia trachomatis infection at a novel step in the attachment process." *Infect Immun* **69**(9): 5899-904.
- Carabeo, R. A., D. J. Mead, et al. (2003). "Golgi-dependent transport of cholesterol to the Chlamydia trachomatis inclusion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(11): 6771-6.
- Cardin, A. D. and H. J. Weintraub (1989). "Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions." *Arteriosclerosis* **9**(1): 21-32.
- Chandrasekar, I., T. E. Stradal, et al. (2005). "Vinculin acts as a sensor in lipid regulation of adhesion-site turnover." *J Cell Sci* **118**(Pt 7): 1461-72.
- Chellas-Gery, B., C. N. Linton, et al. (2007). "Human GCIP interacts with CT847, a novel Chlamydia trachomatis type III secretion substrate, and is degraded in a tissue-culture infection model." *Cell Microbiol* **9**(10): 2417-30.
- Chen, J. C. and R. S. Stephens (1994). "Trachoma and LGV biovars of Chlamydia trachomatis share the same glycosaminoglycan-dependent mechanism for infection of eukaryotic cells." *Mol Microbiol* **11**(3): 501-7.
- Chen, J. C., J. P. Zhang, et al. (1996). "Structural requirements of heparin binding to Chlamydia trachomatis." *J Biol Chem* **271**(19): 11134-40.
- Clausen, J. D., G. Christiansen, et al. (1997). "Chlamydia trachomatis utilizes the host cell microtubule network during early events of infection." *Mol Microbiol* **25**(3): 441-9.
- Clifton, D. R., C. A. Dooley, et al. (2005). "Tyrosine phosphorylation of the chlamydial effector protein Tarp is species specific and not required for recruitment of actin." *Infect Immun* **73**(7): 3860-8.
- Clifton, D. R., K. A. Fields, et al. (2004). "A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(27): 10166-71.
- Conant, C. G. and R. S. Stephens (2007). "Chlamydia attachment to mammalian cells requires protein disulfide isomerase." *Cell Microbiol* **9**(1): 222-32.
- Coombes, B. K. and J. B. Mahony (2002). "Identification of MEK- and phosphoinositide 3-kinase-dependent signalling as essential events during Chlamydia pneumoniae invasion of HEp2 cells." *Cell Microbiol* **4**(7): 447-60.
- Cornelis, G. R. (2006). "The type III secretion injectisome." *Nat Rev Microbiol* **4**(11): 811-25.
- Cossart, P. and P. J. Sansonetti (2004). "Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens." *Science* **304**(5668): 242-8.
- Coutte, L., R. Antoine, et al. (2001). "Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway." *Embo J* **20**(18): 5040-8.
- Crane, D. D., J. H. Carlson, et al. (2006). "Chlamydia trachomatis polymorphic membrane protein D is a species-common pan-neutralizing antigen." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(6): 1894-9.
- Cureton, D. K., R. H. Massol, et al. (2009). "Vesicular stomatitis virus enters cells through vesicles incompletely coated with clathrin that depend upon actin for internalization." *PLoS Pathog* **5**(4): e1000394.
- Cureton, D. K., R. H. Massol, et al. (2010). "The length of vesicular stomatitis virus particles dictates a need for actin assembly during clathrin-dependent endocytosis." *PLoS Pathog* **6**(9): e1001127.
- da Silva, C. V., L. Cruz, et al. (2011). "A glance at Listeria and Salmonella cell invasion: different strategies to promote host actin polymerization." *Int J Med Microbiol* **302**(1): 19-32.

- Damm, E. M., L. Pelkmans, et al. (2005). "Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae." *J Cell Biol* **168**(3): 477-88.
- Dautry-Varsat, A., M. E. Balana, et al. (2004). "Chlamydia--host cell interactions: recent advances on bacterial entry and intracellular development." *Traffic* **5**(8): 561-70.
- Dautry-Varsat, A., A. Subtil, et al. (2005). "Recent insights into the mechanisms of Chlamydia entry." *Cell Microbiol* **7**(12): 1714-22.
- Davis, C. H., J. E. Raulston, et al. (2002). "Protein disulfide isomerase, a component of the estrogen receptor complex, is associated with Chlamydia trachomatis serovar E attached to human endometrial epithelial cells." *Infect Immun* **70**(7): 3413-8.
- Davis, C. H. and P. B. Wyrick (1997). "Differences in the association of Chlamydia trachomatis serovar E and serovar L2 with epithelial cells in vitro may reflect biological differences in vivo." *Infect Immun* **65**(7): 2914-24.
- Delva, E., D. K. Tucker, et al. (2009). "The desmosome." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**(2): a002543.
- Dersch, P. and R. R. Isberg (1999). "A region of the Yersinia pseudotuberculosis invasins protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self-association." *Embo J* **18**(5): 1199-213.
- Diez, G., F. List, et al. (2008). "Direct evidence of vinculin tail-lipid membrane interaction in beta-sheet conformation." *Biochem Biophys Res Commun* **373**(1): 69-73.
- Ding, Y., L. Zhang, et al. (2008). "Plectin regulates the signaling and trafficking of the HIV-1 co-receptor CXCR4 and plays a role in HIV-1 infection." *Exp Cell Res* **314**(3): 590-602.
- Doherty, G. J. and H. T. McMahon (2009). "Mechanisms of endocytosis." *Annu Rev Biochem* **78**: 857-902.
- Dufour, C., H. Guenou, et al. (2008). "FGFR2-Cbl interaction in lipid rafts triggers attenuation of PI3K/Akt signaling and osteoblast survival." *Bone* **42**(6): 1032-9.
- Eitel, J., T. Heise, et al. (2005). "Cell invasion and IL-8 production pathways initiated by YadA of Yersinia pseudotuberculosis require common signalling molecules (FAK, c-Src, Ras) and distinct cell factors." *Cell Microbiol* **7**(1): 63-77.
- Elkin, S. K., D. Ivanov, et al. (2005). "A PHD finger motif in the C terminus of RAG2 modulates recombination activity." *J Biol Chem* **280**(31): 28701-10.
- 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.
- Esko, J. D. and S. B. Selleck (2002). "Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate." *Annu Rev Biochem* **71**: 435-71.
- Everett, K. D., R. M. Bush, et al. (1999). "Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms." *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 2**: 415-40.
- Everett, K. D. and T. P. Hatch (1995). "Architecture of the cell envelope of Chlamydia psittaci 6BC." *J Bacteriol* **177**(4): 877-82.
- Ewers, H., W. Romer, et al. (2010). "GM1 structure determines SV40-induced membrane invagination and infection." *Nat Cell Biol* **12**(1): 11-8; sup pp 1-12.
- Fadel, S. and A. Eley (2004). "Chlorate: a reversible inhibitor of proteoglycan sulphation in Chlamydia trachomatis-infected cells." *J Med Microbiol* **53**(Pt 2): 93-5.
- Fadel, S. and A. Eley (2007). "Chlamydia trachomatis OmcB protein is a surface-exposed glycosaminoglycan-dependent adhesin." *J Med Microbiol* **56**(Pt 1): 15-22.
- Fadel, S. and A. Eley (2008). "Differential glycosaminoglycan binding of Chlamydia trachomatis OmcB protein from serovars E and LGV." *J Med Microbiol* **57**(Pt 9): 1058-61.

- Fadel, S. and A. Eley (2008). "Is lipopolysaccharide a factor in infectivity of *Chlamydia trachomatis*?" J Med Microbiol **57**(Pt 3): 261-6.
- Fechtner, T. (2009). Funktionelle Analyse des chlamydialen Adhäsins OmcB und Identifizierung neuer, potentieller Adhäsine. Lehrstuhl für Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität. **Dilpom Arbeit**.
- Fechtner, T., S. Stallmann, et al. (unveröffentlicht).
- Finco, O., A. Bonci, et al. (2005). "Identification of new potential vaccine candidates against *Chlamydia pneumoniae* by multiple screenings." Vaccine **23**(9): 1178-88.
- Fink, G. R., Hicks, J.B., Sherman, F. (1983). *Methods in yeast genetics, laboratory manual* Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Finn, R. D., J. Mistry, et al. (2010). "The Pfam protein families database." Nucleic Acids Res **38**(Database issue): D211-22.
- Fryden, A., E. Kihlstrom, et al. (1989). "A clinical and epidemiological study of "ornithosis" caused by *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR)." Scand J Infect Dis **21**(6): 681-91.
- Fu, Y. and J. E. Galan (1999). "A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion." Nature **401**(6750): 293-7.
- Fudyk, T., L. Olinger, et al. (2002). "Selection of mutant cell lines resistant to infection by *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*." Infect Immun **70**(11): 6444-7.
- Gabel, B. R., C. Elwell, et al. (2004). "Lipid raft-mediated entry is not required for *Chlamydia trachomatis* infection of cultured epithelial cells." Infect Immun **72**(12): 7367-73.
- Galle, J. (2012). Funktionsanalyse des *Chlamydia pneumoniae* Adhäsionsprotein Yaa1. Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität. **Bachelorarbeit**.
- Garcia-Olivas, R., J. Hoebeke, et al. (2003). "Differential binding of platelet-derived growth factor isoforms to glycosaminoglycans." Histochem Cell Biol **120**(5): 371-82.
- Garner, M. J., R. D. Hayward, et al. (2002). "The *Salmonella* pathogenicity island 1 secretion system directs cellular cholesterol redistribution during mammalian cell entry and intracellular trafficking." Cell Microbiol **4**(3): 153-65.
- Gerlach, R. G. and M. Hensel (2007). "Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens." Int J Med Microbiol **297**(6): 401-15.
- Gietz, R. D., R. H. Schiestl, et al. (1995). "Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure." Yeast **11**(4): 355-60.
- Gimona, M., J. V. Small, et al. (1988). "Porcine vinculin and metavinculin differ by a 68-residue insert located close to the carboxy-terminal part of the molecule." Embo J **7**(8): 2329-34.
- Gold, B. D., M. Huesca, et al. (1993). "*Helicobacter mustelae* and *Helicobacter pylori* bind to common lipid receptors in vitro." Infect Immun **61**(6): 2632-8.
- Grassme, H., V. Jendrossek, et al. (2003). "Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts." Nat Med **9**(3): 322-30.
- Griffiths, E., M. S. Ventresca, et al. (2006). "BLAST screening of chlamydial genomes to identify signature proteins that are unique for the Chlamydiales, Chlamydiaceae, Chlamydozoa and Chlamydia groups of species." BMC Genomics **7**: 14.
- Grimwood, J. and R. S. Stephens (1999). "Computational analysis of the polymorphic membrane protein superfamily of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*." Microb Comp Genomics **4**(3): 187-201.
- Hahn, D. L., A. A. Azenabor, et al. (2002). "*Chlamydia pneumoniae* as a respiratory pathogen." Front Biosci **7**: e66-76.
- Halberstädter, L. and S. Prowazek (1907). "Über Zelleinschlüsse parasitärer Natur beim Trachom." Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, Berlin **26**: 44-47.

- Hall, J. V., M. Schell, et al. (2011). "The multifaceted role of oestrogen in enhancing Chlamydia trachomatis infection in polarized human endometrial epithelial cells." Cell Microbiol **13**(8): 1183-99.
- Hamiaux, C., A. van Eerde, et al. (2006). "Structural mimicry for vinculin activation by IpaA, a virulence factor of Shigella flexneri." EMBO Rep **7**(8): 794-9.
- Hardt, W. D., L. M. Chen, et al. (1998). "S. typhimurium encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells." Cell **93**(5): 815-26.
- Harlow, E. and D. Lane (1999). Using Antibodies: A Laboratory Manual, CHSL Press.
- Hatch, T. P. (1996). "Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in chlamydiae?" J Bacteriol **178**(1): 1-5.
- Hayward, R. D., R. J. Cain, et al. (2005). "Cholesterol binding by the bacterial type III translocon is essential for virulence effector delivery into mammalian cells." Mol Microbiol **56**(3): 590-603.
- Hayward, R. D. and V. Koronakis (1999). "Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive Salmonella." Embo J **18**(18): 4926-34.
- Heise, T. and P. Dersch (2006). "Identification of a domain in Yersinia virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(9): 3375-80.
- Herbst, F. (2011). Identifizierung und Charakterisierung potentieller neuer Effektorproteine aus Chlamydia pneumoniae. Lehrstuhl für Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität. **Dissertation**.
- Hogan, R. J., S. A. Mathews, et al. (2004). "Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm." Infect Immun **72**(4): 1843-55.
- Horn, M. (2008). "Chlamydiae as symbionts in eukaryotes." Annu Rev Microbiol **62**: 113-31.
- Hybiske, K. and R. S. Stephens (2007). "Mechanisms of Chlamydia trachomatis Entry into Nonphagocytic Cells." Infect Immun **75**(8): 3925-34.
- Hybiske, K. and R. S. Stephens (2007). "Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium Chlamydia." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(27): 11430-5.
- Iretton, K., B. Payrastre, et al. (1999). "The Listeria monocytogenes protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase." J Biol Chem **274**(24): 17025-32.
- Isberg, R. R. and P. Barnes (2001). "Subversion of integrins by enteropathogenic Yersinia." J Cell Sci **114**(Pt 1): 21-28.
- Isberg, R. R. and J. M. Leong (1990). "Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells." Cell **60**(5): 861-71.
- Jeannotte, M. E., M. Abul-Milh, et al. (2003). "Binding of Actinobacillus pleuropneumoniae to phosphatidylethanolamine." Infect Immun **71**(8): 4657-63.
- Jewett, T. J., E. R. Fischer, et al. (2006). "Chlamydial TARP is a bacterial nucleator of actin." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(42): 15599-604.
- Jewett, T. J., N. J. Miller, et al. (2010). "The conserved Tarp actin binding domain is important for chlamydial invasion." PLoS Pathog **6**(7): e1000997.
- Jiwani, S., R. J. Ohr, et al. (2012). "Chlamydia trachomatis Tarp cooperates with the Arp2/3 complex to increase the rate of actin polymerization." Biochem Biophys Res Commun **420**(4): 816-21.
- Johnson, R. P. and S. W. Craig (1995). "The carboxy-terminal tail domain of vinculin contains a cryptic binding site for acidic phospholipids." Biochem Biophys Res Commun **210**(1): 159-64.
- Johnson, R. P., V. Niggli, et al. (1998). "A conserved motif in the tail domain of vinculin mediates association with and insertion into acidic phospholipid bilayers." Biochemistry **37**(28): 10211-22.

- Jonquieres, R., J. Pizarro-Cerda, et al. (2001). "Synergy between the N- and C-terminal domains of InlB for efficient invasion of non-phagocytic cells by *Listeria monocytogenes*." Mol Microbiol **42**(4): 955-65.
- Jutras, I., L. Abrami, et al. (2003). "Entry of the lymphogranuloma venereum strain of *Chlamydia trachomatis* into host cells involves cholesterol-rich membrane domains." Infect Immun **71**(1): 260-6.
- Kall, L., A. Krogh, et al. (2004). "A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method." J Mol Biol **338**(5): 1027-36.
- Kalman, S., W. Mitchell, et al. (1999). "Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*." Nat Genet **21**(4): 385-9.
- Kelley, L. A. and M. J. Sternberg (2009). "Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server." Nat Protoc **4**(3): 363-71.
- Kenny, B., R. DeVinney, et al. (1997). "Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells." Cell **91**(4): 511-20.
- Kerr, K., G. Entrican, et al. (2005). "Immunopathology of *Chlamydia abortus* infection in sheep and mice." Res Vet Sci **78**(1): 1-7.
- Kilsdonk, E. P., P. G. Yancey, et al. (1995). "Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins." J Biol Chem **270**(29): 17250-6.
- Kim, J. H., S. Jiang, et al. (2011). "*Chlamydia trachomatis* Co-opts the FGF2 signaling pathway to enhance infection." PLoS Pathog **7**(10): e1002285.
- Kirchhausen, T., E. Macia, et al. (2008). "Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis." Methods Enzymol **438**: 77-93.
- Kirkham, M. and R. G. Parton (2005). "Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers." Biochim Biophys Acta **1746**(3): 349-63.
- Kiselev, A. O., M. C. Skinner, et al. (2009). "Analysis of pmpD expression and PmpD post-translational processing during the life cycle of *Chlamydia trachomatis* serovars A, D, and L2." PLoS One **4**(4): e5191.
- Kjellen, L. and U. Lindahl (1991). "Proteoglycans: structures and interactions [published erratum appears in *Annu Rev Biochem* 1992;61:following viii]." Annu Rev Biochem **60**: 443-75.
- Knudsen, K., A. S. Madsen, et al. (1999). "Identification of two novel genes encoding 97- to 99-kilodalton outer membrane proteins of *Chlamydia pneumoniae*." Infect Immun **67**(1): 375-83.
- Korhonen, J. T., M. Puolakkainen, et al. (2012). "*Chlamydia pneumoniae* entry into epithelial cells by clathrin-independent endocytosis." Microb Pathog **52**(3): 157-64.
- Krachler, A. M., H. Ham, et al. (2011). "Outer membrane adhesion factor multivalent adhesion molecule 7 initiates host cell binding during infection by gram-negative pathogens." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(28): 11614-9.
- Krachler, A. M. and K. Orth (2011). "Functional characterization of the interaction between bacterial adhesin multivalent adhesion molecule 7 (MAM7) protein and its host cell ligands." J Biol Chem **286**(45): 38939-47.
- Krivan, H. C., B. Nilsson, et al. (1991). "*Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae* bind specifically to phosphatidylethanolamine in HeLa cells and to GalNAc beta 1-4Gal beta 1-4GLC sequences-found in asialo-GM1 and asial-GM2." Biochem Biophys Res Commun **175**(3): 1082-9.
- Kubori, T. and J. E. Galan (2003). "Temporal regulation of salmonella virulence effector function by proteasome-dependent protein degradation." Cell **115**(3): 333-42.
- Kumar, Y., J. Cocchiaro, et al. (2006). "The obligate intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis* targets host lipid droplets." Curr Biol **16**(16): 1646-51.
- Kuo, C. C., L. A. Jackson, et al. (1995). "*Chlamydia pneumoniae* (TWAR)." Clin Microbiol Rev **8**(4): 451-61.

- Kuo, C. C., A. Lee, et al. (2004). "Cleavage of the N-linked oligosaccharide from the surfaces of Chlamydia species affects attachment and infectivity of the organisms in human epithelial and endothelial cells." *Infect Immun* **72**(11): 6699-701.
- Kuo, C. C., N. Takahashi, et al. (1996). "An N Linked High Mannose Type Oligosaccharide, Expressed At the Major Outer Membrane Protein of Chlamydia Trachomatis, Mediates Attachment and Infectivity of the Microorganism to Hela Cells." *Journal of Clinical Investigation* **98** (12): 2813-2818.
- Lafont, F., L. Abrami, et al. (2004). "Bacterial subversion of lipid rafts." *Curr Opin Microbiol* **7**(1): 4-10.
- Lafont, F., G. Tran Van Nhieu, et al. (2002). "Initial steps of Shigella infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44-IpaB interaction." *Embo J* **21**(17): 4449-57.
- Lafont, F. and F. G. van der Goot (2005). "Bacterial invasion via lipid rafts." *Cell Microbiol* **7**(5): 613-20.
- Lara-Tejero, M. and J. E. Galan (2009). "Salmonella enterica serovar typhimurium pathogenicity island 1-encoded type III secretion system translocases mediate intimate attachment to nonphagocytic cells." *Infect Immun* **77**(7): 2635-42.
- Lecuit, M., R. Hurme, et al. (2000). "A role for alpha-and beta-catenins in bacterial uptake." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18): 10008-13.
- Lingwood, C. A., M. Huesca, et al. (1992). "The glycerolipid receptor for Helicobacter pylori (and exoenzyme S) is phosphatidylethanolamine." *Infect Immun* **60**(6): 2470-4.
- Linhardt, R. J. and T. Toida (2004). "Role of glycosaminoglycans in cellular communication." *Acc Chem Res* **37**(7): 431-8.
- Lizcano, A., C. J. Sanchez, et al. (2012). "A role for glycosylated serine-rich repeat proteins in gram-positive bacterial pathogenesis." *Mol Oral Microbiol* **27**(4): 257-69.
- Macdonald, J. L. and L. J. Pike (2005). "A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts." *J Lipid Res* **46**(5): 1061-7.
- Machnicka, B., R. Grochowalska, et al. (2011). "Spectrin-based skeleton as an actor in cell signaling." *Cell Mol Life Sci* **69**(2): 191-201.
- Macia, E., M. Ehrlich, et al. (2006). "Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin." *Dev Cell* **10**(6): 839-50.
- Majeed, M. and E. Kihlstrom (1991). "Mobilization of F-actin and clathrin during redistribution of Chlamydia trachomatis to an intracellular site in eucaryotic cells." *Infect Immun* **59**(12): 4465-72.
- Manes, S., G. del Real, et al. (2003). "Pathogens: raft hijackers." *Nat Rev Immunol* **3**(7): 557-68.
- Marquez, D. C., H. W. Chen, et al. (2006). "Estrogen receptors in membrane lipid rafts and signal transduction in breast cancer." *Mol Cell Endocrinol* **246**(1-2): 91-100.
- Matarazzo, S., M. C. Quitadamo, et al. (2012). "Cholesterol-lowering drugs inhibit lectin-like oxidized low-density lipoprotein-1 receptor function by membrane raft disruption." *Mol Pharmacol* **82**(2): 246-54.
- Mazar, J. and P. A. Cotter (2006). "Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion." *Mol Microbiol* **62**(3): 641-54.
- McClarty, G. (1994). "Chlamydiae and the biochemistry of intracellular parasitism." *Trends Microbiol* **2**(5): 157-64.
- McCoy, A. J. and A. T. Maurelli (2006). "Building the invisible wall: updating the chlamydial peptidoglycan anomaly." *Trends Microbiol* **14**(2): 70-7.
- McGhie, E. J., R. D. Hayward, et al. (2001). "Cooperation between actin-binding proteins of invasive Salmonella: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin." *Embo J* **20**(9): 2131-9.
- McGhie, E. J., R. D. Hayward, et al. (2004). "Control of actin turnover by a salmonella invasion protein." *Mol Cell* **13**(4): 497-510.

- McMahon, H. T. and E. Boucrot (2011). "Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(8): 517-33.
- Mercer, J. and A. Helenius (2008). "Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells." Science **320**(5875): 531-5.
- Mierke, C. T. (2009). "The role of vinculin in the regulation of the mechanical properties of cells." Cell Biochem Biophys **53**(3): 115-26.
- Mijouin, L., M. Rosselin, et al. (2012). "Salmonella enteritidis Rck-mediated invasion requires activation of Rac1, which is dependent on the class I PI 3-kinases-Akt signaling pathway." Faseb J **26**(4): 1569-81.
- Mineo, C., G. L. James, et al. (1996). "Localization of epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane." J Biol Chem **271**(20): 11930-5.
- Moelleken, K., E. Becker, et al. (unveröffentlicht).
- Moelleken, K. and J. H. Hegemann (2008). "The Chlamydia outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding." Mol Microbiol **67**(2): 403-19.
- Moelleken, 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): 1004-17.
- Mölleken, K. (2005). Charakterisierung des OmcB Adhäsins von Chlamydia pneumoniae. Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität.
- Montigiani, S., F. Falugi, et al. (2002). "Genomic approach for analysis of surface proteins in Chlamydia pneumoniae." Infect Immun **70**(1): 368-79.
- Moulder, J. W. (1966). "The relation of the psittacosis group (Chlamydiae) to bacteria and viruses." Annu Rev Microbiol **20**: 107-30.
- Moulder, J. W. (1991). "Interaction of chlamydiae and host cells in vitro." Microbiol Rev **55**(1): 143-90.
- Moulder, J. W. (1993). "Why is Chlamydia sensitive to penicillin in the absence of peptidoglycan?" Infect Agents Dis **2**(2): 87-99.
- Mounier, J., M. R. Popoff, et al. (2009). "The IpaC carboxyterminal effector domain mediates Src-dependent actin polymerization during Shigella invasion of epithelial cells." PLoS Pathog **5**(1): e1000271.
- Murra, G. (unveröffentlicht).
- Myeni, S. K. and D. Zhou (2010). "The C terminus of SipC binds and bundles F-actin to promote Salmonella invasion." J Biol Chem **285**(18): 13357-63.
- Mygind, P., G. Christiansen, et al. (1998). "Analysis of the humoral immune response to Chlamydia outer membrane protein 2." Clin Diagn Lab Immunol **5**(3): 313-8.
- Nakamura, F., T. P. Stossel, et al. (2011). "The filamins: organizers of cell structure and function." Cell Adh Migr **5**(2): 160-9.
- Niebuhr, K., S. Giuriato, et al. (2002). "Conversion of PtdIns(4,5)P(2) into PtdIns(5)P by the S.flexneri effector IpgD reorganizes host cell morphology." Embo J **21**(19): 5069-78.
- Nomikos, M., K. Elgmati, et al. (2011). "Novel regulation of PLCzeta activity via its XY-linker." Biochem J **438**(3): 427-32.
- Norkin, L. C., S. A. Wolfson, et al. (2001). "Association of caveolin with Chlamydia trachomatis inclusions at early and late stages of infection." Exp Cell Res **266**(2): 229-38.
- Nummelin, H., M. C. Merckel, et al. (2004). "The Yersinia adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll." Embo J **23**(4): 701-11.
- Ojcius, D. M., T. Darville, et al. (2006). "Die heimliche Seuche." Spektrum der Wissenschaften Februar: 28-35.
- Op den Kamp, J. A. F. (1979). "Lipid Assymetry in Membranes." Annu Rev Biochem(48): 47-71.

- Owen, D. M., A. Magenau, et al. (2012). "The lipid raft hypothesis revisited--new insights on raft composition and function from super-resolution fluorescence microscopy." Bioessays **34**(9): 739-47.
- Palmer, S. M., M. P. Playford, et al. (2009). "Lipid binding to the tail domain of vinculin: specificity and the role of the N and C termini." J Biol Chem **284**(11): 7223-31.
- Parton, R. G. and A. A. Richards (2003). "Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms." Traffic **4**(11): 724-38.
- Patel, J. C. and J. E. Galan (2006). "Differential activation and function of Rho GTPases during Salmonella-host cell interactions." J Cell Biol **175**(3): 453-63.
- Pavelka, M. S., Jr. (2007). "Another brick in the wall." Trends Microbiol **15**(4): 147-9.
- Peeling, R. W. and R. C. Brunham (1996). "Chlamydiae as pathogens: new species and new issues." Emerg Infect Dis **2**(4): 307-19.
- Peters, J., D. P. Wilson, et al. (2007). "Type III secretion a la Chlamydia." Trends Microbiol **15**(6): 241-51.
- Petersen, T. N., S. Brunak, et al. (2011). "SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions." Nat Methods **8**(10): 785-6.
- Peterson, E. M., L. M. de la Maza, et al. (1998). "Characterization of a neutralizing monoclonal antibody directed at the lipopolysaccharide of Chlamydia pneumoniae." Infect Immun **66**(8): 3848-55.
- Pike, L. J. and L. Casey (2002). "Cholesterol levels modulate EGF receptor-mediated signaling by altering receptor function and trafficking." Biochemistry **41**(32): 10315-22.
- Pike, L. J., X. Han, et al. (2005). "Epidermal growth factor receptors are localized to lipid rafts that contain a balance of inner and outer leaflet lipids: a shotgun lipidomics study." J Biol Chem **280**(29): 26796-804.
- Pizarro-Cerda, J., M. Bonazzi, et al. (2010). "Clathrin-mediated endocytosis: what works for small, also works for big." Bioessays **32**(6): 496-504.
- Pizarro-Cerda, J. and P. Cossart (2006). "Bacterial adhesion and entry into host cells." Cell **124**(4): 715-27.
- Portig, I., J. C. Goodall, et al. (2003). "Characterization of the humoral immune response to Chlamydia outer membrane protein 2 in chlamydial infection." Clin Diagn Lab Immunol **10**(1): 103-7.
- Pospischil, A., R. Thoma, et al. (2002). "Abortion in woman caused by caprine Chlamydomphila abortus (Chlamydia psittaci serovar 1)." Swiss Med Wkly **132**(5-6): 64-6.
- Puolakkainen, M., C. C. Kuo, et al. (2005). "Chlamydia pneumoniae uses the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor for infection of endothelial cells." Infect Immun **73**(8): 4620-5.
- Puolakkainen, M., A. Lee, et al. (2008). "Retinoic acid inhibits the infectivity and growth of Chlamydia pneumoniae in epithelial and endothelial cells through different receptors." Microb Pathog **44**(5): 410-6.
- Radhakrishnan, G. K., Q. Yu, et al. (2009). "Brucella TIR Domain-containing Protein Mimics Properties of the Toll-like Receptor Adaptor Protein TIRAP." J Biol Chem **284**(15): 9892-8.
- Read, T. D., G. S. Myers, et al. (2003). "Genome sequence of Chlamydomphila caviae (Chlamydia psittaci GPIC): examining the role of niche-specific genes in the evolution of the Chlamydiaceae." Nucleic Acids Res **31**(8): 2134-47.
- Reineri, S., A. Bertoni, et al. (2007). "Membrane lipid rafts coordinate estrogen-dependent signaling in human platelets." Biochim Biophys Acta **1773**(2): 273-8.
- Riethmuller, J., A. Riehle, et al. (2006). "Membrane rafts in host-pathogen interactions." Biochim Biophys Acta **1758**(12): 2139-47.
- Robert Koch Institut (2012). Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2011. Berlin.

- Rockey, D. D., J. Lenart, et al. (2000). "Genome sequencing and our understanding of chlamydiae." *Infect Immun* **68**(10): 5473-9.
- Rodriguez-Escudero, I., N. L. Ferrer, et al. (2011). "Interaction of the Salmonella Typhimurium effector protein SopB with host cell Cdc42 is involved in intracellular replication." *Mol Microbiol* **80**(5): 1220-40.
- Rosselin, M., I. Virlogeux-Payant, et al. (2010). "Rck of Salmonella enterica, subspecies enterica serovar enteritidis, mediates zipper-like internalization." *Cell Res* **20**(6): 647-64.
- Rothberg, K. G., J. E. Heuser, et al. (1992). "Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats." *Cell* **68**(4): 673-82.
- Ruetz, T., S. Cornick, et al. (2011). "The spectrin cytoskeleton is crucial for adherent and invasive bacterial pathogenesis." *PLoS One* **6**(5): e19940.
- Runge, M., A. Binder, et al. (2012). "Investigations concerning the prevalence of Coxiella burnetii and Chlamydia abortus in sheep in correlation with management systems and abortion rate in Lower Saxony in 2004." *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **125**(3-4): 138-43.
- Rurangirwa, F. R., P. M. Dilbeck, et al. (1999). "Analysis of the 16S rRNA gene of microorganism 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**: 577-81.
- Rust, M. J., M. Lakadamyali, et al. (2004). "Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry." *Nat Struct Mol Biol* **11**(6): 567-73.
- Sambri, V., M. Donati, et al. (2004). "Experimental infection by Chlamydia pneumoniae in the hamster." *Vaccine* **22**(9-10): 1131-7.
- Sambrook, J., T. Maniatis, et al. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor laboratory.
- Samudrala, R., F. Heffron, et al. (2009). "Accurate prediction of secreted substrates and identification of a conserved putative secretion signal for type III secretion systems." *PLoS Pathog* **5**(4): e1000375.
- Sandvig, K., S. Pust, et al. (2011). "Clathrin-independent endocytosis: mechanisms and function." *Curr Opin Cell Biol* **23**(4): 413-20.
- Saunders, R. M., M. R. Holt, et al. (2006). "Role of vinculin in regulating focal adhesion turnover." *Eur J Cell Biol* **85**(6): 487-500.
- Schachter, J., R. S. Stephens, et al. (2001). "Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet." *Int J Syst Evol Microbiol* **51**(Pt 1): 249; author reply 251-3.
- Schlumberger, M. C., A. Friebel, et al. (2003). "Amino acids of the bacterial toxin SopE involved in G nucleotide exchange on Cdc42." *J Biol Chem* **278**(29): 27149-59.
- Schroeder, G. N. and H. Hilbi (2008). "Molecular pathogenesis of Shigella spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion." *Clin Microbiol Rev* **21**(1): 134-56.
- Schubert, W. D., C. Urbanke, et al. (2002). "Structure of internalin, a major invasion protein of Listeria monocytogenes, in complex with its human receptor E-cadherin." *Cell* **111**(6): 825-36.
- Seveau, S., H. Bierne, et al. (2004). "Role of lipid rafts in E-cadherin-- and HGF-R/Met-mediated entry of Listeria monocytogenes into host cells." *J Cell Biol* **166**(5): 743-53.
- Seveau, S., J. Pizarro-Cerda, et al. (2007). "Molecular mechanisms exploited by Listeria monocytogenes during host cell invasion." *Microbes Infect* **9**(10): 1167-75.
- Seveau, S., T. N. Tham, et al. (2007). "A FRET analysis to unravel the role of cholesterol in Rac1 and PI 3-kinase activation in the InlB/Met signalling pathway." *Cell Microbiol* **9**(3): 790-803.

- Sharma, J., Y. Zhong, et al. (2006). "Profiling of human antibody responses to *Chlamydia trachomatis* urogenital tract infection using microplates arrayed with 156 chlamydial fusion proteins." *Infect Immun* **74**(3): 1490-9.
- Shen, Y., M. Naujokas, et al. (2000). "InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase." *Cell* **103**(3): 501-10.
- Shin, J. S., Z. Gao, et al. (2000). "Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells." *Science* **289**(5480): 785-8.
- Sigismund, S., T. Woelk, et al. (2005). "Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(8): 2760-5.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." *Nature* **387**(6633): 569-72.
- Simons, K. and D. Toomre (2000). "Lipid rafts and signal transduction." *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(1): 31-9.
- Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972). "The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes." *Science* **175**: 720-731.
- Skoudy, A., J. Mounier, et al. (2000). "CD44 binds to the *Shigella* IpaB protein and participates in bacterial invasion of epithelial cells." *Cell Microbiol* **2**(1): 19-33.
- Soriani, M., P. Petit, et al. (2010). "Exploiting antigenic diversity for vaccine design: the chlamydia ArtJ paradigm." *J Biol Chem* **285**(39): 30126-38.
- Sousa, S., D. Cabanes, et al. (2007). "Src, cortactin and Arp2/3 complex are required for E-cadherin-mediated internalization of *Listeria* into cells." *Cell Microbiol* **9**(11): 2629-43.
- Stender, S., A. Friebel, et al. (2000). "Identification of SopE2 from *Salmonella typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell." *Mol Microbiol* **36**(6): 1206-21.
- Stephens, R. S., S. Kalman, et al. (1998). "Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *chlamydia trachomatis*." *Science* **282**(5389): 754-9.
- Stephens, R. S., K. Koshiyama, et al. (2001). "Heparin-binding outer membrane protein of chlamydiae." *Mol Microbiol* **40**(3): 691-9.
- Stephens, R. S., G. Myers, et al. (2009). "Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of *Chlamydia* resolved." *FEMS Immunol Med Microbiol* **55**(2): 115-9.
- Stuart, E. S., W. C. Webley, et al. (2003). "Lipid rafts, caveolae, caveolin-1, and entry by *Chlamydiae* into host cells." *Exp Cell Res* **287**(1): 67-78.
- Su, H., L. Raymond, et al. (1996). "A recombinant *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(20): 11143-8.
- Su, H., N. G. Watkins, et al. (1990). "*Chlamydia trachomatis*-host cell interactions: role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesin." *Infect Immun* **58**(4): 1017-25.
- Subtil, A., B. Wyplosz, et al. (2004). "Analysis of *Chlamydia caviae* entry sites and involvement of Cdc42 and Rac activity." *J Cell Sci* **117**(Pt 17): 3923-33.
- Sun, H., Y. Shen, et al. (2005). "Host adaptor proteins Gab1 and CrkII promote InIB-dependent entry of *Listeria monocytogenes*." *Cell Microbiol* **7**(3): 443-57.
- Swanson, A. F. and C. C. Kuo (1994). "Binding of the glycan of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* to HeLa cells." *Infect Immun* **62**(1): 24-8.
- Swanson, K. A., L. D. Taylor, et al. (2009). "*Chlamydia trachomatis* polymorphic membrane protein D is an oligomeric autotransporter with a higher-order structure." *Infect Immun* **77**(1): 508-16.
- Tan, C., R. C. Hsia, et al. (2010). "Variable expression of surface-exposed polymorphic membrane proteins in in vitro-grown *Chlamydia trachomatis*." *Cell Microbiol* **12**(2): 174-87.

- Taraktchoglou, M., A. A. Pacey, et al. (2001). "Infectivity of Chlamydia trachomatis serovar LGV but not E is dependent on host cell heparan sulfate." *Infect Immun* **69**(2): 968-76.
- Ting, L. M., R. C. Hsia, et al. (1995). "Interaction of outer envelope proteins of Chlamydia psittaci GPIC with the HeLa cell surface." *Infect Immun* **63**(9): 3600-8.
- Todd, W. J. and H. D. Caldwell (1985). "The interaction of Chlamydia trachomatis with host cells: ultrastructural studies of the mechanism of release of a biovar II strain from HeLa 229 cells." *J Infect Dis* **151**(6): 1037-44.
- Tran Van Nhieu, G., E. Caron, et al. (1999). "IpaC induces actin polymerization and filopodia formation during Shigella entry into epithelial cells." *Embo J* **18**(12): 3249-62.
- Tusnady, G. E. and I. Simon (2001). "The HMMTOP transmembrane topology prediction server." *Bioinformatics* **17**(9): 849-50.
- Uliczka, F., T. Kornprobst, et al. (2009). "Cell invasion of Yersinia pseudotuberculosis by invasins and YadA requires protein kinase C, phospholipase C-gamma1 and Akt kinase." *Cell Microbiol* **11**(12): 1782-801.
- Valdivia, R. H. (2008). "Chlamydia effector proteins and new insights into chlamydial cellular microbiology." *Curr Opin Microbiol* **11**(1): 53-9.
- van den Brom, R., K. Lievaart-Peterson, et al. (2012). "Abortion in small ruminants in the Netherlands between 2006 and 2011." *Tijdschr Diergeneesk* **137**(7): 450-7.
- van der Goot, F. G., G. Tran van Nhieu, et al. (2004). "Rafts can trigger contact-mediated secretion of bacterial effectors via a lipid-based mechanism." *J Biol Chem* **279**(46): 47792-8.
- van Meer, G., D. R. Voelker, et al. (2008). "Membrane lipids: where they are and how they behave." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(2): 112-24.
- Vandahl, B. B., S. Birkelund, et al. (2004). "Genome and proteome analysis of Chlamydia." *Proteomics* **4**(10): 2831-42.
- Vandahl, B. B., A. S. Pedersen, et al. (2002). "The expression, processing and localization of polymorphic membrane proteins in Chlamydia pneumoniae strain CWL029." *BMC Microbiol* **2**(1): 36.
- Veiga, E. and P. Cossart (2005). "Listeria hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells." *Nat Cell Biol* **7**(9): 894-900.
- Veiga, E. and P. Cossart (2006). "The role of clathrin-dependent endocytosis in bacterial internalization." *Trends Cell Biol* **16**(10): 499-504.
- Vercauteren, D., R. E. Vandenbroucke, et al. (2010). "The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls." *Mol Ther* **18**(3): 561-9.
- Vieira, F. S., G. Correa, et al. (2010). "Host-cell lipid rafts: a safe door for micro-organisms?" *Biol Cell* **102**(7): 391-407.
- Wang, A., S. C. Johnston, et al. (2010). "A systemic network for Chlamydia pneumoniae entry into human cells." *J Bacteriol*.
- Wang, J., B. D. Sykes, et al. (2002). "Structural basis for the conformational adaptability of apolipoprotein III, a helix-bundle exchangeable apolipoprotein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(3): 1188-93.
- Wang, Y., S. Kahane, et al. (2011). "Development of a transformation system for Chlamydia trachomatis: restoration of glycogen biosynthesis by acquisition of a plasmid shuttle vector." *PLoS Pathog* **7**(9): e1002258.
- Wass, M. N., L. A. Kelley, et al. (2010). "3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures." *Nucleic Acids Res* **38**(Web Server issue): W469-73.
- Wehrl, W., V. Brinkmann, et al. (2004). "From the inside out--processing of the Chlamydial autotransporter PmpD and its role in bacterial adhesion and activation of human host cells." *Mol Microbiol* **51**(2): 319-34.
- Weisburg, W. G., T. P. Hatch, et al. (1986). "Eubacterial origin of chlamydiae." *J Bacteriol* **167**(2): 570-4.

- Whitcher, J. P., M. Srinivasan, et al. (2001). "Corneal blindness: a global perspective." Bull World Health Organ **79**(3): 214-21.
- Wiche, G. (1998). "Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics." J Cell Sci **111** (Pt 17): 2477-86.
- Wiedemann, A., M. Rosselin, et al. (2012). "Involvement of c-Src tyrosine kinase upstream of class I phosphatidylinositol (PI) 3-kinases in Salmonella Enteritidis Rck protein-mediated invasion." J Biol Chem **287**(37): 31148-54.
- Witt, S., A. Zieseniss, et al. (2004). "Comparative biochemical analysis suggests that vinculin and metavinculin cooperate in muscular adhesion sites." J Biol Chem **279**(30): 31533-43.
- Wolf, K., E. Fischer, et al. (2000). "Ultrastructural analysis of developmental events in Chlamydia pneumoniae-infected cells." Infect Immun **68**(4): 2379-85.
- Wong, K. W. and R. R. Isberg (2003). "Arf6 and phosphoinositol-4-phosphate-5-kinase activities permit bypass of the Rac1 requirement for beta1 integrin-mediated bacterial uptake." J Exp Med **198**(4): 603-14.
- World Health Organization (2011). Prevalence and Incidence of selected sexually transmitted infections.
- Wu, L. and S. L. Gonias (2005). "The low-density lipoprotein receptor-related protein-1 associates transiently with lipid rafts." J Cell Biochem **96**(5): 1021-33.
- Wu, Y., Q. Li, et al. (2007). "Detecting protein-protein interactions by Far western blotting." Nat Protoc **2**(12): 3278-84.
- Wuppermann, F. N. (2001). Untersuchungen zum Adhäsionsmechanismus von Chlamydia pneumoniae. Naturwissenschaftlichen Fakultät. Giessen, Justus-Liebig-Universität.
- Wuppermann, F. N., J. H. Hegemann, et al. (2001). "Heparan Sulfate-like Glycosaminoglycan Is a Cellular Receptor for Chlamydia pneumoniae." J Infect Dis **184**(2): 181-7.
- Wuppermann, F. N., K. Molleken, et al. (2008). "Chlamydia pneumoniae GroEL1 protein is cell surface associated and required for infection of HEp-2 cells." J Bacteriol **190**(10): 3757-67.
- 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): 7233-42.
- Yan, Y., S. Silvennoinen-Kassinen, et al. (2006). "Inhibitory effect of heparan sulfate-like glycosaminoglycans on the infectivity of Chlamydia pneumoniae in HL cells varies between strains." Microbes Infect **8**(3): 866-72.
- Yoshida, S., E. Katayama, et al. (2002). "Shigella deliver an effector protein to trigger host microtubule destabilization, which promotes Rac1 activity and efficient bacterial internalization." Embo J **21**(12): 2923-35.
- Zhang, J. P. and R. S. Stephens (1992). "Mechanism of C. trachomatis attachment to eukaryotic host cells." Cell **69**(5): 861-9.
- Zhou, D., L. M. Chen, et al. (2001). "A Salmonella inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization." Mol Microbiol **39**(2): 248-59.
- Zhou, D., M. S. Mooseker, et al. (1999). "Role of the S. typhimurium actin-binding protein SipA in bacterial internalization." Science **283**(5410): 2092-5.

## Anhang

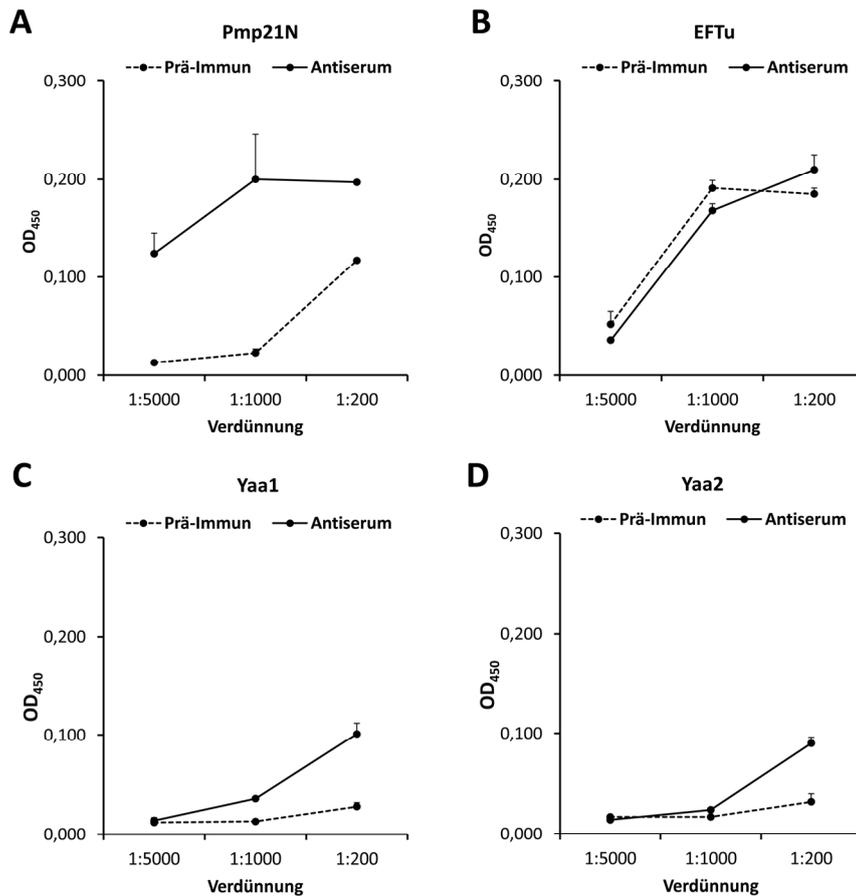
Auflistung aller massenspektrometrisch identifizierten Proteine aus dem „Pull Down“ Experiment zur Identifizierung eines potentiellen Interaktionspartners von rYaa1.

Die Bandennummern entsprechen den ausgeschnittenen Banden wobei Bande 1 die mit dem höchsten Molekulargewicht ist.

Bande	Protein*	Punkte	Sequenz-abdeckung [%]	Anzahl Peptide	gefunden (gesamt)	2te Analyse
1	Plectin	4726,4	20,0	88	3	JA
	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	4017,8	21,0	93	3	JA
	E3 SUMO-protein ligase RanBP2	597,2	4,7	12	1	NEIN
	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain	279,6	1,7	7	1	JA
	Antigen KI-67	174,7	1,8	5	1	NEIN
	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	63,6	0,3	2	2	NEIN
2	Filamin-A	2471,8	25,3	54	1	JA
	Spectrin alpha chain	1590,9	13,3	33	1	JA
	Spectrin beta chain	1179,7	11,0	25	2	JA
	Filamin-B	942,6	10,3	19	1	JA
	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	699,5	8,1	20	3	NEIN
	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	344,4	2,3	10	3	JA
	Fatty acid synthase	337,7	3,1	6	2	NEIN
	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	263,3	2,7	5	1	NEIN
	Plectin	214,5	1,7	7	3	JA
	Neural cell adhesion molecule L1	129,9	2,9	3	1	NEIN
	Desmoplakin	103,7	1,0	3	2	NEIN
	Ribosome-binding protein 1	91,6	1,8	2	1	NEIN
	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	76,4	0,7	2	1	NEIN
	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	70,5	0,4	1	2	NEIN
Nucleoprotein TPR	53,1	0,4	1	1	NEIN	
3	Myosin-9	1362,9	14,6	27	2	NEIN
	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	1223,0	11,6	24	1	NEIN
	Myoferlin	852,0	10,1	18	1	NEIN
	Nuclear mitotic apparatus protein 1	812,6	9,9	19	1	NEIN
	Fatty acid synthase	651,2	6,9	15	2	NEIN
	Nuclear pore membrane glycoprotein 210	568,7	6,7	10	1	NEIN
	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	324,6	3,5	8	3	NEIN
	Nuclear pore complex protein Nup205	318,4	3,7	7	1	NEIN
	Protein RRP5 homolog	249,7	4,1	6	1	NEIN
	Myosin-10	246,1	3,0	2	1	NEIN

	HEAT repeat-containing protein 1	179,0	2,6	5	1	NEIN
	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	152,8	1,9	3	1	NEIN
	Plectin	144,6	1,0	4	3	JA
	Spectrin beta chain	141,6	1,4	2	2	JA
	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	122,8	0,9	4	3	JA
	Transferrin receptor protein 1	94,1	2,9	2	2	NEIN
	Probable global transcription activator SNF2L2	85,9	1,1	2	1	NEIN
	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	72,3	2,3	2	1	NEIN
	CAD protein	68,0	0,5	1	1	NEIN
	Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein 1	56,3	0,6	1	1	NEIN
	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1	53,6	0,7	1	1	NEIN
	Myb-binding protein 1A	52,1	0,8	1	1	NEIN
	Desmoplakin	1224,8	10,6	21	2	NEIN
	Junction plakoglobin	921,1	31,4	15	1	NEIN
	Plakophilin-1	417,0	10,8	6	1	NEIN
	Actin, cytoplasmic 1	272,9	22,7	5	4	NEIN
	Galectin-7	256,5	39,0	4	2	NEIN
	14-3-3 protein sigma	233,8	20,2	4	1	NEIN
	Desmoglein-1	228,9	6,3	4	1	NEIN
	Tubulin alpha-1C chain	176,4	10,0	3	1	NEIN
4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	173,9	13,4	3	1	NEIN
	Glutathione S-transferase P	155,8	23,8	3	1	NEIN
	Heat shock protein beta-1	143,8	16,1	2	1	NEIN
	Fatty acid-binding protein, epidermal	134,1	37,0	2	1	NEIN
	Tubulin beta-2A chain	124,5	5,6	2	1	NEIN
	Annexin A2	122,2	7,4	2	1	NEIN
	Serpine B5	115,3	10,9	3	1	NEIN
	Lamin-A/C	65,6	23,0	1	2	NEIN
	14-3-3 protein zeta/delta	63,6	9,8	1	1	NEIN
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	932,3	20,6	19	2	NEIN
	Matrin-3	415,9	13,8	13	2	NEIN
	Splicing factor 3 subunit 1	263,5	9,5	7	1	NEIN
	N-acetyltransferase 10	236,7	6,0	6	1	NEIN
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	214,8	6,6	5	2	NEIN
5	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	204,4	6,9	6	2	NEIN
	4F2 cell-surface antigen heavy chain	166,2	8,3	3	3	NEIN
	Myosin-Ic	131,4	1,8	2	1	NEIN
	ATP-dependent RNA helicase DDX24	98,1	3,1	2	1	NEIN
	DNA damage-binding protein 1	73,1	1,9	2	1	NEIN
	Actin, cytoplasmic 1	62,9	6,7	2	4	NEIN
	Galectin-7	56,6	16,2	1	2	NEIN

	Splicing factor, proline- and glutamine-rich	854,7	22,5	20	1	NEIN
	Putative ribosomal RNA methyltransferase NOP2	481,9	13,9	10	1	NEIN
	Transcription intermediary factor 1-beta	335,2	12,7	11	1	NEIN
	Interleukin enhancer-binding factor 3	293,1	7,5	6	2	NEIN
	Isoleucyl-tRNA synthetase, mitochondrial	264,3	6,5	5	1	NEIN
	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	252,0	6,1	6	1	NEIN
6	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, mitochondrial	164,5	4,2	5	1	NEIN
	Pre-mRNA-processing factor 6	114,6	3,0	3	1	NEIN
	AP-2 complex subunit beta-1	102,6	3,2	3	1	NEIN
	4F2 cell-surface antigen heavy chain	99,2	7,0	3	3	NEIN
	Integrin beta-1	88,0	2,4	2	1	NEIN
	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	88,0	1,5	1	2	NEIN
	Actin, cytoplasmic 1	53,8	6,1	1	4	NEIN
	Lon protease homolog, mitochondrial	53,3	2,7	2	1	NEIN
	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	51,1	2,2	1	1	NEIN
	Heat shock protein HSP 90-beta	1389,7	31,9	27	1	NEIN
	Heat shock protein HSP 90-alpha	1261,1	30,5	10	1	NEIN
	Calnexin	668,7	22,3	15	1	NEIN
	Nucleolin	636,8	13,2	11	1	NEIN
	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	623,6	16,2	12	1	NEIN
	4F2 cell-surface antigen heavy chain	375,4	12,4	7	3	NEIN
	Importin subunit beta-1	345,2	7,9	6	1	NEIN
	Transferrin receptor protein 1	269,5	7,9	5	2	NEIN
7	Mitochondrial inner membrane protein	240,3	9,9	6	1	NEIN
	Nucleolar RNA helicase 2	191,5	7,4	5	1	NEIN
	Interleukin enhancer-binding factor 3	178,9	5,3	4	2	NEIN
	Transducin beta-like protein 3	139,2	3,6	2	1	NEIN
	Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	128,9	3,6	3	1	NEIN
	Nuclear pore complex protein Nup93	126,1	4,5	3	1	NEIN
	Glucosidase 2 subunit beta	117,2	3,8	2	1	NEIN
	Neutral amino acid transporter B(0)	112,5	3,9	2	1	NEIN
	DNA replication licensing factor MCM5	68,7	3,8	2	1	NEIN



**Abbildung 5.4: ELISA auf lebenden, intakten EBs zur Identifizierung der Oberflächenlokalisierung von Yaa1 und Yaa2**

$1 \times 10^8$  lebende, intakte, gradientengereinigte EBs wurden 30 min bei 4 °C und 2800 rpm auf Vertiefungen von MaxiSorp-Platten (Nunc) zentrifugiert und für weitere 1,5 h bei 4 °C inkubiert. Die Vertiefungen wurden mit 100  $\mu$ l Blockierungslösung (2 % BSA in PBS-T) für 2 h bei 4 °C inkubiert und zweimal mit PBS-T (PBS + 0,05 % Tween 20) gewaschen. Die Seren wurden in PBS-BT (PBS + 2 % BSA + 0,05 % Tween 20) verdünnt und 50  $\mu$ l zur Inkubation für 1,5 h bei 4 °C eingesetzt. Die Vertiefungen wurden dreimal mit PBS-T gewaschen und mit 50  $\mu$ l HRP-gekoppeltem anti-Kaninchen oder anti-Ziege Antikörper (1:5000) in PBS-BT für 1 h bei RT inkubiert. Die Vertiefungen wurden viermal mit PBS-BT gewaschen, die Farbentwicklung erfolgte mit 50  $\mu$ l 1-Step Ultra TMB. Die Farbentwicklung wurde nach 3 min mit 50  $\mu$ l 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und bei OD<sub>450</sub> photometrisch bestimmt.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Taxonomie der Ordnung <i>Chlamydiales</i> .....	2
Abbildung 1.2: Der chlamydialen Entwicklungszyklus.....	7
Abbildung 1.3: Lipid Raft-Mikrodomänen in der Plasmamembran eukaryotischer Zellen .....	9
Abbildung 1.4: Adhäsion und Internalisierung des chlamydialen EBs.....	26
Abbildung 4.1: Expressions- und Aufreinigungsversuche von rekombinantem Yaa3 <sub>10xHis</sub> .....	92
Abbildung 4.2: Expressions- und Aufreinigungsversuche von rekombinantem GST-Yaa3 <sub>6xHis</sub> .....	93
Abbildung 4.3: Expression, Aufreinigung und Nachweis von rekombinantem Yaa2 .....	94
Abbildung 4.4: Expression und Lokalisation von Yaa2.....	96
Abbildung 4.5: Vorbehandlung der chlamydialen EBs mit anti-Yaa2 Antikörper .....	97
Abbildung 4.6: Bindung von rekombinantem Yaa2 an humane HEp-2 Zellen.....	99
Abbildung 4.7: Einfluss von rYaa2 auf die chlamydiale Infektion.....	101
Abbildung 4.8: Expression, Aufreinigung und Nachweis von rekombinantem Yaa1 .....	103
Abbildung 4.9: Expression von Yaa1 in der chlamydialen Infektion .....	104
Abbildung 4.10: Lokalisation von Yaa1 in der chlamydialen Infektion .....	106
Abbildung 4.11: Oberflächenzugänglichkeit von Yaa1 .....	107
Abbildung 4.12: Immunreaktivität von Yaa1 .....	110
Abbildung 4.13: Neutralisation der chlamydialen Infektion durch anti-Yaa1 Antikörper .....	111
Abbildung 4.14: Bindung von rYaa1 an humane HEp-2 Zellen.....	112
Abbildung 4.15: Bindung von löslichen rYaa1 an humane HEp-2 Zellen .....	114
Abbildung 4.16: Die Suche nach einem proteinösen humanen Interaktionspartner von Yaa1 .....	116
Abbildung 4.17: Auswertung der massenspektrometrischen Analyse der potentiellen proteinösen Interaktionspartner von Yaa1 .....	117
Abbildung 4.18: Die Interaktion von rYaa1 mit Phospholipidmembranen .....	120
Abbildung 4.19: Einfluss von rYaa1 auf die chlamydiale Infektion.....	123
Abbildung 4.20: Auswirkung von rYaa1 auf die Adhäsion und Internalisierung der EBs.....	126
Abbildung 4.21: Auswirkung von Endozytoseinhibitoren auf die Infektionssteigerung durch rYaa1 .....	129
Abbildung 4.22: Assoziation von rYaa1 mit der Plasmamembran humaner Zellen .....	130
Abbildung 4.23: Lokalisation von Lipid Rafts und rYaa1 .....	131
Abbildung 4.24: Bedeutung von Lipid Rafts für die Internalisierung der EBs .....	133
Abbildung 4.25: Kolokalisation von Lipid Rafts und Rezeptoren in frühen Einschlüssen.....	134

---

Abbildung 4.26: Einfluss von rYaa1 auf die allgemeine Endozytose der Humanzelle.....	135
Abbildung 4.27: Endozytose von löslichem rYaa1 .....	137
Abbildung 4.28: Wirkung von rYaa1 auf die Internalisierung von Protein-beschichteten Latexkügelchen .....	139
Abbildung 4.29: Wirkung von rYaa1 auf die <i>C. trachomatis</i> Infektion.....	140
Abbildung 4.30: Domänenanalyse von rYaa1 .....	142
Abbildung 4.31: Analyse der Bindedomäne von Yaa1.....	143
Abbildung 4.32: Selbstinteraktionsanalyse von rYaa1.....	144
Abbildung 4.33: Lokalisation von transfiziertem Yaa1 .....	145
Abbildung 5.1: Alignment von Yaa1 mit einer potentiell homologen Domäne von (Meta)Vinculin .....	158
Abbildung 5.2: Funktion von Yaa1 im Kontext der chlamydialen Infektion.....	171
Abbildung 5.3: Postulierte Funktion(en) von Yaa1 im Detail .....	173
Abbildung 5.4: ELISA auf lebenden, intakten EBs zur Identifizierung der Oberflächenlokalisierung von Yaa1 und Yaa2 .....	XVIII

---

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich beim Anfertigen dieser Arbeit unterstützt haben und damit direkt oder indirekt zum Gelingen der Arbeit beitrugen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Johannes H. Hegemann, für das Überlassen des sehr interessanten Themas und der Möglichkeit an seinem Lehrstuhl zu promovieren. Die vielen Gespräche über experimentelle Ansätze, Ergebnisse und Probleme trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei und sein stetiges Interesse war sehr motivierend. Seine ständige Diskussionsbereitschaft und guten Ideen regten mich zum wissenschaftlichen Denken an. Er ermöglichte es mir meine Ergebnisse auf vielen nationalen und internationalen Konferenzen zu präsentieren.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer für die bereitwillige Übernahme des Korreferats. Seine kritischen Anmerkungen und neuen Ideen trugen ebenfalls direkt zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Mein Dank gilt außerdem der MOI-Graduiertenschule, die mein Projekt finanzierte und es mir ermöglichte mich durch verschiedene Veranstaltungen wissenschaftlich weiterzubilden. Hierfür möchte ich mich ausdrücklich bei Herrn Thomas Manchot, stellvertretend für die Jürgen Manchot Stiftung, bedanken. Ein spezieller Dank gilt auch Frau Dr. Inge Krümpelbeck als wissenschaftliche Koordinatorin der MOI-Graduiertenschule, die immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch die stetige und gute Kommunikation mit den anderen Stipendiaten und Kollegiaten bot mir ein gutes Netzwerk für eine erfolgreiche Promotion.

Desweiteren bedanke ich mich bei Frau PD Dr. Ursula Fleig für die kritischen und dadurch sehr hilfreichen Kommentare und Verbesserungsvorschläge zu meinen wissenschaftlichen Präsentationen.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Katja Mölleken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Unser wissenschaftlicher Austausch führte immer wieder zu neuen Anregungen und war sehr förderlich für meine Arbeit.

---

Bedanken möchte ich mich auch bei allen, die mich bei Experimenten unterstützt haben (Dr. Bernd König, Yu-Fu Hung, Steffi Kobus und Jan Galle), mir Material bereitstellten (Jan Wiese) oder mir im Zuge der Laborrotation einen Einblick in andere biologische Felder ermöglichten (Yu-Fu Hung und Katrin Erhardt).

Ein ganz großes Dankeschön gilt allen derzeitigen (Katja, Sonja, Elli, Rafat, Jan, Sebastian, Astrid, Boris, Steffi, Sören, Sandra und Irina) und ehemaligen Mitgliedern (Gido, Frauke, Anne, Karin) der Arbeitsgruppe, sowie den „Pombes“ (Boris, Marcus, Visnja, Jenny und Eva), dem Sekretariat (Steffi) und unserem „FACS-Mann“ (Klaus). Ich danke euch für die tolle Zeit im Labor und einer Atmosphäre, in der ich mich immer sehr wohl gefühlt habe. Danke auch für die zahlreichen, lustigen Unternehmungen neben der Arbeit. Seien es die Cocktailabende, Spieleabende, Feiern, Ausflüge, Urlaube, Brunchs, sportlichen Aktivitäten oder was auch immer wir sonst zusammen unternommen haben - es hat mir immer sehr viel Spaß gemacht und war eine tolle Zeit, die ich nicht missen möchte.

Ein riesengroßer Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie für die Aufmunterung und Unterstützung während der ganzen Zeit. Besonders meine Eltern, meine Schwester und meine Freundin Kathi haben mich während des gesamten Studiums bedingungslos und liebevoll unterstützt und immer fest an mich geglaubt. Durch euren Rückhalt konnte ich meinen Weg gehen. Ich danke euch dafür!

## 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.



Tim Fechtner

(Düsseldorf, Dezember 2012)