

# **Charakterisierung der chlamydialen Pmp Adhäsın Familie**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Elisabeth Becker**

aus Rosenberg (Polen)

Düsseldorf, Mai 2013

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. Werner Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2013

# 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>
1.1 Die Aufklärung der chlamydialen Diversität .....	1
1.2 Chlamydien als Krankheitserreger.....	2
1.2.1 <i>C. pneumoniae</i> .....	3
1.2.2 <i>C. trachomatis</i> .....	4
1.3 Der chlamydiale Entwicklungszyklus .....	6
1.3.1 Adhäsion und Internalisierung von Chlamydien.....	7
1.3.2 Differenzierung von EBs zu RBs und Inklusionmodifikation.....	11
1.3.3 Replikation der RBs und Interaktion mit der Wirtszelle.....	13
1.3.4 Redifferenzierung von RBs zu EBs und Freisetzung der Chlamydien.....	14
1.3.5 Persistenz .....	15
1.4 Komponenten des chlamydiale Außenmembrankomplexes (cOMC) und ihre Bedeutung für die chlamydialen Adhäsion.....	15
1.4.1 Major outer membrane protein (MOMP) .....	16
1.4.2 Outer membrane complex protein B (OmcB).....	17
1.4.3 Polymorphic membrane proteins (Pmps).....	18
1.4.3.1 Identifikation und phylogenetische Gruppierung der Pmps.....	18
1.4.3.2 Charakteristische Merkmale der Pmps .....	22
1.4.3.3 Expression der Pmps und Funktionen in der chlamydialen Pathogenese.....	25
1.4.3.4 Bildung von oligomeren Pmp-Stukturen?.....	27
1.5 Mechanismen der Endozytose.....	28
1.5.1 Epidermal growth factor receptor (EGFR) .....	30
1.5.2 Internalisierung von Chlamydien und anderen pathogenen Bakterien.....	32
1.6 Immunantworten während der chlamydialen Infektion und die Entwicklung einer protektiven Immunität .....	33
1.7 Zielsetzung.....	35

---

<b>2</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>36</b>
2.1	Gebrauchsmaterialien .....	36
2.2	Geräte und Maschinen .....	37
2.3	Chemikalien .....	38
2.4	Lösungen und Puffer .....	41
2.5	Enzyme .....	43
2.5.1	Restriktionsenzyme .....	43
2.5.2	Polymerasen.....	43
2.5.3	Andere Enzyme .....	43
2.6	Antikörper .....	44
2.6.1	Primäre Antikörper .....	44
2.6.2	Sekundäre Antikörper.....	45
2.7	Fluoreszenzfarbstoffe.....	46
2.8	Kits .....	46
2.9	DNA- und Proteingrößenstandards.....	46
2.10	Oligonukleotide .....	46
2.10.1	Oligonukleotide zur Klonierung .....	46
2.10.2	Oligonukleotide zur Sequenzierung.....	52
2.11	Plasmide.....	53
2.12	Zellen und Zelllinien.....	57
2.12.1	Eukaryotische Zellen und Zelllinien.....	57
2.12.2	Prokaryotische Zellen und Zelllinien .....	58
2.13	Medien und Medienzusätze.....	59
2.13.1	Zellkulturmedien und Medienzusätze .....	59
2.13.2	Medien für <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	59
2.13.3	Medien für <i>Escherichia coli</i> .....	60
<b>3</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>61</b>
3.1	Kultivierung von eukaryotischen Zellen in der Zellkultur.....	61
3.1.1	Herstellung des Zellkulturmediums.....	61
3.1.2	Passagieren adhärenter Zellen durch Trypsinbehandlung .....	61
3.1.3	Einfrieren eukaryotischer Zellen.....	62
3.1.4	Bestimmung der Zellzahl .....	62

---

<b>3.2 Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> .....	<b>62</b>
3.2.1 Hefe-Oberflächen-Präsentationssystem .....	62
3.2.1.1 Induktion der Expression von Oberflächen-präsentierten Proteinen.....	64
3.2.1.2 Aufarbeitung von Hefen für die SDS-Gelelektrophorese.....	64
3.2.1.3 $\alpha$ -Mannosidase Verdau Oberflächen-präsentierter Proteine .....	64
3.2.1.4 Indirekte Immunfluoreszenz Oberflächen-präsentierter Proteine .....	65
3.2.1.5 Adhäsionstest mit Hilfe des Hefe-Oberflächen-Präsentationssystems.....	66
3.2.2 Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse.....	66
3.2.2.1 Nachweis der Proteinexpression in Hefezellen mittels Westernblot.....	67
3.2.2.2 Serielle Tropftests .....	68
<b>3.3 Chlamydienkultur</b> .....	<b>68</b>
3.3.1 Herstellung von Stammlösungen für die Chlamydienkultur .....	68
3.3.2 Passage von Chlamydien in 25 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen .....	69
3.3.3 Sedimentation und Einfrieren von Chlamydien .....	70
3.3.4 Reinigung von Chlamydien mittels Gastrografin-Gradient.....	70
3.3.5 Bestimmung der Infektiosität von Chlamydien.....	70
3.3.6 Infektion von Zellen durch Chlamydien ohne Zentrifugation .....	71
3.3.7 Immunologischer Nachweis von Chlamydien mittels Fluoreszenzmikroskopie .....	72
3.3.7.1 Fixierung von infizierten eukaryotischen Zellen.....	72
3.3.7.2 Direkte Immunofluoreszenz .....	72
3.3.7.3 Indirekte Immunofluoreszenz .....	73
3.3.8 Test auf Kontamination durch Mycoplasmen .....	73
<b>3.4 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i></b> .....	<b>74</b>
3.4.1 Kultivierungsbedingungen für <i>E. coli</i> Kulturen .....	74
3.4.2 Induktion der Genexpression in <i>E. coli</i> .....	75
3.4.3 Herstellung elektrokompetenter XL <sub>1</sub> -blue Zellen.....	75
<b>3.5 Zellbiologische Methoden</b> .....	<b>76</b>
3.5.1 Transfektion von eukaryotischen Zellen mittels TurboFect .....	76
3.5.2 Adhäsionsanalysen mit proteinbeschichteten Latexkügelchen .....	77
3.5.3 Internalisierungstest von Latexkügelchen.....	78
3.5.4 Versuche zur Neutralisation der chlamydialen Infektion.....	78
3.5.4.1 Infektion-Neutralisation mit rekombinantem Protein.....	78
3.5.4.2 Infektion-Neutralisation mit polyklonalen Antikörpern.....	79
3.5.4.3 Infektion-Neutralisation mit Heparin.....	80
<b>3.6 Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>80</b>

---

3.6.1	RNA-Präparation aus humanen Zellen und cDNA Synthese.....	80
3.6.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	82
3.6.2.1	Amplifikation von chlamydialen/humanen Gensequenzen .....	82
3.6.2.2	PCR auf Hefezellen .....	83
3.6.3	Auftrennung von DNA-Molekülen mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	84
3.6.4	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	84
3.6.5	Transformation und homologe Rekombination in <i>S. cerevisiae</i> .....	84
3.6.6	DNA-Isolation aus <i>S. cerevisiae</i> .....	85
3.6.7	Transformation in <i>E. coli</i> .....	86
3.6.7.1	Ein-Minuten Transformation .....	86
3.6.7.2	Transformation durch Elektroporation.....	86
3.6.8	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	87
3.6.8.1	Plasmid Minipräparation.....	87
3.6.8.2	Plasmid Midipräparation.....	88
3.6.9	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen .....	88
3.6.10	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung .....	88
3.6.11	Sequenzierung von DNA.....	88
<b>3.7</b>	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>89</b>
3.7.1	Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen .....	89
3.7.1.1	Manuelle Aufreinigung von His <sub>6</sub> -Fusionsproteinen unter denaturierenden Bedingungen .....	89
3.7.1.2	Manuelle Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen unter nativen Bedingungen.....	90
3.7.2	Proteinmengenbestimmung mittels Bradford-Reagenz .....	90
3.7.3	Auftrennung von Proteinproben mittels SDS-PAGE .....	91
3.7.3.1	Aufbereitung von Proteinen für SDS-Gelelektrophorese.....	91
3.7.3.2	Herstellen von SDS-Polyacrylamidgelen.....	91
3.7.3.3	SDS-Gelelektrophorese.....	92
3.7.4	Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliantblau.....	92
3.7.5	Westernblot und Immundetektion .....	93
3.7.6	Fraktionierung von infizierten Humanzellen.....	94
3.7.7	Behandlung von <i>C. pneumoniae</i> EBs mit Detergenzien .....	95
3.7.8	Markierung von Proteinen mit Biotin.....	95
3.7.9	Markierung von Proteinen und Antikörpern mit FITC.....	96
3.7.10	Interaktionsstudien.....	96
3.7.10.1	Protein-Protein-Interaktionsüberprüfung mittels Far-Westernblot .....	96
3.7.10.2	Co-Immunpräzipitation von biotinylierten und FITC-markierten Proteinen.....	97

3.7.10.3	Co-Immunpräzipitation von chlamydialen Proteinen nach Behandlung von <i>C. pneumoniae</i> EBs mit Detergenzien .....	98
3.7.10.4	Rezeptor-Pulldown Experimente mit rekombinanten Proteinen .....	98
3.7.11	Beschichtung und Beschichtungskontrolle von Latexkügelchen.....	99
3.7.11.1	Beschichtung von Latexkügelchen mit Protein.....	99
3.7.11.2	Überprüfung der Beschichtungsqualität.....	100
3.7.12	Generierung eines polyklonalen N-Pmp21 Antikörpers.....	100
3.7.13	Aufreinigung polyklonaler Antikörper mittels NHS-Sephrose .....	101
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>102</b>
<b>4.1</b>	<b><i>C. pneumoniae</i> und <i>C. trachomatis</i> Pmps besitzen adhäsive Eigenschaften .....</b>	<b>102</b>
4.1.1	Nachweis der adhäsiven Eigenschaft Aga2p-Pmp exprimierender Hefezellen an humane Zellen .....	103
4.1.1.1	Repräsentative Kandidaten aller Pmp-Subtypen von <i>C. pneumoniae</i> zeigen ähnliche Adhäsivität im Hefeoberflächen-Präsentationssystem.....	104
4.1.1.2	Alle neun <i>C. trachomatis</i> Pmps adhäreren mit ähnlicher Stärke an Humanzellen .....	107
4.1.2	Charakterisierung der adhäsiven Eigenschaften von rekombinanten Pmps präsentiert auf der Oberfläche von Latexkügelchen.....	109
4.1.2.1	Die rekombinanten <i>C. pneumoniae</i> Pmps zeigen unterschiedliche Adhäsivität .....	110
4.1.2.2	Die rekombinanten Pmps von <i>C. trachomatis</i> binden unterschiedlich stark an Humanzellen.....	113
4.1.2.3	Rekombinante Pmps von <i>C. pneumoniae</i> und <i>C. trachomatis</i> zeigen Unterschiede in der Adhäsivität in Abhängigkeit vom humanen Zelltyp.....	116
<b>4.2</b>	<b>Die Pmp Adhäsine sind wichtig für die chlamydiale Infektion.....</b>	<b>118</b>
4.2.1	Rekombinante <i>C. pneumoniae</i> Pmps inhibieren die <i>C. pneumoniae</i> Infektion signifikant .....	119
4.2.2	Rekombinante <i>C. trachomatis</i> Pmps besitzen eine neutralisierende Wirkung auf die <i>C. trachomatis</i> Infektion .....	120
4.2.3	Ausgewählte rekombinante Pmps von <i>C. pneumoniae</i> und <i>C. trachomatis</i> inhibieren die Infektion Spezies-spezifisch.....	122
4.2.4	Untersuchung der Bedeutung von verschiedenen Pmps für die chlamydiale Infektion.....	124
4.2.5	Pmp21 und OmcB weisen unterschiedliche Adhäsionswege auf.....	126
<b>4.3</b>	<b>Pmp21 vermittelt Internalisierung über eine Interaktion mit dem humanen EGF-Rezeptor.....</b>	<b>129</b>
4.3.1	Pmp21 interagiert stärker mit der zweiten Ligandenbindedomäne des EGF-Rezeptors als mit der ersten.....	129
4.3.2	Pmp21 zeigt keine Bindung an EGFR-negative CHO K1 Zellen .....	132

---

4.3.3	Rekombiantes Pmp21 vermittelt eine Internalisierung von Latexkügelchen in HEp-2 Zellen .....	134
4.3.4	Rekrutierung von phosphoEGFR um internalisierte Pmp21-beschichtete Latexkügelchen .....	137
<b>4.4</b>	<b>PmpD vermittelt Internalisierung.....</b>	<b>139</b>
4.4.1	Rekombinantes PmpD vermittelt die Internalisierung proteinbeschichteter Latexkügelchen .....	140
4.4.2	Rekombinantes PmpD interagiert nicht mit EGFR <i>in vitro</i> .....	141
<b>4.5</b>	<b>Die Pmps von <i>C. pneumoniae</i> zeigen eine variable klonale Expression .....</b>	<b>143</b>
4.5.1	<i>C. pneumoniae</i> -infizierte Menschen besitzen verschiedene Antikörperprofile gegen Pmps. ....	144
4.5.2	Pmp6, Pmp20 und Pmp21 werden während der Infektion prozessiert .....	145
4.5.3	Nicht in allen Inklusionen werden alle Pmps exprimiert .....	148
<b>4.6</b>	<b>Pmps von <i>C. pneumoniae</i> weisen inter- und intramolekulare Wechselwirkungen auf... ..</b>	<b>150</b>
4.6.1	Pmp-Fragmente liegen bakterienassoziiert sowie löslich vor .....	150
4.6.2	Lokalisationsanalysen von Pmp6, Pmp20 und Pmp21 in EBs durch Behandlung mit Detergenzien.....	153
4.6.3	Pmp21 interagiert mit sich selbst in Hefe-Zwei-Hybrid Analysen.....	155
4.6.4	Interaktion von rekombinanten Pmps analysiert mittels Far-Westernblots und Co-Immunpräzipitation.....	157
4.6.5	<i>C. pneumoniae</i> Pmps interagieren <i>in vivo</i> miteinander.....	160
4.6.6	Strukturvorhersage für Pmps.....	162
<b>4.7</b>	<b>Lokalisation der Fragmente M-Pmp21 und N-Pmp21 in der Infektion .....</b>	<b>165</b>
4.7.1	M-Pmp21 und M-Pmp21-tragende Pmp21-Fragmente sind auf der Bakterienoberfläche exponiert.....	165
4.7.2	Expression, Lokalisation und Bedeutung von N-Pmp21 für die chlamydiale Infektion....	166
4.7.3	N-Pmp21 und N-Pmp21-tragende Pmp21-Fragmente sind bakterienassoziiert und auf Fäden im humanen Zytosol lokalisiert .....	169
<b>4.8</b>	<b>Die Suche nach weiteren potentiellen Interaktionspartnern von M-Pmp21.....</b>	<b>172</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>175</b>
<b>5.1</b>	<b>Charakterisierung der Adhäsionsfunktion von <i>C. trachomatis</i> und <i>C. pneumoniae</i> Pmps .....</b>	<b>176</b>
<b>5.2</b>	<b>Welchen Beitrag leisten die Pmps zur chlamydialen Adhäsion?.....</b>	<b>182</b>
<b>5.3</b>	<b>Die Interaktion von Pmp21 mit seinem humanen Interaktionspartner EGFR .....</b>	<b>184</b>

---

5.4	Ist Pmp21 von <i>C. pneumoniae</i> ein bakterielles Invasin? .....	187
5.5	Welche Funktion übt das Ortholog PmpD in der chlamydialen Adhäsion/Internalisierung aus? .....	191
5.6	Mögliche Konsequenzen der proteolytischen Prozessierung von Pmps für die chlamydialen Infektion.....	194
5.7	Die differenzielle Expression der <i>C. pneumoniae</i> Pmps und ihr potentieller Einfluss im Infektionsgeschehen.....	197
5.8	Inter- und intramolekulare Wechselwirkungen zwischen Pmps als Basis von oligomeren Adhäsionsstrukturen.....	201
5.9	Identifikation einer neuen zellulären Lokalisation des N-terminalen Fragmentes von Pmp21 .....	204
<b>6</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>206</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>XIX</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>XXII</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>XXIII</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
AS	Aminosäure
BD	Bindedomäne
bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CHO	chinese hamster ovarian
cOMC	chlamydia outer membrane complex
deion.	deionisiert
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EB	Elementarkörperchen
EGFR	epidermal growth factor receptor
et al.	und andere
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAG	Glykosaminoglykan
GST	Glutathion-S-Transferase
°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
hpi	hours post infection (Stunde(n) nach der Infektion)
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
min	Minute

---

M	Molar
MOI	multiplicity of infection
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline (physiologischer Phosphatpuffer)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pmol	Picomol
Pmp	polymorphic membrane protein
RB	Retikularkörperchen
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SS	Signalsequenz
NLS	nuclear localization signal
U	Unit (Einheit)
ü. N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
x g	x-fache Erdbeschleunigung

## Zusammenfassung

Chlamydien sind obligat intrazelluläre, Gram-negative Bakterien. Zu den bedeutendsten humanpathogenen Chlamydien gehören *Chlamydia pneumoniae* und *Chlamydia trachomatis*. *C. pneumoniae* infiziert die oberen und unteren Atemwege und kann zu Bronchitis und Pneumonien führen. Da etwa 70 % der erwachsenen Menschen auf Grund einer Infektion Antikörper gegen *C. pneumoniae* aufweisen, kann *C. pneumoniae* zu den endemischen Krankheitserregern gezählt werden. *C. trachomatis* ist der Hauptauslöser sexuell übertragbarer Erkrankungen, die unbehandelt zu Infertilität bei Frauen führen können. Des Weiteren infiziert dieses Pathogen die Augen und ist der Hauptauslöser für vermeidbare Erblindung vor allem in Entwicklungsländern.

Bioinformatische Studien identifizierten eine große Familie von putativen Autotransporter-Proteinen, die 9 Mitglieder in *C. trachomatis* und 21 Mitglieder in *C. pneumoniae* umfasst, welche in 6 Subtypen eingeteilt wurden. Die Wichtigkeit dieser sogenannten Pmps (polymorphic membrane proteins) wird durch die Tatsache unterstrichen, dass die *pmp* Genfamilie über 5 % der Codierungskapazität des chlamydialen Genoms repräsentiert.

Die Infektion durch Chlamydien erfordert die Adhäsion an die Wirtszelle sowie die Aufnahme des infektiösen Partikels in die Zelle. Der erste Kontakt erfolgt vermutlich über eine reversible Interaktion des Adhäsins OmcB mit polymeren Glykosaminoglykan-Strukturen auf der Wirtszell-Oberfläche, entlang dieser die Bakterien bis zur spezifischen Eintrittsstelle gelangen. Hier könnten potentiell die Mitglieder der Pmp-Proteinfamilie eine spezifische Interaktion mit einem humanen Rezeptor vermitteln. Für die *C. pneumoniae* Proteine Pmp6, Pmp20 und Pmp21 konnten bereits adhäsive Eigenschaften sowie ihre Wichtigkeit für die chlamydiale Infektion nachgewiesen werden. Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion der Pmps im Infektionsprozess aus verschiedenen Perspektiven zu betrachten und so zu einem besseren Verständnis der spezifischen Interaktion von Chlamydien mit der Wirtszelle beizutragen.

Repräsentative Kandidaten jedes Pmp-Subtyps von *C. pneumoniae* und alle neun Pmps von *C. trachomatis* Serovar E wurden auf adhäsive Fähigkeiten in zwei unabhängigen Systemen untersucht. Hierbei zeigten alle Pmps eine signifikante Adhäsivität an Epithelzellen. Interessanterweise variierte die Bindungskapazität der Pmps in Abhängigkeit von der verwendeten humanen epithelialen und endothelialen Zelllinie, was auf eine mögliche Anpassung der verschiedenen Pmps an distinkte Zelltypen und Gewebe hinweisen könnte.

Alle Pmps sind wichtig für die chlamydiale Infektion, da es möglich war, die jeweilige Infektion durch Blockierung des humanen Rezeptors mit dem jeweiligen rekombinanten Pmp um 50-60 % zu reduzieren. Des Weiteren zeigten ausgewählte Pmps von *C. pneumoniae* und

*C. trachomatis* keine Kreuz-Neutralisierung. Dies deutet auf unterschiedliche Wirtsrezeptoren für die Pmps dieser beiden Spezies hin. Innerhalb einer Spezies wurde eine überlappende Funktion für Pmps im Infektionsprozess nachgewiesen, während Doppelblockexperimente darauf hinwiesen, dass Pmp21 und OmcB mit unterschiedlichen Adhäsionsmechanismen assoziiert sind.

In biochemischen Experimenten wurde der humane EGF-Rezeptor als Interaktionspartner für Pmp21 von *C. pneumoniae* von Dr. Kaja Mölleken identifiziert. Die spezifische und direkte Interaktion zwischen Pmp21 und EGFR konnte mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen bestätigt werden. Interessanterweise zeigten Pmp21-beschichtete Latex-Kügelchen eine signifikante Internalisierung in humane Epithelzellen, wobei eine Rekrutierung des aktivierten Rezeptors um die Kügelchen zu beobachten war. PmpD von *C. trachomatis* zeigte eine vergleichbare Internalisierungsstärke, jedoch konnte keine Interaktion zwischen PmpD und EGFR mittels Rezeptor-Pulldown nachgewiesen werden.

Seren von *C. pneumoniae*-infizierten Patienten zeigten eine starke serologische Reaktion auf rekombinante Pmps, wobei die Patienten verschiedene Pmp-spezifische Antikörper-Profile aufwiesen. Bei der Analyse von repräsentativen Pmps in *C. pneumoniae*-infizierten Humanzellen zeigte sich, dass Pmp6 und Pmp20 nur in etwa 30 % aller Inklusionen exprimiert waren, während Pmp21 eine ubiquitäre Expression aufwies. Dies könnte auf eine Strategie zur Umgehung des Immunsystems des Wirtsorganismus oder auf eine Adaption an spezifische Nischen hinweisen. Darüber hinaus deutet dies auf die besondere Relevanz von Pmp21 für die chlamydiale Infektion hin.

Obwohl die Pmps von *C. pneumoniae* einer komplexen Prozessierung unterliegen, wurde eine partielle Bakterienassoziation bestimmter Pmp-Fragmente nachgewiesen. Interessanterweise konnte eine Interaktion von Pmp21 mit sich selbst sowie mit anderen Pmps nachgewiesen werden. Folglich wäre es möglich, dass Pmp-Fragmente über Homo- und/oder Heterooligomerisierung mit membranverankerten Pmps mit der chlamydialen Oberfläche verbunden bleiben. Möglicherweise könnte hierbei die vorhergesagte rechtsgängige  $\beta$ -helikale Struktur der Pmps die strukturelle Interaktionsplattform darstellen.

Das N-terminale Fragment von Pmp21 konnte zusammen mit anderen Komponenten der äußeren Membran von *C. pneumoniae* auf sogenannten Fibern identifiziert werden, die von der Inklusion ausgehend in das Zytosol der Wirtszelle ragen. Dies könnte auf weitere, bislang unverstandene Funktionen von Pmp21 in der chlamydialen Infektion hinweisen.

## Summary

*Chlamydia* are obligate intracellular, Gram-negative bacteria. *C. pneumoniae* and *C. trachomatis* are the most important human pathogens. *C. pneumoniae* infects the upper and lower respiratory tract and can cause bronchitis and pneumonia. Because approximately 70 % of all adults have antibodies against *C. pneumoniae*, due to a previous infection, *C. pneumoniae* is included in the group of epidemic pathogens. *C. trachomatis* is the major cause of sexually transmitted diseases, which may lead to infertility in women when untreated. Additionally, this pathogen infects the eyes and is the leading cause of preventable blindness, especially in developing countries.

Bioinformatics studies have led to the identification of the large family of putatively autotransported proteins, with 9 members in *C. trachomatis* and 21 in *C. pneumoniae*, which are divided into 6 subtypes. The importance of these so-called Pmps (polymorphic membrane proteins) is underlined by the fact that the *pmp* genes comprise over 5 % of the total coding capacity of the chlamydial genome.

Chlamydial infection requires an effective adhesion to the host cell and entry of the infectious particles into the cell. Adhesion studies have recognized OmcB as a chlamydial adhesin that reversibly interacts with glycosaminoglycans (GAGs) of the host cell. Probably, the infectious particles can reach their specific entry sites on the surfaces of human cells *via* the polymeric GAGs. Members of the Pmp protein family represent potential candidates for a specific interaction with a human cell receptor. In previous studies, we characterized the *C. pneumoniae* proteins Pmp6, Pmp20, and Pmp21 as bacterial adhesins mediating attachment of *C. pneumoniae* to human cells and being important for the chlamydial infection. The aim of this work was to analyze the function of the Pmps in the infection process from a variety of aspects, therefore contributing to a better understanding of the specific interaction between *Chlamydia* and their host cells.

Representative candidates of each Pmp subtype from *C. pneumoniae* and all nine Pmps from *C. trachomatis* Serovar E were selected for adhesion analysis in two independent systems. All analyzed Pmps revealed significant adhesiveness to epithelial cells. Interestingly, the binding capacity of the Pmps varied, depending on the human epithelial and endothelial cell lines that were used, which might indicate an adaptation of the Pmps to distinct cell types and tissues.

All Pmps are important for chlamydial infection, because it was possible to reduce the repective infection by 50-60 % by blocking the human receptors with the respective recombinant Pmp. Furthermore, selected Pmps from *C. pneumoniae* and *C. trachomatis* did not display cross neutralization, indicating the presence of different host cell receptors for the Pmps from the two species. Additionally, Pmps from one *Chlamydia* species exhibited

overlapping functions in the infection process, whereas Pmp21 und OmcB contributed to different adhesion mechanisms.

In a biochemical approach, Dr. Katja Mölleken identified the human EGF receptor as an interaction partner of *C. pneumoniae* Pmp21. The specific and direct interaction between Pmp21 und EGFR was confirmed by yeast-two-hybrid analysis. Interestingly, Pmp21-coated latex beads were significantly internalized into human epithelial cells, thereby inducing a recruitment of the activated receptor around the internalized beads. PmpD from *C. trachomatis* possessed a similar internalization capacity, although an interaction between PmpD and EGFR was not detected *via* receptor pulldown.

Sera from *C. pneumoniae*-infected patients displayed strong serological reactions to recombinant Pmps, even though the profiles of antibody specificity differed between the patients. An analysis of representative Pmps in *C. pneumoniae* infected human cells indicated that Pmp6 and Pmp20 were expressed in approximately only 30 % of all inclusions, whereas Pmp21 showed ubiquitous expression. This not only indicates the presence of a strategy for evasion of the immune system of the host or for adaptation to specific host niches but also points to an important role of Pmp21 in chlamydial infection.

Although the *C. pneumoniae* Pmps undergo extensive processing, a partial bacterial association was demonstrated for certain Pmp fragments. Interestingly, an interaction of Pmp21 with itself, as well as with other Pmps, was identified. Therefore, Pmp fragments may remain connected to the chlamydial surface *via* Homo- and/or Heterooligomerization with membrane-anchored Pmps. The predicted righthanded  $\beta$ -helical structure of the Pmps possibly represents the structural interaction platform.

The N-terminal fragment of Pmp21, together with other components of the chlamydial outer membrane, was identified on so-called fibers protruding from the inclusion into the cytosol of the host cell. This suggests additional, so far unknown functions of Pmp21 in chlamydial infection.

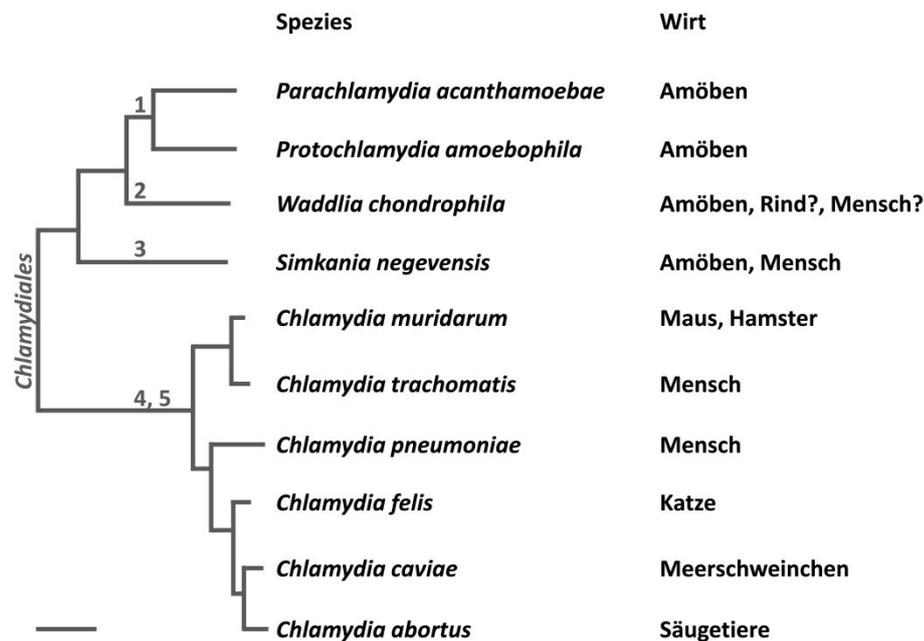
# 1 Einleitung

## 1.1 Die Aufklärung der chlamydialen Diversität

Chlamydien sind obligat intrazelluläre, Gram-negative Bakterien, die eine Vielzahl von Erkrankungen in Menschen und Tieren auslösen und somit von signifikanter Bedeutung für das Gesundheitswesen sind. Die Biologie der Chlamydien ist im Vergleich zu anderen wichtigen bakteriellen Pathogenen jedoch bislang nur ansatzweise entschlüsselt. Dies beruht unter anderem auf zwei limitierenden Faktoren in der chlamydialen Forschung: (i) Trotz intensiver Versuche und erster Erfolge in der stabilen Transformation von Chlamydien (Wang, Kahane et al. 2011), ist die genetische Manipulation des chlamydialen Genoms mit dem Ziel der funktionellen Analyse einzelner Gene noch nicht möglich. (ii) Des Weiteren sind Chlamydien obligat intrazelluläre Bakterien und können außerhalb der Wirtszelle nicht kultiviert werden. Andererseits birgt das chlamydiale Genom mit seiner geringen Größe (ca. 1 Mbp) und seinem moderatem G+C% Gehalt (ca. 40 %) auch Vorteile bei der Sequenzaufklärung (Kalman, Mitchell et al. 1999). So folgten der Sequenzierung des *Chlamydia trachomatis* Serovar D Genoms (Stephens, Kalman et al. 1998) die Aufklärung der Genomsequenzen beispielsweise von *Chlamydia pneumoniae* (Kalman, Mitchell et al. 1999; Read, Brunham et al. 2000), *Chlamydia muridarum* (Read, Brunham et al. 2000), *Chlamydia caviae* (Read, Myers et al. 2003) und *Chlamydia abortus* (Thomson, Yeats et al. 2005). Darauf basierende Sequenzvergleiche von Mitgliedern der weitgreifenden Ordnung *Chlamydiales* führten zu einer neuen Taxonomie (Stephens, Myers et al. 2009) (Abb. 1.1). Die Familie der *Chlamydiaceae* besteht nun nur noch aus der einzigen Gattung *Chlamydia* mit human- und tierpathogenen Spezies (Stephens, Myers et al. 2009; Collingro, Tischler et al. 2011). Die verstärkte Analyse der Familien *Parachlamydiaceae*, *Waddliaceae* und *Simkaniaceae*, deren Vertreter zum Beispiel als Symbionten in freilebenden Amöben vorkommen, verhalf in den letzten Jahren dem Verständnis der chlamydialen Evolution. So besitzen diese sogenannten Umwelt-Chlamydien ein ausgedehnteres Genom mit einer größeren metabolischen Kapazität im Vergleich zu den *Chlamydiaceae*, jedoch auch ein großes Repertoire an gemeinsamen konservierten „Kern-Genen“ (Horn 2008; Collingro, Tischler et al. 2011). Dies weist einerseits auf deutliche Ähnlichkeiten zwischen pathogenen und symbiotisch lebenden Chlamydien in Bezug auf ihre intrazelluläre Lebensweise hin, andererseits auf eine Anpassung der Chlamydien an die jeweilige Nische.

Mittels neuester Sequenzierungsverfahren wurde für verschiedene chlamydiale Stämme sowie für individuelle klinische Isolate eine signifikante genetische Diversität identifiziert (Somboonna, Mead et al. 2008; Jeffrey, Suchland et al. 2010). Dabei wurden genomische

Regionen hoher Variabilität, sogenannte „Hot Spots“ identifiziert. Hierzu gehören unter anderem die chlamydiale Plastizitätszone am Replikationsterminus des Genoms sowie Gene der Pmp- (polymorphic membrane proteins) und Inc- (inclusion membrane proteins) Proteinfamilien (Myers, Mathews et al. 2009; Jeffrey, Suchland et al. 2010; Borges, Nunes et al. 2012).



**Abbildung 1.1: Taxonomie der Ordnung *Chlamydiales*.**

Taxonomische Eingruppierung ausgewählter chlamydialer Spezies basierend auf Sequenzanalysen von 37 konservierten Genen (modifiziert nach Collingro, Tischler et al. 2011). Dargestellt sind die Familien (1) *Parachlamydiaceae*, (2) *Waddliaceae*, (3) *Simkaniaceae* und (4) *Chlamydiaceae* mit der einzigen Gattung (5) *Chlamydia*. Die entsprechenden Wirtsorganismen sind jeweils rechts dargestellt. Der Maßstab entspricht 10 % Sequenz-Divergenz.

## 1.2 Chlamydien als Krankheitserreger

Zu der Familie *Chlamydiaceae* gehören Spezies, die weltweit als relevante human- und tierpathogene Erreger in Erscheinung treten. Tierpathogene Chlamydien verursachen nicht nur Erkrankungen in Haus- und Nagetieren wie Meerschweinchen, Katzen, und Mäusen (*C. caviae*, *C. felis* und *C. muridarum*), sondern auch in Nutztieren wie Rindern, Schafen, Schweinen und Vögeln (*C. abortus*, *C. pecorum*, *C. suis* und *C. psittaci*). Die dabei zugrunde liegende Infektion des respiratorischen Trakts, des Magen-Darm-Trakts, der Augen und/oder des Urogenitaltrakts, wobei Letzteres zu Aborten bzw. Sterilität der Tiere führen kann (Rohde, Straube et al. 2010), haben besonders in Tierbeständen erhebliche wirtschaftlichen Schäden zur Folge (Aitken and Longbottom 2007). Ferner wurden mehrfach Fälle von Infektionsübertragung zwischen Menschen und infizierten Tieren dokumentiert (Pospischil,

Thoma et al. 2002; Harkinezhad, Verminnen et al. 2009). Die humanpathogenen Organismen *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* zählen mit weltweit über 600 Millionen infizierten Menschen zu den verbreitetsten Krankheitserregern bei Menschen (Ojcius, Darville et al. 2005). Im Folgenden werden diese epidemiologisch und klinisch relevanten Spezies detaillierter vorgestellt.

### 1.2.1 *C. pneumoniae*

Ursprünglich wurde *C. pneumoniae* von infizierten Patienten aus Taiwan und Seattle isoliert, als „TWAR“ (taiwan acute respiratory isolate) bezeichnet und zunächst der Spezies *C. psittaci* zugeordnet (Kuo, Chen et al. 1986). Analysen der Ultrastruktur, der DNA sowie der Serologie deklarierten diesen Stamm schließlich als eigene Spezies der Gattung *Chlamydia* (Grayston, Kuo et al. 1989). *C. pneumoniae* tritt primär als human-pathogener Krankheitserreger des respiratorischen Trakts auf und wird über Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch übertragen (Kuo, Jackson et al. 1995; Hammerschlag 2000). Die Mehrheit (70 %) der chlamydialen Atemwegserkrankungen sind asymptomatisch oder weisen einen milden und zeitlich begrenzten Verlauf meist ohne nötige Antibiotika-Behandlung auf. Jedoch hat eine 30 %ige Minderheit der *C. pneumoniae* Infektionen die Ausbildung von schwerwiegenderen Erkrankungen, wie Pneumonien, Bronchitis oder Entzündungen der oberen Atemwege, zur Folge (Hammerschlag 2000; Hahn, Azenabor et al. 2002). *C. pneumoniae* wird in Abhängigkeit von der Patientenpopulation und der verwendeten diagnostischen Methode mit 6-20 % der ambulant erworbenen Pneumonien in Verbindung gesetzt (Kumar and Hammerschlag 2007). Basierend auf serologischen Studien wurde eine massive Durchseuchung mit *C. pneumoniae* identifiziert, die 50 % bei Erwachsenen im Alter von 20 Jahren erreicht und anschließend auf bis zu 80 % bei älteren Altersgruppen ansteigt (Grayston 1992). Damit kann davon ausgegangen werden, dass jeder Mensch im Laufe seines Lebens mindestens einmal eine *C. pneumoniae* Infektion durchläuft.

Ferner wird *C. pneumoniae* mit einer Reihe von chronischen Krankheiten in Verbindung gebracht, die durch anhaltende Entzündungen charakterisiert sind. Jedoch bleibt bei diesen Krankheitsbildern bislang unklar, ob eine *C. pneumoniae* Infektion als Mitinitiator der Erkrankungen fungiert oder eine Folge durch sekundäre Besiedlung des geschädigten Gewebes darstellt. In den meisten Fällen beruht der hergestellte Zusammenhang auf dem serologischen Nachweis von *C. pneumoniae*-spezifischen Antikörpern in Patienten oder dem mikroskopischen bzw. PCR-basierten Nachweis von Bakterien in betroffenen Geweben. So wurde 1988 erstmalig eine Assoziation mit atherosklerotischen kardiovaskulären Erkrankungen postuliert (Saikku, Leinonen et al. 1988; Grayston 2000). Die biologische

Plausibilität wird dadurch unterstrichen, dass *C. pneumoniae* eine Vielzahl von Zellen, wie Monozyten, Makrophagen, vaskuläre Endothelzellen und glatte Aortenmuskelzellen, infizieren kann, die Komponenten von atherosklerotischen Plaques darstellen (Belland, Ouellette et al. 2004). Bislang konnte jedoch keine eindeutige Verbindung zwischen der serologischen Evidenz für eine *C. pneumoniae* Infektion und der Ausbildung von Atherosklerose in Menschen erbracht werden (Hoymans, Bosmans et al. 2007). Des Weiteren konnte im Rahmen von klinischen Studien kein signifikanter positiver Effekt von Antibiotika-Therapien bei dem Verlauf von koronaren Herzerkrankungen beobachtet werden (Andraws, Berger et al. 2005). Dies schließt jedoch eine Rolle von *C. pneumoniae* als potentiellen Risikofaktor bei der Ausbildung von Atherosklerose in Menschen nicht aus (Watson and Alp 2008). In weiteren Studien wird ein potentieller Zusammenhang zwischen akuten *C. pneumoniae* Infektionen und Asthma dokumentiert. Zwar konnte ein erhöhter Wert für *C. pneumoniae*-spezifische Antikörper in Asthma-Patienten nachgewiesen werden (Hahn, Schure et al. 2012), jedoch bleibt ungeklärt, ob *C. pneumoniae* an der Ausbildung der Asthmaerkrankungen oder nur an dem Ausmaß der Symptome beteiligt ist. Ferner wurden Verbindungen zwischen *C. pneumoniae* Infektionen und chronischen neurodegenerativen Erkrankungen, wie Multiple-Sklerose (Sriram, Stratton et al. 1999) und Alzheimer (Gerard, Dreses-Werringloer et al. 2006) identifiziert. So konnten im Falle von Alzheimer lebende Bakterien aus Gehirngewebeproben isoliert und kultiviert werden (Balin and Appelt 2001).

### 1.2.2 *C. trachomatis*

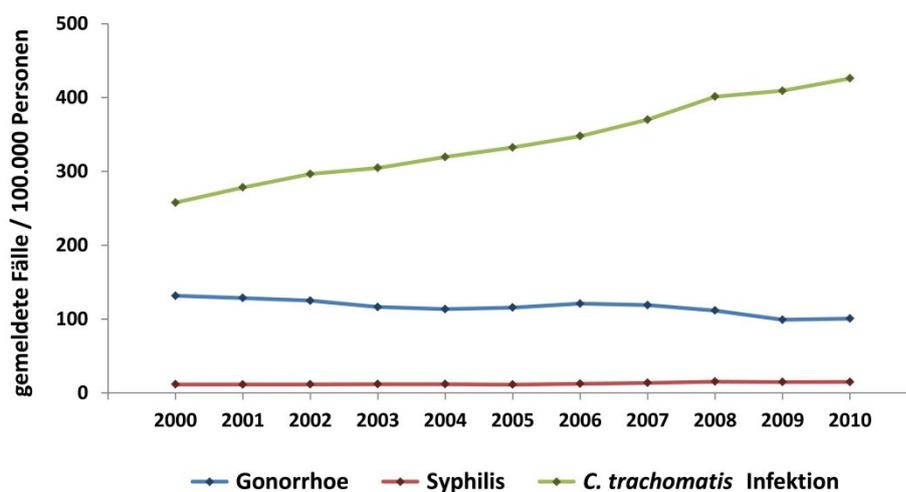
*C. trachomatis* ist die am besten untersuchte *Chlamydia* Spezies und für diverse Krankheitsbefunde verantwortlich. Dieser human-pathogene Organismus wurde als Hauptursache für okulare Trachomen (Serovare A-C) sowie sexuell übertragbare Krankheiten wie Urethritis, Cervicitis, and Salpingitis (Serovar D-K) identifiziert. Die Lymphogranuloma Venereum (LGV) Biovare L1-L3 verursachen zunächst ebenfalls urogenitale Infektionen, sind jedoch fähig sich auf die Lymphknoten auszubreiten und final eine systemische Infektion auszulösen (Schachter 1999).

Urogenitale *C. trachomatis* Infektionen zeigen eine höhere Prävalenz als alle anderen sexuell übertragbaren Infektionen zusammen. So wurden 92 Millionen neue *C. trachomatis* Infektionen weltweit in 1999 dokumentiert (WHO 2001). Während die Prävalenz für Gonorrhoe in den letzten Jahren rückläufig war, wurde eine Verdoppelung der urogenitalen *C. trachomatis* Infektionen in den USA identifiziert (Abb. 1.2) (CDC 2012). Da ca. 70 % der genitalen *C. trachomatis* Infektionen bei Frauen und 50 % bei Männern (Cecil, Howell et al. 2001) asymptomatisch verlaufen, bleiben sie meist unbehandelt und können somit unbemerkt weiter

verbreitet werden. Bei fehlender Behandlung können diese Infektionen bei Frauen zu chronischen Unterleibsinfektionen bis hin zu ektopischen Schwangerschaften bzw. Unfruchtbarkeit durch Eileiterverschluss führen. Eine Urethritis bei Männern kann in seltenen Fällen zu einem reaktiven Arthritis Syndrom führen.

Trachomen sind aktuell die häufigsten Augeninfektionen vor allem in Entwicklungsländern und können unbehandelt zu Erblindung führen (Hu, Harding-Esch et al. 2010). Eine anhaltende Infektion mit *C. trachomatis* resultiert dabei zunächst in einer chronischen Entzündung der Augenlider, sodass schließlich das Narbengewebe eine Deformation der Augenlider und eine Trichiasis (Reiben der Wimpern auf der Hornhaut) bis hin zur irreversiblen Schädigung der Hornhaut bewirkt. Die Weltgesundheitsbehörde publizierte in 2001, dass schätzungsweise 1,3 Millionen Menschen weltweit von einer Erblindung durch Trachomen betroffen sind (WHO 2001). Die höchste Prävalenz von aktiven Trachomen wurde in afrikanischen Ländern mit ca. 50 % bei Kindern unter 10 Jahren identifiziert (Burton and Mabey 2009). Eine Transmission des Erregers erfolgt von Mensch zu Mensch über engen Kontakt, wobei niedrige Hygienestandards die Verbreitung begünstigen.

Mehrfachinfektionen auf Grund des Scheiterns einer Antibiotika-Therapie oder durch Reinfektion stellen einen prominenten Risikofaktor sowohl bei okularen als auch genitalen Infektionen mit *C. trachomatis* dar (Batteiger, Tu et al. 2010; Hu, Harding-Esch et al. 2010). Der Grund dafür ist vermutlich die Ausbildung einer partiellen Immunität bei primärer Infektion, was zwar zu einer reduzierten Organismenzahl und zu einer verkürzten Infektionsdauer bei Reinfektionen führen kann, jedoch keine potente Immunisierung darstellt (Batteiger, Xu et al. 2010).



**Abbildung 1.2: Prävalenz bakterieller, sexuell übertragbarer Krankheiten in den USA.**

Dargestellt sind die in den Jahren 2000-2010 gemeldeten Krankheitsfälle verursacht durch *Neisseria gonorrhoeae* (Gonorrhoe), *Treponema pallidum* (Syphilis) und *C. trachomatis* (urogenitale *C. trachomatis* Infektion) in den USA (Rohdaten aus CDC 2012).

### 1.3 Der chlamydiale Entwicklungszyklus

Trotz der offensichtlichen Unterschiede der Zielgewebe, die durch die verschiedenen chlamydialen Spezies befallen werden, und des Ausmaßes der resultierenden Infektionen, weisen alle *Chlamydia* einen gleichen bisphasischen Entwicklungszyklus auf (Abb. 1.3).

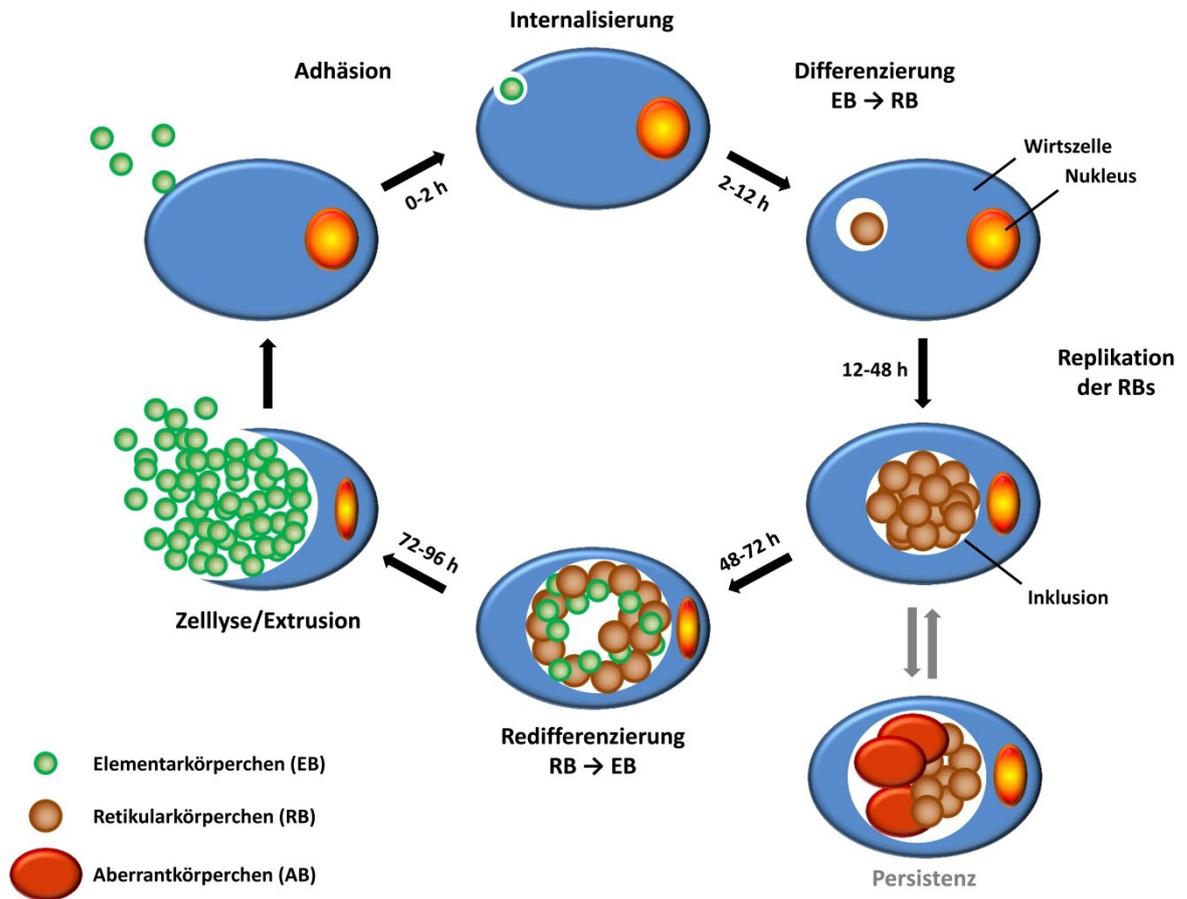


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von *C. pneumoniae*.

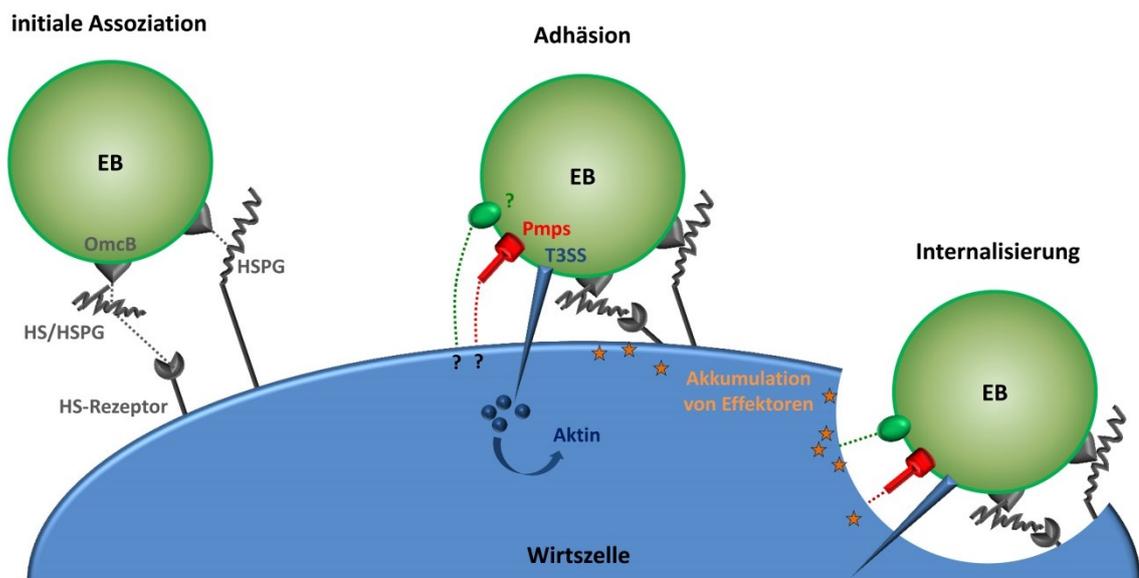
Die Zeitangaben beziehen sich auf elektronenmikroskopische Beobachtungen (Wolf, Fischer et al. 2000).

Dieser ist charakterisiert durch die Adhäsion und subsequente Internalisierung der ca. 0,3 µm großen und infektiösen, jedoch metabolisch inaktiven Elementarkörperchen (EBs) in die Wirtszelle. Das nun in einem spezialisierten Membranvesikel, der sogenannten Inklusion, lokalisierte EB, differenziert im Folgenden zu einem ca. 1 µm großen, nichtinfektiösen, aber metabolisch aktiven Retikularkörperchen (RB), welches sich ca. 10 mal durch binäre Teilung vermehren kann. Anschließend redifferenzieren die RBs zurück zu infektiösen EBs, bis der chlamydiale Einschluss hauptsächlich mit EBs gefüllt ist. Im letzten Schritt wird die chlamydiale Nachkommenschaft durch Lyse der Wirtszelle oder Extrusion freigesetzt und kann so weitere Zellen infizieren (Abdelrahman and Belland 2005; Cocchiario and Valdivia 2009). Während der Entwicklungszyklus von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* Servoar A-K nach 72-96 h beendet ist, weisen die LGV Serovare von *C. trachomatis* einen schnelleren

Lebenszyklus auf. Hierbei ist die Entwicklung bereits nach 48 h durch die Freisetzung der Chlamydien abgeschlossen (Davis and Wyrick 1997). Unter Wachstumsstress-Bedingungen, beruhend auf dem Effekt von Cytokinen, der Behandlung mit Antibiotika sowie Nährstoffmangel, kann der chlamydiale Entwicklungszyklus unterbrochen werden, was in der Ausbildung von großen, aberranten RBs (ABs) resultiert (Hogan, Mathews et al. 2004).

### 1.3.1 Adhäsion und Internalisierung von Chlamydien

Die ersten Schritte der Interaktion zwischen chlamydialen EBs und der eukaryotischen Wirtszelle sind kritisch für die Entwicklung einer erfolgreichen Infektion. Studien der letzten Jahrzehnte haben die Hypothese bestätigt, dass multiple Mechanismen an der chlamydialen Adhäsion beteiligt sind. Dabei wird ein zweistufiger Interaktionsprozess postuliert, der aus elektrostatischen Wechselwirkungen und spezifischen Interaktionen zusammengesetzt ist (Abb. 1.4) (Campbell and Kuo 2006).



**Abbildung 1.4: Modell der chlamydialen Adhäsion und Internalisierung.**

Für die Bindung von Chlamydien an die Wirtszelle wird ein zweistufiger Mechanismus postuliert. Die initiale, reversible Assoziation des EBs erfolgt über die Bindung des chlamydialen OmcB an HS (Heparansulfat) und/oder HSPG (Heparansulfat Proteoglykan) in löslicher Form oder auf der Oberfläche der Wirtszelle lokalisiert. Im folgenden Schritt binden chlamydiale Oberflächenmoleküle, wie z.B. Pmps, LPS, GroEL und MOMP, an bislang noch nicht identifizierte eukaryotische Rezeptoren. Diese stabile Adhäsion könnte im Folgenden eine Interaktion des chlamydialen T3SS (Typ-3-Sekretionssystems) mit der Zellmembran und somit eine Injektion von Effektorproteinen in die Wirtszelle ermöglichen, was beispielsweise die Rekrutierung von Aktin induziert. Während des Adhäsionsprozesses werden zelluläre Komponenten an der Eintrittsstelle akkumuliert und aktiviert, was die Internalisierung des EBs eingeleitet.

Die initiale Interaktion erfolgt vermutlich über eine reversible GAG-abhängige Adhäsion, gefolgt von einer spezifischen Interaktion von chlamydialen Adhäsinen mit Wirtszellrezeptoren,

welche schließlich die Aufnahme der chlamydialen Partikel einleitet (Carabeo and Hackstadt 2001; Fudyk, Olinger et al. 2002). Eine potentielle Nutzung verschiedener Wirtszellrezeptoren könnte letztlich in verschiedene Pathologien der chlamydialen Spezies resultieren (Carabeo and Hackstadt 2001). Bei genauerer Analyse der Adhäsionsprozesse wurde eine Beteiligung zahlreicher chlamydialer Faktoren, sowie eukaryotischen Oberflächenkomponenten identifiziert, die im Folgenden vorgestellt werden.

Die initiale Interaktion der EBs vieler, jedoch nicht aller chlamydialer Spezies und Stämme mit der Wirtszelle erfolgt über eine reversible, elektrostatische Interaktion, an der Glykosaminglykane (GAGs) beteiligt sind (Dautry-Varsat, Subtil et al. 2005). So konnte in einer Reihe von Studien bestätigt werden, dass Chlamydien an GAGs binden und so einen Kontakt zwischen Bakterium und Wirtszelle ausbilden. Für die GAG-abhängige Adhäsion von chlamydialen EBs wird ein trimolekularer Mechanismus postuliert, wobei Glykosaminglykan-Moleküle als Brückenelemente zwischen chlamydialen und eukaryotischen Oberflächenstrukturen fungieren (Stephens, Fawaz et al. 2000). Eine Entfernung der GAGs von der EB-Oberfläche oder von den Wirtszellen sowie eine Vorbehandlung der EBs mit Heparansulfat oder dem Heparansulfat Analogon Heparin führt in vielen Fällen zu einer signifikanten Reduktion der Infektiosität, was auf eine essentielle Rolle der Glykosaminglykane bei der chlamydialen Infektion hindeutet (Davis and Wyrick 1997; Wuppermann, Hegemann et al. 2001; Beswick, Travelstead et al. 2003). Dies trifft jedoch nicht für alle *Chlamydia* Spezies gleichermaßen zu. So wurde für das *C. trachomatis* Serovar E eine Heparin-unabhängige Bindung festgestellt (Taraktchoglou, Pacey et al. 2001; Moelleken and Hegemann 2008). Des Weiteren lässt eine mit Heparin sättigbare Adhäsion der EBs von *C. trachomatis* Serovare B und L2 die Existenz eines GAG-Rezeptors auf der Oberfläche der EBs vermuten (Chen, Zhang et al. 1996). Tatsächlich konnte jüngst das chlamydiale Oberflächenprotein OmcB als Interaktionspartner von Heparin-ähnlichen Glykosaminoglykanen der Wirtszelle identifiziert und charakterisiert werden (Stephens, Koshiyama et al. 2001; Fadel and Eley 2007; Fadel and Eley 2008; Moelleken and Hegemann 2008). Eine weitere Komponente des chlamydialen Außenmembrankomplexes, das MOMP, wurde ebenfalls für die Bindung an Heparansulfat Proteoglykane in Betracht gezogen (Su, Raymond et al. 1996). Jedoch wurde diese Interaktion in folgenden Studien als relativ unspezifisch charakterisiert (Stephens, Koshiyama et al. 2001). Bei der Identifikation von chlamydialen Adhäsinen wurden verschiedene Proteine des chlamydialen Außenmembrankomplexes (genauere Beschreibung in Abschnitt 1.4) sowie oberflächenexponierte Proteine in Erwägung gezogen. Dazu gehören unter anderem die chlamydialen Außenmembranproteine OmcB und MOMP, das oberflächenlokalisierte Chaperon GroEL-1, das chlamydiale LPS, das kürzlich charakterisierte Arginin-Bindeprotein

Art] sowie die Pmp-Proteinfamilie (Kuo, Takahashi et al. 1996; Fadel and Eley 2008; Moelleken and Hegemann 2008; Wuppermann, Molleken et al. 2008; Moelleken, Schmidt et al. 2010; Soriani, Petit et al. 2010).

Auch auf der Seite der Wirtszelle wurden zahlreiche Proteine und Glycoproteine als potentielle Rezeptoren identifiziert. Der epitheliale Anionen-Kanal CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) wurde erst kürzlich mit der Adhäsion und Internalisierung von EBs von *C. trachomatis* Serovar E in Verbindung gesetzt. In diesen Studien konnte unter Verwendung von mutierten Zelllinien, die einen funktionsunfähigen CFTR exprimieren, sowie durch Behandlung mit CFTR Inhibitoren und Antikörpern die chlamydiale Internalisierung signifikant inhibiert werden. Dies wurde *in vivo* durch die reduzierte zelluläre Aufnahme von *C. trachomatis* in CFTR<sup>(-/-)</sup> Mäuse bestätigt (Ajonuma, Fok et al. 2010). Des Weiteren wurde eine direkte Interaktion von CFTR mit dem chlamydialen LPS mittels Immun-Colokalisations- und Coimmunpräzipitations-Analysen identifiziert (Ajonuma, Fok et al. 2010), was eine zuvor postulierte Rolle von LPS bei der chlamydialen Adhäsion bestätigt (Peterson, de la Maza et al. 1998; Fadel and Eley 2008). Ebenfalls kürzlich wurde eine Beteiligung von FGFR (fibroblast growth factor receptor) bei der Infektion von *C. trachomatis* L2 und E identifiziert. Hierbei besteht die Annahme, dass nach einer primären chlamydialen Infektion zelluläres FGF2 (fibroblast growth factor 2) von der lysierten Wirtszelle freigesetzt wird, an EBs bindet und so als Brückenelement zwischen *C. trachomatis* und FGFR auf der Oberfläche benachbarter Zellen fungiert. Dieser Mechanismus trägt vermutlich zur Verstärkung der GAG-vermittelten Adhäsion und der Internalisierungseffizienz von EBs bei (Kim, Jiang et al. 2011). Ferner wurde eine Funktion des Apolipoproteins E4 sowie des M6P/IGF2 (mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor 2) Rezeptors bei der Adhäsion von *C. pneumoniae* EBs dokumentiert, wobei die entsprechenden chlamydialen Liganden bislang nicht identifiziert wurden (Gerard, Fomicheva et al. 2008; Puolakkainen, Lee et al. 2008).

Mittels RNA-Interferenz Screen in *Drosophila melanogaster* S2 Zellen konnte unter anderem die Tyrosin-Kinase PDGFR (platelet derived growth factor receptor) als möglicher Rezeptor bei der *C. trachomatis* Infektion identifiziert werden. So resultierte eine Reduktion der zellulären PDGFR-Moleküle durch RNA-Interferenz in einer verminderten Bindung der EBs. Ferner wurde eine Rekrutierung von PDGFR zur Adhäsionsstelle der EBs sowie eine Aktivierung des Rezeptors während der *C. trachomatis* Infektion beobachtet (Elwell, Ceesay et al. 2008). Auch bei der *C. pneumoniae* Infektion wurde eine Beteiligung von PDGFR postuliert, wobei ein einzelner Knockdown des entsprechenden Gens durch RNA-Interferenz in humanen Zellen die chlamydiale Internalisierung nicht signifikant inhibierte. Erst eine gleichzeitige

Ausschaltung von drei Genen, die für CXCR7 (chemokine C-X-C motif receptor 7), ITGB2 (integrin beta 2) und PDGFR codieren, führte zu einer verminderten *C. pneumoniae* Internalisierung, was auf einen komplexen zellulären Mechanismus während der chlamydialen Infektion deutet (Wang, Johnston et al. 2010).

Die Proteom-Charakterisierung von CHO6, einer gegen chlamydiale Infektionen resistenten Zelllinie, führte zur Identifizierung eines Defektes in der Prozessierung der PDI (protein disulfide isomerase) (Conant and Stephens 2007). Die im Folgenden intensiv untersuchte PDI ist ein oberflächenlokalisierter Bestandteil des Östrogen-Rezeptor-Komplexes. So wurde der PDI eine Rolle bei der Bindung von *C. trachomatis* und *C. psittaci* EBs an Wirtszellen zugesprochen, wobei dies unabhängig von der enzymatischen Aktivität der Isomerase erfolgt. Im Gegensatz dazu erwies sich die Aufnahme der EBs abhängig von der enzymatischen Aktivität der PDI, was eventuell auf eine Funktion in der Reduktion des vernetzten chlamydialen Außenmembrankomplexes zurückzuführen sein könnte (Davis, Raulston et al. 2002; Abromaitis and Stephens 2009). Interessanterweise wurde eine Beteiligung von Östrogen bei der *C. trachomatis* Infektion von humanen endometrialen Epithelzellen postuliert, was auf einen hormonellen Einfluss bei der sexuellen Übertragung von Chlamydien hindeutet (Hall, Schell et al. 2011).

Jüngst wurde der humane EGFR (epidermal growth factor receptor) als zellulärer Rezeptor für das *C. pneumoniae* Adhäsion Pmp21 identifiziert (Moelleken, Becker et al. 2013). Damit könnte der EGF-Rezeptor (Abschnitt 1.5.1) ein Verbindungsstück zwischen der chlamydialen Adhäsion und der darauf folgenden Internalisierung in die Wirtszelle repräsentieren.

Eine Beteiligung von Lipid-Mikrodomänen, sogenannten Lipid-Rafts, an der Bindung und Internalisierung wurde für verschiedene *Chlamydia* Spezies belegt (Jutras, Abrami et al. 2003; Stuart, Webley et al. 2003). So wurde eine Anreicherung von GM1, einem Lipid Raft Marker, an der Eintrittsstelle von *C. caviae* GPIC und eine Ansammlung von Lipid Rafts um internalisierte Chlamydien 5 h nach der Infektion beobachtet (Jutras, Abrami et al. 2003; Subtil, Wyplosz et al. 2004), was auf eine Funktion im frühen Infektionsgeschehen hindeutet. Die dynamischen und ca. 40 nm großen Lipid-Mikrodomänen sind charakterisiert durch einen hohen Gehalt an Cholesterol und Glykosphingolipiden, sowie Rezeptormolekülen, die an zellulären Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind (Brown and London 1998; Simons and Toomre 2000; Kusumi, Koyama-Honda et al. 2004). In Hinblick auf die geringe Größe der Lipid-Rafts ist eine Clusterung dieser Domänen während der chlamydialen Adhäsion denkbar. Dies könnte eine Bündelung von Rezeptormolekülen und somit die Internalisierung in die Wirtszelle begünstigen (Dautry-Varsat, Balana et al. 2004).

Während der chlamydialen Adhäsion kommt es zu einer schnellen Rekrutierung von Aktin an die Andockstelle der EBs. Dies resultiert in einer Ausbildung von Sockel- bzw. Mikrovilliartige Formationen, die an der Aufnahme der Bakterien beteiligt sind (Carabeo, Grieshaber et al. 2002; Coombes and Mahony 2002). Dieser Prozess basiert auf einer lokalen Remodelierung des Aktinzytoskeletts und geht einher mit der Akkumulation von Tyrosin-phosphorylierten Proteinen innerhalb weniger Minuten. So konnte gezeigt werden, dass die Aktinpolymerisation durch Rho GTPasen wie Cdc42 und Rac, die während der chlamydialen Infektion aktiviert werden (Rac bei *C. trachomatis*, Rac und Cdc24 bei *C. caviae*), kontrolliert wird (Carabeo, Grieshaber et al. 2004; Subtil, Wyplosz et al. 2004). Eine Reinitiierung der lokalen Aktinreichen Strukturen nach Auflösung durch das Aktin-destabilisierende Agens Cytochalasin D weist auf einen räumlich begrenzten Signal-Prozess an der Kontaktstelle zwischen EB und Wirtszelle hin (Lane, Mutchler et al. 2008). Für *C. trachomatis* konnte bereits Tarp (translocated actin recruiting protein), das durch das chlamydiale Typ-3-Sekretionssystem in die Wirtszelle transloziert und sogleich phosphoryliert wird, als wichtiger chlamydialer Faktor bei der Aktinakkumulation identifiziert werden (Clifton, Fields et al. 2004; Engel 2004; Jewett, Fischer et al. 2006; Lane, Mutchler et al. 2008). Für das *C. pneumoniae* Homolog Cpn0572 wurde ebenfalls eine Aktin-polymerisierende Funktion während der Infektion bestätigt, wobei es mit dem Aktin-depolymerisierenden Faktor Cofilin um die Bindung von F-Aktin konkurriert (Zrieq 2009).

### 1.3.2 Differenzierung von EBs zu RBs und Inklusionmodifikation

Nach der Internalisierung in die Wirtszelle besitzen die EBs innerhalb der Inklusion noch ihre charakteristische Größe und kondensierte DNA-Struktur (Wolf, Fischer et al. 2000). Wenige Stunden nach Infektionsbeginn wird die Differenzierung der EBs zu RBs mit der Auflockerung der rigiden EB-Hülle durch Auflösung der Disulfidbrücken zwischen den Cystein-reichen Proteinen der chlamydialen Oberfläche eingeleitet (Hackstadt, Todd et al. 1985; Davis, Raulston et al. 2002). Durch welches Signal dieser Prozess initiiert wird, ist *bis dato* noch unklar. Die Differenzierung von metabolisch inaktiven EBs zu metabolisch aktiven RBs kann durch eine Blockierung der bakteriellen Translation mittels Chloramphenicol inhibiert werden, was auf die Notwendigkeit einer *de novo* Proteinsynthese für diesen Schritt in der chlamydiale Entwicklung hindeutet (Scidmore, Rockey et al. 1996). EBs sind charakterisiert durch ein kondensiertes und transkriptionell inaktives Genom, wobei die DNA-Kondensation durch die beiden chlamydialen Histon-H1-ähnlichen Proteine Hc1 und Hc2 bewerkstelligt wird. Für die Freisetzung der bakteriellen Histon-Proteine von der chlamydialen DNA werden zwei Kontrollpunkte postuliert. Während ein Metabolit der Isoprenoid-

Biosynthese die Interaktion zwischen Hc1 und der chlamydialen DNA aufhebt (Grieshaber, Fischer et al. 2004), führt die Expression einer kleinen regulatorischen RNA zur Inhibierung der Hc1-Translation (Grieshaber, Fischer et al. 2004).

Zu den früh im chlamydialen Entwicklungszyklus (1-3 h) exprimierten Genen gehören unter anderem *euo*, *inc*-Gene sowie Gene des chlamydialen Metabolismus (Shaw, Dooley et al. 2000; Belland, Zhong et al. 2003). Während *Euo* als Transkriptionsrepressor der „späten“ chlamydialen Gene die frühzeitige Redifferenzierung der RBs zu EBs inhibiert (Rosario and Tan 2012), verändert der Einbau von *Inc*-Proteinen die Eigenschaften der Inklusionsmembran, was Einfluss auf die zellulären Interaktionen des chlamydialen Einschlusses ausüben kann (Hackstadt 2000; Belland, Zhong et al. 2003). Die Abwesenheit von lysosomalen Markern während der ersten Stunden der Infektion in der Inklusionsmembran sowie im Lumen des chlamydialen Einschlusses bestätigt die Generierung einer intrazellulären Nische. Folglich verhindern Chlamydien die Fusion mit Lysosomen und entgehen so ihrer Zerstörung durch enzymatischen Abbau (Fields and Hackstadt 2002). Ferner werden verschiedene GTPasen der Rab Familie, welche essentielle Regulatoren des Membran-Transports und der Organellen-Identität darstellen (Seabra and Wasmeier 2004), zu der Inklusionsmembran rekrutiert. Die Interaktion der Rab GTPasen mit der Inklusion erfolgt vermutlich über eine Wechselwirkung mit *Incs* oder anderen Proteinen der Inklusionsmembran (Rzomp, Moorhead et al. 2006; Cortes, Rzomp et al. 2007). Hierbei wurde eine Spezies-spezifische Rekrutierung identifiziert: während Rab1, Rab4, Rab11 und Rab14 an *C. trachomatis*, *C. muridarum* und *C. pneumoniae* Inklusionen akkumulieren, wird Rab6 spezifisch zu *C. trachomatis* und Rab10 zu *C. muridarum* und *C. pneumoniae* Inklusionen rekrutiert (Rzomp, Scholtes et al. 2003; Brumell and Scidmore 2007). Diese selektive Rekrutierung von Rab Proteinen könnte nicht nur zur Tarnung der Inklusion vor Lysosomen dienen, sondern auch der Interaktion mit Organellen und Vesikeln der Wirtszelle als Nährstoff-Quelle (Brumell and Scidmore 2007; Capmany and Damiani 2010). Die Akkumulation von SNARE (soluble NSF attachment protein receptor) Proteinen am chlamydialen Einschluss stellt vermutlich eine weitere Strategie zur Kontrolle von Membran-Fusionsprozessen an der Inklusionsmembran dar. Hierbei konnte ebenfalls eine Beteiligung von *Inc* Proteinen als chlamydiale Interaktionspartner bestätigt werden (Delevoye, Nilges et al. 2008).

Bereits 2-4 h nach einer *C. trachomatis* Infektion migrieren internalisierte EBs entlang der Mikrotubuli in Richtung Minus-Ende, was zu einer Akkumulation der Bakterien in der Nähe des Zellkerns führt. Dabei konnte gezeigt werden, dass der chlamydiale Einschluss mit dem Motorprotein Dynein interagiert, um entlang der Mikrotubuli transportiert zu werden (Clausen, Christiansen et al. 1997; Grieshaber, Grieshaber et al. 2003). Die Inklusion bleibt im

Folgenden in räumlicher Nähe zu den Centrosomen am MTOC (microtubule-organizing center), wobei diese Assoziation mit Defekten in der Centrosomen-Duplikation und Lokalisation in Verbindung gesetzt wurde (Grieshaber, Grieshaber et al. 2006; Knowlton, Brown et al. 2011).

### **1.3.3 Replikation der RBs und Interaktion mit der Wirtszelle**

Die chlamydialen RBs vermehren sich innerhalb des Einschlusses durch Zweiteilung, wobei sie auf die Zufuhr von Lipiden und Nährstoffen aus der Wirtszelle angewiesen sind. Um dies zu erreichen, interagieren Chlamydien selektiv mit Organellen der Wirtszelle (Cocchiaro and Valdivia 2009). Bereits innerhalb der ersten Stunden der Infektion verändern sich die Eigenschaften der chlamydialen Inklusion dramatisch. Endozytierte EBs werden zügig zur Peri-Golgi Region der Wirtszelle transportiert und fusionieren dort mit ausgewählten exozytotischen Vesikeln, die Sphingolipide und Cholesterin vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportieren (Hackstadt, Rockey et al. 1996; Carabeo, Mead et al. 2003; Moore, Fischer et al. 2008). Der Einbau von Sphingolipiden in die chlamydiale Inklusionsmembran und Zellwand wurde als essentiell für die Entwicklung der Chlamydien sowie die Stabilität der Inklusionsmembran identifiziert (Robertson, Gu et al. 2009). Des Weiteren wurden Veränderungen in der Architektur des Golgi-Apparates im Rahmen der chlamydiale Infektion beobachtet. So wird während der Infektion die Spaltung von Golgin-84, einer Komponente des strukturellen Gerüsts des Golgi-Apparates, induziert, was zu einer Golgi-Fragmentierung in „Ministacks“ führt (Heuer, Rejman Lipinski et al. 2009). Ferner gibt es Hinweise, dass MVBs (multivesicular bodies) einen alternativen Versorgungsweg bei der chlamydialen Infektion repräsentieren. MVBs sind endozytotische Organellen, die an der Degradation bzw. dem Recycling von Lipiden und Proteinen beteiligt sind und vermutlich bei der Versorgung von Chlamydien mit Lipiden und Nährstoffen eine wichtige Funktion ausüben (Beatty 2006; Beatty 2008; Woodman and Futter 2008). Außerdem konnte für sogenannte Lipid-Tröpfchen, die einen eukaryotischen Speicher von neutralen Lipiden darstellen, eine Akkumulation in der Peripherie der chlamydialen Inklusion identifiziert werden (Kumar, Cocchiaro et al. 2006). Obwohl diese Organellen von einem Phospholipid-Monolayer umgeben sind, konnte mittels Elektronen- und Time Lapse-Mikroskopie die überraschende Beobachtung gemacht werden, dass vollständige Lipidtröpfchen in das Inklusionslumen aufgenommen werden (Cocchiaro, Kumar et al. 2008).

Während der fortlaufenden Infektion werden weiterhin zelluläre Prozesse durch die Chlamydien manipuliert. Dabei ist der Effekt der chlamydialen Infektion auf apoptotische Signalwege der Wirtszelle besonders komplex. Während Chlamydien in der frühen Phase der

Infektion eine frühzeitige Apoptose der Wirtszelle verhindern, wird der Zelltod später in der Infektion induziert (Byrne and Ojcius 2004; Ying, Pettengill et al. 2007). Eine zentrale Rolle in der chlamydialen Apoptoseregulation scheint das mitochondriale Cytochrom c zu spielen. Während der Infektion wird die Degradation von pro-apoptotischen BH3-only Proteinen induziert, was zu einer Inhibierung der Freisetzung von Cytochrom c und somit zur Blockierung der Apoptose führt (Fan, Lu et al. 1998; Dong, Pirbhai et al. 2005; Ying, Seiffert et al. 2005). Ferner wurde für das in die Wirtszelle translozierte CPAF (chlamydial protease-like activity factor) eine zentrale immunregulatorische Funktion postuliert. CPAF führt neben zahlreichen anderen Effekten zu einer Inhibierung der MHC Klasse I und II Antigen-Präsentation durch Degradation spezifischer Transkriptionsfaktoren und des MHC-ähnlichen Proteins CD1d (Zhong, Fan et al. 2001; Kawana, Quayle et al. 2007; Jorgensen, Bednar et al. 2011). Ein weiterer zentraler Punkt in der chlamydialen Modulation der Wirtszell-Immunantwort ist die Inhibierung von NF- $\kappa$ B Signalprozessen, die bei der chlamydialen Infektion in der Wirtszelle induziert werden und eine wichtige Rolle bei der unspezifischen und der adaptiven Immunantwort spielen (Krull, Maass et al. 2005; Cocchiaro and Valdivia 2009). Die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Nukleus der Wirtszelle wird beispielsweise durch Proteolyse von RelA/p53, einer Untereinheit von NF- $\kappa$ B, während der chlamydialen Infektion blockiert (Lad, Li et al. 2006; Christian, Vier et al. 2010). Ferner wird angenommen, dass Chlamydien die NF- $\kappa$ B Aktivierung durch eine Ubiquitin-vermittelte Degradation verhindern können. So wurden die beiden *C. trachomatis* Proteine ChlaDub1 und ChlaDub2 identifiziert, die möglichenfalls als deubiquitinierende und deneddylierende Proteasen in das Zytosol der Wirtszelle sekretiert werden (Misaghi, Balsara et al. 2006).

### 1.3.4 Redifferenzierung von RBs zu EBs und Freisetzung der Chlamydien

Etwa nach der ersten Hälfte des Entwicklungszyklus verläuft die Replikation der Chlamydien asynchron, da vereinzelte RBs anfangen sich zu EBs zu redifferenzieren. Dabei wird die metabolische Aktivität eingestellt und es werden chlamydiale Gene exprimiert, die für die Kondensation des Chromatins und den Aufbau der äußeren Hülle der EBs benötigt werden. Unklar bleibt, welche Signale diesen Prozess auslösen (Wyrick 2000). Das hypothetische „Kontakt-Modell“ favorisiert die Ablösung der RBs von der Inklusionsmembran als mutmaßlichen Auslöser für die Redifferenzierung. Dies beruht auf der Annahme, dass RBs über zahlreiche Typ-3-Sekretionsstrukturen mit der Inklusionsmembran assoziiert sind und diese Assoziation unter einer bestimmten Anzahl von Typ-3-Sekretionsstrukturen eine Ablösung der RBs zur Folge hat (Wilson, Timms et al. 2006). Für die Freisetzung der EBs aus der Wirtszelle werden zwei verschiedene Prozesse postuliert. Während die Freisetzung durch

Zellyse mit der Zerstörung von zellulären Membranen und der Inklusionsmembran durch Cystein-Proteasen einhergeht, bedarf die „Extrusion“ oder Abschnürung der Inklusion von der intakten Wirtszelle der Beteiligung von Aktin und Myosin (Hybiske and Stephens 2007).

### 1.3.5 Persistenz

Als *in vitro* Persistenz wird ein Zustand beschrieben, in dem lebende, jedoch nicht kultivierbare Chlamydien die Morphologie von großen, abberanten und sich nicht teilenden RBs einnehmen. Ferner ist dieser Zustand reversibel und kann durch Entfernung der Persistenz-induzierenden Faktoren zu einer Differenzierung der abberanten RBs zu infektiösen EBs führen (Wyrick 2010). Ausgelöst wird dieses Stadium in der Zellkultur durch Penicillin, IFN- $\gamma$ , Eisen- und Aminosäuremangel und Phagen-Infektionen von Chlamydien (Hogan, Mathews et al. 2004). Ferner wurde eine spontane Persistenz nach der chlamydialen Infektion von Monocyten dokumentiert (Airenne, Surcel et al. 1999). Transkriptom-Analysen einer *C. trachomatis* Infektion, deren Übergang in die Persistenz mittels IFN- $\gamma$  induziert wurde, zeigten eine Hochregulation von Genen, die an der DNA-Reparatur und Rekombination, Protein-Translation und der Phospholipid-Verwertung beteiligt sind, wie auch von Genen der Stress-Antwort. Dagegen wurden Gene, die eine Funktion in der Proteolyse, im Peptid-Transport, der Zellteilung sowie in Prozessen der Redifferenzierung ausüben, transkriptionell runterreguliert (Belland, Zhong et al. 2003). Wichtige Hinweise für das Auftreten chlamydialer Persistenz *in vivo* stammen aus der Veterinärmedizin mit *C. suis* infizierten Schweinen, die abberante Inklusionsmorphologien aufwiesen (Pospischil, Borel et al. 2009). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von infizierten humanen Geweben bzw. klinische Studien lassen auf eine potentielle Beteiligung chlamydialer Persistenz bei chronischen Krankheiten wie Reaktiver Arthritis, koronaren und myokardialen Erkrankungen sowie langanhaltenden zervikalen Infektionen vermuten (Dean, Suchland et al. 2000; Skowasch, Yeghiazaryan et al. 2003; Spagnoli, Pucci et al. 2007).

## 1.4 Komponenten des chlamydiale Außenmembrankomplexes

### (cOMC) und ihre Bedeutung für die chlamydialen Adhäsion

Chlamydien besitzen, wie andere Gram-negative Bakterien, eine innere Membran sowie ein LPS-haltige Außenmembran, die durch einen periplasmatischen Raum getrennt sind (Everett and Hatch 1995). Chlamydien besitzen technisch gesehen ein Lipooligosaccharid (LOS), da es nicht aus dem Lipid A, der Kernregion und der Polysaccharid-Einheit zusammengesetzt ist,

sondern nur aus einer Trisaccharid-Kernregion besteht, die mit dem Membrananker Lipid A verknüpft ist. Ferner weist das chlamydiale Lipid A längere Fettsäuren auf, die eine Aktivität als Endotoxin signifikant reduzieren (Heine, Gronow et al. 2007; Nguyen, Cunningham et al. 2011). Weitere Eigenschaften der chlamydiale Hülle sind, dass Peptidoglykan nur in geringen Mengen oder gar nicht in der Zellwand zu detektieren ist und dass die chlamydiale Außenmembran hauptsächlich aus Cystein-reichen Proteinen besteht (Roulston 1995). Die Existenz von Peptidoglykan in Chlamydien wurde lange debattiert, da paradoxerweise die Gene für den Syntheseweg im chlamydialen Genom repräsentiert sind und die Inhibierung des Peptidoglykan-Synthesewegs mit Penicillin das chlamydiale Wachstum beeinträchtigt (Moulder 1993; McCoy and Maurelli 2006; Pavelka 2007). Daher wird eine Peptidoglykanproduktion unterhalb der Detektionsgrenze vermutet, während die Stabilität der chlamydialen Hülle potentiell über Disulfid-quervernetzte Proteine des cOMC realisiert wird (Hatch 1996). Ursprünglich wurde der cOMC als spezifischer Komplex von Sarkosyl-unlöslichen Proteinen, die aus ganzen EBs extrahiert wurden, charakterisiert (Caldwell, Kromhout et al. 1981). Zahlreiche Studien belegen eine massive Quervernetzung der Hauptkomponenten des cOMC, MOMP (major outer membrane protein), OmcA (outer membrane complex protein A) und OmcB (outer membrane complex protein B) (Ting, Hsia et al. 1995; Hatch 1996). Neuste Untersuchungen bestätigen die Anwesenheit weiterer chlamydialer Proteine auf der EB Oberfläche, wobei eine Assoziation mit dem cOMC nicht essentiell ist (Liu, Afrane et al. 2010). So wurden neben den bereits bekannten Hauptproteinen unter anderem die Familie der Pmps (polymorphic membrane proteins), PorB (porin B), Komponenten des Typ-3-Sekretionssystems, aber auch ursprünglich zytoplasmatische Proteine wie EF-Tu, GroEL-1 und DnaK identifiziert (Birkelund, Morgan-Fisher et al. 2009; Liu, Afrane et al. 2010). Interessanterweise wurden für viele dieser oberflächenlokalisierten Proteine adhäsive Eigenschaften für die Bindung von humanen Zellen nachgewiesen (MOMP: (Su, Raymond et al. 1996); OmcB: (Fadel and Eley 2007; Moelleken and Hegemann 2008); Pmps: (Moelleken, Schmidt et al. 2010); GroEL-1: (Wuppermann, Molleken et al. 2008)).

#### **1.4.1 Major outer membrane protein (MOMP)**

Das ca. 39 kDa große Außenmembranprotein MOMP repräsentiert mit ca. 60 % das am stärksten vertretene Oberflächenprotein bei Chlamydien (Caldwell, Kromhout et al. 1981). Es konnte gezeigt werden, dass der cOMC sowohl durch Disulfidbrücken zwischen MOMP Monomeren, als auch zwischen MOMP und anderen Komponenten des cOMC stabilisiert wird (Newhall and Jones 1983; Hackstadt and Caldwell 1985). Gegen aufgereinigtes MOMP von *C. trachomatis* gerichtete monoklonale Antikörper konnten die EB Infektivität

neutralisieren, was auf eine Zugänglichkeit von antigenen Bereichen des Proteins auf der EB Oberfläche hinweist (Caldwell and Perry 1982). Darüber hinaus konnte eine deutliche Heterogenität der oberflächenpräsentierten Epitope zwischen verschiedenen Serovaren und Spezies identifiziert werden, da die monoklonalen Antikörper gegen einen MOMP-Typ häufig andere MOMP von verwandten Stämmen nicht binden konnten (Stephens, Tam et al. 1982). Im Gegensatz dazu führt das *C. pneumoniae* MOMP trotz seiner Oberflächenlokalisierung zu keiner starken Antikörper-Reaktion (Klein, Kotz et al. 2003). Trotz der hohen Abundanz von MOMP im cOMC aller chlamydialen Spezies konnte nur für rekombinantes MOMP von *C. trachomatis* MoPn (Maus-Pneumonie-Serovar) eine Bindung von Heparansulfat-ähnlichen GAGs und ein inhibierender Effekt auf die Infektion nachgewiesen werden (Su, Raymond et al. 1996). Dies bedeutet, dass MOMP am Adhäsionsprozess von *C. trachomatis* MoPn an Wirtszellen beteiligt ist. Ein weiteres Merkmal ist, dass MOMP einiger chlamydialer Spezies N-glykosyliert vorliegt. Daher wird vermutet, dass es über seine Zuckerketten mit eukaryotischen Mannose-Rezeptoren interagieren kann und dadurch die Adhäsion von EBs fördert (Puolakkainen, Kuo et al. 2005; Campbell and Kuo 2006).

#### **1.4.2 Outer membrane complex protein B (OmcB)**

Das cysteinreiche Protein OmcB (ca. 60 kDa) wurde als zweithäufigster Bestandteil des cOMC identifiziert (Everett and Hatch 1995). Im Gegensatz zu MOMP ist die Aminosäuresequenz dieses Proteins in diversen *Chlamydia* Spezies hoch konserviert (Watson, Lambden et al. 1989). Dabei liegt der C-terminale Bereich des Proteins mit einer Identität von 79-99 % am stärksten konserviert vor, während die N-terminale Region eine deutliche Spezies-spezifische Variabilität mit 33-96 % zeigt. Basierend auf bioinformatischen Analysen wurde für den hydrophoben, Cystein-reichen C-Terminus eine Membranassoziation und für das hydrophile N-terminale Segment eine potentielle Oberflächenlokalisierung vorhergesagt (Mygind, Christiansen et al. 1998; Hegemann and Moelleken 2012). Zhang und Stephens postulierten erstmalig eine Rolle von *C. trachomatis* OmcB bei der Bindung von GAGs, wobei ein trimolekularer Mechanismus mit GAGs als Brückenelementen zwischen Rezeptoren auf der eukaryotischen Zelle und der EB-Oberfläche vorgeschlagen wurde (Zhang and Stephens 1992). Untersuchungen der OmcB-Sequenzen verschiedener *Chlamydia* Spezies führten zur Identifizierung des Motivs XBBXBX (wobei X eine hydrophobe und B eine basische Aminosäure repräsentiert) in der N-terminalen Region, das als Heparin-Bindemotiv in ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) Experimenten mit biotinyliertem Heparin bestätigt wurde (Stephens, Koshiyama et al. 2001). In folgenden Studien wurde unter Verwendung von rekombinantem Protein bzw. spezifischen Antikörpern das OmcB von

*C. pneumoniae* und *C. trachomatis* als bakterielles Adhäsion identifiziert (Fadel and Eley 2007; Moelleken and Hegemann 2008). Die Bindungskapazität des OmcB Proteins von *C. pneumoniae*, *C. caviae* sowie *C. trachomatis* L1 und E wurde ferner mit Hilfe des Hefe-Oberflächen-Präsentationssystems bestätigt (Moelleken and Hegemann 2008). Des Weiteren wurde mittels Infektionsneutralisationsanalysen mit verschiedenen GAGs sowie der Behandlung von Humanzellen mit Heparinase eine essentielle Funktion von Heparin bei der Adhäsion von *C. pneumoniae* OmcB nachgewiesen (Moelleken and Hegemann 2008). Darüber hinaus führten vergleichende Analysen der Bindungseigenschaften von OmcBs verschiedener Spezies zur Identifizierung von spezifischen Aminosäuren innerhalb der Heparin-Bindedomäne, welche vermutlich über lokale Konformationsveränderungen in einer Heparin-abhängigen bzw. Heparin-unabhängigen Bindung von OmcB resultieren (Chen and Stephens 1997; Fadel and Eley 2008; Moelleken and Hegemann 2008). So weisen die OmcB Proteine von *C. pneumoniae*, *C. psittaci* und *C. trachomatis* Serovar L2, jedoch nicht von *C. trachomatis* Serovar E, eine Heparin-abhängige Adhäsion an humane Epithelzellen auf. Folglich bindet das OmcB von *C. trachomatis* Serovar E vermutlich an andere Liganden (Moelleken and Hegemann 2008). Äquivalent dazu konnte gezeigt werden, dass die Präsenz Heparin-ähnlicher GAGs auf der Oberfläche der Wirtszellen essentiell für die Infektion der *C. trachomatis* LGV Biovar ist, während eine erfolgreiche *C. trachomatis* Serovar E Infektion nicht auf diese Oberflächenstrukturen angewiesen ist (Davis and Wyrick 1997; Taraktchoglou, Pacey et al. 2001; Beswick, Travelstead et al. 2003; Moelleken and Hegemann 2008).

### **1.4.3 Polymorphic membrane proteins (Pmps)**

#### **1.4.3.1 Identifikation und phylogenetische Gruppierung der Pmps**

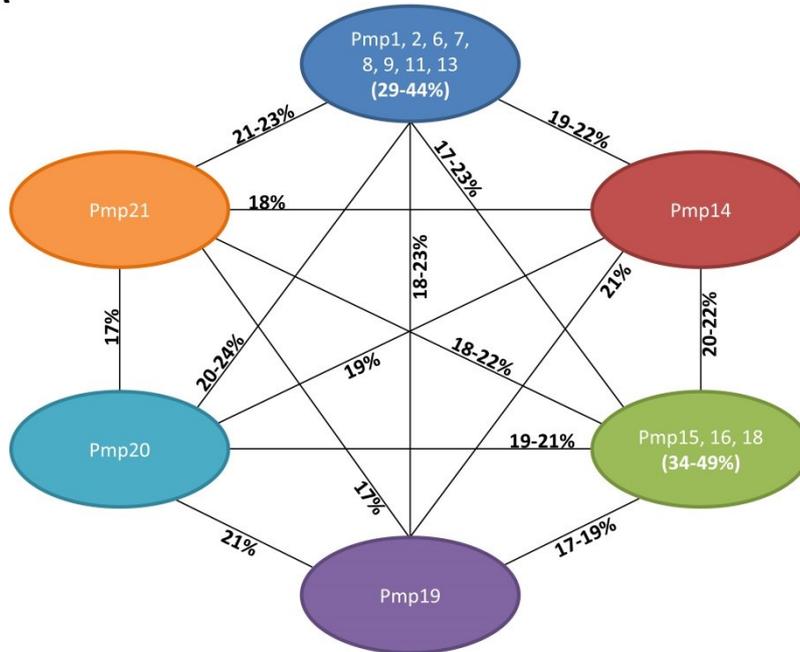
Longbottom und Kollegen identifizierten erstmalig die korrespondierenden Gene einer 90 kDa Proteinfamilie in *C. abortus* (Longbottom, Russell et al. 1998). Die Klonierung und Sequenzierung dieser Gene bestätigte für die entsprechenden Proteine Merkmale eines Außenmembranproteins. Ferner wurden mittels Immunoblot-Analysen starke immunogene Eigenschaften dieser Proteine nachgewiesen, was auf eine Oberflächenlokalisierung schließen lässt (Longbottom, Russell et al. 1998). Im Folgenden wurden auch in *C. pneumoniae* repräsentative Kandidaten dieser Proteinfamilie als immunodominante Komponenten des cOMC identifiziert (Knudsen, Madsen et al. 1999). Nachdem die Sequenzierung der *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* Genome abgeschlossen war (Stephens, Kalman et al. 1998; Kalman, Mitchell et al. 1999), bestätigten Sequenzvergleiche die Existenz von zahlreichen Genen, die eine Homologie zu der zuvor publizierten 90 kDa Proteinfamilie von *C. abortus*

aufwiesen. Überraschend war die Vielzahl und Heterogenität dieser Gene. Während in *C. trachomatis* neun homologe Gene (*pmpA* - *pmpI*) identifiziert wurden (Stephens, Kalman et al. 1998), wies das *C. pneumoniae* Genom eine bemerkenswerte Vergrößerung dieser Genfamilie mit insgesamt 21 Mitgliedern (*pmp1* - *pmp21*) auf (Kalman, Mitchell et al. 1999). Dabei repräsentieren die *pmp*-Gene 13,6 % bzw. 17,5 % der Chlamydien-spezifischen Codierungskapazität von *C. pneumoniae* bzw. *C. trachomatis*, was die Wichtigkeit der Pmps unterstreicht (Rockey, Lenart et al. 2000). Detaillierte Vergleiche der Pmp-Familien beider Spezies führten zu einer phylogenetischen Eingruppierung in sechs Pmp-Subtypen mit jeweils mindestens einem *C. pneumoniae* und einem *C. trachomatis* Pmp (Grimwood and Stephens 1999). Die größte phylogenetische Gruppe, Subtyp PmpG/I, beinhaltet die 15 Mitglieder PmpG und PmpI von *C. trachomatis* und Pmp1-Pmp13 von *C. pneumoniae*. Obwohl alle Pmps die Familien-typischen Merkmale aufweisen (Abschnitt 1.4.3.2), konnte eine beträchtliche Heterogenität identifiziert werden. Basierend auf Sequenzvergleichen der Pmps der beiden Spezies *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* konnten folgende Beobachtungen gemacht werden: (i) Innerhalb eines Pmp-Subtyps innerhalb einer Spezies wurden relativ hohe Aminosäureidentitäten festgestellt, wobei die Werte zwischen 23 % (PmpE/PmpF) und 49 % (Pmp16/Pmp18) lagen (Abb. 1.5 A, B). (ii) Relativ hohe Aminosäureidentitäten wurden ebenfalls innerhalb eines Pmp-Subtyps zwischen den beiden Spezies identifiziert, die zwischen 23 % (Pmp1/PmpI) und 39 % (Pmp20/PmpB) lagen (Abb. 1.5 C). (iii) Außerhalb eines Pmp-Subtyps innerhalb einer Spezies wurden niedrigere Aminosäureidentitäten zwischen 13 % (PmpC/PmpE) und 24 % (Pmp2/Pmp20 und Pmp8/Pmp20) bestimmt (Abb. 1.5 A, B). Allgemein gilt, dass Aminosäureidentitäten über 25 % auf strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten hindeuten könnten (Grimwood and Stephens 1999). Folglich wurden signifikante Aminosäureidentitäten nur zwischen paralogen (innerhalb einer Spezies) und orthologen (zwischen beiden Spezies) Pmps eines Pmp-Subtyps bestimmt, während Pmps verschiedener Subtypen eine deutliche Heterogenität aufwiesen. Gleiches gilt auch für die Homologie-Werte, die zwischen paralogen Pmps bis zu 65 % (Pmp16/Pmp18) und zwischen orthologen Pmps bis zu 53 % (Pmp20/PmpB) erreichten, wohingegen Pmps außerhalb eines Pmp-Subtyps innerhalb einer Spezies Homologie-Werte von maximal 43 % (Pmp8/Pmp15) aufwiesen (Domröse 2012).

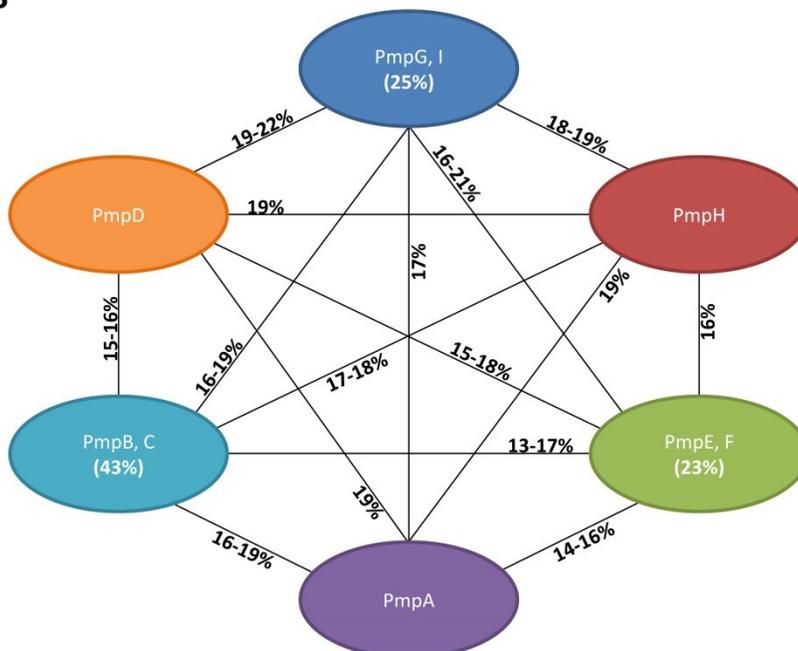
Interessanterweise codieren sechs *C. pneumoniae pmp*-Gene (*pmp3* - *pmp5*, *pmp10*, *pmp12*, *pmp17*) auf Grund von Frameshift-Mutationen bzw. frühzeitigen Stop-Codons vermutlich keine funktionellen Proteine (Grimwood, Olinger et al. 2001). Interessanterweise stammen alle sechs Gene aus den beiden größten Subtypen PmpG/I und PmpE/F. Kürzlich konnten vollständige Versionen dieser *pmp*-Gene in dem *C. pneumoniae* Genom des Koala-Isolates

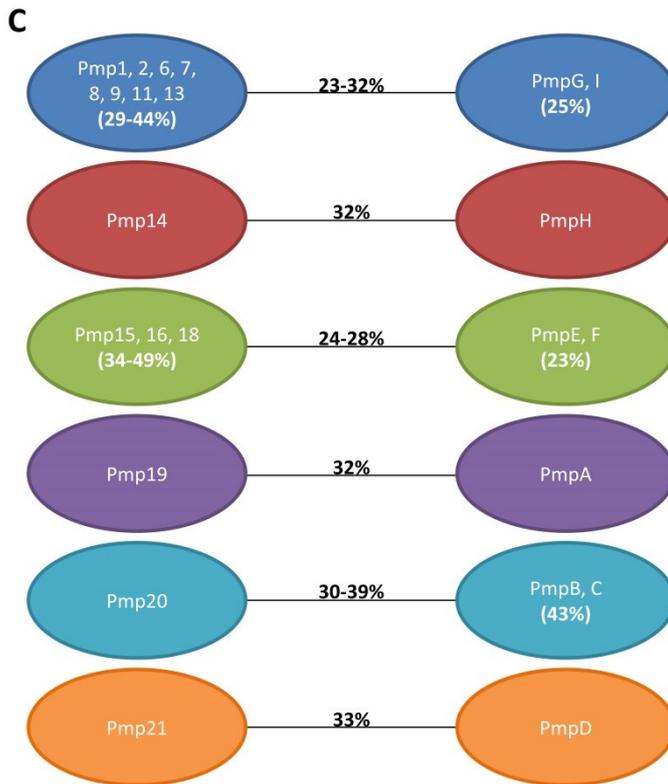
LPCoLN gefunden werden, was auf eine Wirts-spezifische Selektion von *pmp*-Genen deuten könnte (Mitchell, Hovis et al. 2010). Tatsächlich wurde in neusten bioinformatischen Studien eine Beteiligung der Pmps an einer Nischen-Adaption durch positive Selektion in verschiedenen *C. trachomatis* Serovaren postuliert (Stothard, Toth et al. 2003; Carlson, Porcella et al. 2005; Gomes, Nunes et al. 2006; Nunes, Gomes et al. 2007; Borges, Nunes et al. 2012).

**A**



**B**





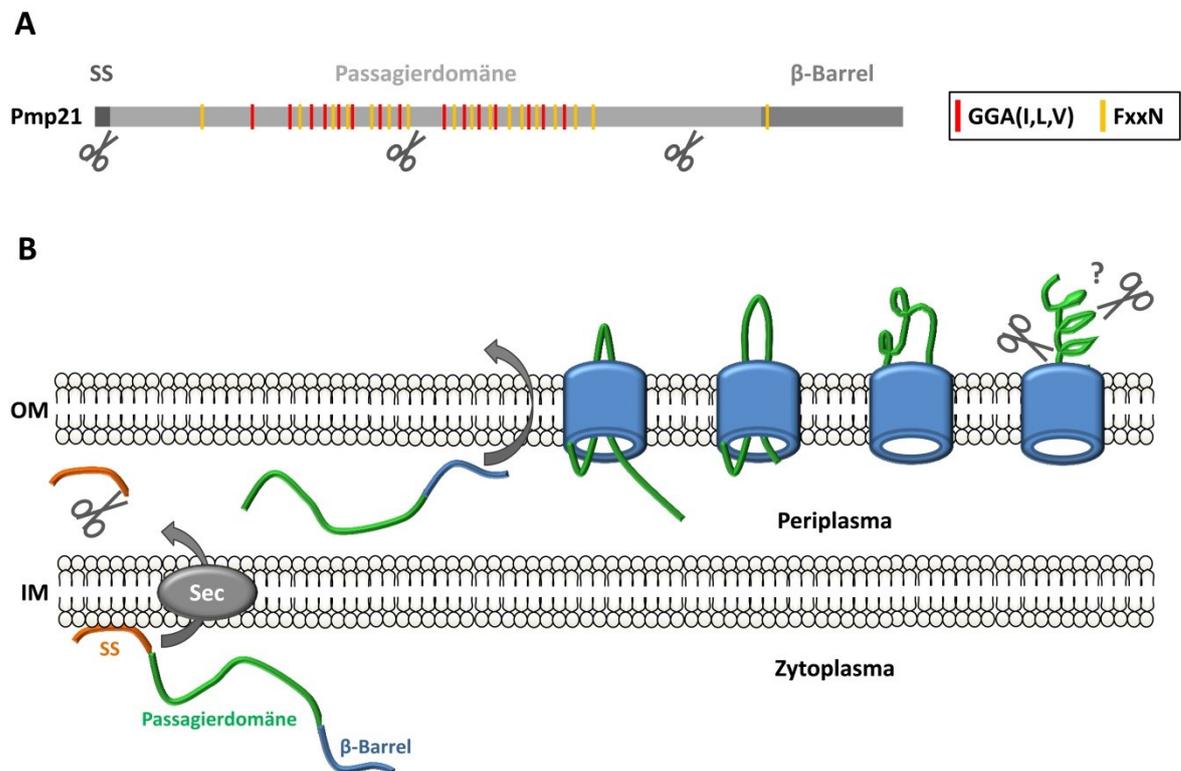
**Abbildung 1.5: Abgleich der Pmp-Subtypen von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis*.**

Die Aminosäureidentitäten [%] der Vollängen-Pmps wurden mit ClustalW2 in multiplen Sequenzalignments ermittelt (Rohdaten siehe Anhang Abb. 6.1; modifiziert nach Domröse 2012). Dargestellt ist der Abgleich aller Pmp-Subtypen von *C. pneumoniae* CWL029 **(A)** und *C. trachomatis* Serovar E/150 **(B)** sowie der Pmp-Subtypen zwischen beiden Spezies **(C)**. Die sechs Pmp-Subtypen sind mit verschiedenen Farben markiert: ● PmpA, ● PmpB/C, ● PmpD, ● PmpE/F, ● PmpG/I, ● PmpH.

Während in den meisten Umwelt-Chlamydien keine Pmps identifiziert wurden, konnte kürzlich die Existenz dreier homologer Proteine von PmpB in *Simkania*, einem potentiellen Auslöser respiratorischer Infektionen, bestätigt werden (Collingro, Tischler et al. 2011). Nachdem das Gen für ein Pmp-ähnliches Protein im Genom von *Waddlia chondrophila*, einem möglichen Verursacher von Fehlgeburten bei Menschen und Rindern, identifiziert wurde (Bertelli, Collyn et al. 2010), konnten für das *Waddlia* Pmp adhäsive Eigenschaften nachgewiesen werden (Domröse 2012). Diese Befunde lassen eine Beteiligung der Pmps an der Adaption von *Chlamydiaceae* an Menschen und Tiere als Wirtsorganismen vermuten (Collingro, Tischler et al. 2011). Die hohe Abundanz der *pmp*-Gene innerhalb des kondensierten chlamydialen Genoms sowie die Konservierung der Pmps über zahlreiche *Chlamydia* Spezies hinweg impliziert eine essentielle Rolle der Pmps in der chlamydialen Biologie (Grimwood and Stephens 1999; Read, Brunham et al. 2000; Read, Myers et al. 2003; Thomson, Yeats et al. 2005).

### 1.4.3.2 Charakteristische Merkmale der Pmps

Die Eingruppierung von Proteinen in die Pmp Proteinfamilie basierte in erster Linie nicht auf ihrer Aminosäureidentität, die sowohl zwischen Pmps verschiedener chlamydialen Arten, als auch innerhalb einer *Chlamydia* Spezies sehr unterschiedlich ausfällt. Stattdessen erfolgte die Identifizierung neuer Pmp-Kandidaten basierend auf dem Vorkommen von spezifischen Motiven sowie einer Autotransporter-typischen Struktur (Abb. 1.6) (Grimwood and Stephens 1999; Rockey, Lenart et al. 2000). Interessanterweise weisen die chlamydialen Pmps einen hohen Gehalt an den Aminosäuren Glycin mit 6,8-12,2 % und Serin mit 10,2-14,3 % auf, deren Präsenz potentiell eine Ausbildung von  $\alpha$ -helikalen Strukturen unterbindet. Des Weiteren zeichnet sich der C-Terminus aller Pmps durch ein hohes Vorkommen von Tryptophan aus, was eine Membranverankerung dieser Region favorisiert (Grimwood and Stephens 1999).



**Abbildung 1.6: Charakteristische Merkmale der chlamydialen Pmp Proteinfamilie.**

**A)** Schematische Darstellung der Drei-Domänen-Struktur und Verteilung der Pmp-charakteristischen Motive GGA(I,L,V) und FxxN in Pmp21 von *C. pneumoniae*. Die potentiellen Schnittstellen sind mit Scheren markiert (Vandahl, Pedersen et al. 2002; Wehrl, Brinkmann et al. 2004; Moelleken, Schmidt et al. 2010).

**B)** Mechanismus der Autotransporter-Translokation über die bakterielle Innen- und Außenmembran. Mit Hilfe der Signalsequenz (SS) erfolgt der Transport vom Zytoplasma, über die innere Membran (IM), in das Periplasma mittels Sec-Apparat. Für die anschließende Translokation der Passagierdomäne durch den porenförmigen  $\beta$ -Barrel in der äußeren Membran (OM) wird ein Haarnadel-Modell postuliert. Dabei induziert eine stabile Kernstruktur in der Passagierdomäne die finale Faltung des Proteins auf der bakteriellen OM. An der Zelloberfläche verbleibt die Passagierdomäne mit dem  $\beta$ -Barrel verbunden oder kann post-translational prozessiert werden (Henderson and Lam 2001; Dautin and Bernstein 2007; Junker, Besingi et al. 2009).

Alle Pmps weisen eine auffällig hohe Anzahl der beiden Tetrapeptidmotive GGA(I,L,V) und FxxN in der Passagierdomäne auf (Abb. 1.6 A). In den *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* Pmps wurden jeweils durchschnittlich 5 bzw. 6,5 Kopien des GGA(I,L,V) Motivs sowie 11,3 bzw. 13,6 Kopien des FxxN Motivs gefunden. Charakteristisch für beide Pmp-spezifischen Motive ist die meist alternierende Abfolge im Protein, wobei die zwischengelagerten Aminosäuresequenzen kein erkennbares Muster aufweisen (Grimwood and Stephens 1999). Die Bedeutung dieser Motive wird dadurch hervorgehoben, dass beispielsweise das GGAI Aminosäuremotiv nur in zehn weiteren Proteinen von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* identifiziert wurde und in diesen Fällen nicht mehr als einmal pro Protein auftritt. Ferner tragen nur wenige nichtchlamydiale Proteine eine signifikante Anzahl der Pmp-charakteristischen Motive, wie z.B. OmpA von *Rickettsia conorii* (10x GGAV und 13x FxxN), YfaL von *E. coli* (6x GGA(I,V) und 7x FxxN) und FHA von *Bordetella pertussis* (10x GGA(L,V) und 1x FxxN) (Grimwood and Stephens 1999) (Diskussion Abb. 5.1). Für YfaL wurde eine Beteiligung an der bakteriellen Biofilmformation postuliert (Roux, Beloin et al. 2005; Wells, Totsika et al. 2010), während für das *Rickettsia* Außenmembranprotein OmpA eine Funktion bei der Adhäsion an Wirtszellen beschrieben wurde (Riley, Goh et al. 2010). FHA (filamentous hemagglutinin) wurde als wichtiger Virulenzfaktor von *Bordetella pertussis* bei der Besiedelung des humanen respiratorischen Traktes identifiziert (van den Berg, Beekhuizen et al. 1999). Bislang wurde jedoch eine Beteiligung der Tetrapeptid-Motive an den adhäsiven Eigenschaften dieser Proteine nicht analysiert.

Die chlamydialen Pmps stellen mit anderen Autotransportern Gram-negativer Bakterien eine Familie von sekretierten Proteinen dar, die über eine charakteristische Drei-Domänen-Struktur verfügen, bestehend aus einer N-terminalen Signalsequenz, einer Passagierdomäne sowie einer C-terminalen  $\beta$ -Barrel Domäne (Henderson, Navarro-Garcia et al. 2004; Dautin and Bernstein 2007). Bei dem weit verbreiteten Autotransporter- bzw. Typ-V-Sekretionsweg erfolgt der Proteintransport über einen zweistufigen Mechanismus vom Zytoplasma über die bakterielle Innen- und Außenmembran zur Zelloberfläche (Abb. 1.6 B). Während des ersten Schrittes erfolgt die Translokation des Proteins über den Sec-Apparat, bestehend aus dem zytoplasmatischen Chaperon SecB, der Translokations-ATPase SecA und dem porenförmigen Translokationskomplex SecYEG, über die innere Membran. Dabei darf das zu transportierende Protein noch nicht seine finale stabile Faltung aufweisen (Suo, Hardy et al. 2011). Bei dem Transport über die bakterielle Innenmembran ist meist die ca. 20-30 Aminosäuren lange Signalsequenz des Autotransporters beteiligt, die im Periplasma durch eine Signal-Peptidase vom restlichen Protein abgespalten wird (Dautin and Bernstein 2007). Im periplasmatischen Raum angelangt, liegt das Protein als Proprotein vor, das seine vollständige

Faltung erst bei der Translokation über die äußere Membran erhält (Henderson, Navarro-Garcia et al. 2004). Dieser Vorgang wird durch die Insertion der  $\beta$ -Barrel Domäne in die Außenmembran eingeleitet, wobei die hydrophoben Aminosäureseitenketten der fassförmigen  $\beta$ -Faltblattstruktur im hydrophoben Lipid-Bilayer eingebettet sind, während die hydrophilen Bestandteile in das Innere der  $\beta$ -Barrel Pore zeigen (Oomen, van Ulsen et al. 2004). Wie der Name dieser Proteinfamilie schon suggeriert, beinhaltet die Autotransporter-Aminosäuresequenz alle essentiellen Komponenten für einen eigenständigen Transport über die Außenmembran, ohne dass externe Energiequellen oder akzessorische Proteine beteiligt sind. Dabei wird ein sogenanntes Haarnadel-Modell postuliert, das die Insertion einer C-terminalen Haarnadel-Struktur der Passagierdomäne in die  $\beta$ -Barrel Pore als Initiation der Translokation favorisiert (Henderson, Navarro-Garcia et al. 2004; Junker, Besingi et al. 2009). An der bakteriellen Oberfläche angelangt, übernimmt vermutlich eine konservierte stabile Kernstruktur der Passagierdomäne die Funktion eines Autochaperons und induziert die finale Faltung des translozierten Proteins (Junker, Schuster et al. 2006; Renn and Clark 2007; Nishimura, Tajima et al. 2010). So konnte für den Autotransporter BrkA gezeigt werden, dass eine Deletion der Autochaperon-Domäne zwar keinen Einfluss auf die Translokation und Präsentation des Proteins auf der Zelloberfläche hat, jedoch eine Faltung in die native Konformation verhindert (Oliver, Huang et al. 2003). Für über 97 % aller Autotransporter, die chlamydialen Pmps inbegriffen, konnte eine  $\beta$ -helikale Struktur der Passagierdomäne analog zur Struktur von Pertactin von *Bordetella pertussis* vorhergesagt werden (Bradley, Cowen et al. 2001; Cowen, Bradley et al. 2002; Junker, Schuster et al. 2006). Das Schicksal der Passagierdomäne ist abhängig von Prozessierungsmechanismen auf der bakteriellen Zelloberfläche. So könnte das Protein intakt bzw. verkürzt weiterhin über die  $\beta$ -Barrel Domäne mit der Außenmembran verbunden bleiben oder durch Prozessierung in das extrazelluläre Milieu sekretiert werden (Wells, Tree et al. 2007). Die meisten Pmps von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* wurden in unabhängigen Studien auf der chlamydialen Oberfläche identifiziert, was eine erfolgreiche Translokation der Proteine aus dem bakteriellen Zytoplasma auf die Außenmembran bestätigt (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; Liu, Afrane et al. 2010; Moelleken, Schmidt et al. 2010; Tan, Hsia et al. 2010). Formal wurde *bis dato* allerdings nicht experimentell nachgewiesen, dass die chlamydialen Pmps über den klassischen Autotransporterweg oder eventuell über einen alternativen Transportmechanismus transloziert werden. Darüber hinaus gibt es erste Hinweise dafür, dass posttranslational prozessierte Fragmente von PmpD zum Teil von *C. trachomatis* EBs in das Inklusionslumen sekretiert werden, wobei die Funktion dieser

löslichen Formen (Abb. 1.7) unklar ist (Kiselev, Skinner et al. 2009; Swanson, Taylor et al. 2009).

Ein weiteres Charakteristikum der Pmps stellt ihre posttranslationelle Prozessierung dar. Hierbei wurden nicht nur Abspaltungen der N-terminalen Signalsequenz und der C-terminalen  $\beta$ -Barrel Domäne, sondern auch Prozessierungen innerhalb der Passagierdomäne identifiziert. Während für Pmp20 von *C. pneumoniae* bislang nur eine Schnittstelle bestimmt werden konnte, wurden für Pmp6 zwei und für Pmp21 sogar drei Schnittstellen identifiziert (Vandahl, Pedersen et al. 2002; Wehrl, Brinkmann et al. 2004; Moelleken, Schmidt et al. 2010). Im Verlauf der Infektion stellen die prozessierten N-Pmp21 und M-Pmp21 Fragmente im Vergleich zum Vollängen Pmp21 den deutlich höheren Anteil dar (Wehrl, Brinkmann et al. 2004; Moelleken, Schmidt et al. 2010). Interessanterweise wurde ebenfalls für Orthologe von Pmp21, das *C. trachomatis* PmpD sowie *C. abortus* Pmp18D, eine massive Prozessierung festgestellt (Kiselev, Stamm et al. 2007; Swanson, Taylor et al. 2009; Wheelhouse, Sait et al. 2012). Darüber hinaus wurde eine zeitabhängige Prozessierung von PmpD in *C. trachomatis* beschrieben, die zunächst zur Abspaltung der weiterhin bakterienassoziierten Formen p73 und p82 vom Vollängenprotein p155 führt, während nach 30 hpi die Fragmente p111, p73 und p30 in der löslichen Fraktion vorliegen (Swanson, Taylor et al. 2009). In einer neusten Studie wurde mittels semitryptischen Peptidanalysen eine Prozessierung aller *C. trachomatis* L2 Pmps, außer PmpA und PmpC, identifiziert, wobei die potentiellen Prozessierungsstellen in vielen Pmps hinter der N-terminalen Signalsequenz und vor dem C-terminalen  $\beta$ -Barrel lokalisiert waren (Saka, Thompson et al. 2011). Interessanterweise wurde *via* quantitativer Proteom-Analysen von *C. trachomatis* L2 EBs und RBs eine unterschiedliche relative Abundanz der verschiedenen Pmps zwischen den beiden chlamydialen Formen beobachtet. So wurden PmpA und PmpI ausschließlich in RBs detektiert, während PmpF nur in EBs identifiziert wurde. PmpB, PmpE und PmpG wurden vorwiegend in EBs, PmpC und PmpD eher in RBs und PmpH gleichermaßen in EBs und RBs detektiert (Skipp, Robinson et al. 2005; Saka, Thompson et al. 2011). Dies könnte auf unterschiedliche Funktionen der einzelnen Pmps im chlamydialen Infektionsgeschehen hindeuten.

#### **1.4.3.3 Expression der Pmps und Funktionen in der chlamydialen Pathogenese**

Verschiedene Studien belegen, dass alle *pmp*-Gene von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* transkribiert werden (Grimwood, Olinger et al. 2001; Nunes, Gomes et al. 2007; Tan, Hsia et al. 2010). Ferner konnte eine Expression aller neun Pmps von *C. trachomatis* E sowie der 16 Vollängen Pmps von *C. pneumoniae* CWL029 immunologisch nachgewiesen werden (Montigiani, Falugi et al. 2002; Vandahl, Pedersen et al. 2002; Tan, Hsia et al. 2010). Da für

zahlreiche Pmps eine Oberflächenlokalisierung nachgewiesen werden konnte (siehe Abschnitt 1.4.3.2), wurde eine Funktion dieser Proteine in der chlamydialen Pathogenese vermutet. Tatsächlich konnte in früheren Studien unter Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen Pmp21 von *C. pneumoniae* und dessen Ortholog PmpD von *C. trachomatis* ein inhibitorischer Effekt auf die chlamydiale Infektion beobachtet werden (Wehrl, Brinkmann et al. 2004; Crane, Carlson et al. 2006). Interessanterweise wies der PmpD-Antikörper eine Pan-neutralisierende Wirkung gegen alle *C. trachomatis* Serovare auf, während die *C. muridarum* Infektion resistent gegen diese Antikörper-Behandlung war. In folgenden Studien wurden die *C. pneumoniae* Proteine Pmp6, Pmp20 und Pmp21 mittels Bindungsanalysen mit Pmp-präsentierenden Hefe-Zellen und proteinbeschichteten Latexkügelchen als bakterielle Adhäsine identifiziert, die eine Bindung von *C. pneumoniae* an humane Zellen bewirken (Moelleken, Schmidt et al. 2010). Äquivalent dazu resultierte eine Vorbehandlung der Humanzellen mit den entsprechenden rekombinanten Proteinen bzw. eine Präinkubation der *C. pneumoniae* EBs mit Pmp-spezifischen Antikörpern in einer signifikant reduzierten chlamydialen Infektion (Moelleken, Schmidt et al. 2010). Darüber hinaus zeigten alle rekombinant hergestellten Fragmente von Pmp21 adhäsive Eigenschaften, wobei ein Minimum von zwei Tetrapeptid-Motiven für die Bindung an Humanzellen erforderlich war. Die Wichtigkeit der Pmp-charakteristischen Motive wurde im Weiteren dadurch bestätigt, dass ein synthetisch hergestelltes Peptid, das einem Pmp21-Abschnitt (Aminosäureposition 745-776) mit zwei Tetrapeptid-Motiven entsprach, die *C. pneumoniae* Infektion inhibieren konnte. In Hinblick auf die postulierte Prozessierung der Pmps (Abschnitt 1.4.3.2) bedeutet dies, dass potentiell alle natürlich existierenden Pmp-Fragmente adhäsive Eigenschaften aufweisen können (Moelleken, Schmidt et al. 2010). Schließlich wurde ein additiver Effekt von Pmp6 und Pmp21 in Infektionsneutralisations-Experimenten identifiziert, in denen beide rekombinanten Proteine in Kombination eingesetzt wurden. Dieses Resultat könnte auf eine überlappende Funktion der entsprechenden nativen Proteine während der chlamydialen Infektion hindeuten (Moelleken, Schmidt et al. 2010).

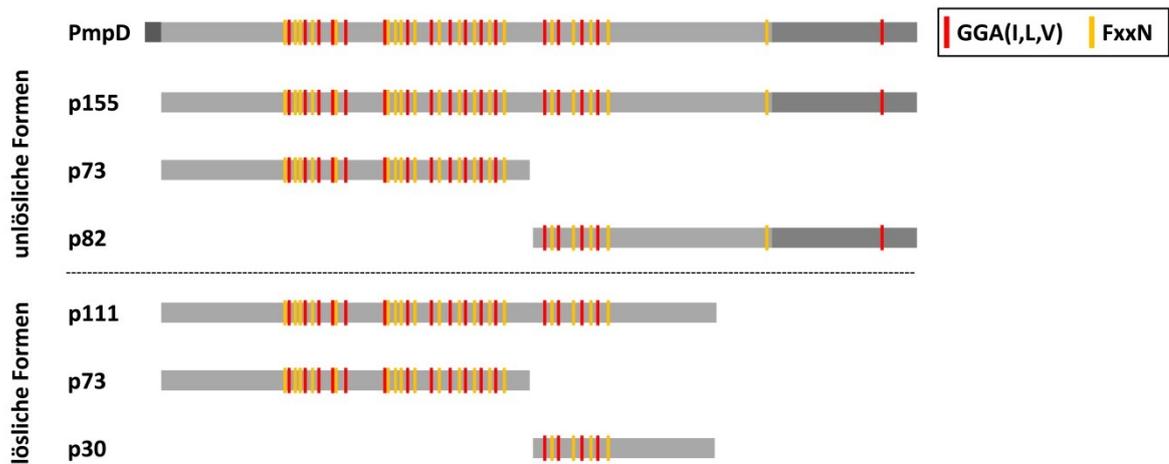
Da die chlamydialen Pmps als oberflächenpräsentierte Proteine von immunologischer Bedeutung sein könnten, wurde bereits früh die Hypothese einer antigenen Variation der Pmps als Strategie zur Umgehung des Immunsystems des Wirts aufgestellt (Grimwood and Stephens 1999; Kalman, Mitchell et al. 1999). Den ersten Hinweis für eine differenzielle Expression von Pmps stellte die in der Zellkultur beobachtete variable Expression von Pmp10 in *C. pneumoniae* CWL029 infizierten HEp-2 Zellen dar. Als molekularer Mechanismus wurde eine Verschiebung des Leserasters in einem Poly-G-Bereich innerhalb des *pmp10*-Gens identifiziert, was zu einem frühzeitigen Stop-Codon führt (Pedersen, Christiansen et al. 2001).

In neusten Studien wurde unter normalen Zellkultur-Bedingungen eine variable Expression aller neun *C. trachomatis* Pmps in individuellen chlamydialen Inklusionen bestimmt (Tan, Hsia et al. 2010). So wurde mittels Immunfluoreszenz eine reproduzierbare Verteilung von Pmp-positiven, Pmp-negativen bzw. intermediären Pmp-Phänotypen identifiziert, wobei die Rate der Pmp-negativen Inklusionen je nach Pmp zwischen 0,1 % und 10 % lag (Tan, Hsia et al. 2010). Diese Beobachtung korreliert mit der Identifizierung differenzieller Antikörperprofile gegen die Pmps von *C. trachomatis* in verschiedenen Patientenseren (Tan, Hsia et al. 2009). Kürzlich wurde das Phänomen der variablen Expression auch für fünf Pmps in *C. abortus* beschrieben, wobei Pmp-spezifische Expressionsmuster im Laufe der chlamydialen Infektion beobachtet werden konnten (Wheelhouse, Sait et al. 2012). Darüber hinaus gibt es erste Hinweise, dass die Expression bestimmter Pmps mit der chlamydialen Persistenz assoziiert ist. So konnte *in vitro* eine veränderte Pmp-Expression in Penicillin-behandelten *C. trachomatis* Infektionen im Vergleich zu Infektionen unter optimalen Bedingungen verzeichnet werden (Carrasco, Tan et al. 2011). Ferner wurde eine erhöhte Reaktivität der Seren von Patienten mit einer potentiell persistenten *C. pneumoniae* Infektion unter anderem gegen Pmp10 und Pmp21 identifiziert, was auf eine differenzielle Expression dieser Pmps während der chlamydialen Persistenz hindeutet (Bunk, Susnea et al. 2008).

#### **1.4.3.4 Bildung von oligomeren Pmp-Strukturen?**

Das intensiv untersuchte PmpD von *C. trachomatis* wurde in zahlreichen Studien auf der chlamydialen Oberfläche detektiert (Crane, Carlson et al. 2006; Kiselev, Skinner et al. 2009; Tan, Hsia et al. 2010), wobei Swanson *et al.* die erste Evidenz für eine Oligomerisierung von PmpD Molekülen auf der Oberfläche von EBs und RBs erbrachten (Swanson, Taylor et al. 2009). So führten Analysen von Immunoaffinität-gereinigtem nativem PmpD von *C. trachomatis* L2 EBs zur Detektion von stabilen blumen-förmigen Strukturen mittels Transmissionselektronenmikroskopie. Die Komposition dieser Komplexe wurde durch Westernblot-Analysen von zweidimensionalen BN-PAGE (blue native polyacrylamide gel electrophoresis) Gelen genauer untersucht. Dabei konnten das Volllängen Protein p155 sowie die prozessierten Fragmente p73 und p82 von PmpD in den 850 kDa bzw. 530 kDa großen affinitätsgereinigten Komplexen identifiziert werden (Abb. 1.7). Eine Interaktion mit anderen *C. trachomatis* Pmps wurde in diesen Studien nicht untersucht (Swanson, Taylor et al. 2009). Interessanterweise wurden in früheren elektronenmikroskopischen Studien ähnliche Strukturen als hexagonale Rosetten auf der Oberfläche von *C. trachomatis*, *C. psittaci* und *C. pneumoniae* EBs beschrieben (Gregory, Gardner et al. 1979; Matsumoto 1982; Matsumoto

1982; Miyashita, Kanamoto et al. 1993). Ob es sich bei diesen Strukturen um die identifizierten PmpD-Oligomere handelt, ist jedoch unklar.



**Abbildung 1.7: PmpD von *C. trachomatis* L2 wird in frühe unlösliche und späte lösliche Formen proteolytisch prozessiert.**

Westernblot-Analysen der unlöslichen und löslichen Fraktion von *C. trachomatis*-infizierten murinen Fibrosarkomzellen führten zur Detektion der PmpD-Fragmente p155, p82 und p73 bereits nach 24 hpi in den unlöslichen Fraktionen. Diese Fragmente wurden ferner mittels Westernblots von 2D BN-PAGE Gelen in Komplexen identifiziert, die bei der Affinitätsreinigung von PmpD aus *C. trachomatis* EBs isoliert wurden. Die Formen p111, p73 und p30 wurden erst 30-36 hpi in den löslichen Fraktionen detektiert (Swanson, Taylor et al. 2009).

## 1.5 Mechanismen der Endozytose

Endozytose beschreibt einen Vorgang, in dem Plasmamembranlipide und integrale Proteine und extrazelluläre Komponenten vollständig in eine Zelle internalisiert werden. Die Internalisierung von Proteinen und Lipiden, aber auch Pathogenen, in eukaryotische Zellen erfolgt in der Regel über einen klassischen, Clathrin-abhängigen oder einen Clathrin-unabhängigen endozytotischen Weg. Grundlage hierfür sind Protein-Protein bzw. Protein-Lipid Interaktionen, die wiederum zu einer spezifischen Rekrutierung von Signalmolekülen und akzessorischen Partnern zu verschiedenen Membrankompartimenten führen. Diese zellulären Prozesse dienen der Kontrolle von Signalkaskaden und regulieren somit die Reaktion der eukaryotischen Zelle auf ihre Umgebung (Le Roy and Wrana 2005; Doherty and McMahon 2009).

Die Zellmembran ist ein Mosaik verschiedenster Lipidmoleküle, wobei Phosphatidylinositole (PIPs) und Membran-Mikrodomänen, bekannt als Lipid-Rafts, essentiell für zelluläre Transportvorgänge sind (Le Roy and Wrana 2005). Verschiedene Phosphatidylinositole sind heterogen in der eukaryotischen Zelle verteilt und geben unterschiedlichen Organellen ihre Identität in Hinblick auf endozytotische Prozesse. Während  $PI(4,5)P_2$  hauptsächlich in der

Plasmamembran lokalisiert und an der Clathrin-abhängigen Endozytose beteiligt ist, ist PI3P vorwiegend in frühen Endosomen, PI(3,5)P<sub>2</sub> in späten Endosomen bzw. MVBs (multivesicular bodies) und PI4P im Golgi und dem endoplasmatischen Retikulum (ER) angereichert (Chang-Ileto, Frere et al. 2012). Lipid-Rafts sind reich an Cholesterol und Glykosphingolipiden sowie bestimmten Oberflächenproteinen wie z.B. GPI-verankerten Proteinen, Caveolin und EGFR (Simons and Toomre 2000; Razani, Woodman et al. 2002; Sigismund, Woelk et al. 2005).

Im Rahmen der Clathrin-abhängigen Endozytose rekrutieren integrale Membranproteine nach der Bindung von extrazellulären Liganden zytoplasmatische Adaptoren, die zusammen mit trimeren Clathrin-Molekülen die Bildung eines endozytotischen „Clathrin-coated pit“ (CCP) in der Plasmamembran bewirken. Hierbei ist die Zeit für eine vollständige Assemblierung des Clathrin-Clusters proportional zur Größe des Cargo-Partikels. Im Folgenden führt die Rekrutierung der GTPase Dynamin zur Abschnürung des CCP von der Membran und somit zur Entstehung eines „Clathrin-coated vesicle“ (CCV). Schließlich setzt eine Dissoziation des Clathrin-Gerüsts nach 15-30 s das neu geformte Vesikel frei (Ehrlich, Boll et al. 2004; Veiga, Guttman et al. 2007; Rappoport 2008; Doherty and McMahon 2009). Der Durchmesser der CCVs variiert zwischen 30 und 150 nm (Ehrlich, Boll et al. 2004; Cheng, Boll et al. 2007), was auf eine obere Grenze von ca. 150 nm für die Größe des Cargos hinweist. Überraschenderweise erfolgt die Internalisierung einiger Viren wie z.B. Influenza ebenfalls über die Clathrin-vermittelte Endozytose, wobei größere Vesikel zu beobachten sind (Marsh and Helenius 2006). Mittels mikroskopische Untersuchungen der Internalisierung von 70 x 200 nm großen VSV (vesicular stomatitis virus) Partikeln und ihren kürzeren Varianten, den DI-T (defective interfering) Partikeln, wurden signifikante Unterschiede in der Clathrin- und Aktin-Rekrutierung während der Endozytose der beiden Virione identifiziert. Während die VSV-Internalisierung durch einen partiellen „Clathrin-Coat“ an der Spitze des Virions, der Kontaktstelle zur Wirtszelle, und durch eine lokale Aktin-Rekrutierung charakterisiert ist, werden DI-T Partikel vollständig von CCVs umschlossen und benötigen keine Aktin-Polymerisierung. Da VSV und DI-T Partikel die gleiche Oberflächenbeschaffenheit aufweisen, besteht die Hypothese, dass die Größe bzw. Form der Virione die Art und Weise des Internalisierungsprozesses vorgibt. So wird vermutet, dass die elongierte Form von VSV Partikeln den vollständigen Einschluss in CCVs verhindert und dadurch die Aktin-Maschinerie dazu anregt, die Internalisierung des Partikels zu vollenden (Cureton, Massol et al. 2009; Cureton, Massol et al. 2010).

Es wurde eine Beteiligung verschiedener Membranproteine, wie Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, G-Protein gekoppelte Rezeptoren sowie Transferrin-Rezeptor, an der Clathrin-abhängigen

Internalisierung bestätigt (Doherty and McMahon 2009). Darüber hinaus wurde eine Akkumulation des Phospholipids PI(4,5)P<sub>2</sub> bei der Bildung und Abschnürung von CCPs postuliert (Zoncu, Perera et al. 2007; Rappoport 2008). Ferner spielen Adaptor-Proteine eine zentrale Rolle in der Bindung von Clathrin, anderen regulatorischen Komponenten bzw. dem Cargo, sodass sich ein Clathrin-Gerüst formieren kann. Während AP2 (Adaptor protein-2) beispielsweise als Adaptor bei der Endozytose des Transferrin-Rezeptors fungiert, ist die EGFR-Internalisierung vorwiegend abhängig von dem Clathrin-interagierenden Adaptor Epsin-1 sowie seinen Partnern Eps15 (EGFR-pathway substrate-15) und Eps15R (Eps15-related protein) (Le Roy and Wrana 2005; Kazazic, Bertelsen et al. 2009).

Die Clathrin-unabhängige Endozytose erfolgt in der Regel über einen Cholesterol-abhängigen Prozess, wobei die diversen endozytotischen Vorgänge noch nicht vollständig aufgeklärt sind (Parton and Richards 2003). Ein wichtiger Clathrin-unabhängiger Weg ist dabei Endozytose mittels Caveolin, ein Lipid Raft assoziiertes Protein, das die Bildung von tubulären Membraneinstülpungen, sogenannten Caveolae, an der Zelloberfläche induziert (Le Roy and Wrana 2005; Doherty and McMahon 2009). Sowohl die Clathrin-unabhängige, als auch die Clathrin-abhängige Internalisierung kann Moleküle verschiedenen Kompartimenten zuführen, wie dem Golgi-Apparat, ER, Lysosomen sowie Recycling-Endosomen (Bishop 2003).

### **1.5.1 Epidermal growth factor receptor (EGFR)**

Der EGF-Rezeptor, auch bekannt als ErbB1 oder HER1, ist das am besten charakterisierte Mitglied der ErbB-Familie, die aus den vier Rezeptor-Tyrosin-Kinasen EGFR, ErbB2, ErbB3 und ErbB4 besteht (Sorkin and Goh 2008). Die strukturelle Gemeinsamkeit aller Rezeptor-Tyrosin-Kinasen ist die extrazelluläre Liganden-Bindedomäne, gefolgt von einer einzelnen Transmembrandomäne und einem zytoplasmatischen Abschnitt mit einer Tyrosin-Kinase-Domäne. Die extrazelluläre Domäne von EGFR ist in die vier Subdomänen L1, S1, L2, und S2 unterteilt, wobei L1 und L2 für die Ligandenbindung verantwortlich sind, während die übrigen Bereiche der extrazellulären Domäne für die Rezeptor-Dimerisierung sowie die Interaktion mit anderen Membranproteinen zuständig sind (Wells 1999; Schlessinger 2002). Rezeptor-Tyrosin-Kinasen werden durch eine Liganden-induzierte Dimerisierung aktiviert. Für EGFR wurden neben EGF sieben weitere Wachstumsfaktoren, wie z.B. TGF $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ ) und Amphiregulin, als natürliche Liganden identifiziert (Henriksen, Grandal et al. 2013). Ist die Rezeptor-Ligand Interaktion ausreichend stabil, stimuliert die anschließende EGFR-Dimerisierung die intrinsische Phosphorylierung verschiedener Tyrosinreste, wie Y992, Y1045, Y1068, Y1148 und Y1173, innerhalb der C-terminalen Domäne von EGFR (Wells 1999; Madshus and Stang 2009). Dieser Prozess führt

zur Rekrutierung verschiedener Effektorproteine, die über ihre SH2 (Src-homology-2) Domänen an die phosphorylierten Tyrosinreste binden. Die Effektoren initiieren im Folgenden diverse Signaltransduktionskaskaden, wie beispielsweise den MAPK- (mitogen-activated protein kinase) Weg über Shc, Grb2, Sos, Ras, Raf, MEK und ERK (Yarden and Shilo 2007). Auf diese Weise werden wichtige Zellprozesse wie Migration, Adhäsion, Proliferation und Apoptose moduliert. Ein zentraler Faktor der EGFR-Internalisierung ist die RING-Finger E3 Ubiquitin Ligase c-Cbl, die an den aktivierten EGFR und das assoziierte Grb2 bindet und eine Ubiquitinierung des Rezeptors durchführt. Diese Modifikation leitet die Endozytose des Rezeptors und schließlich seine Aufnahme in MVBs ein, welche im Folgenden mit Lysosomen fusionieren und so den Abbau von EGF und EGFR induzieren (Le Roy and Wrana 2005; Sorkin and Goh 2008). Kommt es jedoch zur Dissoziation des Liganden vom Rezeptor, geht der in den Endosomen lokalisierte EGFR in den inaktiven Zustand über und wird deubiquitiniert und über einen Recyclingweg zur Plasmamembran transportiert (Madhus and Stang 2009).

Für den Internalisierungsprozess von EGFR wurde sowohl eine Clathrin-vermittelte, als auch eine Clathrin-unabhängige Endozytose postuliert (Le Roy and Wrana 2005; Sorkin and Goh 2008). Eindeutige Hinweise auf eine Clathrin-abhängige Internalisierung stellt die Akkumulation von EGF und aktiviertem EGFR in CCPs sowie die Inhibierung der EGFR-Endozytose durch eine RNAi vermittelte Reduktion von Clathrin-Molekülen in der Zelle dar (Huang, Khvorova et al. 2004; Johannessen, Pedersen et al. 2006). Interessanterweise wurde eine schnelle Internalisierung von EGFR, die vermutlich auf einer Clathrin-vermittelten Endozytose beruht, nur bei physiologischen EGF-Konzentrationen (1-2 ng/ml) beobachtet. Dagegen wurde unter hohen, aber noch physiologisch relevanten EGF-Konzentrationen (20 ng/ml) zusätzlich eine verlangsamte, Clathrin-unabhängige Internalisierung *via* Cholesterolreiche Lipid Rafts identifiziert. Es besteht die Annahme, dass der Clathrin-vermittelte Internalisierungsweg hauptsächlich zu einem Recycling oder „Signalling“ von EGFR beisteuert, während die Clathrin-unabhängige Internalisierung vorwiegend zur Degradation des Rezeptor-Liganden-Komplexes führt (Sigismund, Woelk et al. 2005; Woelk, Sigismund et al. 2007; Sigismund, Argenzio et al. 2008). Im Widerspruch zu dieser Hypothese konnte durch andere Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die EGF-stimulierte Endozytose von EGFR durch einen Clathrin-Knockdown vollständig ausgeschaltet werden kann. Dies lässt auf eine Clathrin-vermittelte Internalisierung als Hauptendozytoseweg von aktiviertem EGFR schließen (Kazazic, Roepstorff et al. 2006; Henriksen, Grandal et al. 2013).

## 1.5.2 Internalisierung von Chlamydien und anderen pathogenen

### Bakterien

Invasive Bakterien haben ein breites Arsenal an Oberflächenstrukturen und sekretierten Molekülen evolviert, um erfolgreich in Wirtszellen einzudringen sowie eine schützende intrazelluläre Nische zu etablieren. Die Komplexität der bakteriellen Adhäsine/Invasine reicht dabei von monomeren Proteinen bis hin zu multimeren Makromolekülen wie z.B. das Typ-3-Sekretionssystem sowie Pili und Fimbrien (Cossart and Sansonetti 2004; Pizarro-Cerda and Cossart 2006). Die initiale Kontaktaufnahme zwischen dem Bakterium und der eukaryotischen Zelle kann dabei unterschiedliche Invasionsprozesse induzieren, welche in „Zipper“ und „Trigger“-Mechanismen eingeteilt werden. Der unter anderem von *Listeria monocytogenes*, *Yersinia pseudotuberculosis* und *Staphylococcus aureus* verwendete „Zipper“-Mechanismus beruht auf der Interaktion eines bakteriellen Liganden mit einem Rezeptor auf der Wirtszelle. Die dadurch ausgelöste Signalkaskade führt zur Aktinpolymerisation und Deformation der Membran, die sich um das eindringende Bakterium stülpt und dieses schließlich umschließt. *Salmonella typhimurium* und *Shigella flexneri* sind Beispiele für Organismen, die einen „Trigger“-Mechanismus benutzen. Dabei führt der Kontakt zwischen Pathogen und Zelle über das Typ-3-Sekretionssystem zu einer Injektion von bakteriellen Effektorproteinen in das Zytoplasma der Wirtszelle. Dies triggert eine massive Reorganisation des Aktinzytoskeletts an der Eintrittsstelle, was die bakterielle Internalisierung ermöglicht (Cossart and Sansonetti 2004; Veiga, Guttman et al. 2007).

Für die bislang noch nicht vollständig aufgeklärte Internalisierung von Chlamydien werden multiple Eintrittsmechanismen sowie die Beteiligung verschiedener Komponenten der zellulären Endozytosemaschinerien postuliert (Hybiske and Stephens 2007). Wie viele andere intrazelluläre pathogene Bakterien nutzen Chlamydien nachweislich das Typ-3-Sekretionssystem um Effektorproteine in die Wirtszelle zu injizieren. Für *C. trachomatis* wurde das sekretierte Protein Tarp als Auslöser zellulärer Aktinrekrutierung am Eintrittsort von EBs identifiziert, das durch Tyrosin-Kinasen der Wirtszelle phosphoryliert wird (Clifton, Fields et al. 2004). Ferner konnte im Rahmen der chlamydialen Adhäsion und Internalisierung eine allgemeine Tyrosin-Phosphorylierung zahlreicher eukaryotischer Proteine am Eintrittsort identifiziert werden, wobei die Kinetik und das Profil der Phosphorylierung vom verwendeten Chlamydien-Stamm abhängen (Krull, Klucken et al. 1999; Krull, Kramp et al. 2004; Krull, Maass et al. 2005; Virok, Nelson et al. 2005). Im Infektionsmodell mit Epithelzellen wurde eine MEK-abhängige Phosphorylierung von ERK1/2, eine Phosphatidylinositol-3-Kinase-abhängige Phosphorylierung von Akt sowie eine Phosphorylierung des Adaptorproteins Shc bereits während der ersten Minuten einer *C. pneumoniae* Invasion in der Wirtszelle beobachtet.

Interessanterweise wurde ebenfalls eine Aktivierung der Tyrosin-Kinase FAK (focal adhesion kinase) dokumentiert, die weitere Effektoren an die Eintrittsstelle der Bakterien rekrutieren könnte (Coombes and Mahony 2002).

Frühere Studien lieferten keine übereinstimmenden Hinweise, ob die Internalisierung von Chlamydien über eine Rezeptor-vermittelte Endozytose in CCPs und/oder über einen Clathrin-unabhängigen Prozess erfolgt (Murray and Ward 1984; Majeed and Kihlstrom 1991; Reynolds and Pearce 1991; Boleti, Benmerah et al. 1999; Hybiske and Stephens 2007). Darüber hinaus wurde eine Beteiligung von Lipid-Rafts an der Bindung und Internalisierung für verschiedene *Chlamydia* Spezies bestätigt (Jutras, Abrami et al. 2003; Stuart, Webley et al. 2003; Subtil, Wyplosz et al. 2004).

## **1.6 Immunantworten während der chlamydialen Infektion und die Entwicklung einer protektiven Immunität**

Eine zentrale Funktion des eukaryotischen Immunsystems ist die Unterscheidung zwischen „zelleigen“ und „zellefremd“. Chlamydiale Antigene werden hauptsächlich über TLR2 (Toll-like receptor 2) Moleküle erkannt, wobei die TLR2 Expression besonders auf der Oberfläche von Neutrophilen für die effektive Kontrolle beispielsweise von chlamydialen Atemwegserkrankungen notwendig ist (Darville, O'Neill et al. 2003; Beckett, Phipps et al. 2012). Unter Zellkulturbedingungen konnte mittels konfokaler Mikroskopie von TLR2-transfizierten und *C. trachomatis* infizierten HEK (human embryonic kidney) Zellen eine Colokalisation von TLR2 mit der Inklusionsmembran identifiziert werden, was auf eine Beteiligung von TLR2 bei der Signaltransduktion während der chlamydialen Infektion hinweist (O'Connell, Ionova et al. 2006). Während rekombinantes GroEL von *C. pneumoniae* als potentieller Stimulator von TLR4 in Makrophagen und vaskulären Endothelzellen postuliert wurde (Bulut, Faure et al. 2002), scheint TLR4 *in vivo* nur eine untergeordnete Rolle bei der Immunerkennung zu spielen (Darville, O'Neill et al. 2003; Beckett, Phipps et al. 2012). Einen weiteren wichtigen Rezeptor bei der Erkennung von Chlamydien stellt das zytosolische und ubiquitär exprimierte NOD1 (Nucleotide oligomerization domain 1) dar, das bakterielle Peptidoglykan-Komponenten wahrnimmt (Welter-Stahl, Ojcius et al. 2006). Generell gesehen führen die TLR und NOD1-vermittelten Signalwege zu einer MAPK-Aktivierung und im Folgenden zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP1 und NF- $\kappa$ B. Diese wiederum initiieren die Expression verschiedener proinflammatorischer Cytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  (Krull, Maass et al. 2005). Des Weiteren werden chlamydiale DNA und Effektoren von multiplen zytosolischen Rezeptoren erkannt und resultieren in einer Aktivierung des

Inflammasoms, einem Multiprotein-Komplex der Wirtszelle mit dem zentralen Enzym Caspase-1 (Abdul-Sater, Koo et al. 2009). Diese Peptidase bewirkt die Sekretion von Interleukin-1 $\beta$  und Interleukin-18 sowie „Pyroptosis“, eine Form von Zelltod ausgelöst durch pathogene Organismen (Franchi, Eigenbrod et al. 2009). Folglich resultiert eine chlamydiale Infektion in einer proinflammatorischen Antwort der Wirtszellen, was bei wiederholter oder chronischer Erkrankung mit Chlamydien zu Gewebeschäden führen kann (Buchholz and Stephens 2006).

Die Ausbildung einer schützenden Immunität gegen eine chlamydiale Infektion beruht auf einer Zell-vermittelten Immunantwort, wobei den CD4<sup>+</sup> TH1-Typ Helferzellen eine vorrangige Funktion zugeschrieben wird (Brunham and Rey-Ladino 2005). Dendritische Zellen initiieren die Immunantwort von T-Zellen, indem sie Antigene des Pathogens in der Peripherie aufnehmen, anschließend zu regionalen Lymphknoten migrieren und dort die prozessierten Antigene auf MHC Klasse II-Molekülen den naiven T-Zellen präsentieren (Steinman and Pope 2002). Daher wurden in neusten Studien nach relevanten T-Zell Antigenen für die Entwicklung eines effektiven Impfstoffs gesucht. Die hierbei identifizierten MHC II Peptide von *C. muridarum* stammen von intra- und extrachlamydialen Proteinen, wobei die Pmp-Proteinfamilie durch die drei Mitglieder PmpG, PmpE und PmpF vertreten war (Karunakaran, Rey-Ladino et al. 2008). Interessantweise induzierten diese T-Zell Antigene eine protektive Immunität gegen eine *C. muridarum* Infektion in Mäusen (Yu, Karunakaran et al. 2012).

Ferner wurde Antikörpern eine fundamentale Rolle in der adaptiven Immunität gegen chlamydiale Infektionen des Genitaltrakts zugeschrieben (Morrison and Morrison 2005; Hafner, Beagley et al. 2008). Auf der Suche nach chlamydialen Antigenen, die eine schützende Immunität auslösen, wurde ein breites Spektrum von bakteriellen Proteinen identifiziert, die in der chlamydialen Membran (z.B. MOMP, OmcB, Pmps) oder in der Inklusionsmembran lokalisieren sind (z.B. IncA) bzw. in das Zytosol der Wirtszelle sekretiert werden (z.B. CPAF) (Wang, Zhang et al. 2010). Für Antikörper gegen chlamydiale Außenmembranproteine wurde in zahlreichen Fällen ein neutralisierender Effekt auf die Chlamydien-Infektion festgestellt, wie z.B. OmcB, PorB, MOMP sowie PmpD von *C. trachomatis* (Fan and Stephens 1997; Kawa and Stephens 2002; Crane, Carlson et al. 2006; Fadel and Eley 2007) bzw. OmcB und Pmp21 von *C. pneumoniae* (Wehrl, Brinkmann et al. 2004; Moelleken and Hegemann 2008; Moelleken, Schmidt et al. 2010). Trotz intensiver Studien ist bislang noch kein schützender Impfstoff gegen genitale und okuläre *C. trachomatis* Infektionen sowie respiratorische *C. pneumoniae* Infektionen entwickelt worden (Christiansen, Pedersen et al. 2000; Eko, Talin et al. 2008; Coler, Bhatia et al. 2009; Schautteet, De Clercq et al. 2011).

## 1.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der Pmps im chlamydialen Adhäsionsprozess aus verschiedenen Perspektiven zu betrachten und so zu einem besseren Verständnis der Interaktion von Chlamydien mit der eukaryotischen Wirtszelle beizutragen. In der Arbeitsgruppe Hegemann wurden die chlamydialen Proteine Pmp6, Pmp20 und Pmp21 als *C. pneumoniae* Adhäsine charakterisiert (Moelleken, Schmidt et al. 2010); jedoch blieb unklar, ob die Pmps der anderen Subtypen von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* ebenfalls als Adhäsine fungieren. Daher sollten repräsentative Kandidaten jedes Pmp-Subtyps von *C. pneumoniae* und alle Pmps von *C. trachomatis* Serovar E auf ihre Bindungsfähigkeit an humane Zellen überprüft werden. In Neutralisationsexperimenten mit rekombinantem Protein sollte dann im Folgenden der Beitrag der Proteine für die chlamydiale Infektion untersucht werden. Die Analyse der Prozessierung und möglichen Oligomerisierung von ausgewählten *C. pneumoniae* Pmps sollte zu einem detaillierteren molekularen Verständnis des Pmp-vermittelten Adhäsionsprozesses beitragen. Jüngst wurde der humane EGFR als zellulärer Rezeptor für Pmp21 mit Hilfe eines Biotin-Pulldown Experiments von Dr. Katja Mölleken identifiziert. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die Interaktion zwischen Pmp21 und dem potentiellen humanen Rezeptor EGFR näher analysiert und eine Beteiligung in der Adhäsion und/oder Internalisierung von *C. pneumoniae* eingehender charakterisieren werden. Darüber hinaus sollten Pmps von *C. pneumoniae* auf eine mögliche differenzielle Expression überprüft werden, was neues Licht auf diese Proteinfamilie in Hinblick auf eine antigene Variation werfen könnte.

## 2 Material

### 2.1 Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsartikel	Hersteller
Chromatographiepapier für Westernblots	VWR
Dialyseschlauch 12-15 kDa Ausschluss	Serva
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad
Falcon (15 ml und 50 ml), steril	Sarstedt
Glasperlen ( $\varnothing \sim 0,5$ mm)	Braun
Glasplättchen für Zellkultur (Deckgläschen $\varnothing$ 12 mm)	Thermo
Kryo-Röhrchen (1,8 ml)	Nunc
Küvetten	Sarstedt
Latexkügelchen ( $\varnothing$ 1,1 $\mu$ m)	Polysciences
Mikro-Schraubröhrchen (2 ml)	Sarstedt
Mini-Zentrifugationssäule (500 $\mu$ l)	Thermo
Multiwell-Objektträger (10 Wells)	Dunn
Objektträger	Diagonal
PCR Reaktionsgefäß (0,5 ml)	Sarstedt
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen (10 $\mu$ l, 200 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l)	Sarstedt
PVDF-Membran für Westernblots	Thermo
Protein-Säulen	Thermo
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (2 ml)	Sarstedt
Zellkulturflaschen (Polystyrol 25 cm <sup>2</sup> /50 ml), steril	Nunc
Zellkulturflaschen (Polystyrol 80 cm <sup>2</sup> /260 ml), steril	Nunc
Zellkulturplatte (24-Well, 96-Well)	Nunc
Zellkultur-Zentrifugationsröhrchen (12 ml)	Greiner
Zellschaber (23 cm), steril	Nunc

## 2.2 Geräte und Maschinen

Gerät/Maschine	Hersteller
Binokular Axiovert 25C	Zeiss
BioPhotometer Plus	Eppendorf
Blotapparatur Fastblot	Biometra
Brutschrank HEPA Class 100	Thermo Electron Corporation
Dounce-Homogenisator	Haeberle
Elektroporationssystem Gene Pulser	Bio-Rad
FACS Aria	BD Biosciences
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 50 +	Zeiss
12 Bit CCD Kamera	Hamamatsu
Geldokumentationssystem	Bio-Rad
Homogenisator precelly s24	bertin Technologies
Inkubator Memmert BE Modell 600	Heraeus
Isopropanol-Einfrierbox	Roth
Magnetrührer	IKA
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Nano-Drop 2000C	Peqlab
PCR-Thermocycler PTC-200	MJ Research
pH-Meter WTW Series pH 720	inoLab
Power Supply/ Netzgerät für Gelsysteme	GE Healthcare
Proteingelsystem SE-260	Hoefer
Schüttler Unitron	Infors
Sicherheitswerkbank Herasafe	Heraeus
Speed-Vac Vacuum-Konzentrator	Savant
Spinning-Disc-Mikroskop Cell observer	Zeiss
Thermoblock	Labnet
Ultraschallstab Sonopuls HD2200	Bandelin
Ultraschallwasserbad RK102H	Bandelin
Ultrazentrifuge Optima Max E, Rotor MLS50	Beckman
Ultrazentrifuge TLA100, Rotor SW40Ti	Beckman
Vibrax VXR basic	IKA
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Zählkammer (Faktor 78.000)	Thoma

Zentrifuge Avanti J-25, Rotoren JLA10.500, JA25-50	Beckman
Zentrifuge Biofuge Pico, Rotor #3324	Heraeus
Zentrifuge Biofuge Primo R, Rotor #7593	Heraeus
Zentrifuge J2-21, Rotoren JA 10, JA 20	Beckman
Zentrifuge Megafuge 1.0R, Rotor #3360	Heraeus
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich

## 2.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)	Serva
Acrylamid (Rodiphorese 35)	Roth
Adenin	Sigma
Agar	BD
Agarose	Biozym
Alanin	AppliChem
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Ammoniumsulfat	Roth
Ampicillin	Sigma
Arginin	Merck
Asparagin	Merck
Asparaginsäure	Merck
Borsäure	AppliChem
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva
Bradford Reagenz	Bio-Rad
Bromphenolblau	Serva
Casein Pepton	BD
Cell Dissociation Solution	Sigma
Complete-Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche
Coomassie Brilliant Blau G250	Merck
Cycloheximid	Sigma
Cystein	AppliChem
D(+)-Galaktose	AppliChem
D(+)-Glukose Monohydrat	Roth

D(+)-Raffinose	Sigma
Desoxynucleosid-5'-Triphosphate (dNTPs)	MBI Fermentas
Dimethylformamid (DMF)	VWR
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	AppliChem
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
DTSSP (3,3'-dithiobis[sulfosuccinimidylpropionate])	Thermo
Essigsäure ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )	VWR
Ethanol (96%) (EtOH)	J. T. Baker
Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)	Roth
Ethylendiamintetraacetat ( $\text{Na}_2$ -EDTA)	AppliChem
EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin	Thermo
EZ-Link Sulfo-NHS SS-Biotin	Thermo
Fötale Kälberserum (FKS)	Sigma
Fungizone (Amphotericin B)	Sigma
Gastrografin	Bayer
Gentamycin	Invitrogen
Glutathion Agarose	Thermo
Glutamin	AppliChem
Glutaminsäure	AppliChem
Glycerin	Roth
Glycin	AppliChem
Guanidin/HCl	Serva
Hank's Salzlösung (HBSS)	Invitrogen
Harnstoff	Sigma
Hefe Nitrogen Basis (YNB)	BD
Hefeextrakt	BD
Heparin	Sigma
Histidin	Sigma
Imidazol	AppliChem
Immersionsöl Immersol 518F	Zeiss
Inositol	Sigma
Isoleucin	Roth
Isopropanol	VWR
Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Thermo

Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Grüssing
Lachssperma-DNA (Carrier-DNA)	Sigma
Leucin	Roth
Lithiumacetat (LiAc)	Roth
Lysin	Sigma
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth
Methanol (MeOH)	J. T. Baker
Methionin	AppliChem
Milchpulver	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Normapur
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	AppliChem
Natriumdodecylsulphat (SDS)	Serva
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Riedel-de Haën
Natriumhydroxid (NaOH)	VWR
NHS-Fluorescein	Thermo
NHS-Sepharose	GE Healthcare
Nicht-essentielle Aminosäuren (MEM)	Invitrogen
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Serva
N-Lauroylsarcosin (Sarkosyl)	Sigma
NP-40	Sigma
Optiprep®	Sigma
Ortho-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid (ONPG)	Serva
Para-Aminobenzoessäure	Fluka
Para-Formaldehyd (PFA)	Fluka
Phenol/Chloroform	Roth
Phenylalanin	Merck
Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)	Sigma
Polyethylenglycol 3350 (PEG)	Sigma
Poly-L-Lysin	Sigma
Protein G Agarose	Thermo
Prolin	AppliChem
Saccharose	Roth
Salzsäure (HCl)	Roth

Serin	AppliChem
Streptavidin Agarose	Thermo
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
Tetrazyklin	Sigma
Threonin	AppliChem
Triethanolamin	Merck
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	VWR
Triton X-100	Sigma
Trizol	Invitrogen
Trypton	BD
Tryptophan	AppliChem
TurboFect	Thermo
Tween 20	AppliChem
Tyrosin	AppliChem
Uracil	Sigma
Valin	AppliChem
Vitaminlösung (MEM)	Biochrom
Vectashield (Anti-fade, mounting fluid)	Vector Laboratories
Xylen-Cyanol FF	Sigma

## 2.4 Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
4 x Sammelpuffer (Protein-Gele)	0,5 M Tris/HCl pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
4 x Trenngelpuffer (Protein-Gele)	1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS
Bead-Kopplungspuffer	0,2 M NaHCO <sub>3</sub> 0,5M NaCl pH 8,6
Blockierungslösung (Westernblot)	3 % (w/v) Milchpulver 0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS
Coomassie-Brillant-Blau-Färbelösung	0,008 % (w/v) CBB-G-250 35 mM HCl in ddH <sub>2</sub> O

Detektionspuffer (Westernblot)	0,1 M Tris/HCl pH 9,5 0,1 M NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub>
DNA-Blaumarker	0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylen-Cyanol FF 15 % Ficoll 10 mM Tris/HCl 10 mM EDTA
Laufpuffer (SDS-PAGE)	0,05 M Tris/HCl pH 8,3 0,2 M Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Lithiumacetat	1 M Lithiumacetat, pH 8,4-8,9
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>
PEG (Polyethylenglykol)	50 % (w/v) PEG
Phospho-Lysis-Puffer	1 % NP-40 1 % Triton X100 20 mM Tris/HCl pH 7,5 140 mM NaCl 2 mM EDTA 1 mM Na <sub>2</sub> VO <sub>4</sub>
Protein-Ladepuffer (4-fach)	50 mM Tris/HCl pH 6,9 2 % SDS 0,1 % Bromphenolblau 5 % Glycerin
Puffer B (Protein-Aufreinigung)	8 M Harnstoff 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Tris/HCl pH 8,0
Puffer C (Protein-Aufreinigung)	8 M Harnstoff 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Tris/HCl pH 6,3

Puffer P1 (Plasmid-Präparation)	50 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0 100 µg/ml RNaseA
Puffer P2 (Plasmid-Präparation)	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
TBE-Puffer	89 mM Tris/HCl 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
TBS (Tris Buffered Saline)	140 mM NaCl 2,5 mM KCl 3,5 mM Tris/HCl, pH 7,4
Transferpuffer (Westernblot)	25 mM Tris 150 mM Glycin 10 % MeOH 0,05 % SDS

## 2.5 Enzyme

### 2.5.1 Restriktionsenzyme

Die Restriktionsenzyme wurden von der Firma Fermentas bezogen. Zur Klonierung von Plasmiden wurden folgende Enzyme verwendet:

*EcoRI, NdeI, NotI, PvuII, SmaI, XbaI, XhoI*

### 2.5.2 Polymerasen

Polymerase	Hersteller
Platinum Pfx DNA-Polymerase	Invitrogen
Taq-Polymerase	Eigene Herstellung (Fr. Volfson)

### 2.5.3 Andere Enzyme

Enzym	Hersteller
α-Mannosidase	Sigma
Lysozym	Sigma
Proteinase K	Roche

RNase A  
Trypsin/EDTA

Qiagen  
Invitrogen

## 2.6 Antikörper

### 2.6.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Reaktivität	Ursprung	Verdünnung	Referenz
Anti-Aktin	humanes Aktin	Maus	Westernblot 1:2000	Sigma
Anti-cMyc	cMyc-Tag	Maus	Westernblot 1:400	Roche
Anti-Cpn0147*	<i>Cpn</i> 0147 Protein	Kaninchen	IF 1:50 Westernblot 1:100	Herbst 2011
Anti-Cpn0809*	<i>Cpn</i> 0809 Protein	Kaninchen	Westernblot 1:50	Herbst 2011
Anti-DnaK	<i>Ctr</i> DnaK heat shock Protein	Maus	IF 1:50 Westernblot 1:500	Birkelund
Anti-EF-Tu*	<i>Cpn</i> EF-Tu	Ziege	IF unverd. Westernblot 1:100	Stahlmann
Anti-EGFR	EGFR C-terminal	Maus	Westernblot 1:300	Santa Cruz
Anti-EGFR	EGFR N-terminal	Maus	IF 1:30	Santa Cruz
Anti-phosphoEGFR	EGFR (Tyr1068)	Maus	IF 1:400	Cell Signaling
Anti-GroEL	<i>Cpn</i> GroEL1 Chaperon	Kaninchen	IF 1:50 Westernblot 1:500	Wuppermann
Anti-GST	GST-Tag	Kaninchen	IF 1:50 Westernblot 1:1000	Santa Cruz
Anti-HA	HA-Tag	Maus	Westernblot 1:80	Roche
Anti-His	6 Histidin-Tag	Maus	Westernblot 1:2500	Roche
Anti-Invasin mAB 3A2	<i>Y. pseudotuberculosis</i> Invasin	Maus	IF 1:20	Dersch
Anti-LPS	chlamydiales LPS	Maus	IF 1:20	USBiological
Anti-MEK-1	humanes MEK-1	Maus	Westernblot 1:200	Santa Cruz
Anti-MOMP	<i>Cpn</i> MOMP	Kaninchen	IF 1:20 Westernblot 1:200	Wuppermann
Anti-MOMP	<i>Cpn</i> MOMP	Maus	IF 1:50	Zhong
Anti-Penta-His	5 Histidin-Tag	Maus	Westernblot 1:2500	Qiagen

Anti-Pmp6*	<i>Cpn</i> Pmp6	Kaninchen	IF 1:20 Westernblot 1:200	Möllerleken
Anti-Pmp20*	<i>Cpn</i> Pmp20	Kaninchen	IF 1:20 Westernblot 1:200	Möllerleken
Anti-M-Pmp21*	<i>Cpn</i> M-Pmp21	Kaninchen	IF 1:20 Westernblot 1:200	Schmidt 2009
Anti-N-Pmp21*	<i>Cpn</i> N-Pmp21	Kaninchen	IF 1:100 Westernblot 1:500	diese Arbeit
Anti-S1	<i>Ctr</i> S1 ribosom. Protein	Maus	IF 1:40 Westernblot 1:500	Birkelund
Anti-V5	V5-Tag	Maus	IF 1:500 Westernblot 1:5000	Invitrogen
Anti-VSV	VSV-Tag	Maus	IF 1:50 Westernblot 1:500	Santa Cruz
Anti-Xpress	Xpress-Tag	Maus	IF 1:500 Westernblot 1:5000	Invitrogen
Pathfinder	chlamydiales LPS	Maus	IF 1:4	BioRad

Mit \* markierte Seren wurde antigengereinigt (Protokoll siehe 3.7.13).

## 2.6.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Referenz
Alexa Fluor 488-Kaninchen	Ziege	IF 1:200	Invitrogen
Alexa Fluor 594-Kaninchen	Ziege	IF 1:200	Invitrogen
Alexa Fluor 488-Maus	Ziege	IF 1:200	Invitrogen
Alexa Fluor 594-Maus	Ziege	IF 1:200	Invitrogen
Alexa Fluor 488-Ziege	Esel	IF 1:200	Invitrogen
Alexa Fluor 594-Ziege	Esel	IF 1:200	Invitrogen
AP-Anti-Human	Ziege	Westernblot 1:7500	Promega
AP-Anti-Kaninchen	Ziege	Westernblot 1:7500	Promega
AP-Anti-Maus	Ziege	Westernblot 1:7500	Promega
AP-Anti-Ziege	Maus	Westernblot 1:500	Santa Cruz
AP-Streptavidin	Kaninchen	Westernblot 1:1000	Sigma
Cy3-Anti-Maus	Kaninchen	IF 1:200	Sigma

## 2.7 Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoff	Verdünnung	Referenz
DAPI	1:1000	Sigma
WGA, Alexa Fluor 594	1:1000	Invitrogen

## 2.8 Kits

Kit	Hersteller
Plasmid Midi Kit	Qiagen
Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit	Thermo
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas

## 2.9 DNA- und Proteingrößenstandards

Größenstandard	Fragmentgrößen	Hersteller
O' GeneRuler™ 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 [bp]	Fermentas
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15, 10 [kDa]	Fermentas
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10 [kDa]	Fermentas

## 2.10 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma Genosys synthetisiert, lyophilisiert geliefert und durch Lösen in entsprechenden Volumina an ddH<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 50 pmol/μl eingestellt. Die folgenden Nummern der Oligonukleotide beziehen sich auf die laborinterne Sammlung.

### 2.10.1 Oligonukleotide zur Klonierung

Nr.	Name	Sequenz (5' →3')
C-1102	pGADT7-His6-s	GGGCATCGATACGGGATCCATCGAGCTCGAGCT GCAGATCACCATCACCATCACCATGAA

C-1103	pGADT7-His6-as	GTTGAAGTGAACCTGCGGGGTTTTCAGTATCTA CGATTCATGGTGATGGTGATGGTGATC
C-1104	pGBKT7-VSV-s	CATGGAGGCCGAATTCCTGGGGATCCGTGACC TGCAGCGTACACCGATATCGAGATGAACAGGCT GGGAAAGGCC
C-1105	pGBKT7-VSV-as	AGACCCGTTTAGAGGCCCAAGGGGTTATGCTA GTTATGCGGCCTTCCCAGCCTGTTTCATCTCGATA TCGGTGTA
C-1106	Pmp21-N pEB1 s	ATTACGCTCATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATT CCACGCACATTCCTTACACAGCTC
C-1107	Pmp21-N pEB1 as	TGCAGCTCGAGCTCGATGGATCCCGTATCGATGC CCACCCGTTTAGGAGGATAATGATCT
C-1108	Pmp21-N pEB2 s	CAGAGGAGGACCTGCATATGGCCATGGAGGCCG AATTCGCACATTCCTTACACAGCTC
C-1110	Pmp21-M pEB1 s	ATTACGCTCATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATT CCACGTAGAAGAGGAAGTGCCACC
C-1111	Pmp21-M pEB1 as	TGCAGCTCGAGCTCGATGGATCCCGTATCGATGC CCACCCCATGTTAATTTGAACTCCGGCA
C-1112	Pmp21-M pEB2 s	CAGAGGAGGACCTGCATATGGCCATGGAGGCCG AATTCGTAGAAGAGGAAGTGCCACC
C-1162	ADPN2 for	ATTACGCTCATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATT CCACGTTCTTCCCTACTGGCCAGAT
C-1163	ADPN2 rev	TGCAGCTCGAGCTCGATGGATCCCGTATCGATGC CCACCCGGCTGGGGCGGAGCGACAGT
C-1164	BCAT2 for	ATTACGCTCATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATT CCACCCCGACCACCAGCTCACC
C-1165	BCAT2 rev	TGCAGCTCGAGCTCGATGGATCCCGTATCGATGC CCACCCGGCACCAGGAACATCCACTCG
C-1166	ELF2 for	ATTACGCTCATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATT CCACGTCATAGATGATGACAAAAGT
C-1167	ELF2 rev	TGCAGCTCGAGCTCGATGGATCCCGTATCGATGC CCACCCGGCACTGTCTTATTCCATCTGC
C-1168	KIAA2026 for	ATTACGCTCATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATT CCACCTTCTCCAAGGAAGAAGGC

C-1169	KIAA2026 rev	TGCAGCTCGAGCTCGATGGATCCC GTATCGATGC CCACCCGGCCACCTCGTGTCTAACA
C-1170	CCDC68 for	ATTACGCTCATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATT CCACCAGATCTCTCATCTGCAGTT
C-1171	CCDC68 rev	TGCAGCTCGAGCTCGATGGATCCC GTATCGATGC CCACCCGGTTTCCGTAACCTAATCAACAT
C-1172	GGA1 for	ATTACGCTCATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATT CCACTCGTCGGATGCCACTGAGC
C-1173	GGA1 rev	TGCAGCTCGAGCTCGATGGATCCC GTATCGATGC CCACCCGGCAGCTTCACCTTCATAACCTT
C-1183	pYD1-Pmp2-s	TACGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGT GTGGTGGAAATGAAGATTCCACTCCGCTT
C-1184	pYD1-Pmp2-as	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGAC TCGAGCTTCGCCCAAGAAACCGTAG
C-1185	pYD1-Pmp6-s	TACGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGT GTGGTGGAAATGAAATATTCITTTACCTTGGC
C-1186	pYD1-Pmp6-as	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGAC TCGAGCGCTTGCCATTCGCGACC
C-1187	pYD1-Pmp14-s	TACGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGT GTGGTGGAAATGCCTCTTTCTTTCAAATCTT
C-1188	pYD1-Pmp14-as	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGAC TCGAGTGAATTCATACAGCATAGAG
C-1189	pYD1-Pmp16-s	TACGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGT GTGGTGGAAATGTTTCGGGATGACTCCTGC
C-1190	pYD1-Pmp16-as	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGAC TCGAGGGGAGTCCAATTTGGCATAACA
C-1191	pYD1-Pmp19-s	TACGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGT GTGGTGGAAATGAAGCAGATGCGTCTTTGG
C-1192	pYD1-Pmp19-as	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGAC TCGAGAGGAGTCCAAGAGGCTATAAT
C-1193	pYD1-Pmp20-s	TACGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGT GTGGTGGAAATGAAGTGGCTACCAGCTAC
C-1194	pYD1-Pmp20	TAGTGCTAGAATCGACAGTAA

C-1195	pYD1-Pmp20-as	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGAC TCGAGAAAGGTCCATTTTAGAATAATTT
C-1196	pYD1-Pmp20 for	GAAGCAACTACAGCAGCAAC
C-1228	pYD1-Pmp10-s	TACGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGT GTGGTGGAAATGAAATCGCAATTTTCCTGG
C-1229	pYD1-Pmp10-as	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGAC TCGAGGGAAGCCAGTGTAAGCTTCT
C-1297	Pmp21-M pEB1 as neu	TGCAGCTCGAGCTCGATGGATCCCCTATCGATGC CCACCCATGTTAATTTGAACTCCGGCA
C-1298	Pmp21-M pEB2 as neu	CATCTCGATATCGGTGTACGCTGCAGGTCGACG GATCCCCATGTTAATTTGAACTCCGGCA
C-1352	pKM32-Pmp2-s	CCATCACCATCACCATACGGATCCGCATGCGAGC TCGGTATCAACAACAAGCTTTTCTAGTA
C-1353	pKM32-Pmp2-as	CAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTGGCTG CAGGTCCCTTCGCCCAAGAAACCGTAG
C-1354	pKM32-Pmp14-s	CCATCACCATCACCATACGGATCCGCATGCGAGC TCGGTAGAGATCTTACTCACTTCAGAT
C-1355	pKM32-Pmp14-as	CAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTGGCTG CAGGTCTGAATTCCATACAGCATAGAG
C-1356	pKM32-Pmp16-s	CCATCACCATCACCATACGGATCCGCATGCGAGC TCGGTACGTACGAGCTTTCCTCTCTT
C-1357	pKM32-Pmp16-as	CAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTGGCTG CAGGTCTGGGAGTCCAATTGGCATAACA
C-1358	pKM32-Pmp19-s	CCATCACCATCACCATACGGATCCGCATGCGAGC TCGGTAGGGATTCATCTCTGGAGAAGAC
C-1359	pKM32-Pmp19-as	CAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTGGCTG CAGGTCTCAGGAGTCCAAGAGGCTATAAT
C-1360	pKM32-Pmp10-s	CCATCACCATCACCATACGGATCCGCATGCGAGC TCGGTAGATAGCTTTGACGGAAGTACT
C-1361	pKM32-Pmp10-as	CAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTGGCTG CAGGTCTGGAAGCCAGTGTAAGCTTCT
C-1537	pEB1-EGFR-s	ATTACGCTCATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATT CCACATGCGACCCTCCGGGACGG

C-1538	pEB1-EGFR-as	TGCAGCTCGAGCTCGATGGATCCCCTATCGATGC CCACCCGGGATGTGGCGCCTTC
C-1539	pEB2-EGF-s	CAGAGGAGGACCTGCATATGGCCATGGAGGCCG AATTCAATAGTGACTCTGAATGTCCC
C-1540	pEB2-EGF-as	CATCTCGATATCGGTGTACGCTGCAGGTCGACG GATGCGCAGTTCCCACCACTTC
C-1611	EGFR-LBD-as	TGAAGGAGTCACCCCTAAAT
C-1612	EGFR-LBD-Dim-s	ATTTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCTC TGGATCTTGCAGTCGTCAGCCTGAACATAACATC C
C-1613	EGFR-LBD-Dim- as	GTAATCCCAAGGATGTTATGTTTCAGGCTGACGAC TGCAAGATCCAGAGGAGGAGTATGTGTGAAGGA GTC
C-1614	EGFR-LBD-s	CATAACATCCTTGGGATTAC
C-1751	pKM32-pmpG-s	CCATCACCATCACCATACGGATCCGCATGCGAGC TCGGTAGCAGAAATCATGATTCCTCA
C-1752	pKM32-pmpG-as	CAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTGGCTG CAGGTCATCCACACTTGCTTGAATTG
C-1785	pEB1-EGFR- ohneLBD1-s	ATTACGCTCATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATT CCACAGCAGTGACTTTCTCAGCAAC
C-1881	pKM32-pmpD-s	CCATCACCATCACCATACGGATCCGCATGCGAGC TCGGTATCTTTTGAAGGAAACAGCGC
C-1882	pKM32-pmpD-as	GGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTGGCTGCA GGTCAGAAATTTCCTTTAAAAACAATA
C-1932	pYD1-PmpA-s	CGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGTGT GGTGGAAAGGATCTGAAAGCACAGGAGG
C-1933	pYD1-PmpA-as	TAGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGA CTCGAGGGTGAGCAAGATTTCCATTT
C-1934	pYD1-PmpB-s	CGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGTGT GGTGGAAAGAAGGCGGTGCTATCTTCTC
C-1935	pYD1-PmpB-as	TAGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGA CTCGAGAGGTGCTGAAGCTGTTGTTG
C-1936	pYD1-PmpC-s	CGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGTGT GGTGGAAAACGGAGGAGCTATTTATGG

C-1937	pYD1-PmpC-as	TAGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGA CTCGAGGACACTCTCGTCAGTTATT
C-1938	pYD1-PmpD-s	CGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGTGT GGTGGAAATCTTTTGAAGGAAACAGCGC
C-1939	pYD1-PmpD-as	TAGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGA CTCGAGAGAATTTCCCTTTAAAAACAA
C-1940	pYD1-PmpE-s	CGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGTGT GGTGGAAAGATACACAAAAAGAAGGTAT
C-1941	pYD1-PmpE-as	TAGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGA CTCGAGTCTCCTAGGAGGATTAGTAC
C-1942	pYD1-PmpF-s	CGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGTGT GGTGGAACTCTTCTGCAACAACACTACTG
C-1943	pYD1-PmpF-as	TAGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGA CTCGAGCGGATTTTGGGTAAACGGGA
C-1944	pYD1-PmpG-s	CGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGTGT GGTGGAAAGAAATCATGGTTCCTCAAGG
C-1945	pYD1-PmpG-as	TAGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGA CTCGAGATCCACACTTGCTTGAATTG
C-1946	pYD1-PmpH-s	CGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGTGT GGTGGAAATGTTCTCGAAAAATGTTTC
C-1947	pYD1-PmpH-as	TAGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGA CTCGAGGCTGCGCTCICCAGGACGAT
C-1948	pYD1-PmpI-s	CGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGTGT GGTGGAAAGTTTCTGTGCGAAATCATGC
C-1949	pYD1-PmpI-as	TAGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGA CTCGAGGAGAGGAATATTGTTTTGCT
C-2035	pKM32-PmpA-s	CCATCACCATCACCATACGGATCCGCATGCGAGC TCGGTAGGATCTGAAAGCACAGGAGG
C-2036	pKM32-PmpA-as	CAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTGGCTG CAGGTTCGGTGAGCAAGATTTCCATTT
C-2037	pKM32-PmpB-s	CCATCACCATCACCATACGGATCCGCATGCGAGC TCGGTAGAAGGCCGGTGCTATCTTCTC
C-2038	pKM32-PmpB-rev	GCCTTTAGCATAGATAGCTC
C-2039	pKM32-PmpB-for	GAGCTATCTATGCTAAAGGC

C-2040	pKM32-PmpB-as	CAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTGGCTG CAGGTCAGGTGCTGAAGCTGTTGTTG
C-2041	pKM32-PmpC-s	CCATCACCATCACCATACGGATCCGCATGCGAGC TCGGTAAACGGAGGAGCTATTTATGG
C-2042	pKM32-PmpC-as	CAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTGGCTG CAGGTCGACACTCTCGTCAGTTATTT
C-2043	pKM32-PmpE-s	CCATCACCATCACCATACGGATCCGCATGCGAGC TCGGTAGATACACAAAAAGAAGGTAT
C-2044	pKM32-PmpE-as	CAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTGGCTG CAGGTCTCTCCTAGGAGGATTAGTAC
C-2045	pKM32-PmpF-s	CCATCACCATCACCATACGGATCCGCATGCGAGC TCGGTACTCTTCTGCAACAACACTACTG
C-2046	pKM32-PmpF-as	CAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTGGCTG CAGGTCCGGATT*TTGGGTAAACGGGA
C-2047	pKM32-PmpH-s	CCATCACCATCACCATACGGATCCGCATGCGAGC TCGGTAATGT*TTCTCGAAAAATGTTTC
C-2048	pKM32-PmpH-as	CAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTGGCTG CAGGTGCTGCGCTCTCCAGGACGAT
C-2049	pKM32-PmpI-s	CCATCACCATCACCATACGGATCCGCATGCGAGC TCGGTAAGTT*TTCTGTCGAAATCATGC
C-2050	pKM32-PmpI-as	CAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTGGCTG CAGGTGAGAGGAATAT*TGTTTTGCT
C-2277	pKM53-pmpD-s	CCATCACCATCACCATACGGATCCGCATGCGAGC TCGGTATCTTT*TGAAGGAAACAGCGC
C-2278	pKM53-pmpD-as	ACTTTCCAGCCTGTTTCATCTCGATATCGGTGTAC CCGGGAGAATTTCCCTTTAAAAACAA

### 2.10.2 Oligonukleotide zur Sequenzierung

Nr.	Name	Sequenz (5' → 3')
C-192	Aga2-Seq2	ATGCAAGGAGTTTTTGAATAT
C-203	Aga2-Seq3new	AGATCAGCGGGTTTAAACTC
C-795	seq pKM32 tim hin	TTTCGTCTT*CACCTCGAGAAA
C-796	Seq pKM32 tim her	GGTCATTACTGGATCTATCAA
C-1114	Seq pEB1 s	GACTCACTATAGGGCGAGCG

C-1115	Seq pEB1 as	CAGTATCTACGATTCATGGTG
C-1116	Seq pEB2 s	CTCACTATAGGGCGAGCCGC
C-1117	Seq pEB2 as	GTTATGCTAGTTATGCGGCC
C-1197	Pmp2-Seq	GAATTTAAGCCTATTGGATAA
C-1198	Pmp14-Seq	CTCCCGCAATCACTACAGTA
C-1199	Pmp16-Seq	GATTTCTCAAAATCAAGGGAC
C-1257	Pmp19-Seq1	CATTAGCTATGGACCTGGAG
C-1337	EGFR SeqFor2	CCCACTCATGCTCTACAACC
C-1753	pKM32-pmpG-seq	CAGAAGATCCAGTAGTAAGT
C-1883	pKM32-pmpD-seq	ATTTGGTGAAAATATTTCTC
C-2039	pKM32-PmpB-for	GAGCTATCTATGCTAAAGGC

## 2.11 Plasmide

Die folgenden Nummern der Plasmide beziehen sich auf die laborinterne Sammlung.

Nr.	Name	Konstruktion, Referenz
# 1301	pGBKT7	Clontech, 2-Hybrid-System
# 1302	pGBKT7-53	Clontech, 2-Hybrid-System
# 1675	pGADT7	Clontech, 2-Hybrid-System
# 1676	pGADT7-T	Clontech, 2-Hybrid-System
# 1677	pGBKT7-Lam	Clontech, 2-Hybrid-System
# 2027	pSK2	pEB1 mit Integrin- $\beta$ 1 ohne Transmembrandomäne (Kobus)
# 2028	pSK3	pEB1 mit LDL-Rezeptor ohne Transmembrandomäne (Kobus)
# 1104	pYD1	Invitrogen, Hefe-Display-System
# 1139	pEG1	pYD1 mit Pmp21-Fragment von GiD <i>Cpn</i> (Schmidt)
# 1941	pKM32	pQE-31 geschnitten mit <i>Xba</i> I/ <i>Pvu</i> II, Integration von CEN6 ARS URA3 von pAC2 generiert mit den Oligonukleotiden C-613/C-614, Expressionsvektor mit N-term. His6-Tag (Möller)
# 1612	pFT8	Expressionsvektor mit N-term. GST- und C-term. His6-Tag (Fechtner)
# 1740	pKM50	pKM32 mit Inv497 aus <i>Y. pseudotuberculosis</i> (Möller)

# 1888	pKM48	pKM32 geschnitten mit <i>SmaI</i> , Integration eines Pmp20-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1087/C-1088 auf GiD <i>Cpn</i> DNA (Mölleken)
# 1889	pKM49	pKM32 geschnitten mit <i>SmaI</i> , Integration eines Pmp6-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1089/C-1090 auf GiD <i>Cpn</i> DNA (Mölleken)
# 1341	pEG27	pKM32 geschnitten mit <i>SmaI</i> , Integration eines M-Pmp21-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-641/C-640 auf GiD <i>Cpn</i> DNA (Schmidt)
# 1884	pKM44	pKM32 geschnitten mit <i>SmaI</i> , Integration eines N-Pmp21-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-639/C-642 auf GiD <i>Cpn</i> DNA (Mölleken)
# 1892	pKM53	pKM32 geschnitten mit <i>SmaI</i> , Integration von VSV Primer Dimer generiert mit den Oligonukleotiden C-723/C-724 (Mölleken)
# 1896	pKM56	pKM53 geschnitten mit <i>SmaI</i> , Integration von M-Pmp21 generiert mit den Oligonukleotiden C-1335/C-1336 auf GiD <i>Cpn</i> DNA (Mölleken)
# 1662	pEB1	pGADT7 geschnitten mit <i>XhoI</i> , Integration eines His6-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1102/C-1103
# 1663	pEB2	pGBKT7 geschnitten mit <i>EcoRI</i> , Integration eines VSV-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1104/C-1105
# 1669	pEB3	pEB1 geschnitten mit <i>NdeI</i> , Integration eines N-Pmp21-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1106/C-1107
# 1670	pEB4	pEB1 geschnitten mit <i>NdeI</i> , Integration eines M-Pmp21-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1108/C-1297
# 1671	pEB5	pEB2 geschnitten mit <i>SmaI</i> , Integration eines N-Pmp21-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1110/C-1111
# 1672	pEB6	pEB2 geschnitten mit <i>SmaI</i> , Integration eines M-Pmp21-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1112/C-1298
# 1698	pEB7	pEB1 geschnitten mit <i>NdeI</i> , Integration eines ADNP2-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1162/C-1163
# 1699	pEB8	pEB1 geschnitten mit <i>NdeI</i> , Integration eines BCAT2-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1164/C-1165

# 1700	pEB9	pEB1 geschnitten mit <i>NdeI</i> , Integration eines ELF2-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1166/C-1167
# 1701	pEB10	pEB1 geschnitten mit <i>NdeI</i> , Integration eines KIAA2026-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1168/C-1169
# 1702	pEB11	pEB1 geschnitten mit <i>NdeI</i> , Integration eines CCDC68-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1170/C-1171
# 1703	pEB12	pEB1 geschnitten mit <i>NdeI</i> , Integration eines GGA1-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1172/C-1173
# 1704	pEB13	pYD1 geschnitten mit <i>NoAI/EcoRI</i> , Integration eines Pmp2-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1183/C-1184
# 1705	pEB14	pYD1 geschnitten mit <i>NoAI/EcoRI</i> , Integration eines Pmp6-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1185/C-1186
# 1706	pEB15	pYD1 geschnitten mit <i>NoAI/EcoRI</i> , Integration eines Pmp14-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1187/C-1188
# 1707	pEB16	pYD1 geschnitten mit <i>NoAI/EcoRI</i> , Integration eines Pmp16-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1189/C-1190
# 1708	pEB17	pYD1 geschnitten mit <i>NoAI/EcoRI</i> , Integration eines Pmp19-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1191/C-1192
# 1709	pEB18	pYD1 geschnitten mit <i>NoAI/EcoRI</i> , Integration eines Pmp20-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1193/C-1194 und C-1195/C-1196
# 1710	pEB19	pYD1 geschnitten mit <i>NoAI/EcoRI</i> , Integration eines Pmp10-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1228/C-1229
# 1761	pEB20	pKM32 geschnitten mit <i>SmaI</i> , Integration eines Pmp2-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1352/C-1353
# 1762	pEB21	pKM32 geschnitten mit <i>SmaI</i> , Integration eines Pmp14-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1354/C-1355
# 1763	pEB22	pKM32 geschnitten mit <i>SmaI</i> , Integration eines Pmp16-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1356/C-1357
# 1764	pEB23	pKM32 geschnitten mit <i>SmaI</i> , Integration eines Pmp19-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1358/C-1359
# 1765	pEB24	pKM32 geschnitten mit <i>SmaI</i> , Integration eines Pmp10-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1360/C-1361

# 1995	pEB35	pEB1 geschnitten mit <i>NdeI</i> , Integration eines EGFR-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1537/C-1538
# 1996	pEB36	pEB2 geschnitten mit <i>SmaI</i> , Integration eines EGF-Fragments generiert mit den Oligonukleotiden C-1539/C-1540
# 1997	pEB37	pEB1 geschnitten mit <i>NdeI</i> , Integration eines EGFR-Fragments (ohne Liganden-Bindedomäne 2) generiert mit den Oligonukleotiden C-1537/C-1611, C-1612/C-1613 und C-1614/C-1538
# 1998	pEB39	pKM32 geschnitten mit <i>SmaI</i> , Integration eines PmpG-Fragments ( <i>Ctr</i> serovar E) generiert mit den Oligonukleotiden C-1751/C-1752
# 2002	pEB43	pEB1 geschnitten mit <i>NdeI</i> , Integration eines EGFR-Fragments (ohne Liganden-Bindedomäne 1) generiert mit den Oligonukleotiden C-1785/C-1538
# 2003	pEB44	pKM32 geschnitten mit <i>SmaI</i> , Integration eines PmpD-Fragments ( <i>Ctr</i> serovar E) generiert mit den Oligonukleotiden C-1881/C-1882
# 2160	pEB51	pYD1 geschnitten mit <i>NoAI/EcoRI</i> , Integration eines PmpA-Fragments ( <i>Ctr</i> serovar E) generiert mit den Oligonukleotiden C-1932/C-1933
# 2161	pEB52	pYD1 geschnitten mit <i>NoAI/EcoRI</i> , Integration eines PmpB-Fragments ( <i>Ctr</i> serovar E) generiert mit den Oligonukleotiden C-1934/C-1935
# 2162	pEB53	pYD1 geschnitten mit <i>NoAI/EcoRI</i> , Integration eines PmpC-Fragments ( <i>Ctr</i> serovar E) generiert mit den Oligonukleotiden C-1936/C-1937
# 2163	pEB54	pYD1 geschnitten mit <i>NoAI/EcoRI</i> , Integration eines PmpD-Fragments ( <i>Ctr</i> serovar E) generiert mit den Oligonukleotiden C-1938/C-1939
# 2164	pEB55	pYD1 geschnitten mit <i>NoAI/EcoRI</i> , Integration eines PmpE-Fragments ( <i>Ctr</i> serovar E) generiert mit den Oligonukleotiden C-1940/C-1941
# 2165	pEB56	pYD1 geschnitten mit <i>NoAI/EcoRI</i> , Integration eines PmpF-Fragments ( <i>Ctr</i> serovar E) generiert mit den Oligonukleotiden C-1942/C-1943

# 2166	pEB57	pYD1 geschnitten mit <i>NoAI/EcoRI</i> , Integration eines PmpG-Fragments ( <i>Ctr</i> serovar E) generiert mit den Oligonukleotiden C-1944/C-1945
# 2167	pEB58	pYD1 geschnitten mit <i>NoAI/EcoRI</i> , Integration eines PmpH-Fragments ( <i>Ctr</i> serovar E) generiert mit den Oligonukleotiden C-1946/C-1947
# 2168	pEB59	pYD1 geschnitten mit <i>NoAI/EcoRI</i> , Integration eines PmpI-Fragments ( <i>Ctr</i> serovar E) generiert mit den Oligonukleotiden C-1948/C-1949
# 2175	pEB66	pKM32 geschnitten mit <i>SmaI</i> , Integration eines PmpA-Fragments ( <i>Ctr</i> serovar E) generiert mit den Oligonukleotiden C-2035/C-2036
# 2176	pEB67	pKM32 geschnitten mit <i>SmaI</i> , Integration eines PmpB-Fragments ( <i>Ctr</i> serovar E) generiert mit den Oligonukleotiden C-2037/C-2038/C-2039/C-2040
# 2177	pEB68	pKM32 geschnitten mit <i>SmaI</i> , Integration eines PmpC-Fragments ( <i>Ctr</i> serovar E) generiert mit den Oligonukleotiden C-2041/C-2042
# 2178	pEB69	pKM32 geschnitten mit <i>SmaI</i> , Integration eines PmpE-Fragments ( <i>Ctr</i> serovar E) generiert mit den Oligonukleotiden C-2043/C-2044
# 2179	pEB70	pKM32 geschnitten mit <i>SmaI</i> , Integration eines PmpF-Fragments ( <i>Ctr</i> serovar E) generiert mit den Oligonukleotiden C-2045/C-2046
# 2180	pEB71	pKM32 geschnitten mit <i>SmaI</i> , Integration eines PmpH-Fragments ( <i>Ctr</i> serovar E) generiert mit den Oligonukleotiden C-2047/C-2048
# 2181	pEB72	pKM32 geschnitten mit <i>SmaI</i> , Integration eines PmpI-Fragments ( <i>Ctr</i> serovar E) generiert mit den Oligonukleotiden C-2049/C-2050
# 2183	pEB74	pKM53 geschnitten mit <i>SmaI</i> , Integration eines PmpD-Fragments ( <i>Ctr</i> serovar E) generiert mit den Oligonukleotiden C-2277/C-2278

## 2.12 Zellen und Zelllinien

### 2.12.1 Eukaryotische Zellen und Zelllinien

#### Adhärenzte Zellkulturlinien

**CHO K1:** Hamsterzelllinie, Wildtypkontrollstamm zu den anderen CHOZelllinien (ATCC Nr.: CCL-61)

- HEp-2:** epitheliale Larynxkarzinom-Zelllinie menschlichen Ursprungs, HeLa-Morphologie, 46 Chromosomen  
(ATCC Nr.: CCL-23)
- HeLa:** epitheliale Zervixkarzinom-Zelllinie menschlichen Ursprungs  
(ATCC Nr.: CCL-2.1)
- HUVEC:** endotheliale Nabelschnurvenen-Zelllinie menschlichen Ursprungs  
(Prof. Dr. B. Homey)

### *Saccharomyces cerevisiae*

- 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*  
*URA3::MEL1<sub>UAS</sub> - MEL1<sub>TATA</sub> - LacZ MEL1*  
(Clontech)
- 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)
- YKM2:** *MAT<sub>a</sub> ura 3-52 trp1 leu2Δ1::pCM149(LEU2) his3Δ200 pep4:HIS3::loxP-*  
*KanMx-loxP-Met25p-GFP prb1Δ.6Rcan1 tetO<sub>7</sub> AGA1::pIU211(UR43)*

## 2.12.2 Prokaryotische Zellen und Zelllinien

### *Chlamydia pneumoniae*

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

### *Chlamydia trachomatis*

- Serovar E:** DK-20 (Institute of Ophthalmology, London)

### *Escherichia coli*

- XL<sub>1</sub>-blue:** *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac-[F<sup>c</sup> proAB lac<sup>P</sup> ZΔM15*  
*Tn10(Tet<sup>r</sup>)]*  
(Stratagene)

## 2.13 Medien und Medienzusätze

### 2.13.1 Zellkulturmedien und Medienzusätze

Minimal Essential Medium DMEM GlutaMAX™ +Glukose +Pyruvat (Invitrogen)

Endothelial Cell Medium (Lonza)

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

Fötale Kälberserum (FKS), dialysiert

Fungizone (Amphotericin B)

Gentamycin

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

Vitaminlösung (MEM) Endkonzentration (100 x)

### 2.13.2 Medien für *Saccharomyces cerevisiae*

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

20	g	Glukose
10	g	Hefeextrakt
20	g	Casein Hydrolysat (Pepton)
13,5	g	Agar (nur bei Festmedium)
2	ml	Adeninstocklsg. (2 mg/ml)
4	ml	Tryptophanstocklsg. (5 mg/ml)

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

#### SD-Minimalmedium (Festmedium):

20	g	Glukose
20	g	Agar
1,7	g	Hefe Nitrogen Base
5	g	Ammoniumsulfat
2	g	Aminosäuremix

#### SD-Minimalmedium (flüssig):

1,7	g	Hefe Nitrogen Base
5	g	Ammoniumsulfat
2	g	Aminosäuremix

Für Agarplatten die Komponenten in 1 l dd H<sub>2</sub>O lösen und vor dem Autoklavieren mit 1 M NaOH auf pH 6 einstellen. Zur Selektion wird die entsprechende Aminosäure oder Nukleobase nicht mit in den Aminosäure-Mix gegeben. Für das Flüssigmedium wird die Kohlenstoffquelle als 20 %ige Stocklösung separat autoklaviert und dem Medium nachträglich zugefügt.

**Aminosäuremix +24:**

Der Aminosäure-Mix ist 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.

Aminosäure	Menge	Aminosäure	Menge
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

**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 1 l dd H<sub>2</sub>O lösen, autoklavieren und bei ca. 50 °C Zugabe von 50 mg/l Ampicillin oder Kanamycin 10 mg/l (flüssig) bzw. 15 mg/l (fest).

## 3 Methoden

### 3.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen in der Zellkultur

#### 3.1.1 Herstellung des Zellkulturmediums

Für die Kultivierung von HEP-2, HeLa und CHO K1 Zellen wurden 500 ml Minimal Essential Medium (DMEM Glutamax + HEPES (25 mM) + Earle's salts) um folgende Zusätzen erweitert (DMEM+5):

50 ml FKS (hitzeinaktiviert für 1 h bei 56 °C)	Endkonzentration: 10 %
5 ml MEM nicht essentielle Aminosäuren (100 x)	Endkonzentration: 1 x
5 ml MEM Vitamine (100x)	Endkonzentration: 1 x
0,5 ml Gentamycin (50 mg/ml)	Endkonzentration: 50 µg/ml
5 ml Amphotericin B (250 mg/ml)	Endkonzentration: 2,5 µg/ml

#### 3.1.2 Passagieren adhärenter Zellen durch Trypsinbehandlung

- Aus einer konfluent mit adhärenter Zellen bewachsenen Zellkulturflasche (80 cm<sup>2</sup>) wird das Zellkulturmedium abgesaugt.
- Der Zellrasen wird einmal mit 10 ml Hank's-Lösung (HBSS) vorsichtig gewaschen.
- Die Zellen werden mit 5 ml Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung überschichtet und bis zum Ablösen bei RT inkubiert, was durch leichtes Schwenken der Flasche gefördert wird.
- Es werden 5 ml Zellkulturmedium hinzupipettiert und die Suspension vorsichtig gemischt.
- Die Suspension wird in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 43 x g (500 Upm / Rotanta 460R) zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen und das Sediment in 5 ml Zellkulturmedium vorsichtig resuspendiert.
- Zur Passage in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen werden 0,5 ml der Zellsuspension in 5 ml Medium pipettiert und die Zellen für 2 Tage bis zum Erreichen eines konfluenten Zellrasens bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> inkubiert.
- Zur Passage in 80 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen wird 1 ml Zellsuspension in 15 ml Medium gegeben und die Zellen für 2 Tage inkubiert.
- Zur Passage in 24-Well Platten wird jeweils ein steriles Glasplättchen in jedes Well gelegt. Je nach Bedarf werden die Zellen im Verhältnis 1:10 bis 1:30 mit

Zellkulturmedium verdünnt. Aus dieser Lösung wird jeweils 1 ml in jedes Well pipettiert. Die Inkubation der Zellen erfolgt für 1-2 Tage bis die gewünschte Zelldichte erreicht ist.

### 3.1.3 Einfrieren eukaryotischer Zellen

- Aus einer konfluent mit adhärennten Zellen bewachsenen Zellkulturflasche (80 cm<sup>2</sup>) wird das Zellkulturmedium abgesaugt.
- Der Zellrasen wird einmal mit 10 ml Hank's-Lösung (HBSS) vorsichtig gewaschen.
- Die Zellen werden mit 5 ml Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung überschichtet und bis zum Ablösen bei RT inkubiert, was durch leichtes Schwenken der Flasche gefördert wird.
- Es werden 5 ml Zellkulturmedium hinzupipettiert und die Suspension vorsichtig gemischt.
- Die Suspension wird in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 43 x g (500 Upm / Rotanta 460R) zentrifugiert.
- Das Sediment wird in 1 ml Einfriermedium (90 % FKS, 10 % DMSO) resuspendiert und die Suspension in ein Kryo-Röhrchen überführt.
- Die Zellen werden schonend in einer Isopropanol-Einfrierbox bei -70 °C eingefroren.

### 3.1.4 Bestimmung der Zellzahl

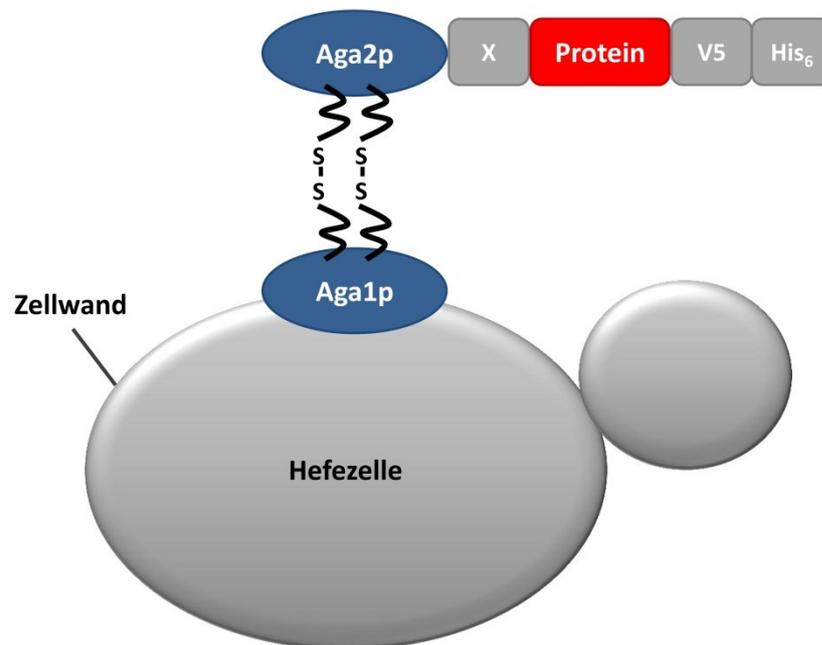
- Die Zellen werden mittels Trypsinbehandlung aus den Zellkulturflaschen abgelöst, bei 43 x g für 10 min sedimentiert und anschließend in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert.
- 10 µl dieser Suspension werden in eine Neubauer-Zählkammer eingefüllt.
- Die Zellzahl wird bestimmt und mittels des Zählkammer-spezifischen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

## 3.2 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

### 3.2.1 Hefe-Oberflächen-Präsentationssystem

Bei dem Hefe-Oberflächen-Präsentationssystem wird der  $\alpha$ -Agglutininrezeptor von *S. cerevisiae* als Präsentationsmolekül von Fusionsproteinen an der Oberfläche von Hefezellen genutzt

(Boder and Wittrup 1997). Dieser interagiert bei der Hefe-Paarung mit dem  $\alpha$ -Agglutininrezeptor und leitet somit die Zell-Zell Adhäsion der  $a$  und  $\alpha$  haploiden Zelle ein, was schließlich in der Fusion der Hefe-Zellen resultiert. Der  $a$ -Agglutininrezeptor setzt sich aus den zwei Untereinheiten Aga1p (73 kDa) und Aga2p (7 kDa) zusammen, welche stark O-glykosyliert vorliegen. Die Untereinheit Aga1p ist über einen GPI-Anker mit der Zellwand verknüpft, während das sekretierte Aga2p kovalent über zwei Disulfidbrücken an Aga1p bindet (Abb. 3.1) (Shen, Wang et al. 2001). Das zu untersuchende Protein ist C-terminal an das Aga2p fusioniert, wobei es N-terminal vom Xpress-Epitop und C-terminal vom V5-Epitop sowie His<sub>6</sub>-Tag flankiert wird, wodurch die Proteinexpression und Oberflächenlokalisierung nachgewiesen werden kann.



**Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Hefe-Oberflächen-Präsentationssystems.**

Das Aga1p Protein des  $a$ -Agglutininrezeptors ist in der Zellwand der Hefe verankert und bindet das Aga2p Protein kovalent über zwei Disulfidbrücken. Das zu untersuchende Protein ist C-terminal an das Aga2p fusioniert, wobei es N-terminal vom Xpress-Tag und C-terminal vom V5-Tag und dem His<sub>6</sub>-Tag flankiert ist.

X: Xpress-Tag, V5: V5-Tag, His<sub>6</sub>: His<sub>6</sub>-Tag.

Das in dieser Arbeit verwendete System besteht aus dem modifizierten Hefestamm YKM2, der eine im Genom integrierte GFP-Kassette unter Kontrolle des *MET25*-Promotors trägt, und dem pYD1-Expressionsvektor mit dem *AGA2*-Gen unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors. Die Kultivierung der Hefen erfolgt in SD-Minimalmedium ohne Methionin zur GFP-Induktion und ohne Tryptophan zur Selektion auf das pYD1-Plasmid. Da Glukose den *GAL1*-Promotor reprimiert, werden die Hefen zunächst in Glukose-freiem Medium mit 2 %

Raffinose als Kohlenstoffquelle angeimpft, bevor sie ins Induktionsmedium mit 2 % Galaktose als Kohlenstoffquelle übergeimpft werden.

Die Vorteile dieses Systems sind die einfache genetische Manipulierbarkeit und leichte Kultivierbarkeit der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, deren Sekretionsmaschinerie eine effiziente Proteinfaltung ermöglicht. Das Hefe-Oberflächen-Präsentationssystem konnte erfolgreich zur Analyse chlamydialer Adhäsionsproteine, wie z.B. OmcB und Pmp21, etabliert werden (Moelleken and Hegemann 2008; Moelleken, Schmidt et al. 2010).

### 3.2.1.1 Induktion der Expression von Oberflächen-präsentierten Proteinen

- Die Hefen werden in 5 ml Minimalmedium (SD Trp<sup>-</sup>, Met<sup>-</sup>, ohne Glukose) mit 2 % Raffinose als Kohlenstoffquelle mit einer Start OD600 von 0,1 angeimpft und über Nacht unter rotierendem Schütteln bei 30 °C inkubiert.
- Nach 24 h wird die OD600 der Kultur bestimmt und die Hefen auf eine Start-OD600 von 0,1 in 5 ml Minimalmedium (SD Trp<sup>-</sup>, Met<sup>-</sup>, ohne Glukose) mit 2 % Galaktose zur Induktion der Proteinexpression übergeimpft.
- Nach weiteren 24 h Inkubation bei 30 °C unter rotierendem Schütteln können die Hefen geerntet werden und für weitere Verwendungszwecke genutzt werden.

### 3.2.1.2 Aufarbeitung von Hefen für die SDS-Gelelektrophorese

- Zum Nachweis der Proteinexpression werden 3 OD600 Hefezellen einer Induktionskultur für 1 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert.
- Das Medium wird abgenommen und die Zellen in 50 µl 8 M Harnstoff resuspendiert.
- Zur Suspension werden 15 µl Protein-Ladepuffer und 10 µl 1 M DTT hinzugegeben.
- Die Probe wird 30 min bei 100 °C gekocht und anschließend auf Eis abgekühlt.
- Es werden 20 µl der Probe auf ein SDS-Gel geladen und mittels Westernblot analysiert.

### 3.2.1.3 $\alpha$ -Mannosidase Verdau Oberflächen-präsentierter Proteine

Da die Aga2p-Untereinheit des  $\alpha$ -Agglutininrezeptors stark O-glykosyliert vorliegt (Shen, Wang et al. 2001), zeigt sich im Westernblot eine große Abweichung des apparenten Laufverhaltens vom theoretischen Molekulargewicht. Daher wurden Zellextrakte von Aga2p und Aga2p-Fusionsprotein exprimierenden Hefezellen mit  $\alpha$ -Mannosidase behandelt.

- Für die  $\alpha$ -Mannosidase Behandlung werden 10 OD600 Hefezellen für 1 min bei 13000 Upm (Hereaus Biofuge pico) pelletiert und anschließend mit 1 ml PBS gewaschen.
- Das Zellpellet wird in 150  $\mu$ l PBS + 50  $\mu$ l Proteaseinhibitor-Cocktail resuspendiert, 2/3 der Probevolumens an Glasperlen zugefügt und der Zellaufschluss erfolgt für 2 x 20 s bei 6500 Upm mit 5 s Pause im Zellhomogenisator (Homogenisator precellys24).
- Die Glasperlen werden für 1 min bei 3000 Upm und 4 °C pelletiert und der Überstand für 10 min bei 13000 Upm und 4 °C zentrifugiert.
- Der klare Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 U  $\alpha$ -Mannosidase für 2 h bei 37 °C inkubiert.
- Es werden 50  $\mu$ l Protein-Ladepuffer und 20  $\mu$ l 1 M DTT zugegeben, für 10 min bei 100 °C gekocht und auf Eis abgekühlt.
- Anschließend werden 20  $\mu$ l der Probe auf ein SDS-Gel geladen und mittels Westernblot analysiert.

#### 3.2.1.4 Indirekte Immunfluoreszenz Oberflächen-präsentierter Proteine

- 500  $\mu$ l Hefezellen einer Induktionskultur werden geerntet und mit 1 ml PBS gewaschen. Bei Bedarf werden die Zellen durch Inkubation in 250  $\mu$ l Methanol für 10 min bei RT fixiert, zentrifugiert und das Zellpellet mit 1 ml PBS gewaschen.
- Die Hefezellen werden in 100  $\mu$ l des 1:500 verdünnten primären Antikörpers (Xpress oder V5) resuspendiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert.
- Die Zellen werden zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und in 100  $\mu$ l des 1:200 verdünnten sekundären Antikörpers (anti-Maus Cy3) resuspendiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert.
- Ungebundener Antikörper wird durch Waschen mit 1 ml PBS entfernt und die Hefen in 500  $\mu$ l PBS aufgenommen.
- Ein Multiwell-Objektträger wird mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, getrocknet und in jede Vertiefung 20  $\mu$ l Poly-L-Lysin (0,5 mg/ml) gegeben und für 10 min bei RT inkubiert.
- Das Poly-L-Lysin wird vorsichtig mit dest. Wasser vom Objektträger abgewaschen und getrocknet.
- 20  $\mu$ l der Hefesuspension werden auf den Objektträger getropft, 10 min bei RT inkubiert, die überschüssige Flüssigkeit abgenommen und der Objektträger getrocknet.
- Die Zellen werden mit 2  $\mu$ l Vectashield beschichtet, mit einem Deckglas abgedeckt und mit Nagellack versiegelt.

- Die Oberflächenpräsentation von Proteinen wird mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

### 3.2.1.5 Adhäsionstest mit Hilfe des Hefe-Oberflächen-Präsentationssystems

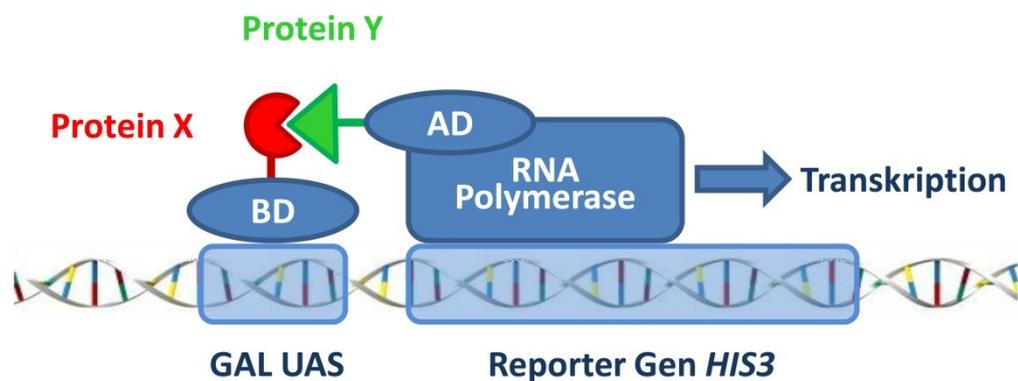
Durch den Hefe-Adhäsionstest wurde die Bindungsfähigkeit von Proteinen, die auf der Oberfläche von Hefezellen präsentiert werden, an eukaryotische Zellen untersucht. Verwendet werden Hefezellen, welche Aga2p bzw. Aga2p-Fusionsproteine exprimieren, sowie adhärente epitheliale HEp-2 bzw. HeLa Zellen.

- Eine 24-Well Platte wird mit Glasplättchen bestückt und pro Deckgläschen werden  $1 \times 10^5$  HEp-2 bzw. HeLa Zellen ausgesät.
- Die humanen Zellen werden für 48 h im Inkubationsschrank bei 37 °C inkubiert.
- Die Hefe-Zellzahl einer Induktionskultur wird mikroskopisch bestimmt.
- Für den Adhäsionstest werden  $10^6$  Hefezellen (10 Hefezellen/humane Zelle) in 500 µl PBS für 1 h bei RT mit den humanen Zellen inkubiert.
- Die Hefezellsuspension wird abgenommen und die humanen Zellen unter mikroskopischer Beobachtung mit PBS gewaschen bis die Zellzwischenräume frei von ungebundenen Hefezellen sind.
- Die Zellen werden mit 250 µl 4 % Formaldehyd in PBS für 20 min bei RT fixiert und mit PBS gewaschen.
- Auf einen Objektträger werden 3 µl Glycerin/PBS-Lösung (1:9) gegeben und das getrocknete Glasplättchen mit den Zellen nach unten in die Glycerinlösung gelegt.
- Bei 63 x Vergrößerung werden pro Deckgläschen 1000 humane Zellen und die daran gebundenen Hefezellen ausgezählt.

### 3.2.2 Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse

Mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems kann die direkte Interaktion zwischen zwei Proteinen *in vivo* untersucht werden. Grundlage des Systems ist der Transkriptionsfaktor Gal4p der Hefe *S. cerevisiae*. Dieser besteht aus zwei funktionellen Domänen, der DNA-Bindedomäne (BD), die an die GAL UAS (GAL Upstream-Aktivierungssequenz) bindet, und einer Aktivierungsdomäne (AD), die mit der basalen Transkriptionsmaschinerie interagiert und so die Transkription aktiviert (Abb. 3.2). Zum Nachweis der Interaktionen zwischen zwei Proteinen wird ein zu testendes Gen mit der GAL4-DNA-Bindedomäne und das andere zu

testende Gen mit der *GAL*-Aktivator-domäne jeweils in einem Expressionsvektor fusioniert. Die beiden Expressionsvektoren (Vektor pEB1 mit der AD, Vektor pEB2 mit der BD) werden anschließend in *S. cerevisiae* co-transformiert. Der Nachweis der Interaktion zwischen zwei Proteinen erfolgt mit Hilfe von Reporterproteinen. Bei einer bestehenden Interaktion zwischen den zu testenden Proteinen kommen die DNA-Bindedomäne und die Aktivierungsdomäne in räumliche Nähe und die Aktivität des Gal4p Transkriptionsfaktors wird wieder hergestellt. Es kommt zur Transkription der Reportergene *ADE2*, *HIS3* und *MEL1*, welche in das Genom des Hefestammes AH109 integriert sind.



**Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems.**

Durch eine Interaktion zwischen den zu testenden Proteinen X und Y kommen die DNA-Bindedomäne (BD) und die Aktivierungsdomäne (AD) in räumliche Nähe, was die Transkription von Reportergenen, beispielsweise von *HIS3*, zur Folge hat.

### 3.2.2.1 Nachweis der Proteinexpression in Hefezellen mittels Westernblot

- Zur Proteinexpression werden 5 ml Hefekultur in Selektivmedium (SD  $\text{Trp}^-$ ,  $\text{Leu}^-$ ) angesetzt und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Kultur wird anschließend in Selektivmedium auf eine OD600 von 0,1-0,4 überimpft und für 4-5 h bis zu einer OD600 von 1 inkubiert.
- Zum Nachweis der Proteinexpression werden 3 OD600 Hefezellen für 1 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert.
- Das Medium wird abgenommen und die Zellen in 50  $\mu\text{l}$  8 M Harnstoff resuspendiert.
- Zur Suspension werden 15  $\mu\text{l}$  Protein-Ladepuffer und 10  $\mu\text{l}$  1 M DTT hinzugegeben.
- Die Probe wird 30 min bei 100 °C gekocht und anschließend auf Eis abgekühlt.
- Es werden 20  $\mu\text{l}$  der Probe auf ein SDS-Gel geladen und mittels Westernblot analysiert.

### 3.2.2.2 Serielle Tropftests

- Zur Durchführung eines seriellen Tropftests werden Hefezellen einer Übernachtskultur in Selektivmedium (SD Trp<sup>-</sup>, Leu) auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 - 0,4 überimpft und für 4-5 h bei 30 °C inkubiert.
- Die Zellzahl pro ml wird in der Zählkammer ermittelt.
- $2 \times 10^6$  Zellen werden aus der Kultur entnommen, in ein 1 ml Reaktionsgefäß überführt und mit sterilem ddH<sub>2</sub>O auf 1 ml aufgefüllt.
- Durch serielle Verdünnung um den Faktor 10 werden die Zellkonzentrationen  $2 \times 10^5$ /ml,  $2 \times 10^4$ /ml und  $2 \times 10^3$ /ml in neuen Reaktionsgefäßen angesetzt.
- Aus jeder Verdünnung werden 5 µl (d.h. jeweils 10.000, 1.000, 100 und 10 Zellen) auf entsprechende feste Selektionsmedien getropft und für mindestens zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

## 3.3 Chlamydienkultur

Chlamydien sind obligat intrazelluläre Bakterien und benötigen die Wirtszelle für eine erfolgreiche Vermehrung. Ein konfluenter Zellrasen adhärenter Humanzellen wird mit einer Chlamydien suspension durch Zentrifugation infiziert, um das Eindringen der Chlamydien zu erleichtern. Im Chlamydienmedium befindet sich Cycloheximid, das die Aktivität der Peptidyltransferase an der 60S-Untereinheit der Ribosomen hemmt und so eine erfolgreiche Translation verhindert. Dadurch wird die Zellteilung der Humanzellen deutlich verringert. Zusätzlich produziert die humane Wirtszelle so vermehrt ATP, welches sich positiv auf die Entwicklung und Zellteilung der Chlamydien auswirkt.

### 3.3.1 Herstellung von Stammlösungen für die Chlamydienkultur

#### Chlamydienkulturmedium:

Eine Cycloheximid-Lösung (Sigma, 100 mg/ml) wird mit HBSS auf eine Konzentration von 100 µg/ml verdünnt und bei -20 °C gelagert. Das Chlamydienkulturmedium besteht aus dem Zellkulturmedium und 1,2 µg/ml Cycloheximid.

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

Zum Einfrieren von Chlamydien wird ein Saccharose-Phosphat-Glutaminsäure (SPG) Puffer verwendet. 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> und 0,72 g Glutaminsäure

werden eingewogen und auf 1000 ml mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt und der pH-Wert der Lösung auf 7,5 eingestellt. Der Puffer wird autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

### 3.3.2 Passage von Chlamydien in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen

- Von konfluenten HEp-2 Zellen in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen wird das Medium entfernt.
- 1 ml Chlamydien suspension (ca. 10<sup>7</sup> IFU/ml) in SPG-Puffer wird aufgetaut und durch Zugabe von Zellkulturmedium auf ein Volumen von 5 ml pro Flasche aufgefüllt, gevortext und in die Zellkulturflaschen pipettiert. Pro Kryo-Röhrchen Chlamydien suspension können 1-4 kleine Flaschen infiziert werden.
- Die Flaschen werden verschlossen und für 60 min bei 1560 g (3000 Upm / Rotanta 460R) und 30 °C zentrifugiert und anschließend für 60 min zur Adsorption bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.
- Das Medium wird abgenommen, durch 5 ml Chlamydienkulturmedium ersetzen und die infizierten Zellen für 3 Tage im Brutschrank inkubiert.
- Nach 3 Tagen wird der Grad der Infektion mikroskopisch begutachtet, wobei ein Ablösen der Zellen und das Auftreten vieler Inklusionen auf eine starke Infektion hinweisen.
- Mit Hilfe eines sterilen Zellschabers werden infizierte Zellen vom Flaschengrund abgekratzt und die Suspension von bis zu 6 Flaschen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen vereint.
- Die Suspension wird 45 s bei 40 % Leistung mit einem Ultraschallstab (Snonplus HD2200, Bandelin) behandelt und für 10 min bei 1560 g (3000 Upm / Rotanta 460R) zum Pelletieren von Humanzelltrümmern zentrifugiert (Differentialzentrifugation).
- Der Überstand wird in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und erneut zentrifugiert.
- Der geklärte Überstand des zweiten Zentrifugationsschrittes wird zur Infektion neuer Zellkulturflaschen verwendet, indem die Chlamydien aus einer Flasche nun auf 4 neue Flaschen mit konfluenten HEp-2 Zellen aufgeteilt werden, oder zur Sedimentation der Chlamydien weiterverarbeitet.

### 3.3.3 Sedimentation und Einfrieren von Chlamydien

- Nach der Differentialzentrifugation wird die Chlamydien suspension in ein steriles Ultrazentrifugationsröhrchen (Beckman) überführt und 1 h bei 30.000 x g (Avanti J-25) und 4 °C zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen und das Chlamydien pellet in 1 ml SPG-Puffer mit Hilfe des Ultraschallbades vorsichtig resuspendiert.
- Die Suspension wird in ein Kryo-Röhrchen überführt und bei -80 °C gelagert.

### 3.3.4 Reinigung von Chlamydien mittels Gastrografin-Gradient

Chlamydien können mittels Dichtegradientenzentrifugation von eukaryotischen Zelltrümmern gereinigt werden. Für diese Reinigung werden die geernteten Chlamydien von bis zu 32 kleinen Zellkulturflaschen auf einem Gastrografin-Gradienten aufgetrennt.

- Die differentialzentrifugierte und in Kryo-Röhrchen eingefrorene Chlamydien suspension wird vorsichtig aufgetaut und bei 15000 Upm (Hereaus Biofuge Primo R) und 4 °C für 30 min zentrifugiert.
- Die Pellets werden in 1 ml HBSS vereinigt und resuspendiert.
- In ein steriles Zentrifugenröhrchen werden 9 ml 30 % Gastrografin gegeben.
- Die Chlamydien suspension wird vorsichtig darauf pipettiert und bei 30.000 x g (Beckmann J2-21) und 4 °C für 1 h zentrifugiert.
- Das Pellet wird zweimal mit 10 ml HBSS gewaschen, erneut sedimentiert, in 1 ml SPG aufgenommen, aliquotiert (250 µl) und bei -80 °C eingefroren.

### 3.3.5 Bestimmung der Infektiösität von Chlamydien

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

- Eine Chlamydien suspension wird 1:10 bis zur Verdünnungsstufe  $10^{-10}$  schrittweise mit Medium verdünnt.
- In einer 96-Well Platte werden HEP-2 Zellen zu einem konfluenten Zellrasen angezogen und 100 µl jeder Verdünnung als 3-fach Bestimmung in die Vertiefungen pipettiert.

- Die Platte wird für 60 min bei 1560 g (3000 Upm / Rotanta 460R) und 30 °C zentrifugiert und anschließend 60 min zur Adsorption bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.
- Das Medium wird abgenommen, durch 200 µl Chlamydienmedium pro Vertiefung ersetzt und die infizierten Zellen für 2 Tage im Brutschrank inkubiert.
- Der Überstand wird abgenommen und die Zellen mit 100 µl Methanol pro Vertiefung für 5 min fixiert.
- Die gebildeten Einschlüsse werden durch einen FITC-konjugierten Antikörper gegen das chlamydiale LPS (Pathfinder, 1:4 verdünnt) für 30 min bei 30 °C gefärbt.
- Die Einschlüsse je Vertiefung werden mittels Fluoreszenzmikroskop bei 20 x Vergrößerung gezählt und die Zahl der Einschluss-bildenden Partikel pro ml der Ausgangssuspension errechnet.

### 3.3.6 Infektion von Zellen durch Chlamydien ohne Zentrifugation

Bei den sogenannten Neutralisationsexperimenten, in denen der Einfluss einer Präinkubation mit rekombinantem Protein, Antikörper oder Heparin auf die chlamydiale Infektion analysiert wird, erfolgt die Infektion mit gradientengereinigten EBs ohne Zentrifugation in 24-Well Platten.

- Das Zellkulturmedium wird von den Humanzellen abgenommen und die Zellen 2 x mit HBSS gespült.
- x µl Chlamydien suspension werden in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert und auf die Zellen pipettiert.
- Anschließend erfolgt eine stationäre Inkubation der Zellen für 2 h bei 37 °C.
- Danach werden die Zellen mit 1 ml HBSS gewaschen und mit 1 ml Chlamydienkulturmedium überschichtet.
- Das Chlamydienwachstum erfolgt für 24 h bei einer *C. trachomatis* Infektion bzw. für 48 h bei einer *C. pneumoniae* Infektion bei 37 °C im Brutschrank.
- Im Anschluss werden die Zellen mit 100 µl Methanol für 5 min fixiert und die Einschlüsse durch einen FITC-konjugierten Antikörper gegen das chlamydiale LPS (Pathfinder, 1:4 verdünnt) für 30 min bei 30 °C gefärbt.
- Bei 63 x Vergrößerung werden pro Deckgläschen 1000 humane Zellen ausgewertet und die Anzahl an Einschlüssen ermittelt.

### 3.3.7 Immunologischer Nachweis von Chlamydien mittels Fluoreszenzmikroskopie

#### 3.3.7.1 Fixierung von infizierten eukaryotischen Zellen

##### Fixierung durch Methanol:

- Das Zellkulturmedium wird vorsichtig abgenommen und die infizierten Zellen mit PBS gewaschen.
- Die Zellen werden mit 100 µl Methanol überschichtet und für 5 min bei RT inkubiert.
- Das Methanol wird abgenommen und die Zellen werden mit 1 ml PBS überschichtet.
- Die fixierten Zellen können bei 4 °C über mehrere Wochen gelagert werden.

##### Fixierung durch Formaldehyd:

- Das Zellkulturmedium wird vorsichtig abgenommen und die infizierten Zellen mit PBS gewaschen.
- 30 % para-Formaldehyd (bei -20 °C gelagert) wird mit PBS auf 3 % Formaldehyd verdünnt.
- Die Zellen werden mit 250 µl 3 % Formaldehyd-Lösung überschichtet und für 10 min bei RT inkubiert.
- Die Formaldehyd-Lösung wird abgenommen und die Zellen werden mit PBS überschichtet.
- Die fixierten Zellen können bei 4 °C eine Woche gelagert werden.
- Je nach Bedarf können die fixierten Zellen vor der Antikörperfärbung permeabilisiert werden. Hierzu werden die Zellen mit 250 µl 0,2 % Triton überschichtet, für 10 min bei RT inkubiert und anschließend mit PBS überschichtet.

#### 3.3.7.2 Direkte Immunofluoreszenz

Bei dieser Methode werden chlamydienspezifische Lipopolysaccharid-Komponenten mit einem FITC-konjugierten, monoklonalen Antikörper identifiziert.

- Die fixierten Zellen werden mit 1 ml PBS gewaschen.
- Es werden 30 µl Antikörperlösung (Pathfinder, 1:4 in PBS verdünnt) auf jedes Glasplättchen in einer 24-Well Platte verteilt.
- Die 24-Well Platte wird für 30-60 min im Brutschrank bei 30 °C inkubiert.

- Auf einen Objektträger wird ein Tropfen Vectashield aufgesetzt.
- Das Glasplättchen wird in der 24-Well Platte zweimal mit 1 ml PBS gewaschen, entnommen, getrocknet und mit dem Zellrasen nach unten auf den Tropfen Vectashield gelegt.
- Das Plättchen wird am Rand mit Nagellack abgedichtet und kann bei 4 °C über mehrere Wochen gelagert werden
- Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops können die Chlamydien als grüne Einschlüsse in den humanen Zellen nachgewiesen werden.

### 3.3.7.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Der indirekte immunologische Nachweis von chlamydialen oder humanen Antigenen erfolgt über die Verwendung von spezifischen Primär-Antikörpern in Kombination mit Fluoreszenz-konjugierten Sekundär-Antikörpern.

- Die infizierten Zellen werden in einer 24-Well-Patte fixiert und gewaschen.
- Ein Primär-Antikörper wird mit PBS verdünnt und 30 µl dieser Verdünnung werden auf das Glasplättchen gegeben.
- Die Inkubation erfolgt für 30-60 min bei 30 °C.
- Das Glasplättchen wird dreimal mit PBS gewaschen.
- 30 µl eines fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörpers (verdünnt nach Herstellerangaben mit PBS) werden auf das Glasplättchen gegeben.
- Die Inkubation erfolgt für weitere 30-60 min bei 30 °C.
- Es folgt dreimaliges Waschen mit PBS.
- Je nach Bedarf werden die Zellen mit DAPI (1 µg/ml in PBS) für 10 min bei RT gefärbt und erneut dreimal mit PBS gewaschen.
- Das Präparat wird getrocknet und wie für die direkte Immunfluoreszenz weiter verarbeitet.

### 3.3.8 Test auf Kontamination durch Mycoplasmen

Mycoplasmen, insbesondere *Mycoplasma arginini* und *Mycoplasma hominis*, stellen häufige Kontaminationen der Zellkultur dar. Zum Nachweis wird eine mycoplasmenspezifische PCR eingesetzt (Ossewaarde, de Vries et al. 1996). Als Zielsequenz wird das 16 S rRNA Gen benutzt.

**Probenherstellung:**

- 100 µl Überstand von infizierten oder nicht infizierten Zellen werden in ein Reaktionsgefäß überführt.
- Die Probe wird für 10 min bei 100 °C erhitzt.

**PCR-Ansatz:**

2,5 µl	dNTPs (4 mM)
5 µl	10 x Puffer TrueStart Taq Polymerase (Fermentas)
1 µl	Primer C-118
1 µl	Primer C-119
3 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
10 µl	Zellkulturprobe (bzw. 0,5 µl einer Mycoplasmen-positiven Kontrolle)
27,25 µl	ddH <sub>2</sub> O
0,25 µl	TrueStart Taq Polymerase (Fermentas)

**PCR-Bedingungen:**

1) Denaturierung	2 min	95 °C
2) 35 Zyklen mit folgenden Bedingungen:		
Denaturieren	1 min	95 °C
Annealing	1 min	60 °C
Elongation	1 min	72 °C
3) finale Elongation	10 min	72 °C

**Analyse:**

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

**3.4 Kultivierung von *Escherichia coli*****3.4.1 Kultivierungsbedingungen für *E. coli* Kulturen**

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

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

Zur Expression von Fusionsproteinen unter Kontrolle des *lac*-Promotors wird die *E. coli* Kultur bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,6 mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) versetzt. Die Induktion der Genexpression wird durch die Aufarbeitung von Proteinproben und deren gelelektrophoretische Auftrennung mittels SDS-PAGE kontrolliert.

- Von einer 50 ml Übernachtskultur wird eine 1 l Induktionskultur auf eine Start-OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.
- Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 wird die Kultur durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert.
- Anschließend wird die Induktionskultur weitere 4 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.
- Die *E. coli* Zellen werden für 10 min bei 5000 Upm (Beckman Avanti J-25) abzentrifugiert.
- Das Pellet wird mit 40 ml PBS gewaschen und 15 min bei 4600 Upm (Heraeus Multifuge 3SR+) erneut zentrifugiert.
- Final wird das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

#### Kontrolle der Proteinexpression in einer *E. coli* Kultur:

- 1 OD<sub>600</sub> Zellen einer *E. coli* Kultur wird 1 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge Pico) zentrifugiert und das Zellpellet in 32,5 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.
- Es werden 12,5 µl Protein-Ladepuffer und 5 µl 1M DTT hinzugefügt und die Probe wird für 10 min bei 100 °C gekocht und anschließend auf Eis abgekühlt.
- Es werden 10-20 µl der Probe auf ein SDS-Gel geladen und mittels Coomassie-Färbung oder Westernblot analysiert.

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

- XL<sub>1</sub>-blue Zellen aus der Stammsammlung werden auf einer LB-Platte mit Tetracyclin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubieren.
- Es werden zwei 5 ml Übernachtskulturen angesetzt.
- Die beiden Übernachtskulturen werden jeweils in 1 l LB-Medium übergeimpft und bei 37 °C bis eine OD<sub>600</sub> von 0,7-0,8 inkubiert.

- Die 1 l Kulturen werden für 30 min auf Eis abgekühlt und 15 min bei 4000 Upm (Beckmann J2-21) und 4 °C abzentrifugiert.
- Die pelletierten Zellen jeder Kultur werden zweimal mit 1000 ml eiskaltem, sterilem ddH<sub>2</sub>O gewaschen.
- Die Pellets werden in je 20 ml eiskaltem, sterilem 10 %igem Glyzerin resuspendiert und erneut 15 min bei 4000 Upm und 4 °C abzentrifugiert.
- Final werden die Zellen in je 2 - 3 ml 10 %igem Glyzerin resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.
- Die elektrokompetenten Zellen werden bei -80 °C gelagert. Vor dem Gebrauch wird die Transformationseffizienz durch eine Testtransformation mit 0,01 ng pBIISK+ in 1 µl Volumen bestimmt.

## 3.5 Zellbiologische Methoden

### 3.5.1 Transfektion von eukaryotischen Zellen mittels TurboFect

Bei der Transfektion mittels TurboFect können Expressionsvektoren in eukaryotische Zellen eingebracht werden. Das kationische Polymer des Transfektions-Reagenzes bildet kompakte positiv-geladene Komplexe mit der Plasmid-DNA, die in eukaryotische Zellen aufgenommen werden.

- 10<sup>5</sup> Zellen werden 24 h vor der Transfektion in 24-Well Platten auf Deckgläschen ausgesät.
- 100 µl Serum-freies DMEM Medium, 1 µg Plasmid-DNA und 2 µl TurboFect Reagenz werden in einem sterilen Reaktionsgefäß gemischt.
- Die Lösung wird für 15-20 min bei RT inkubiert und anschließend tropfenweise unter leichtem Schwenken zu den Zellen pipettiert.
- Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> wird das Medium abgenommen und die Zellen werden mit PBS gewaschen und mit 3 % para-Formaldehyd für die Mikroskopie fixiert.

#### Kontrolle der Proteinexpression in eukaryotischen Zellen:

- Die Zellen eines Wells werden mit 150 µl Phospho-Lysis-Puffer für 10 min bei 37 °C inkubiert, vorsichtig abgespült und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

- Es werden 57,5 µl Protein-Ladepuffer und 23 µl 1M DTT hinzugefügt und die Probe für 10 min bei 100 °C gekocht und anschließend auf Eis abgekühlt.
- Es werden 20-30 µl der Probe auf ein SDS-Gel geladen und mittels Westernblot analysiert.

### 3.5.2 Adhäsionsanalysen mit proteinbeschichteten Latexkügelchen

Mit Hilfe von Latexkügelchen können die adhäsiven Eigenschaften von chlamydialen Proteinen an eukaryotische Zellen untersucht werden. Hierzu werden eukaryotische Zellen mit proteinbeschichteten Latexkügelchen inkubiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie im FACS Aria (BD) die Adhäsion quantifiziert.

- $10^5$  Zellen werden pro Well auf Glasplättchen ausgesät und für 2 Tage bei 37 °C und 6% CO<sub>2</sub> inkubiert.
- Proteinbeschichtete Latexkügelchen in 300 µl Zellkulturmedium werden für 5 min bei 700 Upm (Heracus Rotanta 460R) und 30 °C auf die Zellen zentrifugiert. Es werden 10 beschichtete Latexkügelchen pro eukaryotische Zelle eingesetzt.
- Es folgt eine Inkubation für 1 h bei 37 °C im Brutschrank.
- Die Suspension wird abgenommen und die Zellen werden unter mikroskopischer Beobachtung mit PBS gewaschen bis die Zellzwischenräume frei von ungebundenen Latexkügelchen sind.
- Anschließend werden die Zellen für 20 min bei RT mit 3 % para-Formaldehyd fixiert und für die fluoreszenzmikroskopische Analyse vorbereitet.
- Zur Quantifizierung der Adhäsion mittels Durchflusszytometrie werden die gewaschenen Zellen mit 300 µl Cell Dissociation Solution bedeckt und für 20-30 min bei 37 °C inkubiert.
- Die abgelösten Zellen werden vorsichtig aus den Wells herausgespült, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µl 4 % para-Formaldehyd versetzt.
- Die Zellen werden für 30 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C fixiert.
- Von jeweils 10.000 eukaryotischen Zellen und daran gebundenen Latexkügelchen wird die mittlere FITC-Fluoreszenz im FACS Aria bestimmt bzw. die an 1000 eukaryotischen Zellen gebundenen Latexkügelchen fluoreszenzmikroskopisch quantifiziert.

### 3.5.3 Internalisierungstest von Latexkügelchen

Zur Untersuchung des Internalisierungsverhaltens von Proteinen in Abwesenheit anderer bakterieller Faktoren werden grün- bzw. blau-fluoreszierende 1  $\mu\text{m}$  Latexkügelchen verwendet.

- $10^5$  Zellen werden pro Well auf Glasplättchen ausgesät und für 2 Tage bei 37 °C und 6%  $\text{CO}_2$  inkubiert.
- Proteinbeschichtete Latexkügelchen in 300  $\mu\text{l}$  Zellkulturmedium werden für 5 min bei 700 Upm (Heraeus Rotanta 460R) und 4 °C auf die Zellen zentrifugiert. Es werden 5 beschichtete Latexkügelchen pro eukaryotische Zelle eingesetzt.
- Es folgt eine Inkubation für 1 h bei 4 °C bzw. für 1-4 h bei 37 °C.
- Die Suspension wird zum gewünschten Zeitpunkt abgenommen und die Zellen werden unter mikroskopischer Beobachtung mit PBS gewaschen bis die Zellzwischenräume frei von ungebundenen Latexkügelchen sind.
- Die Zellen werden für 20 min bei 4 °C mit 3 % para-Formaldehyd fixiert und für die fluoreszenzmikroskopische Analyse vorbereitet.

### 3.5.4 Versuche zur Neutralisation der chlamydialen Infektion

#### 3.5.4.1 Infektion-Neutralisation mit rekombinantem Protein

Um den Einfluss von chlamydialen Proteinen bei der Infektion zu untersuchen, wird eine Infektion von eukaryotischen Zellen durchgeführt, die mit rekombinantem Protein vorbehandelt wurden. In diesem Fall wird der Rezeptor eines potentiellen Adhäsins mit rekombinantem Protein besetzt. Zur Durchführung dieses Experimentes werden gradientengereinigte chlamydiale Partikel sowie rekombinant hergestelltes und affinitätsgereinigtes Protein benötigt.

- Eukaryotische Zellen werden auf Glasplättchen ausgesät und zwei Tage im Brutschrank inkubiert bis sich ein konfluenter Zellrasen ausgebildet hat.
- Das Zellkulturmedium wird von den Zellen abgenommen und durch 250  $\mu\text{l}$  Proteinsuspension ersetzt. Dazu wird rekombinant hergestelltes Protein in PBS (12,5-200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) mit Medium versetzt.
- Medium mit BSA (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) als unspezifisches Protein wird als Kontrolle benutzt.
- Die Zellen werden für 2 h bei 37 °C mit der Proteinsuspension inkubiert.

- Anschließend werden 50 µl Chlamydien suspension (gradientengereinigte Chlamydien in SPG-Puffer, MOI=20) der Zell-Proteinsuspension zugesetzt und erneut bei 37 °C für 2 h inkubiert.
- Die Suspension wird abgenommen und die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen und dann mit 1 ml Chlamydienkulturmedium überschichtet.
- Die Zellen werden für 24 h bei einer *C. trachomatis* Infektion und für 48 h bei einer *C. pneumoniae* Infektion im Brutschrank inkubiert und anschließend mit Methanol fixiert.
- Gebildete Einschlüsse werden durch einen FITC-konjugierten Antikörper gegen das chlamydiale LPS (Pathfinder, 1:4 in PBS verdünnt) detektiert und die Einschlüsse in 1000 eukaryotischen Zellen ausgezählt.

#### **3.5.4.2 Infektion-Neutralisation mit polyklonalen Antikörpern**

Um den Einfluss von chlamydialen Proteinen bei der Infektion zu untersuchen, wird eine Infektion mit chlamydialen Partikeln durchgeführt, die mit polyklonalen Antikörpern vorbehandelt wurden. In diesem Fall wird das potentielle chlamydiale Adhäsion von Antikörpermolekülen gebunden. Zur Durchführung dieses Experimentes werden gradientengereinigte chlamydiale Partikel sowie Präimmunsereum und finales Serum verwendet.

- Eukaryotische Zellen werden auf Glasplättchen ausgesät und zwei Tage im Brutschrank inkubiert bis sich ein konfluenter Zellrasen ausgebildet hat.
- Das Präimmunsereum und das finale Serum werden 1:10, 1:100 und 1:1000 mit Medium verdünnt.
- 50 µl Chlamydien suspension (gradientengereinigte Chlamydien in SPG-Puffer, MOI=20) werden zu 250 µl der verschiedenen Antikörperlösungen gegeben und für 1 h bei 4 °C inkubiert.
- Das Zellkulturmedium wird von den eukaryotischen Zellen abgenommen und durch 300 µl Chlamydien/Antikörpersuspension ersetzt.
- Nach einer Inkubation für 2 h bei 37 °C werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und danach mit 1 ml Chlamydienkulturmedium überschichtet.
- Die Zellen werden für 48 h bei einer *C. pneumoniae* Infektion im Brutschrank inkubiert und anschließend mit Methanol fixiert.
- Die Analyse erfolgt wie in 3.5.4.1 beschrieben.

### 3.5.4.3 Infektion-Neutralisation mit Heparin

Um den Einfluss von OmcB bei der chlamydialen Infektion zu untersuchen, werden Chlamydien, die zuvor mit Heparin vorbehandelt wurden, in Infektionsversuchen mit eukaryotischen Zellen eingesetzt. Es wird eine Heparin-Konzentration (Endkonzentration 0,5 µg/ml) gewählt, die nach Wuppermann et al. 2001 zu einer Inhibierung der *C. pneumoniae* Infektion um ca. 50 % führt.

- Eukaryotische Zellen werden auf Glasplättchen ausgesät und zwei Tage im Brutschrank inkubiert bis sich ein konfluenter Zellrasen ausgebildet hat.
- gradientengereinigte Chlamydien (in SPG-Puffer, MOI=20) werden in einer Heparinlösung (Endkonzentration 0,5 µg/ml) für 30 min bei 4 °C inkubiert.
- Die Chlamydien/Heparinsuspension wird auf ein Endvolumen von 300 µl mit Medium aufgefüllt und auf den konfluenten Zellrasen gegeben.
- Nach einer Inkubation für 2 h bei 37 °C werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und danach mit 1 ml Chlamydienkulturmedium überschichtet.
- Die Zellen werden für 48 h im Brutschrank inkubiert und anschließend mit Methanol fixiert.
- Die Analyse erfolgt wie in 3.5.4.1 beschrieben.

## 3.6 Molekularbiologische Methoden

### 3.6.1 RNA-Präparation aus humanen Zellen und cDNA Sythese

Zur Klonierung von humanen Genen in Expressionsvektoren bedarf es einer Isolierung der mRNA aus humanen Zellen, die als Matrize für eine Gen-spezifische cDNA-Synthese dient. Das resultierende DNA-Produkt wird anschließend durch eine Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert.

#### RNA-Präparation:

- Aus einer konfluent mit adhärennten Zellen bewachsenen Zellkulturflasche (80 cm<sup>2</sup>) wird das Zellkulturmedium abgesaugt.
- Der Zellrasen wird einmal mit HBSS vorsichtig gewaschen.
- Mit Hilfe eines sterilen Zellschabers werden die Zellen vom Flaschengrund abgekratzt, in 5 ml HBSS aufgenommen und in ein Greiner-Röhrchen überführt.
- Die Suspension wird bei 500 Upm (Rotanta 460R) zentrifugiert.

- Der Überstand wird verworfen und das Sediment in 900 µl Trizol resuspendiert und über Nacht eingefroren.
- 250 µl Phenol/Chloroform werden hinzugefügt und die Lösung wird gut gemischt und für 10 min bei RT inkubiert.
- Es folgt ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 13000 Upm (Hereaus Biofuge Primo R) und 4 °C.
- Die obere wässrige Phase wird vollständig abgenommen, in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µl Isopropanol durch Vortexen vermischt.
- Die RNA-Fällung erfolgt für 30 min bei -20 °C.
- Die Lösung wird für 30 min bei 15000 Upm (Hereaus Biofuge Primo R) und 4 °C zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen und das RNA-Pellet mit 1 ml 80 % Ethanol gewaschen.
- Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wird der Überstand abgenommen und das RNA-Pellet im Vakuum-Konzentrator getrocknet und in 200 µl sterilem DEPC Wasser aufgenommen.

#### **cDNA Synthese:**

- In ein Nuklease-freies PCR Reaktionsgefäß wird folgender Reaktionsmix pipettiert:

1 µl	antisense Oligonukleotid
5 µl	Matrizen-RNA
1 µl	dNTPs (25 mM)
7,5 µl	DEPC H <sub>2</sub> O
- Der Reaktionsmix wird für 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt.
- Zu dem Reaktionsmix werden folgende Zusätze beigemischt:

4 µl	5 x RT Puffer (Fermentas)
1µl	RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase (Fermentas)
- Es folgt eine Inkubation im PCR-Thermocycler:

50 °C	30 min
85 °C	5 min
- 3-5 µl der cDNA werden zur Amplifikation in einer Polymerasen-Kettenreaktion mit *Taq*-Polymerase eingesetzt.

### 3.6.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe von spezifischen, synthetisch hergestellten Oligonukleotiden (Primer), die komplementär zu den Randbereichen der zu amplifizierenden Sequenz sind, wird der Bereich zwischen den Primern durch eine thermostabile DNA-Polymerase vervielfältigt. Die Amplifikation verläuft in einem dreiphasigen Zyklus, der aus Denaturierung des DNA-Doppelstrangs, Anlagerung (Annealing) der Oligonukleotide und DNA-Synthese (Elongation) besteht. Auf diese Weise wird eine exponentielle Vermehrung der Ziel-DNA erreicht, da jeder neu gebildete Strang als Matrize für die weitere Synthese verwendet wird.

#### 3.6.2.1 Amplifikation von chlamydialen/humanen Gensequenzen

Zur Amplifikation einer Gensequenz für die homologe Rekombination werden Oligonukleotide konstruiert, die homologe Bereiche zum Zielvektor (40 nt) als auch Homologien zu der zu amplifizierenden DNA (20 nt) aufweisen. Als Matrize dienen Plasmide, die das gewünschte Gen tragen, oder genomische DNA aus Chlamydien bzw. cDNA aus humanen Zellen. Die Anlagerungstemperatur wird für jedes Oligonukleotidpaar nach der folgenden Formel berechnet:

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

(**A**) Anzahl der Guanin- und Cytosin-Basen bzw. (**B**) der Adenin- und Thymin-Basen innerhalb der Oligonukleotidsequenz, die komplementär zur Matrize ist.

Die optimale Elongationstemperatur ist abhängig von der verwendeten thermostabilen DNA-Polymerase. Um fehlerfreie Gensequenzen für Klonierungen zu generieren, wird eine *Pfx*-Polymerase mit Korrekturlesefunktion („proof-reading“) genutzt, deren Temperaturoptimum bei 68 °C liegt. Für PCR-Reaktionen, die keine Korrekturlesefunktion benötigen, wird die *Taq*-Polymerase bei einer Elongationstemperatur von 72 °C verwendet. Die Elongationszeit ist abhängig von der Größe des zu amplifizierenden Fragments und wird mit 1 min pro 1000 Nukleotide angesetzt.

#### PCR-Ansatz:

##### *Pfx*-Polymerase

x µl	10-100 ng Plasmid-DNA
1 µl	Oligonukleotide 1 (50 pmol)
1 µL	Oligonukleotide 1 (50 pmol)
5 µl	dNTP (4 mM)
5 µl	Puffer (10 x)

##### *Taq*-Polymerase

x µl	10-100 ng Plasmid-DNA
1 µl	Oligonukleotide 2 (50 pmol)
1 µl	Oligonukleotide 2 (50 pmol)
5 µl	dNTP (4 mM)
5 µl	Puffer (10 x)

4 µl	Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (25 mM)	4 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
5 µl	Enhancer (10 x)		
1 µl	<i>Pfx</i> -Polymerase (1 U/µl)	1 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (1 U/µl)
ad 50 µl	ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl	ddH <sub>2</sub> O

**PCR-Bedingungen:**

- 1) Denaturierung                      2 min                      5 °C
- 2) 35 Zyklen mit folgenden Bedingungen:
 

Denaturieren	1 min	95 °C
Annealing	1 min	49-60 °C
Elongation	1 min	68 / 72 °C
- 3) finale Elongation                      10 min                      68 / 72 °C

**Analyse:**

Die PCR-Proben werden mit 5 µl Blaumarker gemischt und mittels eines Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegels analysiert und die gewünschten Fragmente aus dem Gel eluiert.

**3.6.2.2 PCR auf Hefezellen**

Zur Verifikation positiver Hefeklone nach einer homologen Rekombination werden mit einer Pipettenspitze Zellen von Einzelkolonien in einem PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl resuspendiert. Die PCR wird mit der *Taq*-Polymerase durchgeführt unter Zusatz von DMSO und Tween 20 als Enhancer.

**PCR-Ansatz:**

0,3 µl	Oligonukleotid 1 (50 pmol)
0,3 µl	Oligonukleotid 2 (50 pmol)
0,24 µl	dNTPs (25 mM)
3 µl	Puffer (10 x)
0,3 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (1 U/µl)
1,8 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
24,06 µl	ddH <sub>2</sub> O + Hefezellen

**PCR-Bedingungen:**

Die PCR-Bedingungen werden wie in 3.6.2.1 beschrieben gewählt.

### 3.6.3 Auftrennung von DNA-Molekülen mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur präparativen oder analytischen Auftrennung von DNA-Fragmenten werden Agarosegele verwendet. Die jeweiligen Proben werden hierzu mit Blaumarker (10 x) gemischt, auf ein 0,7-2,0 %iges Agarosegel aufgetragen und bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Zugabe des DNA-interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid (1 µg/ml) wird die DNA unter UV-Licht sichtbar. Zur Größenbestimmung der aufgetrennten DNA-Fragmente werden 5 µl eines DNA-Größenstandards (O' GeneRuler™ DNA Ladder Mix) aufgetragen.

### 3.6.4 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel erfolgt unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits nach Herstellerangaben. Hierbei werden DNA-Fragmente nach der Gelelektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten, der Agaroseblock wird gelöst und die DNA zuerst an ein Trägermaterial gebunden, gewaschen und schließlich mit ddH<sub>2</sub>O eluiert.

### 3.6.5 Transformation und homologe Rekombination in *S. cerevisiae*

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

Ein gewünschtes DNA-Fragment kann über homologe *in vivo* Rekombination in einen Expressionsvektor eingebracht werden. Hierfür wird zunächst das DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert. Für die PCR werden zwei spezifische Oligonukleotide verwendet, die im 5'-Bereich jeweils 40 Nukleotide Homologie zum Ziel-Plasmid sowie im 3'-Bereich je 20 Nukleotide Homologie zum Zielgen besitzen. Das erhaltene PCR-Produkt wird zusammen mit dem linearisierten Ziel-Plasmid in die Hefe transformiert. In der Hefe wird infolge der homologen Bereiche das amplifizierte Gen über Rekombination in das Plasmid integriert.

- Eine 50 ml YDP-Hauptkultur wird mit einer Übernachtskultur des zu transformierenden Hefestammes auf eine Zellzahl von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml angeimpft und erneut bei 140 Upm und 30 °C inkubiert bis zu einer Konzentration von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml.
- Die Kultur wird 5 min bei 3500 Upm (Heraeus Multifuge 3SR+) sedimentiert.
- Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden mit 25 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen.

- Das erhaltene Zellpellet wird in 1 ml 100 mM LiAc resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.
- Anschließend werden die Zellen 5 s bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) sedimentiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100 mM LiAc pH 8,4-8,9 resuspendiert, sodass die Zellzahl bei etwa  $2 \times 10^9$  Zellen/ml liegt.
- Für die Transformation werden 50  $\mu$ l Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, die Zellen erneut 5 s bei 13000 Upm zentrifugiert und der Überstand wird abgenommen.
- Die Carrier-DNA (2 mg/ml) wird in der Zwischenzeit zum Denaturieren für 10 min auf 100 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt.
- Zu den 50  $\mu$ l Hefezellen wird der folgende „Transformationsmix“ in der vorgegebenen Reihenfolge zugegeben:
 

240 $\mu$ l	PEG (50 % w/v)
36 $\mu$ l	1 M LiAc pH 8,4-8,9
50 $\mu$ l	Carrier DNA
x $\mu$ l	Plasmid-DNA (0,1-1 $\mu$ g) bzw. linear. Plasmid + PCR-Produkt (1:3)
ad 34 $\mu$ l	ddH <sub>2</sub> O
- Der Ansatz wird gevortext und 30 min bei 30 °C inkubiert.
- Anschließend erfolgt ein Hitzeschock für 30 min bei 42 °C.
- Der Transformationsansatz wird für 5 s bei 13000 Upm sedimentiert und in 200  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.
- Die Zellsuspension wird zu 90 % und 10 % auf zwei selektive Platten ausgestrichen und bei 30 °C für 2-3 Tage inkubiert.

### 3.6.6 DNA-Isolation aus *S. cerevisiae*

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

- Eine 5 ml Übernachtkultur wird in SD-Minimalmedium angeimpft.
- Die Hefekultur wird in ein 1,8 ml Kryo-Röhrchen überführt, und für 5 s bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge pico) sedimentiert und das Pellet mit 1 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen.
- Die Zellen werden in 500  $\mu$ l Puffer P1 mit RNase A (100  $\mu$ g/ml) resuspendiert und 500  $\mu$ l Puffer P2 hinzugefügt und vorsichtig gemischt.
- Zur Zellsuspension werden ca. 2/3 des Volumens an Glasperlen zugesetzt.

- Der Zellaufschluss erfolgt für 2 x 20 s bei 5500 Upm mit 5 s Pause im Zellhomogenisator (Homogenisator precelly s24).
- Die Glasperlen werden kurz abzentrifugiert und 1 ml des Überstands wird in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.
- 500 µl Puffer P3 werden zugegeben und gemischt.
- Die Probe wird 10 min auf Eis inkubiert, bevor sie 15 min bei 13.000 Upm zentrifugiert wird.
- 750 µl des Überstandes werden in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 750 µl Isopropanol gemischt.
- Durch Zentrifugation für 30 min bei 13.000 Upm wird die DNA gefällt und das DNA-Präzipitat anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen.
- Die DNA wird im Vakuum-Konzentrator getrocknet und in 20 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert

### **3.6.7 Transformation in *E. coli***

#### **3.6.7.1 Ein-Minuten Transformation**

Zur Transformation in *E. coli* wird eine schnelle Ein-Minuten-Transformation durchgeführt, die aber aufgrund der niedrigen Effizienz nur für die Transformation von Plasmid-DNA geeignet ist. Enthält das zutransformierende Plasmid einen Kanamycin-Selektionsmarker ist diese Methode nicht effizient genug, um Kolonien zu erhalten.

- 7 µl DMSO kompetente *E. coli* Zellen werden auf Eis aufgetaut.
- Die Zellen werden mit 1 µl Plasmid-DNA (ca. 100 ng) gemischt.
- Der Ansatz wird für 1 min bei 42 °C erhitzt und sofort mit 100 µl LB-Medium versetzt und auf die entsprechende Selektionsplatte ausgestrichen.
- Die Platte wird über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### **3.6.7.2 Transformation durch Elektroporation**

Für Plasmid-DNA, die aus *S. cerevisiae* isoliert wurde, oder für Plasmide mit einem Kanamycin-Selektionsmarker wird die sehr effiziente *E. coli* Transformation durch Elektroporation genutzt.

- 10 µl elektrokompente Zellen pro Transformationsansatz werden auf Eis aufgetaut.

- Sterile Elektroporationsküvetten werden auf Eis vorgekühlt.
- 1-10  $\mu\text{l}$  DNA, 40  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O und 10  $\mu\text{l}$  elektrokompente Zellen werden auf Eis gemischt und das Zell/DNA-Gemisch wird in die eiskalten Küvetten pipettiert.
- Die Elektroporation erfolgt unter folgenden Bedingungen: Spannung 2,1 kV, Widerstand 200 Ohm, Kapazität 25kF (Bio-Rad Gene Pulser + Bio-Rad Pulse Controller).
- Der Ansatz wird mit 1 ml LB-Medium versetzt und 30-45 min bei 140 Upm und 37 °C inkubiert.
- Die Zellen werden für 5 s bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge pico) pelletiert und der Überstand wird abgekippt.
- Die Zellen werden in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und auf Selektionsplatten ausgestrichen.
- Die Inkubation der Platten erfolgt über Nacht bei 37 °C.

### 3.6.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

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

#### 3.6.8.1 Plasmid Minipräparation

- Eine *E. coli* Kultur wird in 2 ml LB-Flüssigmedium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum über Nacht bei 140 Upm und 37 °C angezogen.
- 1 ml der Kultur wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, pelletiert und der Überstand verworfen.
- Das Pellet wird in 300  $\mu\text{l}$  Puffer P1 mit RNase A (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) resuspendiert.
- Anschließend werden 300  $\mu\text{l}$  Puffer P2 zugegeben und durch mehrmaliges Invertieren gemischt.
- Danach werden 300  $\mu\text{l}$  Puffer P3 hinzugegeben und durch Schütteln gemischt.
- Der Ansatz wird anschließend für 10 min bei RT und 13.000 Upm abzentrifugiert.
- Der Überstand wird in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen.
- Durch Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Isopropanol zum Überstand und 20 minütiger Zentrifugation bei 13.000 Upm wird die Plasmid-DNA pelletiert.

- Der Überstand wird verworfen und das DNA-Pellet mit 500  $\mu\text{l}$  70 % Ethanol gewaschen.
- Nach einer erneuten Zentrifugation wird der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet.
- Die gewonnene Plasmid-DNA wird in 50-100  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

### 3.6.8.2 Plasmid Midipräparation

Für die saubere Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* wird eine 50 ml Übernachtkultur mit Hilfe des Plasmid Midi Kits der Firma Qiagen aufgereinigt.

### 3.6.9 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Spaltung von Plasmid-DNA und zur Überprüfung einer korrekten Integration nach einer homologen Rekombination werden Restriktionsendonukleasen mit Hersteller-spezifischen Puffern verwendet und die DNA für 2-5 h oder über Nacht verdaut. Die erhaltenen Fragmente werden im Agarosegel aufgetrennt und gegebenenfalls mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits aus dem Agarosegel eluiert.

### 3.6.10 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration isolierter Plasmid-DNA wird über spektralphotometrische Messung bei 260 nm, dem charakteristischen Absorptionsmaximum von DNA, von 1  $\mu\text{l}$  DNA-Lösung im NanoDrop bestimmt. Der Abgleich erfolgt gegen 1  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O. Das Absorptionsergebnis ist die Menge DNA in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in der Ausgangslösung. Die Reinheit der DNA-Lösung kann durch Messung des Quotienten zwischen der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt werden. Dieser Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### 3.6.11 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen von allen generierten Plasmiden, die zuvor mit Restriktionsenzymen überprüft wurden, werden von der Firma GATC-Biotech durchgeführt.

## 3.7 Biochemische Methoden

### 3.7.1 Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen

Durch Affinitätschromatographie können Fusionsproteine, die einen His<sub>6</sub>- oder GST-Tag tragen, mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose bzw. Glutathion-Agarose aus *E. coli* Zellextrakten aufgereinigt werden. Durch mehrmaliges Waschen des Trägermaterials werden Proteine ohne Tag entfernt. Im finalen Schritt werden die über den Tag gebundenen Proteine durch Zugabe eines spezifischen Kompetitors (Imidazol bzw. reduziertes Glutathion) vom Trägermaterial eluiert.

#### 3.7.1.1 Manuelle Aufreinigung von His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen unter denaturierenden Bedingungen

- Das Zellpellet einer 1 l Induktionskultur wird aufgetaut und in 20 ml Puffer B resuspendiert.
- Die Zellen werden auf dem Rad für mindestens 1 h oder über Nacht bei RT lysiert.
- Das Lysat wird 20 min bei 15000 U<sub>pm</sub> (Avanti J-25) zentrifugiert.
- Der geklärte Überstand wird mit 1 ml Ni-NTA-Agarose versetzt und auf dem Rad für 1 h bei RT inkubiert.
- Eine Säule wird mit einer Fritte bestückt, sodass die Ni-NTA-Agarose nicht durchlaufen kann.
- Die Säule wird mit dem Proteingemisch beladen und anschließend mit 10 ml Puffer B und 20 ml Puffer C + 50 mM Imidazol gewaschen.
- Das His<sub>6</sub>-Fusionsprotein wird mit 2 ml Puffer C + 500 mM Imidazol nach einer 5 minütigen Inkubation eluiert. Der Vorgang wird nochmal wiederholt.
- Nach Überprüfung der Elutionsfraktionen in einem Coomassie gefärbten SDS-Gel werden die Proteinproben zur Renaturierung in gekochten und wieder abgekühlten Dialysenschläuchen (Ausschlussgröße 12 -15 kDa) dialysiert. Die Dialyse erfolgt zweimal gegen jeweils 2 l PBS über Nacht bei 4 °C.

### 3.7.1.2 Manuelle Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen unter nativen Bedingungen

- Das Zellpellet einer 1 l Induktionskultur wird aufgetaut, in 20 ml PBS + 1 mM PMSF + 0,5 mg/ml Lysozym resuspendiert und die Lyse erfolgt für mindestens 1 h oder über Nacht auf Eis.
- Das Lysat wird in vorgekühlte Metallbecher überführt und 3 x 10 s mit dem Ultraschallstab auf Eis sonifiziert mit Pausen von 30 s zur Abkühlung des Lysates.
- Es folgt ein Zentrifugationsschritt für 20 min bei 15000 Upm (Avanti J-25) und 4 °C.
- 70 mg Glutathion-Agarose werden abgewogen, mit 200 ml/g ddH<sub>2</sub>O für 1 h bei RT aufgequollen und anschließend mit PBS gewaschen.
- Der geklärte Überstand wird mit der gequollenen Glutathion-Agarose versetzt und auf dem Rad für 1 h bei 4 °C inkubiert.
- Eine Säule wird mit einer Fritte bestückt, sodass die Agarose nicht durchlaufen kann.
- Die Säule wird mit dem Proteingemisch beladen, der Durchfluss wird gesammelt und erneut über die Säule geschickt.
- Die Säule wird zweimal mit 10 ml PBS gewaschen.
- Die Elution erfolgt mit 5 x 1 ml 50 mM Tris + 10 mM red. Glutathion (5 min Inkubationszeit vor der ersten Elution).

### 3.7.2 Proteinmengenbestimmung mittels Bradford-Reagenz

Die Proteinmengenbestimmung nach Bradford basiert auf einer spezifischen Farbreaktion, bei der Coomassie Brilliant Blau G250 verwendet wird. Dieser Farbstoff reagiert mit Proteinen und bildet Komplexe mit einem Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 595$  nm, während der ungebundene Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei 465 nm zeigt. Die Proteinmenge im Rohextrakt wird anhand der Adsorptionswerte einer erstellten Standardkurve bekannten Proteingehaltes (0  $\mu$ g - 10  $\mu$ g, in 2  $\mu$ g Schritten) mit Rinderserumalbumin (BSA) ermittelt. Je nach Proteinkonzentration werden  $800 - x$   $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 200  $\mu$ l Bradford-Reagenz und  $x$   $\mu$ l Proteinlösung gemischt ( $x = 1$  bis 10  $\mu$ l) und für 10 min bei RT inkubiert und die Absorption bei 595 nm mit dem Beckman DU-800 Spektralphotometer bestimmt.

Die Proteinendkonzentration bei Einsatz von 10  $\mu$ l Proteinlösung errechnet sich nach folgender Formel: Proteingehalt [ $\mu$ g/ml] = Absorption 595 nm x 18,64 x 100

### 3.7.3 Auftrennung von Proteinproben mittels SDS-PAGE

Durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) werden Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Dabei erhalten die Proteine durch gebundenes SDS eine negative Ladung, die proportional zu ihrem Molekulargewicht ist, sodass die SDS-Protein-Komplexe in der Gelmatrix nach ihrer molaren Masse aufgetrennt werden. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode nach Lämmli werden die Proteine zunächst in einem Sammelgel für eine saubere Bandenbildung konzentriert und dann in einem 10 %igen Trenngel aufgetrennt.

#### 3.7.3.1 Aufbereitung von Proteinen für SDS-Gelelektrophorese

- $x \mu\text{l}$  einer Proteinprobe wird auf  $32,5 \mu\text{l}$  mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt.
- Zur Probe werden  $12,5 \mu\text{l}$  Protein-Ladepuffer und  $5 \mu\text{l}$  1 M DTT zugegeben.
- Die Probe wird 10 min bei 100 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und 5 s bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) abzentrifugiert.

#### 3.7.3.2 Herstellen von SDS-Polyacrylamidgelen

Es werden kleine Proteingele mit den Maßen 7 x 9 cm hergestellt. Die Glasplatten und Abstandhalter werden vorher sorgfältig mit 70 %igen Ethanol und deion. H<sub>2</sub>O gereinigt und getrocknet.

##### Herstellung eines 10 %igen Trenngels:

- 6,7 ml Acrylamid (30:0.8), 5 ml Trenngelpuffer und 8,4 ml deion. H<sub>2</sub>O werden zusammenpipettiert und gut gemischt.
- Als letztes werden 200  $\mu\text{l}$  TEMED und 70  $\mu\text{l}$  Ammoniumpersulfat (10 %ige Stocklösung) hinzugegeben.
- Die Gelmasse wird zügig zwischen die Glas- und Aluminiumplatte bis 2 cm unter den oberen Rand gegossen.
- Das Gel wird mit Isopropanol überschichtet.
- Nach dem Auspolymerisieren wird der Isopropanol abgegossen und das Gel vorsichtig mehrfach mit deion. H<sub>2</sub>O gespült.

**Herstellung eines Sammelgels:**

- 1,5 ml Acrylamidlösung (30:0.8) werden mit 2,5 ml Sammelgelpuffer und 6 ml deion. H<sub>2</sub>O gemischt.
- Als letztes werden 200 µl 10 %ige Ammoniumpersulfatlösung und 20 µl TEMED hinzugegeben.
- Das Sammelgel wird auf das Trenngel gegossen und ein Kamm in das Sammelgel gesteckt, sodass sich Ladetaschen bilden können.
- Nach dem Auspolymerisieren kann der Kamm herausgezogen und die Ladetaschen mehrfach mit Laufpuffer gespült werden.

**3.7.3.3 SDS-Gelelektrophorese**

- Das Gel wird in die Apparatur eingespannt und beide Kammern mit Laufpuffer soweit gefüllt, dass das Gel Kontakt zum Laufpuffer hat.
- Die Proben (max. 25 µl/Ladetasche) werden aufgetragen.
- Als Größenstandard werden 5-7,5 µl PageRuler™ Prestained Protein Ladder bzw. PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder aufgetragen.
- Die Auftrennung erfolgte bei einer maximalen Stromspannung von 200 V (etwa 20 mA) für 1-2 h.

**3.7.4 Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliantblau**

- Das Proteingel wird in deion. H<sub>2</sub>O in der Mikrowelle bei 600 Watt für 20 s erhitzt und dann für 10 min unter leichtem Schwenken bei RT gewaschen. Dieser Vorgang wird ein weiteres Mal wiederholt.
- Anschließend wird das Proteingel mit der Färbelösung ebenfalls in der Mikrowelle bei 600 Watt für 20 s erhitzt und dann unter Schwenken solange bei RT inkubiert bis deutliche Proteinbanden auf dem Gel zu erkennen sind.
- Die Färbelösung wird vorsichtig abgenommen und kann wiederverwendet werden.
- Das Gel wird mit deion. H<sub>2</sub>O unter leichtem Schwenken gewaschen.

### 3.7.5 Westernblot und Immundetektion

Das Verfahren beruht auf dem Transfer von Proteinen aus einem Acrylamidgel auf eine PVDF-Membran, wodurch diese immobilisiert werden. Auf der Membran können dann spezifische Proteine mittels Antikörperreaktion nachgewiesen werden. Der Primär-Antikörper richtet sich spezifisch gegen das Protein oder einen Tag des Proteins. Der sekundäre Antikörper verstärkt das Signal und ist konjugiert mit alkalischer Phosphatase, die schließlich die Farbentwicklung katalysiert.

#### Proteintransfer auf eine PVDF-Membran:

- Zwei Filterpapiere und eine PVDF-Membran werden in der Größe des zu blottenden Gels vorbereiten.
- Die Filterpapiere werden in Transferpuffer inkubiert, während die PVDF-Membran zuerst in Methanol und anschließend in Transferpuffer gelegt wird.
- In folgender Reihenfolge wird der Blot luftblasenfrei auf eine Graphitplatte der Blotapparatur geschichtet: Filterpapier, Membran, SDS-Gel und zuoberst Filterpapier.
- Die zweite Graphitplatte wird aufgelegt und die Apparatur an die Stromquelle angeschlossen. Ein Gewicht von etwa 1 kg wird auf die Apparatur gestellt, um den Transfer zu begünstigen.
- Der Proteintransfer erfolgt bei 200 mA für 20-40 min.
- Anschließend wird die Membran 30 min bei RT in Blockierungslösung geschwenkt.

#### Immundetektion von Proteinen:

- Um spezifische Proteine auf einer PVDF-Membran zu detektieren wird die Membran für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C am Rad mit einem Primärantikörper in 5 ml Blockierungslösung inkubiert.
- Die Membran wird 3 x 10 min mit PBS schüttelnd gewaschen.
- Im Anschluss folgt die Inkubation der Membran für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit dem Sekundär-Antikörper in 5 ml Blockierungslösung.
- Anschließend wird die Membran erneut 3 x 10 min mit PBS gewaschen.
- Für die Farbentwicklung wird die Membran in 20 ml Farbsubstrat-Lösung (20 ml Detektionspuffer + 66 µl BCIP-Lösung [0,5 g BCIP in 5 ml DMF] + 66 µl NBT-Lösung [0,5 g NBT in 10 ml 70 %igem DMF]) inkubiert.
- Die Farbreaktion wird durch Waschen mit deion. H<sub>2</sub>O gestoppt.

### 3.7.6 Fraktionierung von infizierten Humanzellen

Die Fraktionierung von infizierten Humanzellen mittels Ultrazentrifugation dient der Separierung in lösliche (Zytosol und Inklusionslumen) und unlösliche Bestandteile (Kernfraktion, Membranen und Bakterien) und wird nach einem modifizierten Protokoll von Kiselev et al. 2009 durchgeführt. Mit Hilfe dieser Fraktionierungsmethode können Rückschlüsse auf die Lokalisation von Proteinen bzw. Proteinfragmenten gezogen werden. Hierfür werden die mit *C. pneumoniae* infizierten Humanzellen zu drei verschiedenen Infektionszeitpunkten (24, 48 und 72 hpi) geerntet und für die Präparation der löslichen und unlöslichen Fraktionen genutzt.

- HEp-2 Zellen werden in 32 kleine Flaschen (pro Infektionszeitpunkt) ausgesät und für 2 Tag im Inkubationsschrank bei 37 °C inkubiert.
- Die konfluenten Zellen werden mit einer MOI von 20 infiziert und nach 24, 48 bzw. 72 h oder ohne *C. pneumoniae* Infektion geerntet.
- Hierzu wird das Medium abgesaugt und in jede Flasche 1 ml PBS mit Proteaseinhibitor (1:100 Verdünnung) gegeben.
- Die Zellen werden mit einem sterilen Zellschaber abgekratzt und in ein 50 ml Falcon überführt.
- Die Zellen werden für 5 min bei 1000 x g (Hereaus Biofuge Primo R) und 4 °C pelletiert und mit 7 ml PBS + Proteaseinhibitor gewaschen und anschließend in 7 ml PBS + Proteaseinhibitor resuspendiert.
- Die Lyse erfolgt mit einem Dounce-Homogenisator auf Eis, wobei 20-mal der grobe Pistill und 20-mal der feine Pistill verwendet wird.
- Das Gesamtzellysate wird bei 125.000 x g für 1 h bei 4 °C in der Ultrazentrifuge (TLA100, Rotor SW40Ti) zentrifugiert.
- Der Überstand entspricht der löslichen Fraktion, während das Pellet die unlöslichen Bestandteile enthält.
- Das Pellet wird zweimal mit 7 ml PBS + Proteaseinhibitor gewaschen, anschließend in 7 ml PBS + Proteaseinhibitor resuspendiert und mit dem Dounce-Homogenisator 20-mal mit der groben Pistill und 20-mal mit der feinen Pistill auf Eis homogenisiert.
- Von beiden proteinhaltigen Fraktionen wird die gleiche Menge Protein in einem Westernblot analysiert.

### 3.7.7 Behandlung von *C. pneumoniae* EBs mit Detergenzien

- Für die Detergenzien-Behandlung werden gradientengereinigte *C. pneumoniae* EBs ( $10^6$  IFU/ml) verwendet.
- Jeweils 100  $\mu$ l gradientengereinigte EBs werden für 30 min bei 21885 g (15000 Upm / Hereaus Biofuge Primo R) und 4 °C in einem Reaktionsgefäß pelletiert.
- Das Pellet wird in 75  $\mu$ l PBS im Ultraschallbad resuspendiert und mit PBS oder Detergenzien (Endkonzentrationen: 1 % Triton X-100, 2 % Sarkosyl oder 1 % NP-40 + 50 mM DTT) auf 150  $\mu$ l aufgefüllt und für 1 h bei 37 °C inkubiert.
- Die Suspension wird für 1 h bei 100.000 x g (42.000 Upm, Ultrazentrifuge Beckman Optima MaxE, Rotor MLS50) und 4 °C pelletiert und der lösliche Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 57,7  $\mu$ l Protein-Ladepuffer und 23  $\mu$ l 1 M DTT zugefügt und 10 min bei 100 °C erhitzt.
- Das Chlamydienpellet wird in 150  $\mu$ l PBS, 57,7  $\mu$ l Protein-Ladepuffer und 23  $\mu$ l 1 M DTT resuspendiert und für 10 min bei 100 °C erhitzt.
- Für den Westernblot werden jeweils 20  $\mu$ l der Pelletfraktion und des Überstandes geladen und die Blots mit verschiedenen Antikörpern detektiert.

### 3.7.8 Markierung von Proteinen mit Biotin

Die Biotinylierung von Proteinen erfolgt durch EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin in einem 20 fachen molaren Überschuss.

- 2,2 mg Biotin werden kurz vor Gebrauch in 500  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.
- Von dieser 10 mM Biotin-Lösung werden x  $\mu$ l zu der Protein-Lösung gegeben. Die nötige Menge an Biotin-Lösung berechnet sich nach folgender Formel:  
$$x \mu\text{l Biotin-Lösung} = (x \text{ mg Protein} / x \text{ Da Protein-Molekulargewicht}) \times 20 \times 100000$$
- Die Protein/Biotin-Lösung wird für 2 h auf Eis inkubiert.
- Anschließend wird die Reaktion mit 1 M Tris pH 7,5 bei einer Endkonzentration von 50 mM Tris gequencht.
- Die Lösung wird in einen Dialyseschlauch (Ausschlussgröße 12 -15 kDa) gefüllt und das biotinylierte Protein gegen 2 l PBS über Nacht bei 4 °C dialysiert.

### 3.7.9 Markierung von Proteinen und Antikörpern mit FITC

Eine Markierung von rekombinanten Proteinen für Interaktionsstudien bzw. von Antikörpern für Lokalisationsstudien wird mit NHS-Fluorescein in einem 20-fach molaren Überschuss durchgeführt.

- 1 mg NHS-Fluorescein wird kurz vor Gebrauch in 100 µl DMSO resuspendiert.
- Für die Markierung von Proteinen wird folgende Menge an Fluorescein-Lösung zu der Protein-Lösung gegeben:  
$$x \text{ µl FITC-Lösung} = (x \text{ mg Protein} / x \text{ Da Protein Molekulargewicht}) \times 20 \times 47340$$
- Für die Markierung von Antikörpern wird Antigen-gereinigte und dialysierte Antikörper-Lösung benötigt. Es wird folgende Menge an Fluorescein-Lösung zu dem Antikörper gegeben:  
$$x \text{ µl FITC-Lösung} = (x \text{ mg Protein} / 150000 \text{ Da IgG Molekulargewicht}) \times 20 \times 47340$$
- Die Lösung wird für 2 h auf Eis inkubiert.
- Anschließend wird die Reaktion mit 1 M Tris pH 7,5 bei einer Endkonzentration von 50 mM Tris gequenchet.
- Die Lösung wird in einen Dialyseschlauch (Ausschlussgröße 12 -15 kDa) gefüllt und gegen 2 l PBS über Nacht bei 4 °C dialysiert.

### 3.7.10 Interaktionsstudien

#### 3.7.10.1 Protein-Protein-Interaktionsüberprüfung mittels Far-Westernblot

Zur Detektion direkter Protein-Protein Interaktionen zwischen zwei möglichen Interaktionspartnern *in vitro* werden Far-Westernblot Analysen eingesetzt (Wu, Li et al. 2007). Hierfür werden Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran gebロットet. Die immobilisierten Proteine werden mit 6 M Guanidin-HCl zunächst komplett denaturiert und dann mit schrittweise abnehmender Konzentration an Guanidin-HCl renaturiert und so die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins wiederhergestellt.

Nun wird die Membran mit nativem, EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin-markiertem Protein (3.7.8) inkubiert und mit einem Streptavidin-konjugiertem Antikörper die Interaktion auf der Membran detektiert.

In dieser Arbeit wird 1 µg Protein als Target auf der Membran renaturiert und mit 3 ml 2 µg/ml biotinyliertem His-Fusionsprotein über Nacht bei 4 °C inkubiert.

<b>Guanidin-HCl (M)</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>0,1</b>	<b>0</b>
Glyzerin (ml)	5	5	5	5	5
5 M NaCl (ml)	1	1	1	1	1
1 M Tris pH 7,5 (ml)	1	1	1	1	1
0,5 M EDTA (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
10 % Tween-20 (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Milchpulver (g)	1	1	1	1	1
1 M DTT (ml)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
8 M Guanidin-HCl (ml)	37,5	18,6	6,3	0,6	0
ddH <sub>2</sub> O (ml)	4,9	12,8	36	41,8	42,4
Total (ml)	50	50	50	50	50
Zeit/Temperatur	30min/RT	30min/RT	30min/RT	30min/4°C	ü.N./4°C

### 3.7.10.2 Co-Immunpräzipitation von biotinylierten und FITC-markierten

#### Proteinen

Zur Untersuchung von Interaktionen zwischen zwei rekombinanten Proteinen wird eine Co-Immunpräzipitation mittels Streptavidin Agarose nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wird das eine zu testende Protein biotinyliert und an die Streptavidin-Agarose gebunden, während das andere Protein mit NHS-Fluorescein markiert und anschließend mit dem immobilisierten Protein inkubiert wird. Die Menge an gebundenem FITC-gelabelten Protein wird mittels Fluoreszenz-Messung bei 493 nm ermittelt.

- Rekombinantes Protein werden entweder mit EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin (3.7.8) oder NHS-Fluorescein (3.7.9) in einem 20 fach molaren Überschuss markiert.
- 100 µl Streptavidin Agarose werden in eine Mini-Zentrifugationssäule pipettiert und dreimal mit 500 µl PBS gewaschen.
- Die Säule wird verschlossen und 150 µg biotinyliertes Protein zu der Streptavidin Agarose gegeben.
- Die Inkubation erfolgt für 10 min bei RT am Rad.
- Anschließend wird die Säule viermal mit 500 µl PBS gewaschen, erneut verschlossen und danach mit 150 µg FITC-markiertem Protein befüllt.
- Nach einer Inkubation für 2 h bei RT am Rad, wird zweimal mit 500 µl PBS gewaschen und mit 100 µl 8 M Guandidin-HCl pH 1,5 eluiert.
- Die Fluoreszenz-Messung der Probe erfolgt mittels NanoDrop bei 493 nm.

### 3.7.10.3 Co-Immünpräzipitation von chlamydialen Proteinen nach Behandlung von *C. pneumoniae* EBs mit Detergenzien

- 100  $\mu$ l gradientengereingte EBs ( $10^6$  IFU/ml) werden für 30 min bei 21885 g (15000 Upm / Hereaus Biofuge Primo R) und 4 °C in einem Reaktionsgefäß pelletiert.
- Das Pellet wird in 150  $\mu$ l Phospho-Lysis-Puffer mit Proteaseinhibitor (1:100 Verdünnung) resuspeniert und für 30 min bei 37 °C inkubiert.
- Die Suspension wird für 1 h bei 100.000 x g (42.000 Upm, Ultrazentrifuge Beckman Optima MaxE, Rotor MLS50) und 4 °C pelletiert und der lösliche Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.
- 50  $\mu$ l Protein-G-Agarose werden zweimal mit 1 ml PBS gewaschen.
- Der aus der Ultrazentrifugation resultierende Überstand wird mit 2  $\mu$ g Antikörper für 1 h bei 4 °C am Rad vorinkubiert und anschließend wird die gewaschene Protein-G-Agarose hinzugefügt.
- Nach einer Inkubation über Nacht bei 4 °C am Rad, wird das Gemisch in eine Mini-Zentrifugationssäule pipettiert und dreimal mit 500  $\mu$ l PBS gewaschen.
- Der Antikörper-Antigen-Komplex wird zweimal mit 50  $\mu$ l Glycin pH 2,5 für 5 min eluieren und die beiden Elutionsfraktionen werden vereinigt.
- Das Eluat wird mit 10  $\mu$ l 1 M Tris pH 9 zur Neutralisation, sowie 38,75  $\mu$ l Protein-Ladepuffer und 15,5  $\mu$ l 1 M DTT gemischt, für 10 min gekochen und im Westernblot untersucht.

### 3.7.10.4 Rezeptor-Pulldown Experimente mit rekombinanten Proteinen

Für Interaktionsanalysen werden rekombinante Proteine mit adhärenenten HEp-2 Zellen inkubiert und gebundenes Protein auf der Oberfläche der Zellen mit dem membranunlöslichen und spaltbaren Crosslinker DTSSP vernetzt. Anschließend wird mittels Phospho-Lysis-Puffer und Sonifikation ein Zelllysat generiert, welches in einem Pulldown-Experiment eingesetzt wird.

- Zwei konfluente 25 cm<sup>2</sup> Flaschen mit HEp-2 Zellen werden mit je 4 ml VSV-Fusionsprotein (50  $\mu$ g/ml) pro Flasche bzw. mit PBS als Kontrolle für 1 h bei 37 °C inkubiert.
- Die Lösung wird abgenommen und die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen.
- Es folgt eine Inkubation mit je 4 ml 2 mM DTSSP in PBS pro Flasche für 30 min bei RT.

- Der Crosslinker wird abgenommen und die Zellen werden anschließend zweimal mit je 4 ml 50 mM Tris pH 7,5 pro Flasche gewaschen.
- Die Zellen werden in je 4 ml 50 mM Tris pH 7,5 pro Flasche mit einem Zellschaber abgelöst und die Zellsuspension beider Flaschen in einem 50 ml Falcon vereinigt.
- Die Zellsuspension wird für 10 min bei 2800 Upm und 4 °C sedimentiert und das Pellet in 500 µl Phospho-Lysis-Puffer mit Proteaseinhibitor (1:100 Verdünnung) resuspendiert und für 10 s mit dem Ultraschallstab (10 % Leistung) auf Eis sonifiziert.
- Das Lyse erfolgt für 30 min auf Eis.
- 50 µl Protein-G-Agarose werden zweimal mit 1 ml PBS gewaschen.
- Das Zellysate wird mit 2 µg Antikörper für 1 h bei 4 °C am Rad vorinkubiert und anschließend wird die gewaschene Protein-G-Agarose hinzugefügt.
- Nach einer Inkubation über Nacht bei 4 °C am Rad, wird das Lysat/Agarose Gemisch in eine Mini-Zentrifugationssäule pipettiert und dreimal mit 500 µl PBS gewaschen.
- Der Antikörper-Antigen Komplex wird zweimal mit 50 µl Glycin pH 2,5 für 5 min eluieren und die beiden Elutionsfraktionen werden vereinigt.
- Das Eluat wird mit 10 µl 1 M Tris pH 9 zur Neutralisation, sowie 38,75 µl Protein-Ladepuffer und 15,5 µl 1 M DTT gemischt, für 10 min gekochen und im Westernblot untersucht.

### **3.7.11 Beschichtung und Beschichtungskontrolle von Latexkugeln**

Mit Hilfe von Latexkugeln können die Adhäsionseigenschaften von chlamydialen Proteinen an eukaryotische Zellen in Abwesenheit anderer bakterieller Faktoren untersucht werden. Hierfür werden grün bzw. blau fluoreszierende 1 µm Latexkugeln verwendet, deren Proteinbeschichtung kovalent erfolgt (Dersch and Isberg 1999).

#### **3.7.11.1 Beschichtung von Latexkugeln mit Protein**

- 10<sup>9</sup> carboxylierte Latexkugeln werden in 1 ml PBS für 5 min bei 12000 Upm (Heraeus Biofuge Pico) pelletiert und danach erneut mit 1 ml PBS gewaschen.
- Die Latexkugeln werden in 1 ml Bead-Kopplungspuffer resuspendiert und für 5 min bei 12000 Upm zentrifugiert.
- Anschließend werden die Latexkugeln in 100 µl Kopplungspuffer resuspendiert.
- Zu der Suspension wird native Proteinlösung und Kopplungspuffer zugegeben, so dass die Endkonzentration 25-200 µg/ml in einem Endvolumen von 200 µl beträgt.

- Es folgt eine Inkubation für 1 h bei 37 °C.
- 500 µl Bindungspuffer werden hinzupipettiert, die Suspension wird für 1 min im Ultraschallwasserbad sonifiziert und 500 µl BSA (40 mg/ml in Bindungspuffer) zugegeben.
- Die proteinbeschichteten Latexkügelchen werden 5 min bei 12000 Upm pelletiert und mit 1 ml BSA (1 mg/ml in PBS) gewaschen.
- Die Latexkügelchen werden in 500 µl BSA (0,2 mg/ml in PBS) resuspendiert und bei 4 °C gelagert.

### 3.7.11.2 Überprüfung der Beschichtungsqualität

Die Proteinbeschichtung von Latexkügelchen wird mittels Westernblot-Analyse überprüft.

- $2 \times 10^7$  proteinbeschichtete Latexkügelchen werden für 5 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge Pico) sedimentiert.
- Der Überstand wird abgenommen und die Latexkügelchen werden in 13 µl ddH<sub>2</sub>O, 5 µl Protein-Ladepuffer und 2 µl 1 M DTT resuspendiert.
- Die Probe wird 10 min bei 100 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt.
- Die Probe wird vollständig auf ein SDS-Gel geladen und mittels Westernblot analysiert.

### 3.7.12 Generierung eines polyklonalen N-Pmp21 Antikörpers

Für die Immunisierungen von Kaninchen wurde rekombinantes N-Pmp21<sub>His6</sub> Fusionsprotein unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt und gegen PBS dialysiert. Die Immunisierungen und die Gewinnung des polyklonalen Serums wurden von der Firma Eurogentec in Belgien vorgenommen.

Für einen Antikörper werden insgesamt 800 µg Protein benötigt, da jeweils 4 aufeinanderfolgende Immunisierungen an zwei unterschiedlichen Kaninchen durchgeführt werden und pro Injektion 100 µg Protein verwendet werden. Dazu werden 600 µg Protein über ein 10 %iges Coomassie gefärbtes SDS-Gel aufgetrennt und das Volllängenprotein aus dem Gel ausgeschnitten und für die ersten 3 Immunisierungen verwendet. Die letzte Immunisierung erfolgt mit jeweils 100 µg nativer Proteinlösung.

### 3.7.13 Aufreinigung polyklonaler Antikörper mittels NHS-Sepharose

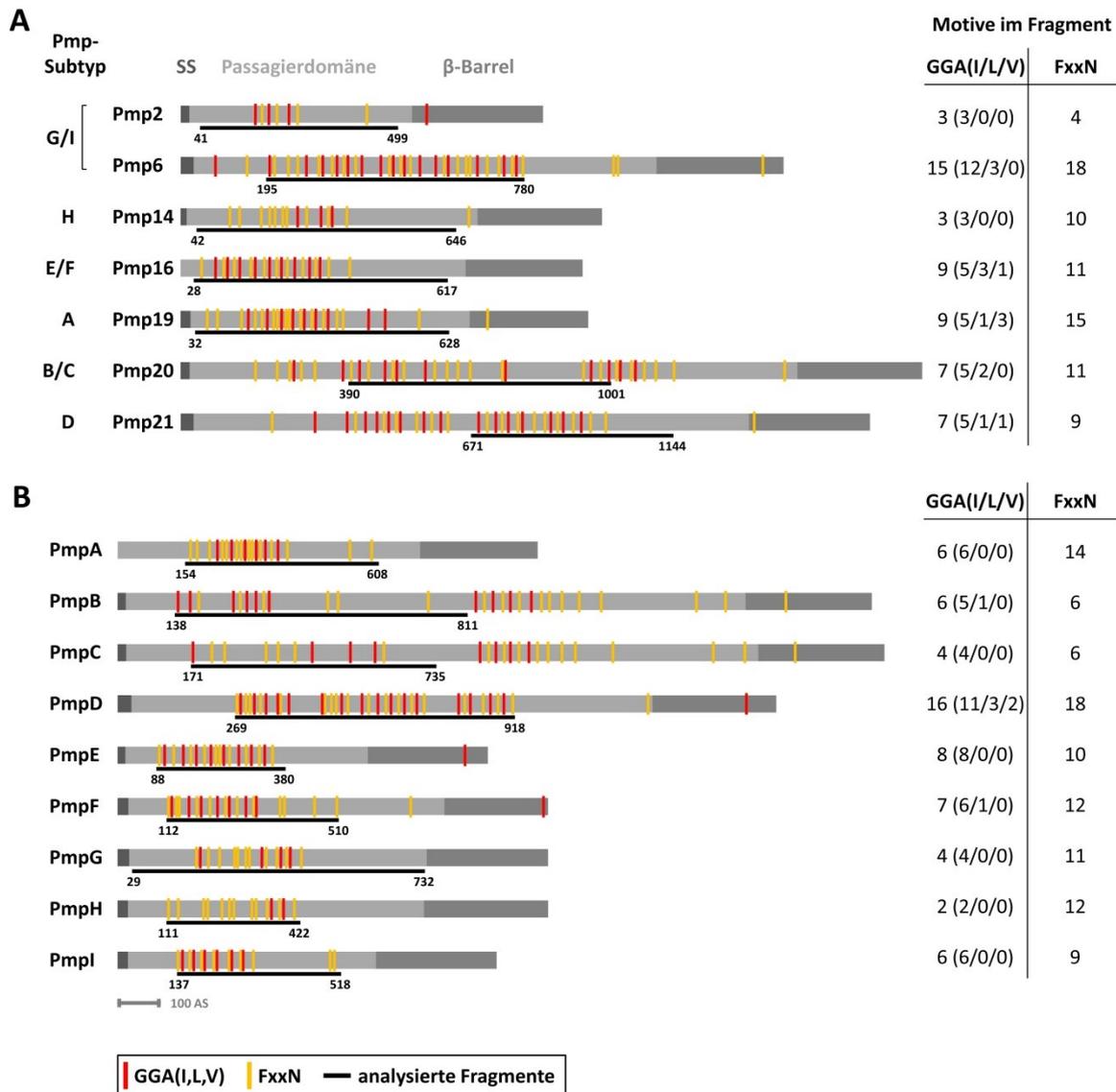
Um die Spezifität und Reinheit der polyklonalen Antikörper zu erhöhen, wird durch Verwendung von NHS-aktivierter Sepharose eine Antigenreinigung des Serums durchgeführt. Dabei bildet NHS (N-Hydroxysuccinimid) eine chemische stabile Amidbindung mit primären Aminogruppen von Proteinliganden aus. Das entsprechende rekombinante Protein wird an die NHS-Sepharose in einer Säule gekoppelt und die Säule anschließend mit dem Serum inkubiert. Es binden nur die für das Protein spezifischen Antikörper und der Antikörper kann durch Elution des Proteins gewonnen werden. Für die Aufreinigung von 3 ml Serum werden 1,5 ml NHS-Sepharose und 1,5 mg rekombinantes Protein eingesetzt.

- 1,5 ml NHS-Sepharose werden in eine leere Säule mit Fritte geben und durch Zugabe von 20 ml kaltem 1 mM HCl das Isopropanol herauswaschen.
- Die NHS-Sepharose wird mit 10 ml Kopplungspuffer (0,2 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8,3) gewaschen.
- 1,5 mg Proteinlösung in PBS wird mit demselben Volumen an Kopplungspuffer gemischt und die verschlossene Säule über Nacht bei 4 °C auf dem Rad inkubiert.
- Um nicht-reagierte Gruppen zu blockieren, werden 4 ml Blockierungslösung (0,5 M Ethanolamin, 0,1 M Tris pH 8,5) zugefügt und 4 h bei 4 °C auf dem Rad inkubiert.
- Es wird 3 x alternierend mit 1,5 ml Puffer 1 (0,1 M Tris pH 8,0) und 1,5 ml Puffer 2 (0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl pH 4,0) gewaschen.
- 3 ml polyklonales Antikörperserum werden in 8 ml 0,1 M Tris pH 8,0 auf die Säule gegeben und 4 h bei 4 °C auf dem Rad inkubiert.
- Es wird mit 10 ml 10 mM Tris pH 7,5 und 10 ml 500 mM NaCl gewaschen.
- Die 1. Elution des Antikörpers erfolgt mit 2 x 2 ml 100 mM Glycin pH 2,5 für 5 min (saure Elution) und die Eluate werden jeweils in 0,2 ml 1 M Tris pH 9,0 auffangen um den pH-Wert zu neutralisieren.
- Die 2. Elution des Antikörpers erfolgt mit 2 x 2 ml 0,1 M Triethanolamin pH 11,5 für 5 min (basische Elution) und die Eluate werden jeweils in 0,2 ml 1 M Tris pH 8,0 auffangen um den pH-Wert zu neutralisieren.
- Eine Absorptionsmessung bei 280 nm mittels Nano-Drop zeigt, wieviel mg/ml Antikörper sich in den Elutionen befindet.  
Dabei gilt: 1 OD<sub>280</sub> = 0,75 mg/ml Immunglobulin (Harlow and Lane 1999)
- Der gereinigte Antikörper wird portioniert und bei -20 °C gelagert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* Pmps besitzen adhäsive Eigenschaften

Die Oberflächenproteine Pmp6, Pmp20 und Pmp21 wurden in vorherigen Studien als bakterielle Adhäsine identifiziert, die an der Bindung von *C. pneumoniae* an humane Epithelzellen beteiligt sind (Moelleken, Schmidt et al. 2010). Dies bedeutet jedoch nicht zwangsläufig, dass alle chlamydialen Pmps als Adhäsine fungieren. Sequenzvergleiche von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* Pmps zeigten signifikante Aminosäureidentitäten zwischen paralogen und orthologen Pmps innerhalb eines Pmp-Subtyps. So wurde beispielsweise für die paralogen Proteine Pmp16 und Pmp18 von *C. pneumoniae* eine Aminosäureidentität von 49 % und für die orthologen Proteine Pmp20 von *C. pneumoniae* und PmpB von *C. trachomatis* eine Aminosäureidentität von 39 % bestimmt (Abb. 1.5). Andererseits zeigen Pmps verschiedener Subtypen nur geringe Identitäten, wie z.B. PmpC und PmpE mit einer Aminosäureidentität von nur 13 %. Aufgrund dieser großen Diversität zwischen den Pmps war es unklar, ob die Pmps der übrigen Pmp-Subtypen von *C. pneumoniae* und die Pmps von *C. trachomatis* als Adhäsine fungieren. Um die Rolle der Pmps im chlamydialen Adhäsionsprozess näher zu betrachten, wurden repräsentative Kandidaten jedes Pmp-Subtyps von *C. pneumoniae* GiD und alle neun Pmps von *C. trachomatis* Serovar E auf eine Bindungsfähigkeit an humane Zellen untersucht. Hierbei wurden nicht die Vollängen-Pmps, sondern Fragmente der Passagierdomäne ohne die N-terminale Signalsequenz, die den Transport von Proteinen über die bakterielle Innenmembran ins Periplasma vermittelt, und ohne den C-terminalen  $\beta$ -Barrel, der eine Verankerung von Proteinen in der bakteriellen Außenmembran ermöglicht, analysiert. Da die repetitiven und für alle Pmps charakteristischen Motive GGA(I,L,V) und FxxN als essentiell für den Bindungsprozess von Pmp21 identifiziert werden konnten (Schmidt 2009; Moelleken, Schmidt et al. 2010), wurden jeweils Regionen der Passagierdomäne der verschiedenen Pmps ausgewählt, die eine signifikante Anzahl der Motive aufweisen. Ein maximales theoretisches Molekulargewicht von ca. 70 kDa stellte ein weiteres Kriterium für die Auswahl der Proteinfragmente für die Funktionsstudien dar (Abb. 4.1), da bereits in früheren Analysen beobachtet werden konnte, dass größere Proteine eine höhere Anfälligkeit für eine Degradation aufwiesen (Schmidt 2009).



**Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der analysierten Pmps.**

Abgebildet sind in **(A)** die repräsentativen Kandidaten aller sechs Pmp-Subtypen von *C. pneumoniae* GID und in **(B)** alle neun Pmps von *C. trachomatis* Serovar E. Die charakteristische Drei-Domänen-Struktur der Pmps mit der N-terminalen Signalsequenz (SS), der Passagierdomäne und der C-terminalen β-Barrel-Domäne ist durch Rechtecke in verschiedenen Grautönen angezeigt. Die Position der Tetrapeptid-Motive GGA(I,L,V) und FxxN ist durch rote und gelbe Linien markiert. Die Motiv-Anzahl in den analysierten Fragmenten ist in der rechten Tabelle aufgeführt, wobei in Klammern die jeweilige Anzahl der Motive GGAI, GGAL und GGAV dargestellt ist. Die analysierten Proteinfragmente sind durch schwarze Linien mit den entsprechenden N- und C-terminalen Aminosäuren gekennzeichnet.

#### 4.1.1 Nachweis der adhäsiven Eigenschaft Aga2p-Pmp exprimierender Hefezellen an humane Zellen

Zur Charakterisierung der adhäsiven Eigenschaften der Pmps wurde das bereits etablierte „yeast surface display system“ genutzt, mit dessen Hilfe die zu untersuchenden Proteine über

den stark O-glykosylierten  $\alpha$ -Agglutininrezeptor auf der Oberfläche von Hefezellen präsentiert werden (Abschnitt 3.2.1) (Moelleken and Hegemann 2008; Moelleken, Schmidt et al. 2010). Die zu analysierenden Fragmente der *pmp* Gene wurden einzeln mittels homologer Rekombination in den Expressionsvektor pYD1 integriert, der für die Aga2p-Untereinheit des  $\alpha$ -Agglutininrezeptors kodiert. Im Folgenden wurden die Plasmid-Konstrukte in den Hefestamm YKM2 transformiert, der eine im Genom integrierte GFP-Kassette unter Kontrolle des *MET25*-Promotors aufweist. Die Kultivierung der Hefen erfolgte in SD-Minimalmedium ohne Methionin zur GFP-Induktion und ohne Tryptophan zur Selektion auf das pYD1-Plasmid. Um die Expression der Aga2p-Fusionsproteine, die der Kontrolle des *GAL1*-Promotors unterliegt, zu ermöglichen, wurde Induktionsmedium mit Galaktose verwendet. Damit der *GAL1*-Promotor nicht reprimiert wird, musste das Induktionsmedium frei von Glukose sein. Daher wurden die Hefezellen zunächst in Medium mit Raffinose als Kohlenstoffquelle kultiviert und anschließend in Medium mit Galaktose überimpft. Lebende Hefezellen können während einer Inkubation mit humanen Epithel- oder Endothelzellen über die oberflächenlokalisierten Fusionsproteine interagieren, so dass die Anzahl der gebundenen Hefezellen die Bindungsstärke der zu untersuchenden Proteine repräsentiert. Aga2p-präsentierende Hefen dienten als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurde das Fusionsprotein Aga2p-Pmp21 verwendet, welches in vorherigen Analysen starke Adhäsion an Humanzellen gezeigt hatte (Schmidt 2009; Moelleken, Schmidt et al. 2010).

#### **4.1.1.1 Repräsentative Kandidaten aller Pmp-Subtypen von *C. pneumoniae* zeigen ähnliche Adhäsivität im Hefeoberflächen-Präsentationssystem**

Zur Analyse der Adhäsivität von *C. pneumoniae* Pmps wurden die angegebenen Fragmente der repräsentativen Kandidaten aller sechs Pmp-Subtypen von *C. pneumoniae* (Abb. 4.1 A) an den C-Terminus der Aga2p-Untereinheit des  $\alpha$ -Agglutininrezeptors von *S. cerevisiae* fusioniert. Zunächst wurde mittels Westernblot-Analyse die Expression der Aga2p und Aga2p-Pmp-Fusionsproteine in den Hefezellen kontrolliert. Dabei diente ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel als Ladekontrolle (Abb. 4.2 A). Da das Aga2p Protein stark O-glykosyliert vorliegt (Shen, Wang et al. 2001), wurden die Proteinextrakte zuvor einer  $\alpha$ -Mannosidase Behandlung zur Deglykosylierung unterzogen. Das Aga2p Protein (theor. MW: 19 kDa) zeigte einen Schmier auf der Höhe von 35-40 kDa (Abb. 4.2 B). Auch die Fusionsproteine zeigten jeweils einen Schmier und liefen deutlich höher als erwartet, was wahrscheinlich auf eine unvollständige Deglykosylierung des Aga2p Proteins bei der  $\alpha$ -Mannosidase Behandlung zurückzuführen ist. Ferner waren deutliche Expressionsunterschiede zwischen den Fusionsproteinen zu

beobachten. So wiesen die Fusionsproteine Aga2p-Pmp2 und Aga2p-Pmp21 eine starke Expression auf, vergleichbar zu der Negativkontrolle Aga2p. Dagegen wurden die übrigen Aga2p-Pmp Fusionsproteine schwächer in den Hefezellen exprimiert.

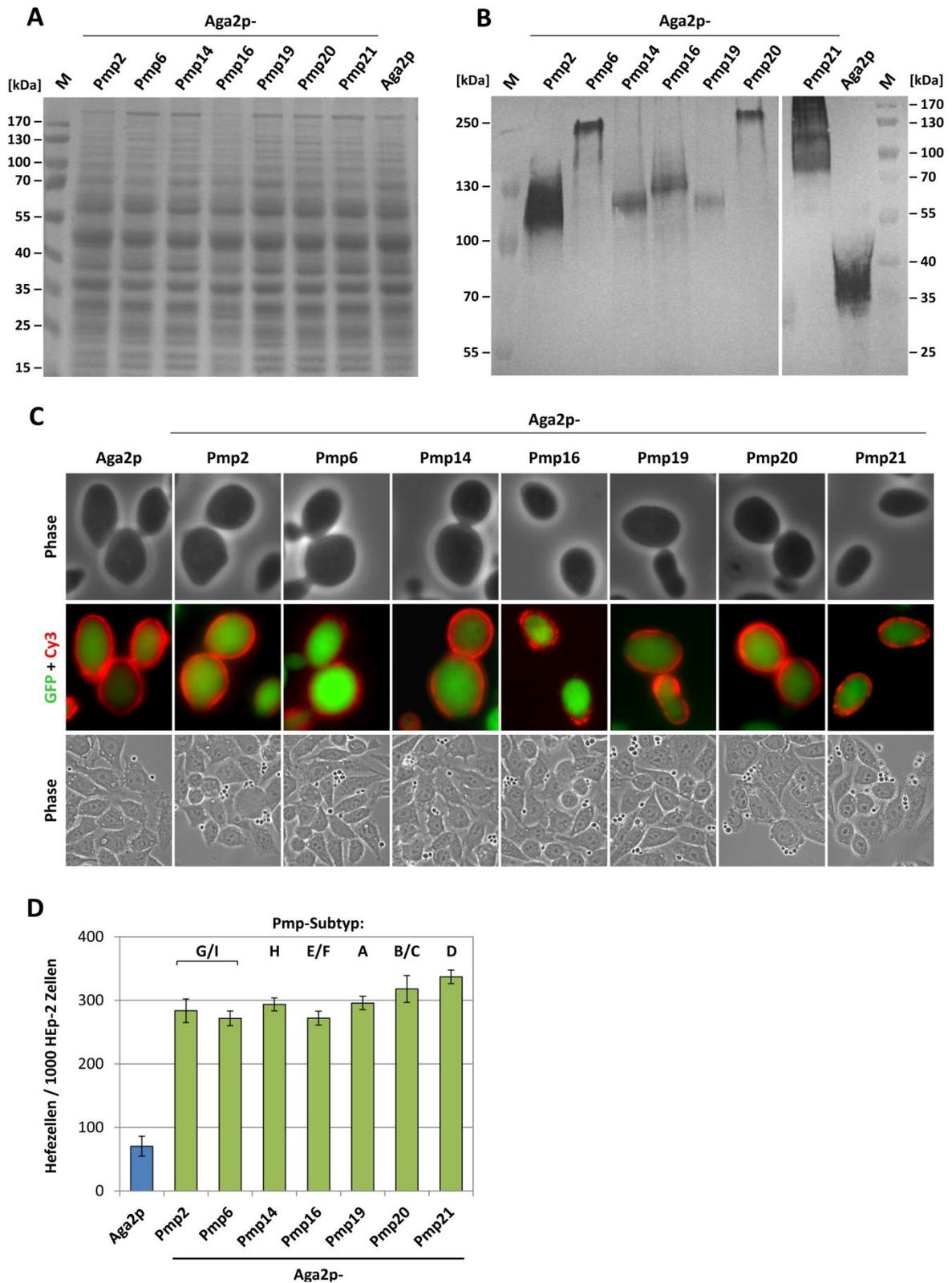


Abbildung 4.2: *C. pneumoniae* Pmp präsentierende Hefezellen binden an Humanzellen.

**A)** Coomassie-gefärbtes SDS-Gel von  $\alpha$ -Mannosidase behandelten Hefezelleextrakten als Ladekontrolle. Die Expressionsvektoren wurden in den Hefestamm YKM2 transformiert. Die Anzucht der Induktionskulturen erfolgte für 24 h in SD Trp<sup>-</sup>, Met<sup>-</sup>, 2 % Raffinose und für weitere 24 h in SD Trp<sup>-</sup>, Met<sup>-</sup>, 2 % Galaktose. Für die  $\alpha$ -Mannosidase Behandlung wurden 10 OD<sub>600</sub> Hefezellen mit Glasperlen aufgeschlossen und mit 1 U  $\alpha$ -Mannosidase für 2 h bei 37 °C inkubiert. Der Zellextrakt (200  $\mu$ l) wurde mit 50  $\mu$ l Protein-Ladepuffer und 20  $\mu$ l DTT aufgekocht und 20  $\mu$ l der Probe auf ein SDS-Gel geladen.

**B)** Westernblot zur Kontrolle der Expression von Aga2p und Aga2p-Pmp-Fusionsproteinen. Die Hefezelleextrakte wurden nach der  $\alpha$ -Mannosidase Behandlung gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion des C-terminalen His<sub>6</sub>-Tags von Aga2p und Aga2p-Fusionsproteinen erfolgte mittels  $\alpha$ -His5 (1:2500) und AP-konjugiertem  $\alpha$ -Maus Antikörper (1:7500). Theor. MW: Aga2p-Pmp2 69 kDa, Aga2p-Pmp6 126 kDa, Aga2p-Pmp14 84 kDa, Aga2p-Pmp16 84 kDa, Aga2p-Pmp19 86 kDa, Aga2p-Pmp20 159 kDa, Aga2p-Pmp21 133 kDa, Aga2p 19 kDa. M: Größenstandard

**C)** Phasenkontrast- (oben) und Immunfluoreszenzmikroskopie (mittig) von Aga2p bzw. Aga2p-Fusionsprotein-exprimierenden grünfluoreszierenden Hefezellen nach Methanol-Fixierung (63 x Vergrößerung). Die Detektion des C-terminalen V5-Tags von Aga2p und Aga2p-Fusionsproteinen erfolgte mittels  $\alpha$ -V5 (1:500) und  $\alpha$ -Maus Cy-3 (1:200). Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen (unten) des Hefe-Adhäsionstests (20 x Vergrößerung).

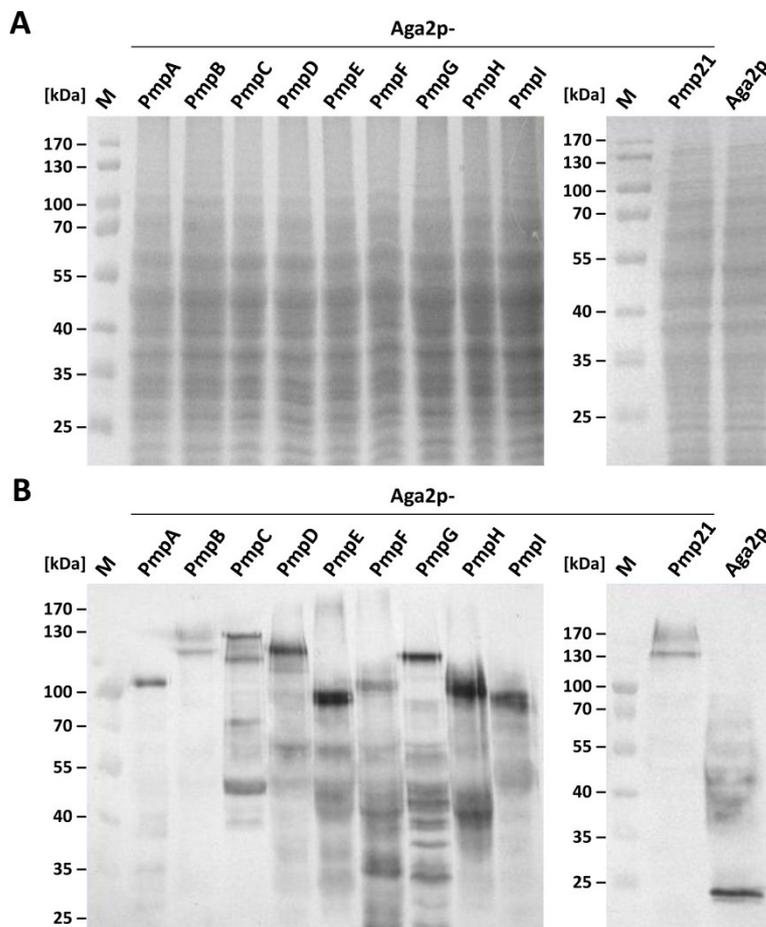
**D)** Quantifizierung der Hefe-Adhäsionstests. Hefezellen wurden im 10-fachen Überschuss mit HEp-2 Zellen für 1 h bei RT inkubiert, die ungebundenen Hefezellen mit PBS gewaschen und bei jeweils 1000 HEp-2 Zellen die daran gebundenen Hefen mikroskopisch bestimmt (n=3).

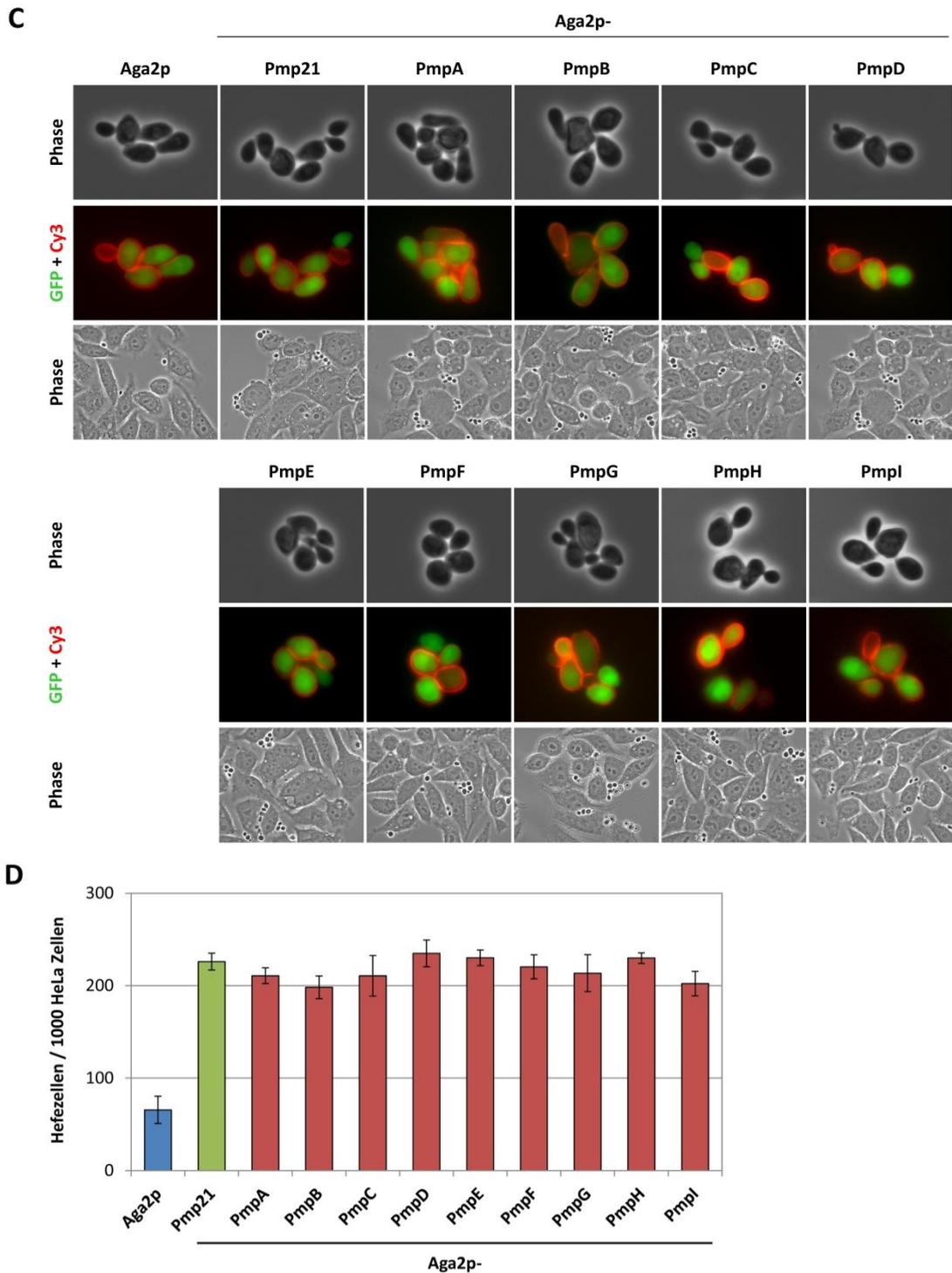
Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde die Oberflächenexpression von Aga2p und den Aga2p-Pmp Fusionsproteinen auf Methanol-fixierten Hefezellen nachgewiesen (Abb. 4.2 C). Die Antikörperfärbung führte zu einer intensiven Färbung der gesamten Zelloberfläche der Hefen, wobei für alle Aga2p-Pmp Konstrukte eine ähnliche Signalintensität zu beobachten war. Folglich wurden die Fusionsproteine trotz unterschiedlich starker Expression in vergleichbarer Menge auf der Hefeoberfläche präsentiert. Somit ist ein direkter Vergleich der Bindungsstärken der verschiedenen Konstrukte möglich.

Bei der Untersuchung der adhäsiven Eigenschaften der Proteine im Hefe-Adhäsionstest zeigten die Aga2p-exprimierenden Hefezellen mit  $70 \pm 16$  gebundenen Hefen pro 1000 HEp-2 Zellen eine schwache unspezifische Bindung an die Humanzellen (Abb. 4.1 D). Im Vergleich dazu wiesen alle Aga2p-Pmp präsentierenden Hefezellen mit ca. vierfach mehr gebundenen Hefen eine signifikante Adhäsion an die Humanzellen auf. Die Adhäsionsstärke der verschiedenen Aga2p-Pmp-Fusionsproteine war ähnlich, wobei Aga2p-Pmp6 und Aga2p-Pmp16 mit  $272 \pm 12$  gebundenen Hefen die schwächste Adhäsion und Aga2p-Pmp21 mit  $337 \pm 11$  gebundenen Hefen die stärkste Adhäsion aufwiesen. Folglich zeigten die repräsentativen Kandidaten aller sechs Pmp-Subtypen von *C. pneumoniae* vergleichbare adhäsive Eigenschaften im Hefe-Adhäsionstest.

#### 4.1.1.2 Alle neun *C. trachomatis* Pmps adhären mit ähnlicher Stärke an Humanzellen

Sequenzvergleiche von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* Pmps zeigten signifikante Aminosäureidentitäten zwischen den orthologen Pmps innerhalb eines Pmp-Subtyps (Abb. 1.5). Da für die *C. pneumoniae* Pmps aller sechs Pmp-Subtypen adhäsive Eigenschaften im Hefe-Adhäsionstest identifiziert wurden (Abb. 4.2), wäre eine Adhäsion-Funktion der orthologen Pmps von *C. trachomatis* durchaus denkbar. Andererseits wiesen Pmps verschiedener Subtypen mit Aminosäureidentitäten unter 25 % eine deutliche Heterogenität auf (Abb. 1.5). Um zu überprüfen, ob eine gemeinsame und demnach Spezies-unabhängige Funktion der Pmps vorliegt, wurde erstmalig die Adhäsivität aller neun *C. trachomatis* Serovar E Pmps analysiert. Hierzu wurden die angegebenen Fragmente der *C. trachomatis* Pmps PmpA-PmpI (Abb. 4.1 B) auf der Hefe-Oberfläche präsentiert. Ferner wurden in diesen Analysen HeLa Zellen für den Hefe-Adhäsionstest verwendet, die als Epithelzellen eines Zervixkarzinoms den Wirtszellen am natürlichen Infektionsort der *C. trachomatis* Serovare D-K eher entsprechen.





**Abbildung 4.3: *C. trachomatis* Pmp präsentierende Hefezellen adhäreren an Humanzellen.**

Die Analysen wurden wie in Abb. 4.2 beschrieben durchgeführt.

**A)** Coomassie-gefärbte SDS-Gele von  $\alpha$ -Mannosidase behandelten Hefezelleextrakten als Ladekontrolle.

**B)** Westernblots zur Kontrolle der Expression von Aga2p und Aga2p-Pmp Fusionsproteinen. Theor. MW: Aga2p-PmpA 66 kDa, Aga2p-PmpB 86 kDa, Aga2p-PmpC 76 kDa, Aga2p-PmpD 84 kDa, Aga2p-PmpE 49 kDa, Aga2p-PmpF 61 kDa, Aga2p-PmpG 90 kDa, Aga2p-PmpH 49 kDa, Aga2p-PmpI 58 kDa, Aga2p-Pmp21 133 kDa, Aga2p 19 kDa. M: Größenstandard

**C)** Phasenkontrast- (oben) und Immunfluoreszenzmikroskopie (mittig) von Aga2p bzw. Aga2p-Fusionsprotein-exprimierenden Hefezellen; Phasenkontrastaufnahmen (unten) des Hefe-Adhäsionstests.

**D)** Quantifizierung der Hefe-Adhäsionstests. Abweichend von Abb. 4.2 D wurde dieser Adhäsionstest mit HeLa-Zellen durchgeführt.

Um die Expression von Aga2p bzw. Aga2p-Fusionsproteinen in Hefezellen zu kontrollieren, wurden die entsprechenden Hefezellextrakte mit  $\alpha$ -Mannosidase behandelt und anschließend mittels Westernblot-Analyse überprüft (Abb. 4.3 B). Das Aga2p Protein zeigte eine distinkte Bande unterhalb von 25 kDa sowie einen undeutlichen Schmier auf der Höhe von 35–70 kDa. Bei dem Schmier handelt es sich vermutlich um unvollständig deglykolysiertes Aga2p Protein. Gleiches gilt für die Positivkontrolle Aga2p-Pmp21, die eine deutliche Bande auf der Höhe von ca. 130 kDa sowie einen hochmolekularen Schmier zeigte. Die übrigen Aga2p-Pmp Fusionsproteine wiesen ebenfalls ca. 40 kDa höhere Hauptbanden als erwartet auf sowie teilweise einen hochmolekularen Schmier. Ferner zeigten die Fusionsproteine neben einer Hauptbande diverse Abbaubanden sowie deutliche Unterschiede in der Bandenintensität. Die Kontrolle der Oberflächen-Lokalisation der exprimierten Proteine mittels indirekter Immunfluoreszenz ergab für Aga2p und die Aga2p-Pmp Fusionsproteine ein etwa gleichwertiges Cy3-Signal auf den meisten Hefezellen, während vereinzelte Zellen ein schwächeres Signal aufwiesen (Abb. 4.3 C). Da dieses Phänomen für alle Konstrukte gleichermaßen beobachtet wurde, ist ein direkter Vergleich der Bindungsstärken der verschiedenen Konstrukte dennoch möglich.

Im Hefe-Adhäsionstest wiesen Aga2p-exprimierende Hefezellen eine schwache, unspezifische Bindung mit  $66 \pm 15$  gebundenen Hefen pro 1000 HeLa Zellen auf (Abb. 4.3 D). Die Positivkontrolle Aga2p-Pmp21 ( $226 \pm 9$  gebundene Hefen) sowie alle Aga2p-Fusionsproteine der *C. trachomatis* Pmps (ca. 200-235 gebundene Hefen) zeigten eine ähnliche Adhäsivität, wobei Aga2p-PmpD mit  $235 \pm 14$  gebundenen Hefen die stärkste Adhäsion aufwies.

Hiermit konnte zum ersten Mal die adhäsive Funktion der neun *C. trachomatis* Pmps mit Hilfe des Hefe-Adhäsionstests nachgewiesen werden. Dabei zeigten alle *C. trachomatis* Pmps eine vergleichbare Bindungsstärke zu Pmp21 von *C. pneumoniae*.

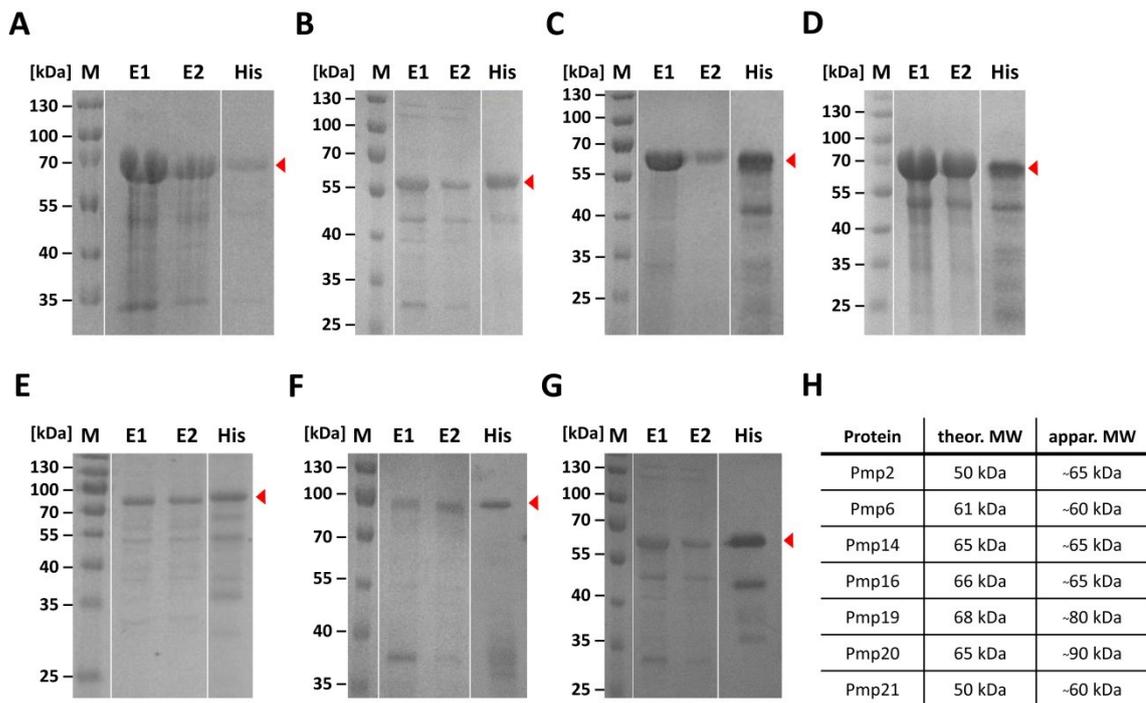
#### **4.1.2 Charakterisierung der adhäsiven Eigenschaften von rekombinanten Pmps präsentiert auf der Oberfläche von Latexkügelchen**

Um die mit Hilfe des Hefe-Oberflächen-Präsentationssystems erlangten Ergebnisse zu verifizieren, wurden von allen untersuchten Pmps rekombinante His6-markierte Proteine (rPmps) hergestellt. Anschließend wurden grünfluoreszierenden Latexkügelchen mit den rekombinanten Proteinen gekoppelt. Die proteinbeschichteten Latexkügelchen wurden mit Humanzellen inkubiert und die Adhäsion der fluoreszierenden Kügelchen mittels FACS analysiert.

#### 4.1.2.1 Die rekombinanten *C. pneumoniae* Pmps zeigen unterschiedliche Adhäsivität

Die repräsentativen Kandidaten aller sechs Pmp-Subtypen von *C. pneumoniae* zeigten adhäsive Eigenschaften im Hefeoberflächen-Präsentationssystem. Um dies in einem weiteren, unabhängigen System zu überprüfen, wurde die Adhäsivität von Pmp-beschichteten Latexkügelchen getestet.

Die Reinheit der rekombinanten Proteine wurde nach der Affinitätschromatographischen Aufreinigung in Coomassie-gefärbten SDS-Gelen sowie in Westernblot-Analysen überprüft (Abb. 4.4). Alle rekombinanten Proteine wiesen neben einer deutlichen Hauptbande (siehe Pfeil) zusätzliche schwache Nebenbanden unterhalb der Hauptbande auf. Das Bandenmuster der Proteine im Coomassie-gefärbten SDS-Gel entsprach größtenteils dem beobachteten Bandenmuster in der Westernblot-Analyse. Folglich handelt es sich bei diesen zusätzlichen Nebenbanden vermutlich um Abbauprodukte der rekombinanten Proteine. Weitere sehr schwache Banden oberhalb der Hauptbanden von Pmp2, Pmp6 und Pmp21 konnten nicht mit dem  $\alpha$ -His Antikörper detektiert werden (Abb. 4.4 A, B, G), entweder weil die Antikörperempfindlichkeit nicht ausreichte oder weil es sich hierbei vermutlich um Verunreinigungen durch andere Proteine handelt. Einige rekombinante Proteine wiesen höhere Hauptbanden auf als erwartet (Abb. 4.4 H), was bereits in vorangegangenen Studien für rekombinantes Pmp21 zu beobachten war (Schmidt 2009). Während bei Pmp6, Pmp14 und Pmp16 das theoretische und apparente Molekulargewicht annähernd übereinstimmten, war das apparente Molekulargewicht von Pmp2, Pmp19, Pmp20 und Pmp21 um 10-25 kDa höher als das jeweilige theoretische Molekulargewicht.



**Abbildung 4.4: Aufgereinigte *C. pneumoniae* Pmp-Proteinfragmente aus *E. coli*.**

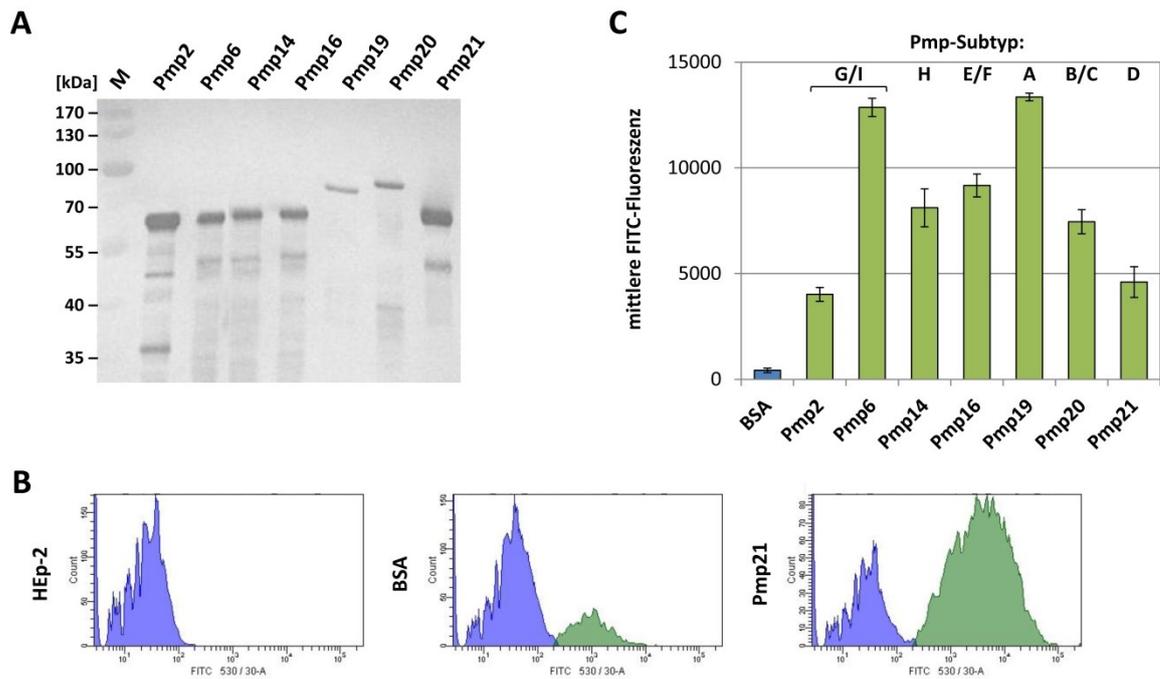
Coomassie-gefärbte 10%ige SDS-Gele zur Analyse der Elutionsfraktionen (E1+E2) der affinitätschromatographischen Proteinreinigung sowie Westernblot-Analyse der vereinigten Eluate (His) unter Verwendung eines  $\alpha$ -His Antikörpers (1:2500) und AP-konjugiertem  $\alpha$ -Maus Antikörper (1:7500). Die Expressionsvektoren wurden in den *E. coli* Stamm XL1blue transformiert und die Anzucht der Induktionskulturen erfolgte jeweils in 1 l LB+Amp. Zur Induktion wurde die Kultur bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,6 mit 1 mM IPTG versetzt und für weitere 4 h bei 37 °C inkubiert. Die His<sub>6</sub>-Fusionsproteine wurden bei der manuellen Aufreinigung unter denaturierten Bedingungen zweimal mit je 2 ml Puffer C + 500 mM Imidazol eluiert und die Elutionsfraktionen zweimal gegen jeweils 2 l PBS über Nacht bei 4 °C dialysiert. Es wurden jeweils 32,5  $\mu$ l der Eluate mit 12,5  $\mu$ l Protein-Ladepuffer und 5  $\mu$ l DTT aufgeköcht und anschließend 15  $\mu$ l (Coomassie-gefärbtes Gel) bzw. 10  $\mu$ l der Proben (Westernblot) auf das SDS-Gel geladen. Analysiert wurden Proteinextrakte von Pmp2 (A), Pmp6 (B), Pmp14 (C), Pmp16 (D), Pmp19 (E), Pmp20 (F) und Pmp21 (G). Pfeile markieren die jeweiligen Vollängen-Proteinbanden. M: Größenstandard (H) Gegenüberstellung des theoretischen und apparenten Molekulargewichts (MW) der rekombinanten Pmps.

Grünfluoreszierende Latexkügelchen wurden mit verschiedenen Proteinlösungen mit einer Konzentration von 200  $\mu$ g/ml gekoppelt. Die Überprüfung der Beschichtung der Latexkügelchen ergab, dass alle rekombinanten Pmps erfolgreich auf die Kügelchen geladen werden konnten. Dabei fiel die Beladung mit rekombinantem Pmp2 und Pmp21 am stärksten aus (Abb. 4.5 A). Im Vergleich dazu waren die Banden von Pmp6, Pmp14 und Pmp16 um etwa die Hälfte schwächer. Die Beschichtung der Latexkügelchen mit Pmp19 und Pmp20 war nochmals um das ca. Dreifache ineffizienter. Ferner zeigte sich, dass die Intensität der Abbaubanden im Vergleich zum Vollängenprotein durch den Beschichtungsprozess der Latexkügelchen nicht zugenommen hatte (vgl. Abb. 4.4 und Abb. 4.5 A).

Im Folgenden wurden die proteinbeschichteten Latexkügelchen mit HEp-2 Zellen inkubiert und schließlich mittels FACS die mittlere FITC-Fluoreszenz der Humanzellen mit den daran

gebundenen Latexkügelchen quantifiziert (Abb. 4.5 B, C). Zellen, die mit BSA-beschichteten Latexkügelchen inkubiert wurden, zeigten eine mittlere Fluoreszenz von ca. 400 (Abb. 4.5 C). Wurden die Latexkügelchen hingegen mit rekombinanten *C. pneumoniae* Pmps beschichtet, so resultierte dies in einer signifikanten Adhäsion an HEp-2 Zellen. Dabei zeigten Pmp2 und Pmp21 die schwächste Bindung (mittlere Fluoreszenz von ca. 4000 bzw. 4500), wohingegen für Pmp6 und Pmp19 eine deutlich stärkere Adhäsion nachzuweisen war (mittlere Fluoreszenz von ca. 13000). Die übrigen rekombinanten Pmps Pmp14, Pmp16 und Pmp20 wiesen eine intermediäre Bindungsstärke (mittlere Fluoreszenz von ca. 7500-9000) auf. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Pmp-beladenen Latexkügelchen deutliche Unterschiede in der Beschichtungsqualität aufwiesen (Abb. 4.5 A). Folglich ist ein quantitativer Vergleich der Bindungsstärken der verschiedenen rekombinanten Pmps in diesem experimentellen Ansatz nur bedingt für Pmps mit gleicher Beschichtungseffizienz möglich. Pmp2 und Pmp21 zeigten trotz höchster Beladung der Latexkügelchen die geringsten Bindungsstärken, während Pmp6, Pmp14 und Pmp16 (mittlere Beladung) sowie Pmp19 und Pmp20 (geringste Beladung) unterschiedliche Bindungsstärken unabhängig von der Beschichtungsqualität aufwiesen. Interessanterweise identifizierte Andreas Domröse mittels Adhäsionskinetiken einen sigmoiden Verlauf der Bindungskurven von ausgewählten Pmps (Domröse 2012). Da die in dieser Arbeit verwendete Beschichtungskonzentration von 200 µg/ml im Sättigungsbereich liegt, wäre es durchaus möglich, dass die beobachteten Unterschiede in der Beschichtungsqualität keinen starken Einfluss auf die Bindungsstärke der Latexkügelchen ausüben. Demgemäß wäre ein direkter Vergleich der Bindungsstärken der verschiedenen Pmps trotz Beschichtungsunterschiede möglich.

Folglich verfügen alle rekombinant hergestellten *C. pneumoniae* Pmps der verschiedenen Pmp-Subtypen über signifikante adhäsive Eigenschaften. Im Gegensatz zu der im Hefe-Adhäsionsexperiment ermittelten vergleichbaren Adhäsivität der verschiedenen Pmps (Abschnitt 4.1.1.1) zeigten die mit rekombinanten Pmps beschichteten Latexkügelchen unterschiedliche Bindungsstärken.



**Abbildung 4.5: Adhäsion von *C. pneumoniae* rPmp-beschichteten Latexkugeln an HEp-2 Zellen.**

**A)** Zur Überprüfung der Beschichtungsqualität wurde das Protein von  $2 \times 10^7$  beschichteten Latexkugeln in einem SDS-Gel aufgetrennt und mit  $\alpha$ -His (1:2500) detektiert. M: Größenstandard

**B)** Repräsentative Darstellung der FACS-Ausgabedatei mit Gegenüberstellung der Stärke der Fluoreszenz bei 530 nm (X-Achse) gegen die Zellzahl (Y-Achse) der HEp-2 Zellen. Die Gesamtheit aller gemessenen Einzelzellen aus 10000 gemessenen Ereignissen liegt in Fenster P1 (gesamtes dargestelltes Fenster). P1 setzt sich aus der blau markierten Population P2 (Fluoreszenz der Zellen ohne gebundene Kügelchen) und der grün markierten Population P3 (Fluoreszenz der adhären Latexkugeln an HEp-2 Zellen) zusammen. Die mittlere FITC-Fluoreszenz in P1 gibt den Mittelwert der gemessenen Fluoreszenz von 10000 Einzelzellen mit daran adhären Latexkugeln an.

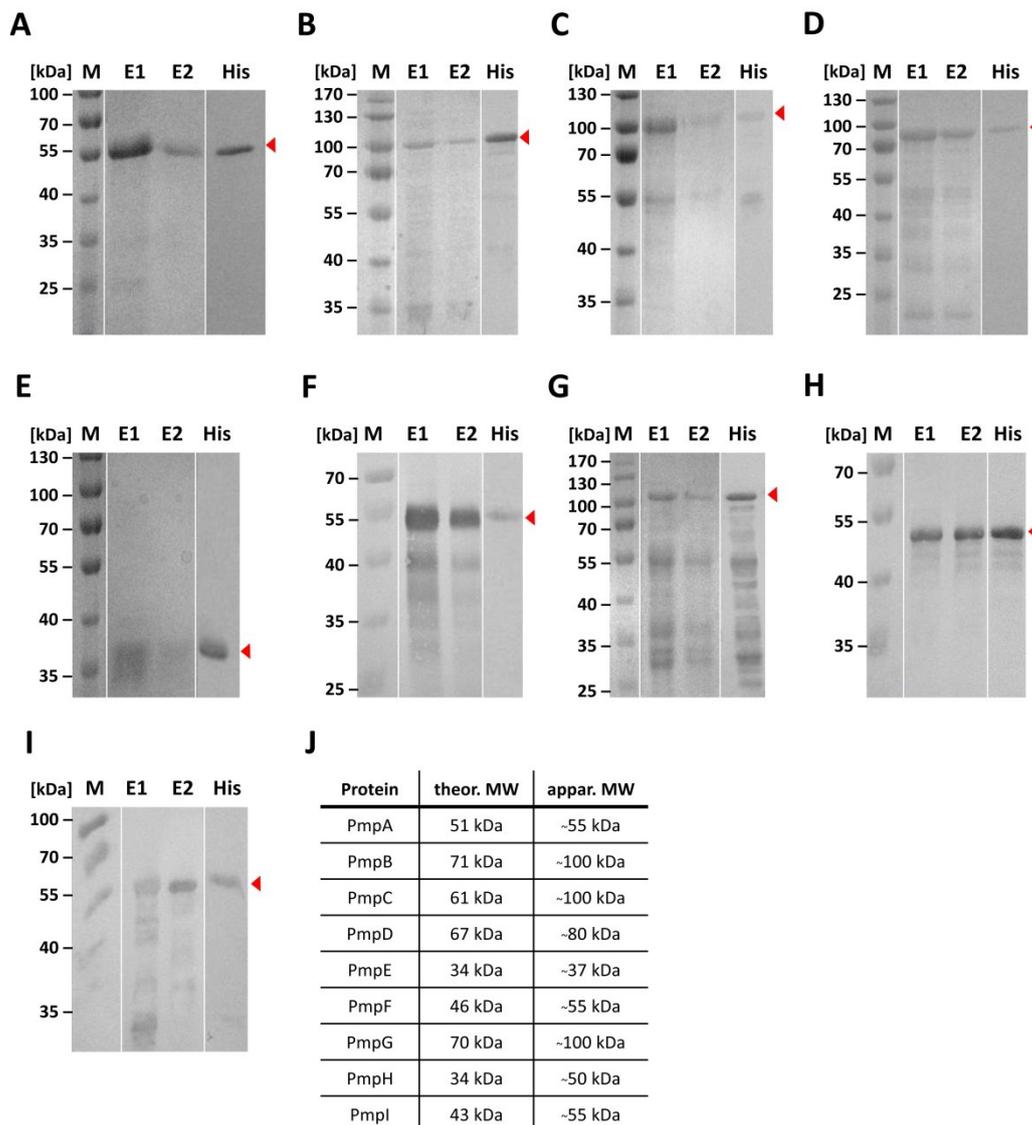
**C)** FACS-Auswertung der Adhäsionsexperimente.  $1 \times 10^9$  grünfluoreszierende Latexkugeln wurden mit einer  $200 \mu\text{g/ml}$  Lösung der rekombinanten Proteine gekoppelt. Proteinbeschichtete Kügelchen in  $300 \mu\text{l}$  Zellkulturmedium wurden für 5 min bei 700 Upm in einem 10-fachen Überschuss auf HEp-2 Zellen zentrifugiert und für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die ungebundenen Kügelchen wurden mit PBS gewaschen und die Zellen mittels Cell Dissociation Solution aus den Vertiefungen der Zellkulturplatte abgelöst und mit 3 % PFA fixiert. Im FACS wurde von jeweils 10000 HEp-2 Zellen und daran gebundenen Latexkugeln die mittlere FITC-Fluoreszenz bestimmt. Die Experimente wurden in Triplets durchgeführt ( $n = 3$ ).

#### 4.1.2.2 Die rekombinanten Pmps von *C. trachomatis* binden unterschiedlich stark an Humanzellen

Auch die neun *C. trachomatis* Pmps sollten als rekombinante Proteine auf der Oberfläche von Latexkugeln in Adhäsionsanalysen getestet werden.

Im Coomassie-gefärbten SDS-Gel konnten für die verschiedenen rekombinanten Pmps deutliche Hauptbanden (siehe Pfeile) detektiert werden, welche für die meisten Proteine höher als erwartet auftraten (Abb. 4.6). Während bei PmpA und PmpE das theoretische Molekulargewicht dem apparenten Molekulargewicht nahe kam, wurde für PmpD, PmpF,

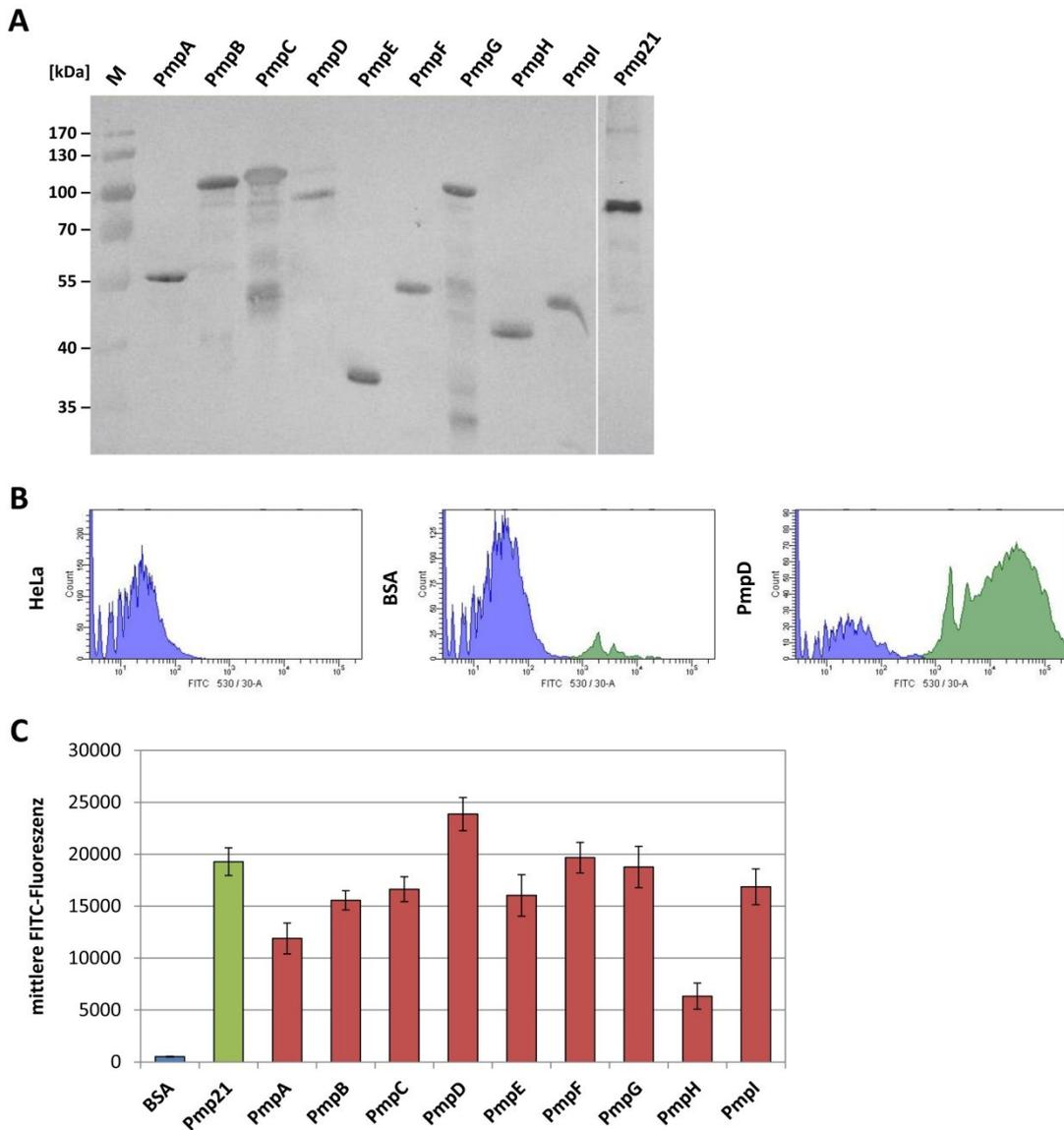
PmpH und PmpI ein 10-15 kDa höheres und für PmpB, PmpC und PmpG sogar ein 30-40 kDa höheres apparentes Molekulargewicht identifiziert. Die spezifischen Proteinbanden der rekombinanten Pmps konnten im Westernblot auf gleicher Laufhöhe wie im Coomassie-Gel detektiert werden. Ferner wiesen alle rekombinanten *C. trachomatis* Pmps zusätzlich schwache Proteinbanden unterhalb der Hauptbanden auf, welche in Westernblot-Analysen größtenteils als Degradationsbanden identifiziert werden konnten. Bei den übrigen Nebenbanden, die nicht über den N-terminalen His-Tag detektiert wurden, könnte es sich entweder um C-terminale Degradationsprodukte oder um Proteinverunreinigungen handeln.



**Abbildung 4.6: Aufgereinigte *C. trachomatis* Pmp-Fragmente aus *E. coli*.**

Coomassie-gefärbte 10%ige SDS-Gele zur Analyse der Elutionsfraktionen (E1+E2) der affinitätschromatographischen Proteinreinigung sowie Westernblot-Analyse der vereinigten Eluate unter Verwendung eines  $\alpha$ -His Antikörpers (His). Aufbereitung der Proben siehe Abb. 4.4. Analysiert wurden Proteinextrakte von PmpA (A), PmpB (B), PmpC (C), PmpD (D), PmpE (E), PmpF (F), PmpG (G), PmpH (H) und PmpI (I). Pfeile markieren die jeweiligen Vollängen-Proteinbanden. M: Größenstandard  
J) Gegenüberstellung des theoretischen und apparenten Molekulargewichts (MW) der rekombinanten Pmps.

Die Latexkugeln wurden mit Proteinlösungen gleicher Konzentration (200 µg/ml) beschichtet. Die Effizienz der Beschichtung war wiederum nicht für alle Pmps identisch (Abb. 4.7 A). PmpA, PmpE, PmpF, PmpG, PmpH und PmpI wiesen eine etwa vergleichbare Beschichtungseffizienz auf. Im Vergleich dazu war die Beschichtung der Latexkugeln mit PmpD etwa um den Faktor zwei schwächer, wohingegen PmpB und Pmp21 eine ca. zweifach höhere und PmpC eine ca. dreifach höhere Beschichtung zeigten.



**Abbildung 4.7: Bindung von *C. trachomatis* rPmp beladenen Latexkugeln an HeLa Zellen.**

Die Analysen wurden wie in Abb. 4.5 beschrieben durchgeführt.

**A)** Westernblot-Analyse mit  $\alpha$ -His Antikörper zur Kontrolle der Proteinbeschichtung von  $2 \times 10^7$  beladenen Latexkugeln. M: Größenstandard

**B)** Repräsentative Darstellungen der FACS-Ausgabedatei.

**C)** FACS-Auswertung der Adhäsionsexperimente.

Die proteinbeschichteten Latexkugeln wurden auf ihr Adhäsionsvermögen an HeLa Zellen überprüft (Abb. 4.7 B, C). BSA-beladene Latexkugeln wiesen eine schwache unspezifische

Bindung auf (mittlere Fluoreszenz von ca. 500). Pmp21-beschichtete Latexkugeln dienten als Positivkontrolle und zeigten eine starke Bindung an HeLa Zellen (mittlere Fluoreszenz von ca. 20000). Interessanterweise zeigten auch alle neun *C. trachomatis* Pmps eine signifikante Adhäsion an HeLa Zellen. Im Gegensatz zu den im Hefe-Adhäsionstest ermittelten Ergebnissen zeigten sich hier wieder unterschiedliche Bindungsstärken (Abb. 4.7 C). Die Adhäsivität reichte von PmpD als stärkstes Adhäsiv (mittlere Fluoreszenz von ca. 25000) bis PmpH mit der schwächsten Bindung (mittlere Fluoreszenz von ca. 6000). Die anderen sieben *C. trachomatis* Pmps adhärten mit intermediärer Intensität an Humanzellen (mittlere Fluoreszenz von ca. 12000-20000). Dabei korrelierte die Beschichtungsqualität der Latexkugeln nicht mit der Adhäsionsstärke. Während beispielsweise PmpD die geringste Beschichtungseffizienz und dennoch das stärkste Adhäsionsvermögen aufwies, zeigte PmpH eine intermediäre Beschichtung und die schwächste Bindung aller rekombinanten Pmps. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Bindungseffizienzen erweist sich rekombinantes PmpD somit als deutlich stärkstes Adhäsiv, wohingegen rekombinantes PmpH das mit Abstand schwächste Adhäsiv repräsentiert. Die übrigen Pmps weisen ein intermediäres Adhäsionsvermögen auf.

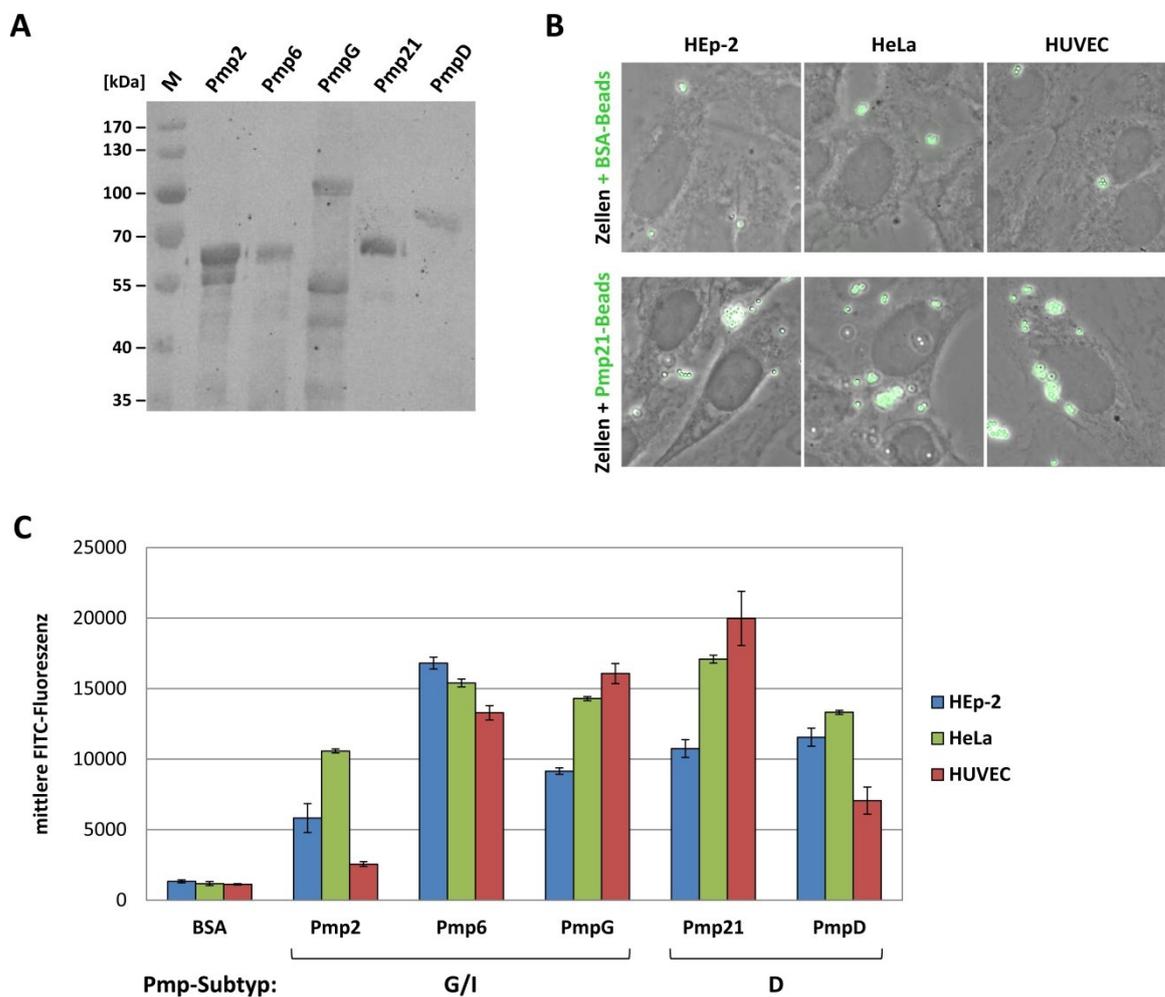
Folglich zeigen die rekombinanten Pmps von *C. trachomatis* signifikante Adhäsivität an humane Epithelzellen, wobei allerdings Pmp-spezifische Unterschiede in der Adhäsionsstärke zu beobachten waren.

#### **4.1.2.3 Rekombinante Pmps von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* zeigen**

##### **Unterschiede in der Adhäsivität in Abhängigkeit vom humanen Zelltyp**

Die Daten dieser Arbeit belegen die adhäsiven Eigenschaften von repräsentativen Pmps der Pmp-Subtypen von *C. pneumoniae* sowie aller *C. trachomatis* Pmps (Abschnitt 4.1.1 und 4.1.2). Vorangegangene Studien führten zu der Spekulation, dass Pmps von *C. trachomatis* an einer Adaption an unterschiedliche humane Zelltypen beteiligt sein könnten (Jeffrey, Suchland et al. 2010; Tan, Hsia et al. 2010; Borges, Nunes et al. 2012). Daher sollte im Folgenden die Adhäsionsfähigkeit von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* Pmps an verschiedene epitheliale (HEp-2, HeLa) und endotheliale (primäre HUVEC) Zelllinien bestimmt werden. Für diese Analyse wurden Pmp2, Pmp6 und Pmp21 von *C. pneumoniae* sowie PmpG und PmpD von *C. trachomatis* als repräsentative Kandidaten der beiden Pmp-Subtypen G/I und D ausgewählt. Um einen direkten Vergleich der Adhäsionsstärken zu erlauben, wurden in diesem Experiment identische proteinbeschichtete Latexkugeln-Chargen parallel mit den verschiedenen Zelllinien inkubiert.

Die Überprüfung der Proteinbeladung der Latexkugeln ergab, dass die Beschichtungsqualität deutlich unterschiedlich war (Abb. 4.8 A). Da neben den Vollängenbanden von Pmp2 und PmpG prominente Degradationsbanden auf der Höhe von ca. 55 kDa identifiziert wurden, ist ein direkter Vergleich der Beschichtungsqualität schwierig. Dennoch war deutlich zu erkennen, dass die Beladung der Kugeln mit Pmp2 am effektivsten und diejenige mit PmpD am schwächsten war. Mit dem folgenden Adhäsionsexperiment war somit kein direkter quantitativer Vergleich der Bindefähigkeiten der verschiedenen rekombinanten Pmps untereinander möglich, sondern nur ein Vergleich des Bindungsvermögens an die verschiedenen Zelllinien.



**Abbildung 4.8: Bindung von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* rPmp beschichteten Latexkugeln an epitheliale (HEp-2, HeLa) und endotheliale (HUVEC) Zellen.**

Die Analysen wurden wie in Abb. 4.5 beschrieben durchgeführt.

**A)** Westernblot-Analyse zur Prüfung der Beschichtungsqualität der Latexkugeln unter Verwendung eines  $\alpha$ -His Antikörpers. M: Größenstandard

**B)** Überlagerte Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen (63 x Vergrößerung) von Bindungstests mit HEp-2, HeLa und HUVE Zellen und BSA- bzw. Pmp21-beschichteten Latexkugeln.

**C)** FACS-Auswertung der Adhäsionsexperimente. Es wurden für alle drei Zelllinien die identischen proteinbeschichteten Latexkugeln-Chargen verwendet und die Experimente parallel angesetzt.

Im Adhäsionstest zeigte die Negativkontrolle BSA lediglich eine nahezu identische schwache Adhäsion an alle drei Zelllinien (mittlere Fluoreszenz von ca. 1000) (Abb. 4.8 B, C). Interessanterweise zeigten die verschiedenen Pmps unterschiedliche Bindungsstärken an die verschiedenen Zelllinien. So wies Pmp6 eine ähnliche Bindung an alle drei Zelltypen auf (mittlere Fluoreszenz von ca. 13000-17000). Im Gegensatz dazu adhärierte Pmp2 am effektivsten an HeLa Zellen (mittlere Fluoreszenz von ca. 11000), während die Bindung an HEp-2 ca. zweifach schwächer (mittlere Fluoreszenz von ca. 6000) und an HUVE Zellen ca. vierfach schwächer (mittlere Fluoreszenz von ca. 3000) war. Dagegen waren die Unterschiede in den Bindungsstärken von PmpG, Pmp21 und PmpD an die verschiedenen Zelllinien mit einem Faktor von  $\leq 2$  moderater. Interessanterweise wiesen Pmp6 und PmpG des Subtyps G/I und Pmp21 und PmpD des Subtyps D gegenläufige Adhäsionsmuster auf, während PmpG und Pmp21 (HEp-2 > HeLa > HUVEC) bzw. Pmp2 und PmpD (HeLa > HEp-2 > HUVEC) jeweils ähnliche Adhäsionsprofile zeigten. Folglich korreliert das Adhäsionsverhalten nicht mit der Zugehörigkeit zu einem Pmp-Subtyp. Ferner liegen keine offensichtlichen Ähnlichkeiten der Bindungsstärken bei den beiden epithelialen Zelllinien HEp-2 und HeLa vor und somit keine Abgrenzung von der endothelialen HUVE Zelllinie. Zusammenfassend zeigten die rekombinanten *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* Pmps deutlich unterschiedliche Bindungsstärken an verschiedene Zelllinien. Des Weiteren wiesen die Pmps eines Subtyps kein gemeinsames Adhäsionsverhalten auf.

## 4.2 Die Pmp Adhäsine sind wichtig für die chlamydiale Infektion

Die Adhäsivität der Pmps von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* wurde in zwei unabhängigen experimentellen Ansätzen nachgewiesen. Daher stellte sich die Frage, ob die Pmps als potentielle bakterielle Adhäsine wichtig für die chlamydiale Infektion sind. Um dies zu untersuchen, wurden Humanzellen vor der Infektion mit den rekombinanten Pmps behandelt, sodass diese den natürlichen humanen Interaktionspartner binden und diesen so vor der Bindung durch das natürliche Adhäsine auf der EB-Oberfläche abschirmen. Falls die Pmps wichtig für die chlamydiale Infektion sind, würde die Blockierung des humanen Rezeptors in einer verminderten Adhäsion und folglich in einer reduzierten Infektion resultieren.

### 4.2.1 Rekombinante *C. pneumoniae* Pmps inhibieren die *C. pneumoniae* Infektion signifikant

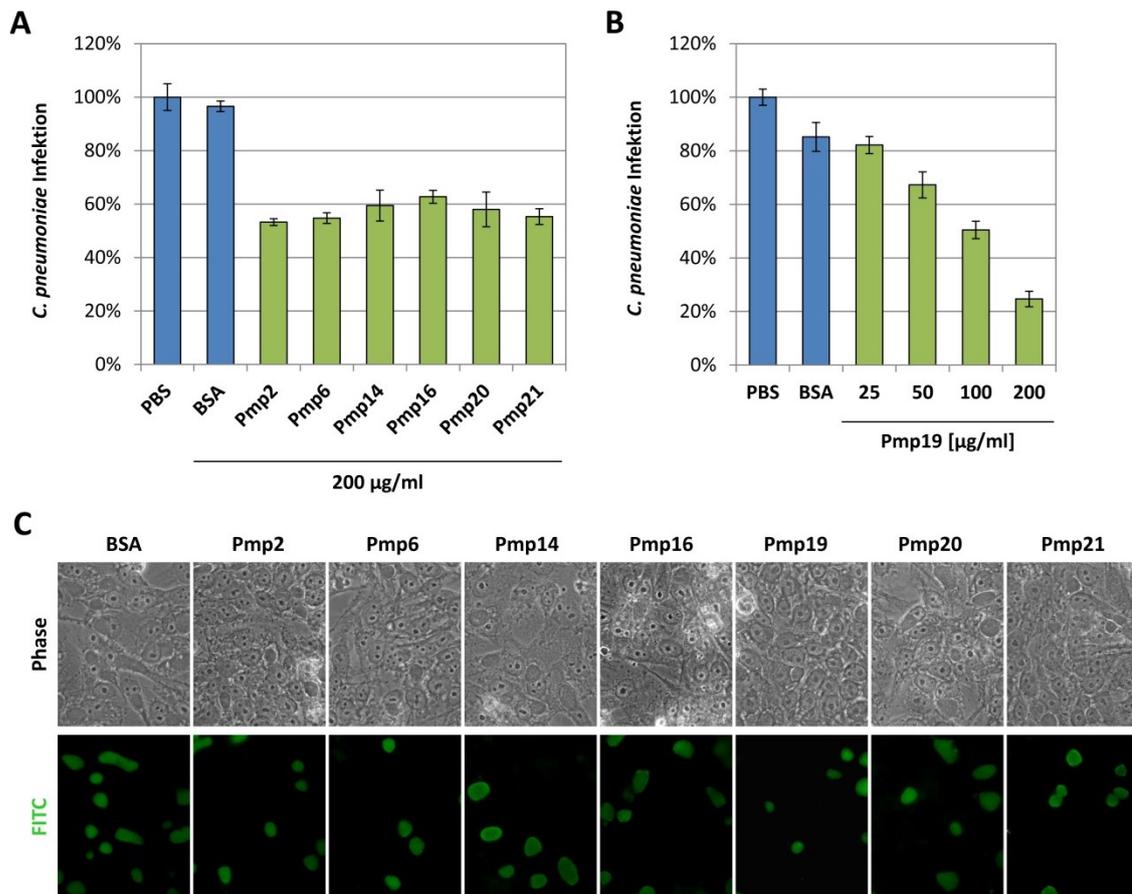
Zunächst wurde der Einfluss der repräsentativen Kandidaten der Pmp-Subtypen von *C. pneumoniae* (Abb. 4.1 A) auf die chlamydiale Infektion bestimmt.

Zur Auswertung des Experiments wurde die Infektion PBS-vorbehandelter Humanzellen auf 100 % normiert (Abb. 4.9 A, B). Die Inkubation der HEp-2 Zellen mit 200 µg/ml BSA als unspezifischem Protein führte zu keiner signifikanten Veränderung der Infektionsrate (97 % Restinfektion). Eine Vorbehandlung der Humanzellen mit 200 µg/ml der rekombinanten Pmps resultierte hingegen in einer signifikanten Verminderung der Infektion (Abb. 4.9 A). Die Restinfektion lag bei 50-60 % für die verschiedenen *C. pneumoniae* Pmps.

Zusätzlich wurde beispielhaft für rekombinantes Pmp19 eine Konzentrationskinetik aufgenommen um zu untersuchen, ob und ab welcher Proteinkonzentration die neutralisierende Wirkung des rekombinanten Proteins in einen Sättigungsbereich übergeht (Abb. 4.9 B). Hierbei reichte die Restinfektion von 82 % (25 µg/ml) über 67 % (50 µg/ml) und 50 % (100 µg/ml) bis 25 % (200 µg/ml). Eine Vorinkubation mit BSA resultierte jedoch bereits in einer Reduktion der Infektion auf 85 %. Das Experiment zeigte, dass die neutralisierende Wirkung von Pmp19 im untersuchten Konzentrationsbereich offensichtlich noch keinen Sättigungsbereich erreichte. Folglich wäre es durchaus möglich, dass bei zunehmender Proteinkonzentration eine weitere Reduktion der Infektion erfolgen würde.

Durch die Vorbehandlung der Humanzellen mit rekombinanten Pmps war nach einer *C. pneumoniae* Infektion für 48 h weder die Morphologie noch die Größe der Inklusionen verändert, sondern nur die Anzahl der Inklusionen reduziert (Abb. 4.9 C). Folglich hatte die Inkubation der Zellen mit rekombinantem Protein keinen augenscheinlichen Einfluss auf die weitere Entwicklung der Chlamydien innerhalb der Humanzellen, sondern nur auf die Infektiösität der chlamydialen Partikel.

Mit Hilfe dieses Experiments konnte gezeigt werden, dass eine Blockierung der Rezeptoren auf der humane Zelloberfläche mit rekombinant hergestellten Pmps einen inhibitorischen Effekt auf die Infektiösität von *C. pneumoniae* ausübte. Somit konnte eine essentielle Bedeutung der repräsentativen Pmps aller Pmp-Subtypen von *C. pneumoniae* in der frühen Phase der Infektion aufgezeigt werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen vorangegangener Studien für Pmp6, Pmp20 und Pmp21 überein (Schmidt 2009; Moelleken, Schmidt et al. 2010).



**Abbildung 4.9: Inhibierung der *C. pneumoniae* Infektion durch rekombinante Pmps.**

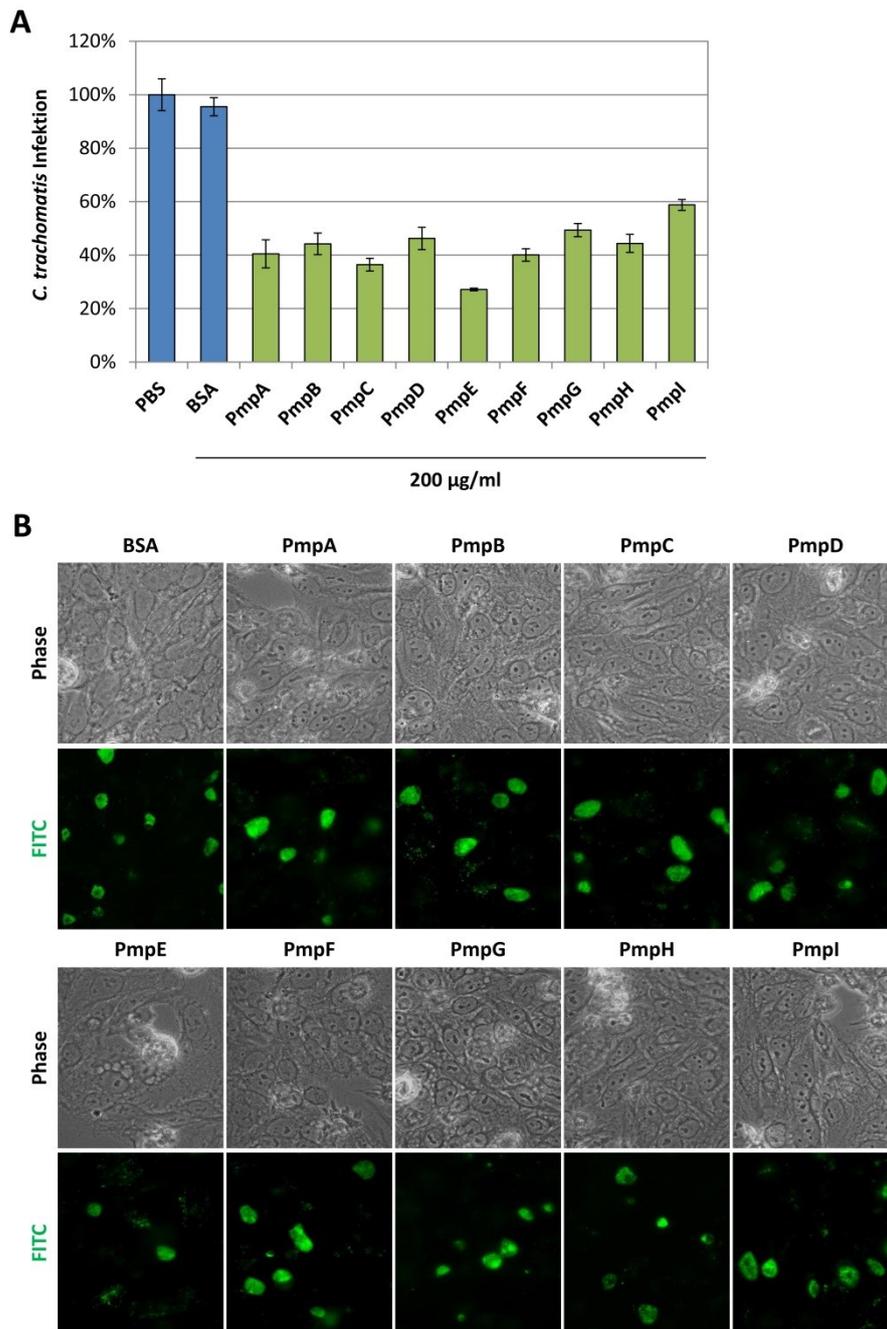
**A)** Quantifizierung des Neutralisations-Experiments. HEp-2 Zellen wurden mit PBS, BSA (200 µg/ml) bzw. mit rekombinant hergestellten Pmps (200 µg/ml) für 2 h bei 37 °C inkubiert, bevor sie mit gereinigten *C. pneumoniae* EBs (MOI=20) infiziert wurden. Nach 2 h bei 37 °C erfolgte ein Medienwechsel. Die Zellen wurden 48 hpi mit Methanol fixiert und die Anzahl der gebildeten Einschlüsse wurde unter Verwendung eines FITC-konjugierten  $\alpha$ -LPS Antikörpers mikroskopisch bestimmt. Dabei wurden die Einschlüsse in 1000 eukaryotischen Zellen ausgezählt. Die Anzahl der Inklusionen nach PBS-Behandlung der Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Die Experimente wurden in Triplets durchgeführt (n=3).

**B)** Quantifizierung des Neutralisations-Experiments mit verschiedenen Pmp19 Konzentrationen (25-200 µg/ml). Durchführung wie in A) beschrieben.

**C)** Repräsentative Phasenkontrast- (oben) und Immunfluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen (unten) der chlamydialen Einschlüsse nach 48 hpi (63 x Vergrößerung). Die Einschlüsse wurden mit einem FITC-konjugierten  $\alpha$ -LPS Antikörper (1:4) gefärbt.

## 4.2.2 Rekombinante *C. trachomatis* Pmps besitzen eine neutralisierende Wirkung auf die *C. trachomatis* Infektion

Da die bisherigen Adhäsionsdaten auf eine Adhäsion-Funktion der *C. trachomatis* Pmps hindeuten und bereits für PmpD von *C. trachomatis* eine wichtige Rolle im Infektionsgeschehen nachgewiesen worden war (Crane, Carlson et al. 2006), wurden erstmalig Neutralisationsexperimente mit rekombinanten *C. trachomatis* Pmps durchgeführt.



**Abbildung 4.10: Inhibierung der *C. trachomatis* Infektion durch rekombinante Pmps.**

Die Analysen wurden wie in Abb. 4.9 beschrieben durchgeführt.

**A)** Quantifizierung des Neutralisations-Experiments. Abweichend von Abb. 4.9 wurde die Infektion in diesem Experiment mit gereinigten *C. trachomatis* Serovar E EBs (MOI=20) durchgeführt. Ferner erfolgte die Fixierung der infizierten Zellen bereits nach 24 hpi.

**B)** Repräsentative Phasenkontrast- (oben) und Immunfluoreszenzmikroskopie- Aufnahmen (unten) der chlamydialen Einschlüsse nach 24 hpi (63 x Vergrößerung).

Eine Vorbehandlung der Humanzellen mit 200 µg/ml BSA als Negativkontrolle hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Infektiosität von *C. trachomatis* (Abb. 4.10 A). Im Gegensatz dazu führten alle neun rekombinanten *C. trachomatis* Pmps zu einer deutlichen Inhibierung der *C. trachomatis* Infektion. Dabei reichte die Reduktion der Infektion von ca. 30 % bis 60 %

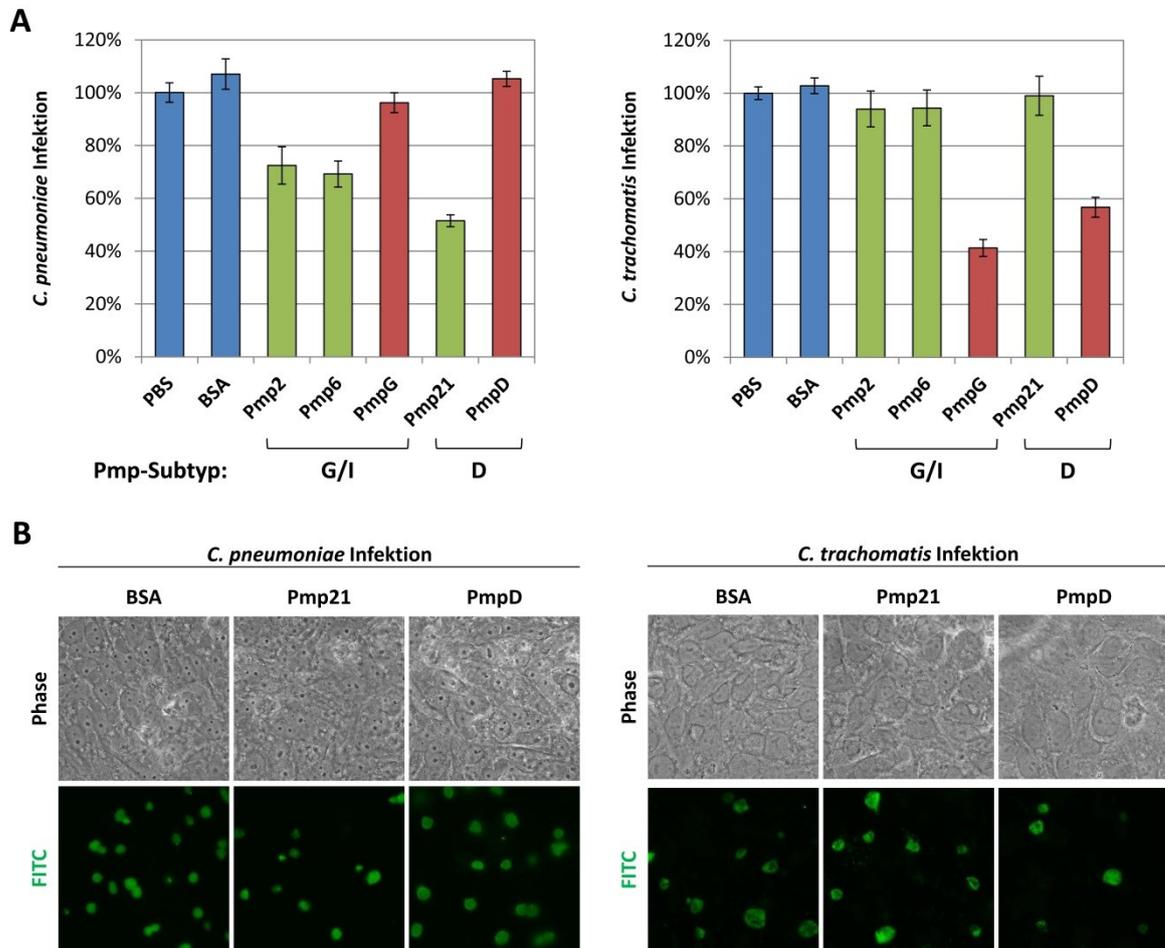
Restinfektion im Vergleich zu PBS behandelten Zellen. Die Vorinkubation mit rekombinantem PmpE hatte die stärkste Infektionsreduktion zur Folge (27 % Restinfektion). Die Mehrheit der Pmps führte zu einer intermediären Reduktion auf 40-50 % in der absteigenden Reihenfolge PmpC, PmpF, PmpA, PmpB, PmpH, PmpD und PmpG. Eine Behandlung mit rekombinantem PmpI hatte die schwächste Infektionsinhibierung zur Folge (59 % Restinfektion). Demzufolge zeigten alle rekombinanten *C. trachomatis* Pmps eine infektionsreduzierende Wirkung auf die chlamydiale Infektion. Die mikroskopische Untersuchung der Inklusionsmorphologie ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit PBS, BSA bzw. Pmps vorbehandelten Zellen (Abb. 4.10 B). Folglich hatte die Inkubation der Humanzellen mit rekombinanten Pmps keine Auswirkung auf die intrazelluläre Entwicklung der Chlamydien, sondern nur auf die Infektionsrate der *C. trachomatis* EBs. Zusammenfassend deuten die Adhäsionsanalysen und Neutralisationsexperimente darauf hin, dass eine gemeinsame Funktion der *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* Pmps als Adhäsine vorliegt und dass alle Pmps eine wichtige Rolle im Infektionsprozess ausüben. Es stellte sich daher die Frage, ob der Adhäsionsmechanismus der Pmps Spezies-übergreifend konserviert ist, d.h. ob rekombinante *C. pneumoniae* Pmps eine *C. trachomatis* Infektion inhibieren können und *vice versa*.

#### **4.2.3 Ausgewählte rekombinante Pmps von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* inhibieren die Infektion Spezies-spezifisch**

Da in den zuvor durchgeführten Experimenten gezeigt werden konnte, dass die chlamydialen Pmps als bakterielle Adhäsine fungieren, wäre die Nutzung desselben humanen Wirtszellrezeptors durchaus denkbar. Daher wurde nun untersucht, ob eine Vorbehandlung der Humanzellen mit rekombinanten *C. pneumoniae* Pmps und die daraus resultierende Absättigung des Wirtszellrezeptors auch in einer Reduktion der *C. trachomatis* Serovar E Infektion resultiert und *vice versa*. Hierfür wurden Neutralisationsexperimente exemplarisch mit repräsentativen Pmps der beiden Pmp-Subtypen G/I und D von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* durchgeführt (Abb. 4.11).

Einer Vorinkubation von HEp-2 Zellen mit BSA führte weder bei der *C. pneumoniae*, noch bei der *C. trachomatis* Infektion zu einer signifikanten Veränderung der Infektionsrate (107 % bzw. 103 %). Die Infektionsrate von *C. pneumoniae* konnte durch eine Behandlung mit rekombinantem Pmp2 und Pmp6 auf ca. 70 % reduziert werden, während Pmp21 zu einer Restinfektion von 50 % führte (Abb. 4.11 A, linkes Diagramm). Interessanterweise zeigten PmpG und PmpD keine inhibierende Wirkung auf die *C. pneumoniae* Infektion (96 % bzw.

105 %). Im umgekehrten Experiment führte eine Vorinkubation der Humanzellen mit PmpG bzw. PmpD zu einer *C. trachomatis* Restinfektion von ca. 40 % respektive 55 % (Abb. 4.11 A, rechtes Diagramm). Im Gegensatz dazu bleibt die *C. trachomatis* Serovar E Infektion durch eine Vorbehandlung mit Pmp2, Pmp6 und Pmp21 nahezu unbeeinflusst (94 %, 94 % bzw. 99%).



**Abbildung 4.11: Rekombinante *C. pneumoniae* Pmps können keine *C. trachomatis* Infektion inhibieren und *vice versa*.**

Die Analysen wurden wie in Abb. 4.9 beschrieben durchgeführt.

**A)** Quantifizierung der Neutralisations-Experimente. Die Infektion in diesen Experimenten wurde mit gereinigten *C. pneumoniae* EBs bzw. *C. trachomatis* Serovar E EBs (MOI=20) durchgeführt. Die Fixierung der infizierten Zellen erfolgte nach 48 hpi (*Cpn* Infektion) bzw. 24 hpi (*Ctr* Infektion).

**B)** Repräsentative Phasenkontrast- (oben) und Immunfluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen (unten) der gebildeten chlamydialen Einschlüsse nach 48 hpi (*Cpn* Infektion) bzw. 24 hpi (*Ctr* Infektion) (63 x Vergrößerung).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass rekombinante Pmps die chlamydiale Infektion Spezies-spezifisch inhibieren. Dies könnte bedeuten, dass die Pmp-Adhäsine von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* Serovar E unterschiedliche Adhäsionsmechanismen bzw. Wirtszellrezeptoren benutzen. Es bleibt daher im Folgenden zu klären, ob die Pmps einer *Chlamydia*-Spezies denselben Bindungsmechanismus bzw. humanen Rezeptor nutzen.

#### 4.2.4 Untersuchung der Bedeutung von verschiedenen Pmps für die chlamydiale Infektion

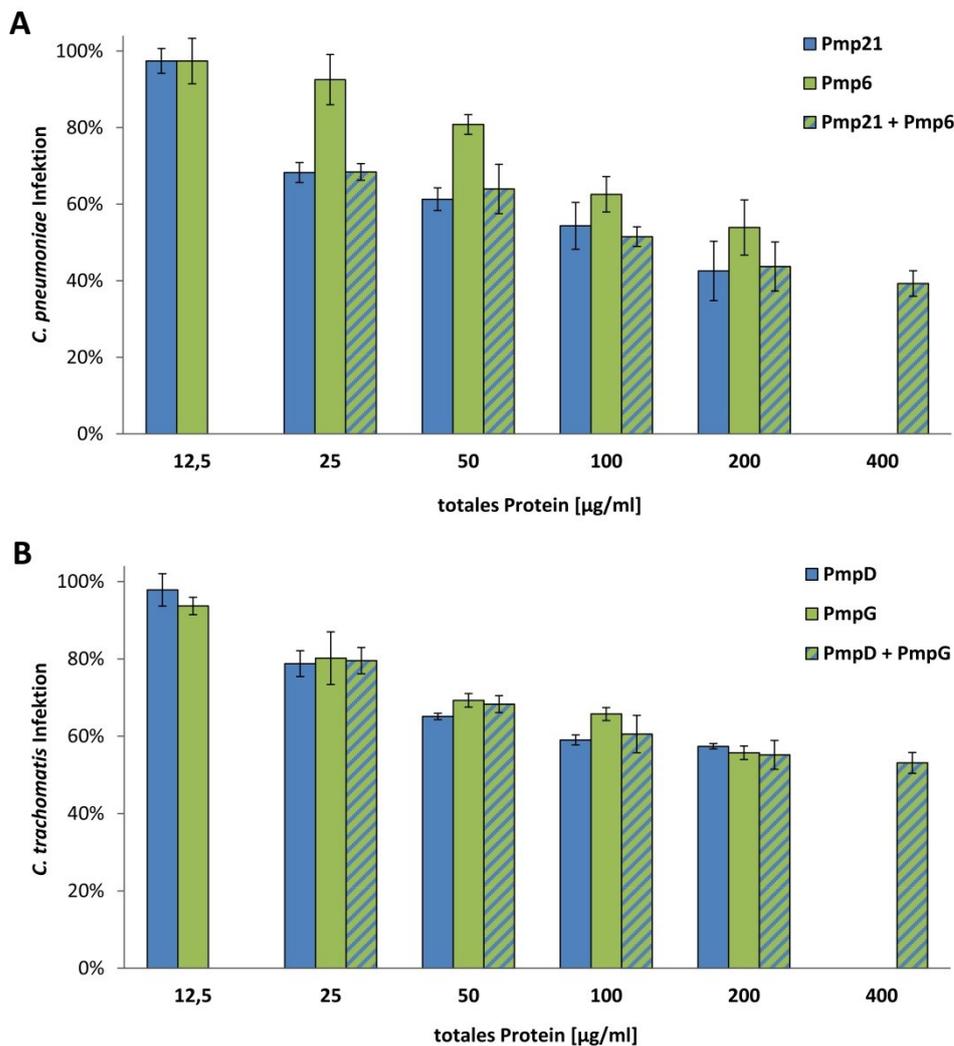
Da alle Pmps vermutlich eine adhäsive Funktion in der chlamydialen Infektion ausüben, stellte sich im Folgenden die Frage, ob die Pmps einer Chlamydien-Spezies an den gleichen Wirtszellrezeptor binden. Wäre dies der Fall, wäre es unerheblich, ob in einem Neutralisationsexperiment der humane Rezeptor nur durch ein rekombinantes Pmp oder durch eine Mischung verschiedener rekombinanter Pmps blockiert wird. Vorherige Neutralisationsanalysen mit rekombinantem Pmp6 und Pmp21 von *C. pneumoniae* deuteten bereits auf eine überlappende Funktion dieser beiden Proteine hin (Moelleken, Schmidt et al. 2010). Für eine detailliertere Untersuchung wurde in einem Neutralisationsexperiment beispielhaft für zwei Pmps verschiedener Pmp-Subtypen von *C. pneumoniae* (Pmp21 und Pmp6) und von *C. trachomatis* (PmpD und PmpG) eine Konzentrationskinetik aufgenommen (Abb. 4.12).

Eine Vorinkubation von HEp-2 Zellen mit rekombinantem Pmp21 bzw. Pmp6 oder einer Kombination beider Proteine führte zu einer konzentrationsabhängigen Inhibierung der *C. pneumoniae* Infektion (Abb. 4.12 A). Dabei erzielte rekombinantes Pmp21 bei allen analysierten Konzentrationen stets einen stärkeren inhibitorischen Effekt als Pmp6. So wurde die chlamydiale Infektion durch Vorinkubation mit Pmp21 auf 43 % bei 200 µg/ml reduziert, während die Behandlung mit Pmp6 zu einer Restinfektion von 54 % bei gleicher Konzentration führte. Dies weist auf eine unterschiedliche Infektionsneutralisations-Kapazität der beiden rekombinanten Proteine hin. Interessanterweise führte eine Inkubation mit Pmp21 und Pmp6 zusammen zu einer stärkeren Verminderung der Infektion im Vergleich zu einer alleinigen Pmp6-Behandlung. So zeigten Pmp21 und Pmp6 in Kombination eine Restinfektion von 43 % bei 200 µg/ml (100 µg/ml Pmp21 + 100 µg/ml Pmp6). Dieser inhibitorische Effekt war somit identisch zu dem Effekt von Pmp21 alleine. Dies bedeutet, dass Pmp21 und Pmp6 einen additiven Effekt bei der Inhibierung der *C. pneumoniae* Infektion aufweisen.

Parallel dazu wurde der neutralisierende Effekt von rekombinantem PmpD bzw. PmpG oder einer Mischung beider Proteine auf die *C. trachomatis* untersucht (Abb. 4.12 B). Beide rekombinanten Proteine alleine führten bei den jeweiligen Konzentrationen zu einer ähnlichen Infektionsreduktion. So lag beispielsweise bei maximaler Proteinkonzentration (200 µg/ml) die Restinfektion bei 57 % für beide Einzelproteine. Interessanterweise führte eine Kombination beider rekombinanter Proteine über die gesamte Konzentrationsspanne zu einer vergleichbaren Neutralisation wie die Einzelproteine. So resultierte z.B. eine Vorinkubation mit 200 µg/ml PmpD und PmpG zusammen (100 µg/ml PmpD + 100 µg/ml PmpG) in

einer Restinfektion von 55 %. Folglich liegt ein stringent additiver Effekt beim inhibitorischen Verhalten von PmpD und PmpG vor, d.h. es ist unerheblich, ob rekombinantes PmpD oder PmpG alleine oder in einem 1:1 Gemisch eingesetzt werden.

Zusammenfassend resultierte die Vorbehandlung von Humanzellen mit Pmp21 und Pmp6 von *C. pneumoniae* bzw. PmpD und PmpG von *C. trachomatis* in einem additiven Effekt bei der Inhibierung der Infektion. Dies deutet auf eine überlappende Funktion der Pmps einer Chlamydien-Spezies hin. Somit wäre die Nutzung desselben Wirtszellrezeptors für diese Pmps durchaus denkbar.



**Abbildung 4.12: Infektionsneutralisations-Verhalten verschiedener rekombinanter Pmps alleine bzw. in einer 1:1 Kombination.**

Quantifizierung der Neutralisations-Experimente. HEp-2 Zellen wurden mit PBS bzw. mit rekombinant hergestellten Pmps alleine (12,5-200 µg/ml) bzw. in Kombination (Gesamtkonz. beider Proteine: 25-400 µg/ml) für 2 h bei 37 °C inkubiert, bevor sie mit gradientengereinigten **(A)** *C. pneumoniae* EBs oder **(B)** *C. trachomatis* Serovar E EBs (MOI=20) infiziert wurden. Nach 48 hpi (*Cpn* Infektion) bzw. 24 hpi (*Ctr* Infektion) wurden die Zellen mit Methanol fixiert und die Anzahl der gebildeten Einschlüsse in 1000 eukaryotischen Zellen wurde unter Verwendung eines FITC-konjugierten  $\alpha$ -LPS Antikörpers (1:4) bestimmt (n=3). Die Anzahl der Inklusionen nach PBS-Behandlung wurde auf 100 % gesetzt.

### 4.2.5 Pmp21 und OmcB weisen unterschiedliche Adhäsionswege auf

Um die Funktion der Pmps mit der eines bereits detailliert analysierten Adhäsins, dem OmcB von *C. pneumoniae*, zu vergleichen, wurden in verschiedenen experimentellen Ansätzen die jeweiligen Adhäsionswege von Pmp21 bzw. OmcB blockiert und der inhibitorische Effekt auf die *C. pneumoniae* Infektion untersucht (Abb. 4.13 A).

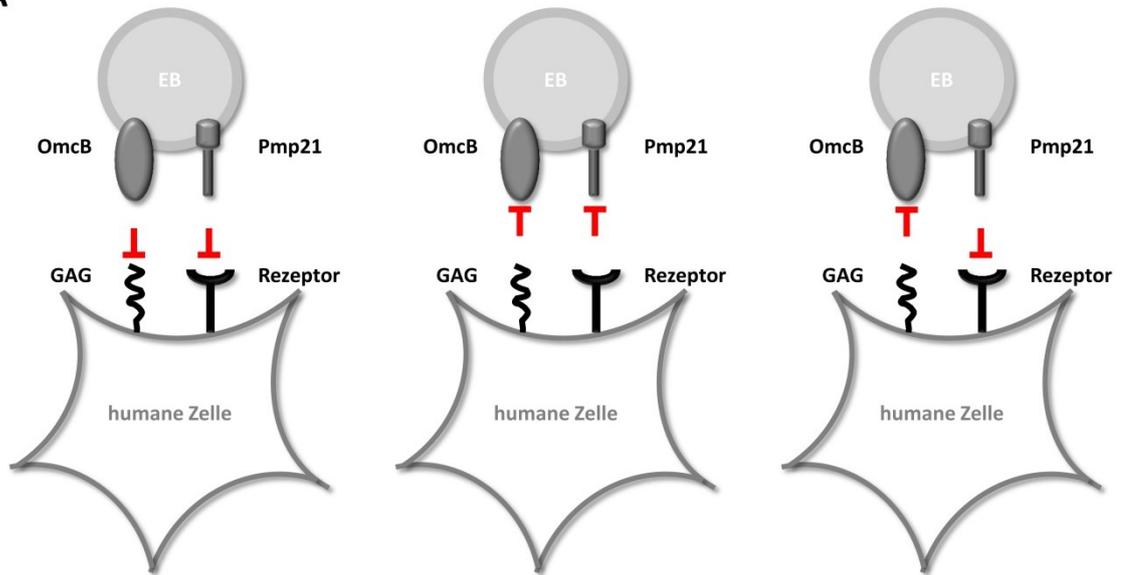
Im ersten experimentellen Ansatz wurden die humanen Bindestellen für Pmp21 und OmcB durch Vorinkubation von Humanzellen mit rekombinantem Protein blockiert (Abb. 4.13 B). Die Behandlung mit rekombinantem Pmp21 führte zu einer konzentrationsabhängigen Infektionsreduktion bis zu einer Restinfektion von 50 % bei 200 µg/ml. Die Blockierung der GAGs als OmcB-Bindestellen auf der humanen Zelloberfläche (Fadel and Eley 2007; Moelleken and Hegemann 2008) durch rekombinantes OmcB resultierte ebenfalls in einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Infektion bis zu 58 %. Eine Kombination beider Proteine führte hingegen zu einer signifikant stärkeren Verminderung der *C. pneumoniae* Infektion als beide Proteine alleine. So resultierte eine Vorinkubation der Humanzellen mit 200 µg/ml Pmp21 und OmcB zusammen (100 µg/ml Pmp21 + 100 µg/ml OmcB) in einer Inhibierung der Infektion auf 36 %. Dieser synergistische Effekt weist auf eine Blockierung verschiedener Bindestellen auf der humanen Zelloberfläche durch rekombinantes Pmp21 und OmcB hin. Folglich sind die beiden Proteine an verschiedenen Adhäsionsmechanismen beteiligt.

Um diese Daten zu verifizieren, wurden im folgenden Experiment Pmp21 und OmcB auf der EB-Oberfläche durch Inkubation mit polyklonalen Antikörpern blockiert (Abb. 4.13 C). Auch dieser experimentelle Ansatz belegte eine synergistische Funktion beider Proteine im Infektionsgeschehen. So führte beispielsweise eine 1:10 Verdünnung des finalen  $\alpha$ -Pmp21-Serums zu einer Restinfektion von 58 % und des  $\alpha$ -OmcB-Serums zu 54 % im Vergleich zur Präimmun-Kontrolle. Beide Seren in Kombination resultierten in einer signifikant stärkeren Reduktion, beispielsweise bei einer 1:10 Verdünnung (1:20  $\alpha$ -Pmp21 + 1:20  $\alpha$ -OmcB) auf 37 %.

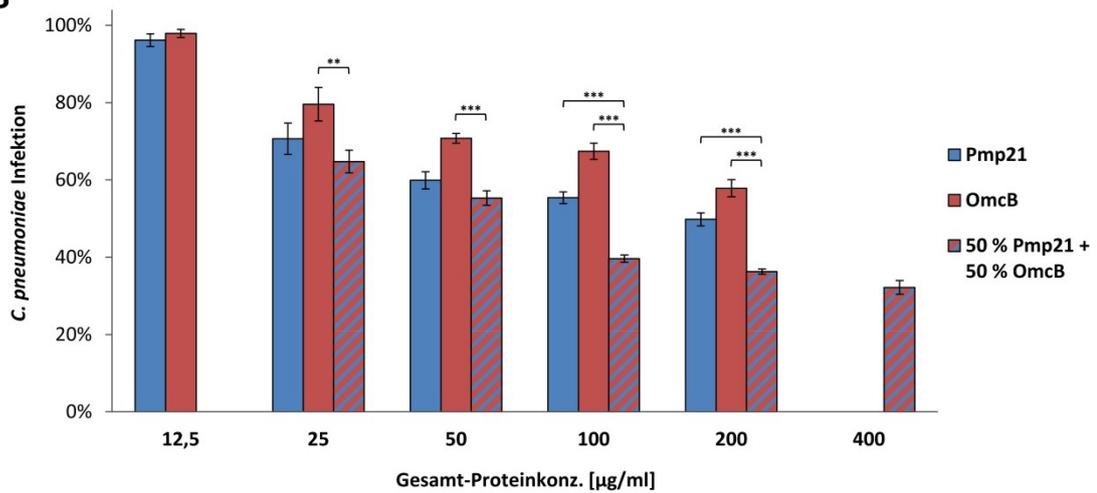
Im letzten experimentellen Ansatz wurde durch Behandlung der *C. pneumoniae* EBs mit Heparin das OmcB auf der EB Oberfläche blockiert, während die humane Bindungsstelle für Pmp21 durch Inkubation mit rekombinantem Protein inhibiert wurde (Abb. 4.13 D). Eine Vorinkubation der EBs mit Heparin (0,5 µg/ml) alleine resultierte in einer Restinfektion von 52 %. Dies stimmte mit den Daten von vorherigen Studien überein (Wuppermann, Hegemann et al. 2001). Die Behandlung mit rekombinatem Pmp21 führte zu einer konzentrationsabhängigen Infektionsreduktion bis zu einer Restinfektion von 50 % bei 200 µg/ml. Eine Blockierung des chlamydialen OmcB und der humanen Pmp21-Bindestelle

zusammen hatte einen stärkeren inhibitorischen Effekt. Beispielsweise resultierte die Behandlung mit Heparin und 200  $\mu\text{g/ml}$  Pmp21 in einer maximalen Reduktion der Infektion auf 34 %.

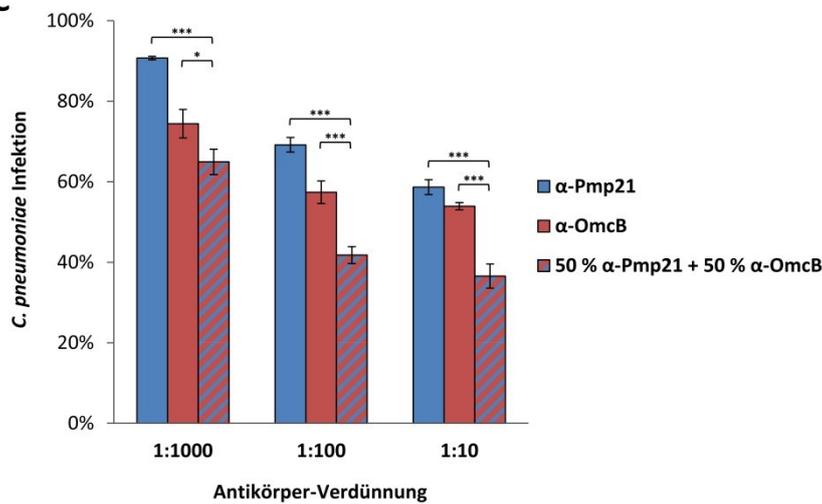
**A**

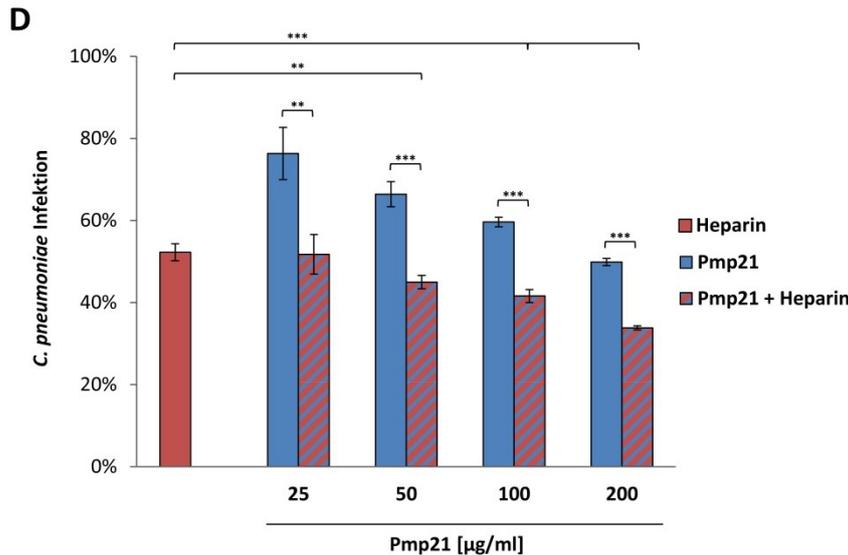


**B**



**C**





**Abbildung 4.13: Pmp21 und OmcB sind an zwei unterschiedlichen Adhäsionswegen beteiligt.**

**A)** Schematische Darstellung der verschiedenen Infektionsneutralisations-Analysen: Blockierung der humanen Bindungsstellen für Pmp21 und OmcB durch Inkubation von Humanzellen mit rekombinanten Proteinen (links), Blockierung der chlamydialen Adhäsine Pmp21 und OmcB auf der EB Oberfläche durch Inkubation mit polyklonalen Antikörpern (mittig), Blockierung von OmcB auf der EB Oberfläche durch Behandlung mit Heparin und Blockierung der humanen Bindungsstelle für Pmp21 durch Inkubation mit rekombinantem Protein (rechts).

**B)** Die Durchführung des Neutralisations-Experiments erfolgte wie in Abb. 4.12 beschrieben.

**C)** Gradientengereinigte *C. pneumoniae* EBs wurden mit Präimmunsereen oder finalen Vollseren in den angegebenen Verdünnungen für 1 h bei 4 °C vorbehandelt, bevor sie zur Infektion von HEp-2 Zellen eingesetzt wurden. Nach einer Inkubation der EBs und Humanzellen für 2 h bei 37 °C erfolgte ein Medienwechsel. 48 hpi wurden die infizierte Zellen mit Methanol fixiert und die Anzahl der Einschlüsse wurde in 1000 Humanzellen unter Verwendung eines FITC-konjugierten  $\alpha$ -LPS Antikörpers (1:4) mikroskopisch bestimmt (n=3). Dargestellt ist jeweils die relative Infektion im Vergleich zur Präimmunsereum-Kontrolle.

**D)** Die Durchführung des Neutralisations-Experiments mit rekombinantem Pmp21 erfolgte wie in Abb. 4.12 beschrieben. Des Weiteren wurden *C. pneumoniae* EBs mit 0,5 µg/ml Heparin für 30 min bei 4 °C vorinkubiert, bevor sie zur Infektion von HEp-2 Zellen eingesetzt wurden.

Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels *t*-Test bestimmt (\*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ , kein Stern = kein signifikanter Unterschied).

Interessanterweise entsprach die Infektionsreduktion in allen drei experimentellen Ansätzen nicht der kalkulierten Summe der Einzel-Inhibierungen. So führte beispielsweise die Behandlung mit beiden rekombinanten Proteinen zu einer Reduktion der Infektion um 68 % (Gesamtkonzentration 400 µg/ml), während Pmp21 alleine die Infektion um 50 % (200 µg/ml) und OmcB um 42 % (200 µg/ml) verminderte (Abb. 4.13 B). Würde man die Neutralisationseffekte von Pmp21 und OmcB summieren, wäre jedoch eine Inhibierung um 92 % zu erwarten. Dies lässt vermuten, dass die beiden verschiedenen Adhäsionsmechanismen von Pmp21 und OmcB teilweise miteinander assoziiert sind.

Somit konnte mit drei unabhängigen experimentellen Ansätzen belegt werden, dass die gemeinsame Blockierung der Pmp21- und OmcB-vermittelten Adhäsionswege zu einer

synergistischen Inhibierung der *C. pneumoniae* Infektion führt. Dies deutet auf zwei verschiedene Wirkungsmechanismen der beiden Adhäsine hin. Jedoch scheinen diese Adhäsionswege nicht vollständig voneinander getrennt, sondern funktionell miteinander verbunden zu sein.

### **4.3 Pmp21 vermittelt Internalisierung über eine Interaktion mit dem humanen EGF-Rezeptor**

Die Pmps erfüllen als Adhäsine eine wichtige Funktion in der *C. pneumoniae* Infektion. In vorangegangenen Studien von Dr. Katja Mölleken wurde nach einem potentiellen humanen Rezeptor beispielhaft für Pmp21 gesucht. Hierzu wurde in einem *in vitro* Experiment der humane EGF-Rezeptor als potentieller Interaktionspartner für Pmp21 identifiziert (Moelleken, Becker et al. 2013). Interessanterweise war schon zuvor beobachtet worden, dass rekombinantes Pmp21 die Aufnahme von proteinbeschichteten Latexkügelchen in Humanzellen vermitteln kann (Schmidt 2009). Dieses Resultat lässt auf eine Funktion von Pmp21 bei der Internalisierung von *C. pneumoniae* in die Wirtszelle schließen, eventuell vermittelt über eine Interaktion mit dem humanen EGF-Rezeptor. Im Folgenden wurde daher analysiert, ob eine Verbindung zwischen der Pmp21-EGFR-Interaktion und der Internalisierung von Pmp21-beschichteten Latexkügelchen vorliegt.

#### **4.3.1 Pmp21 interagiert stärker mit der zweiten Ligandenbindedomäne des EGF-Rezeptors als mit der ersten**

Um die potentielle Interaktion zwischen Pmp21 und dem humanen EGF-Rezeptor zu verifizieren, wurden Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen (Abb. 3.2) durchgeführt (Moelleken, Becker et al. 2013). Hierzu wurde ein N-terminales Fragment des humanen EGFR als Fusionsprotein mit der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) analog zu früheren Analysen exprimiert (Santra, Reed et al. 2002). Der natürliche Ligand EGF bzw. das M-Pmp21-Fragment lagen fusioniert an der Gal4-DNA-Bindedomäne (BD) vor. Ferner wurde untersucht, ob Pmp21 mit der gleichen EGFR-Region interagiert wie EGF. Dazu wurden zwei weitere EGFR-Varianten exprimiert, die entweder eine partielle Deletion der ersten Ligandenbindestelle (EGFR $\Delta$ BD1) oder der zweiten Ligandenbindestelle (EGFR $\Delta$ BD2) zeigten (Abb. 4.14 A).

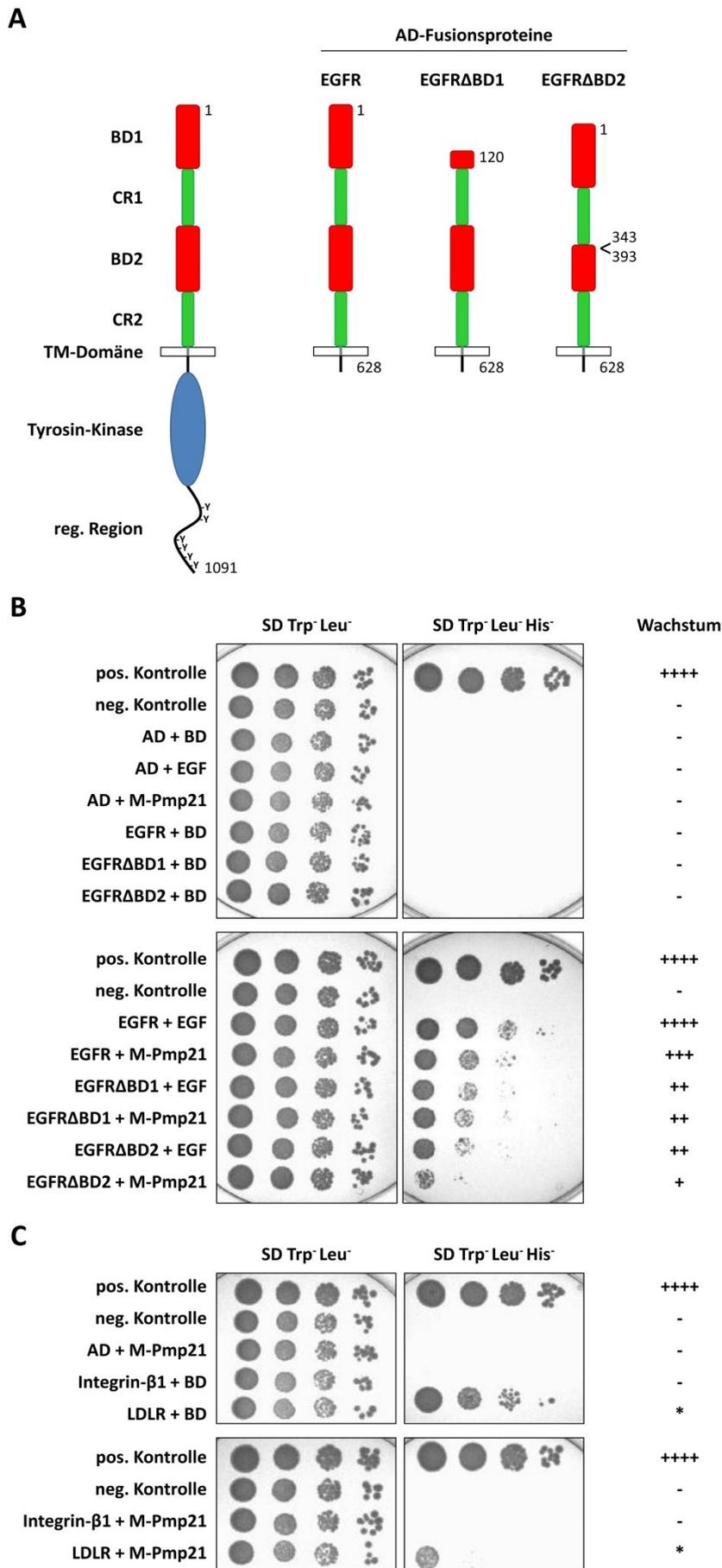


Abbildung 4.14: Pmp21 interagiert mit EGFR hauptsächlich über seine zweite Ligandenbindestelle.

**A)** Schematische Darstellung der EGFR-Subdomänen und der verwendeten AD-Fusionsproteine. Die extrazelluläre Domäne von EGFR besteht aus zwei Ligandenbindedomänen (BD1 und BD2) und zwei cysteinreichen Regionen (CR1 und CR2). Danach folgen jeweils eine Transmembran- und eine Kinase-Domäne sowie eine regulatorische Region mit Tyrosinresten (Y), die durch die Kinase-Domäne phosphoryliert werden können (Wells 1999; Santra, Reed et al. 2002). Die analysierten EGFR-Fragmente sind mit den entsprechenden Aminosäuren des Vollängen-EGFR gekennzeichnet.

**B) C)** Serielle Tropftests zur Wachstumsanalyse von Hefezellen. Die Wachstumskontrolle erfolgte auf dem Selektionsmedium SD Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup> und die Analyse der Interaktion der Fusionsproteine auf SD Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>His<sup>-</sup>. Es wurden jeweils 10.000, 1.000, 100 und 10 Zellen auf festes Selektionsmedium getropft und für 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Die quantitative Bewertung des Hefewachstums auf SD Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>His<sup>-</sup> ist auf der rechten Seite dargestellt. Positivkontrolle: p53 + SV40 T-Antigen; Negativkontrolle: Lamin C + SV40 T-Antigen; \*: aufgrund von Autoaktivität keine Quantifizierung möglich.

Die seriellen Tropftests zur Wachstumsanalyse auf SD Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup> Medium bestätigten, dass alle Fusionsprotein-exprimierenden Hefen ein vergleichbares Wachstum aufwiesen (Abb. 4.14 B, linke Spalte). Ferner zeigte keins der Konstrukte Autoaktivität auf SD Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>His<sup>-</sup> Medium (Abb. 4.14 B, oben rechts). Hefezellen, die EGFR zusammen mit EGF bzw. Pmp21 exprimierten, zeigten ein deutliches Wachstum auf SD Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>His<sup>-</sup> Medium, was auf eine Interaktion zwischen den AD- und BD-Fusionsproteinen hindeutete (Abb. 4.14 B, unten rechts). Eine Deletion der ersten Ligandenbindedomäne von EGFR (EGFR $\Delta$ BD1) führte zu einer schwächeren Interaktion zwischen EGFR $\Delta$ BD1 und EGF, aber auch zwischen EGFR $\Delta$ BD1 und Pmp21. Die Deletion der zweiten Ligandenbindestelle (EGFR $\Delta$ BD2) resultierte ebenfalls in einer ähnlich schwachen Interaktion mit dem Liganden EGF, wie in anderen Studien beschrieben (Santra, Reed et al. 2002). Im Vergleich dazu zeigten EGFR $\Delta$ BD2 und Pmp21 eine noch geringere Interaktion. Folglich deutet dieses Experiment darauf hin, dass die Interaktion zwischen Pmp21 bzw. EGF und dem EGF-Rezeptor über beide Ligandenbindestellen von EGFR erfolgt. Allerdings interagiert Pmp21 möglicherweise etwas stärker mit der zweiten Ligandenbindestelle von EGFR als mit der ersten.

Um die Spezifität der Bindung zwischen Pmp21 und dem humanen EGF-Rezeptor zu verifizieren, wurde mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen auch überprüft, ob Pmp21 mit anderen humanen Membranproteinen interagieren kann. Hierfür wurden LDLR (low density lipoprotein receptor) und Integrin- $\beta$ 1 als Kontrollen ausgewählt. Von beiden humanen Proteinen wurde jeweils die extrazelluläre Domäne (LDLR: AS 1-787, Integrin- $\beta$ 1: AS 1-728) als Fusionsprotein mit der Gal4-Aktivierungsdomäne exprimiert (Abb. 4.14 C). Das LDLR-Konstrukt zeigte Autoaktivität als AD-Fusionsprotein im Hefe-Zwei-Hybrid-System (mit \* markiert). Folglich konnte keine Aussage über eine Interaktion zwischen Pmp21 und LDLR gemacht werden. Hefezellen, die Integrin- $\beta$ 1 und Pmp21 coexprimierten, wiesen kein Wachstum auf SD Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>His<sup>-</sup> Medium auf. Demnach bestand keine Interaktion zwischen dem Integrin- $\beta$ 1 und Pmp21.

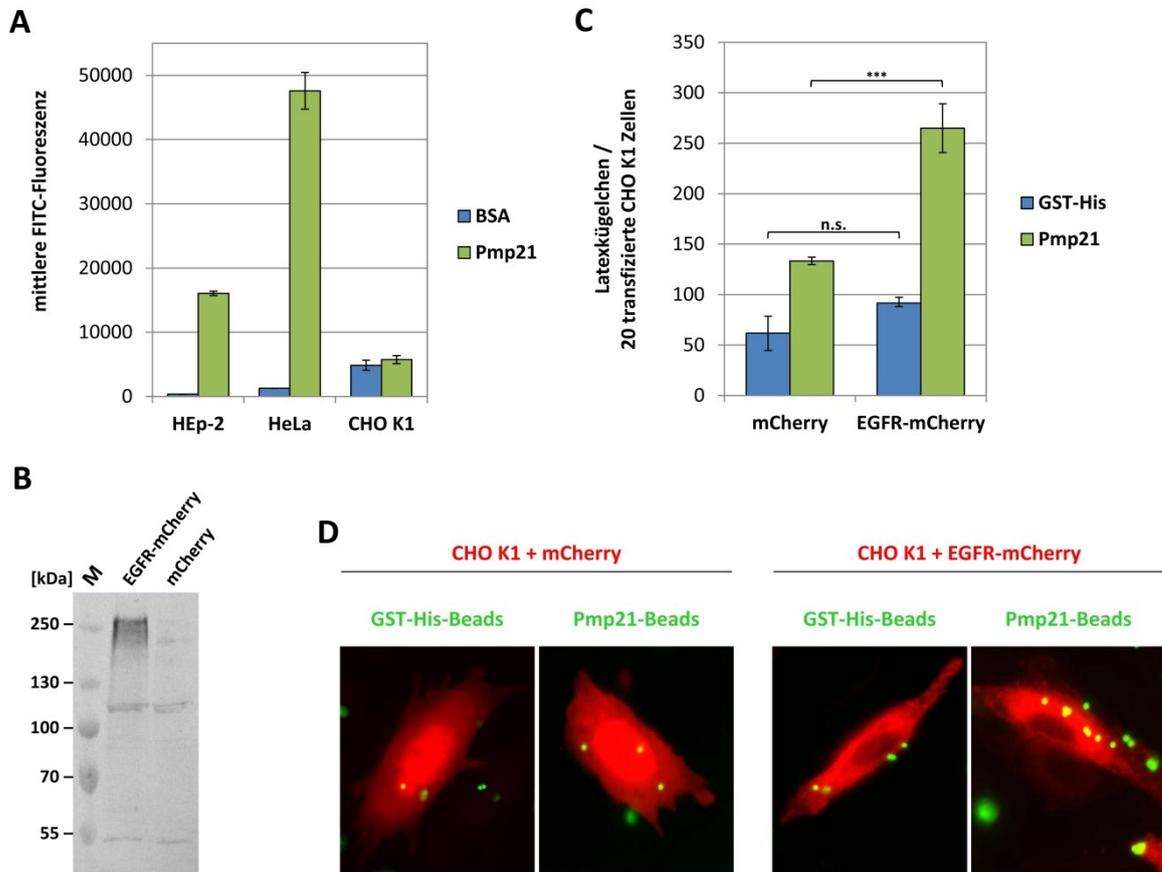
Zusammenfassend zeigten diese Experimente, dass eine spezifische Interaktion zwischen Pmp21 und EGFR vorliegt, wobei besonders die zweite Ligandenbindestelle von EGFR eine wichtige Funktion bei der Bindung ausübt.

### 4.3.2 Pmp21 zeigt keine Bindung an EGFR-negative CHO K1 Zellen

Die Hefe-Zwei-Hybrid-Daten hatten gezeigt, dass Pmp21 spezifisch an den humanen EGF-Rezeptor bindet. Falls EGFR den einzigen Rezeptor auf der Wirtszelloberfläche für Pmp21 darstellt, dürfte Pmp21 keinerlei Adhäsivität an EGFR-negative Zellen aufweisen. Ferner sollte eine Komplementierung dieser EGFR-Defizienz in einer Wiederherstellung der Adhäsivität von Pmp21 an die Zellen resultieren. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde im Folgenden die Adhäsion von Pmp21-beschichteten Latexkügelchen an die Hamsterzelllinie CHO K1 (chinese hamster ovary) untersucht, die keine endogene EGFR-Expression aufweist (Nogami, Yamazaki et al. 2003; Moelleken, Becker et al. 2013).

Im Adhäsionstest dienten die beiden EGFR-exprimierenden Zelllinien HEP-2 und HeLa als Positivkontrollen für eine Interaktion mit Pmp21-beladenen Latexkügelchen (Abb. 4.15 B). Im Vergleich zu der schwachen Bindung von BSA-beschichteten Kügelchen an HEP-2 und HeLa Zellen (mittlere Fluoreszenz von ca. 300 bzw. 1200), zeigten die mit rekombinatem Pmp21-beschichteten Latexkügelchen eine signifikante Adhäsion an die Humanzellen (mittlere Fluoreszenz von ca. 16000 bzw. 48000). Im Gegensatz dazu resultierte eine Inkubation der proteinbeschichteten Latexkügelchen mit CHO K1 Zellen in einer vergleichbar geringen Bindung von BSA- und Pmp21-beschichteten Latexkügelchen (mittlere Fluoreszenz von ca. 4900 bzw. 5700). Dies lässt vermuten, dass es sich hierbei um eine unspezifische Bindung handelt. Da rekombinantes Pmp21 keine spezifische Adhäsion an EGFR-negative CHO K1 Zellen aufwies, deutete dies darauf hin, dass Pmp21 vermutlich nur EGFR und keinen weiteren humanen Rezeptor als Interaktionspartner für die Adhäsion nutzt. Da eine EGFR-Expression in CHO K1 Zellen mittels Transfektion eines entsprechenden Expressionsvektors induziert werden kann (Yao, Dolginov et al. 2000), wurde überprüft, ob eine Pmp21-Adhäsion an CHO K1 Zellen durch eine EGFR-Expression nach Transfektion komplementiert werden kann. Bei der Kontrolle der EGFR-Expression mittels Westernblot wurde nur für EGFR-mCherry-transfizierte Zellen eine Bande auf der Höhe von ca. 250 kDa nachgewiesen (Abb. 4.15 B). Die deutliche Abweichung vom theoretischen Molekulargewicht (150 kDa) ist auf die starke Glykosylierung von EGFR zurückzuführen. Zusätzliche unspezifische Banden wurden sowohl für EGFR-mCherry als auch mCherry-transfizierte Zellen detektiert. Eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der mCherry-transfizierten CHO K1 Zellen zeigte ein gleichmäßiges Fluoreszenzsignal im Zytoplasma sowie eine

Akkumulation im Zellkern (Abb. 4.15 D). Im Gegensatz dazu wurde das EGFR-mCherry Fusionsprotein in der Plasmamembran und im Zytoplasma, jedoch kaum im Zellkern detektiert. Dies korreliert mit vorherigen Untersuchungen von EGFR-transfizierten CHO Zellen (Yao, Dolginov et al. 2000).



**Abbildung 4.15: Pmp21-beschichtete Latexkugeln binden nicht an EGFR-negative Zellen.**

**A)** FACS-Auswertung der Adhäsionsexperimente mit HEp-2, HeLa und CHO K1 Zellen. Durchführung wie in Abb. 4.5 beschrieben.

**B)** Westernblot-Analyse zur Kontrolle der EGFR-Expression in EGFR-mCherry- bzw. mCherry-transfizierten CHO K1 Zellen. Die Transfektion erfolgte mittels TurboFect für 24 h. Die transfizierten Zellen eines Wells wurden mit 150 µl Phospho-Lysis-Puffer für 10 min bei 37 °C lysiert und mit 57,5 µl Protein-Ladepuffer und 23 µl DTT gekocht. 20 µl der Probe wurden auf ein SDS-Gel geladen und im Westernblot unter Verwendung eines α-EGFR Antikörpers (1:300) analysiert. M: Größenstandard (PageRuler™ Plus)

**C)** Mikroskopische Auswertung des Adhäsionsexperiments. EGFR-mCherry- bzw. mCherry-transfizierte CHO K1 Zellen wurden mit einem 5-fachen Überschuss an proteinbeschichteten Latexkugeln für 1 h bei 37 °C inkubiert, die ungebundenen Kugeln mit PBS gewaschen, Zellen mit 3 % PFA fixiert und für jeweils 20 transfizierte Zellen die daran gebundenen Latexkugeln mikroskopisch bestimmt (n = 3).

Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels *t*-Test bestimmt (\*\*\*,  $P < 0,001$ , n.s. = nicht signifikant).

**D)** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (63 x Vergrößerung) von transfizierten CHO K1 Zellen (rot) mit gebundenen Latexkugeln (grün).

Im Adhäsionsexperiment zeigten GST-His-beschichtete Latexkugeln eine schwache Bindung an mCherry und EGFR-mCherry-transfizierte CHO K1 Zellen ( $62 \pm 17$  bzw.  $92 \pm 6$  Kugeln pro 20 transfizierte Zellen) (Abb. 4.15 C). Im Vergleich dazu wiesen Pmp21-

beladenen Kügelchen eine stärkere Adhäsion an mCherry und EGFR-mCherry-transfizierte Zellen auf ( $133 \pm 4$  bzw.  $265 \pm 24$  Kügelchen pro 20 transfizierte Zellen). Während somit kein signifikanter Unterschied in der Bindungsstärke von GST-His-beschichteten Kügelchen an mCherry-transfizierten Zellen im Vergleich zu EGFR-mCherry-transfizierten Zellen identifiziert wurde, adhärten Pmp21-Latexkügelchen signifikant stärker an EGFR-mCherry-transfizierte Zellen als an mCherry-exprimierende Zellen. Folglich führte die Expression von EGFR in CHO K1 Zellen zu einer signifikant stärkeren Adhäsion von Pmp21.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass Pmp21 keine Bindung an EGFR-negative CHO K1 Zellen aufwies, was die Rolle von EGFR als Rezeptor für Pmp21 bestätigte. Dementsprechend führte eine Komplementierung der EGFR-Defizienz durch Transfektion zu einer Adhäsivität von Pmp21 an die Zellen.

### **4.3.3 Rekombiantes Pmp21 vermittelt eine Internalisierung von Latexkügelchen in HEp-2 Zellen**

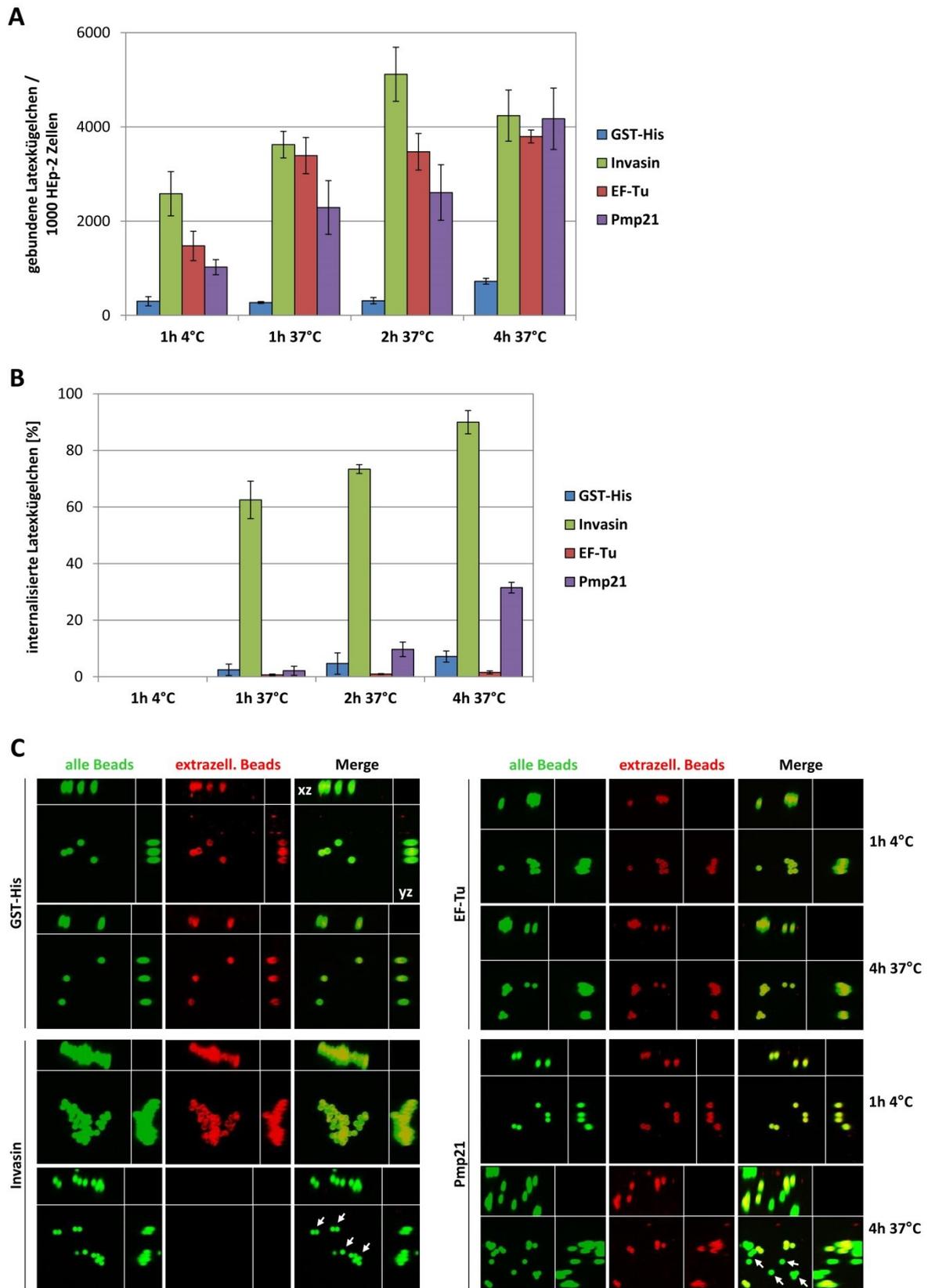
In vorangegangenen Studien wurde erstmalig beobachtet, dass Pmp21-beschichtete Latexkügelchen internalisiert werden (Schmidt 2009). Um die Pmp21-vermittelten Adhäsions- und Internalisierungsprozesse genauer zu untersuchen, wurde eine Zeitkinetik mit proteinbeschichteten Latexkügelchen bei 37 °C aufgenommen (Abb. 4.16). Zusätzliche Analysen wurden bei einer Temperatur von 4 °C durchgeführt, die zwar Adhäsionsprozesse erlaubt, jedoch den Ablauf von endozytotischen Prozessen inhibiert (Steinman, Mellman et al. 1983). Zum Vergleich wurde das gut untersuchte bakterielle Internalisierungsprotein Invasin, ein Adhäsion von *Y. pseudotuberculosis*, verwendet (Dersch and Isberg 1999).

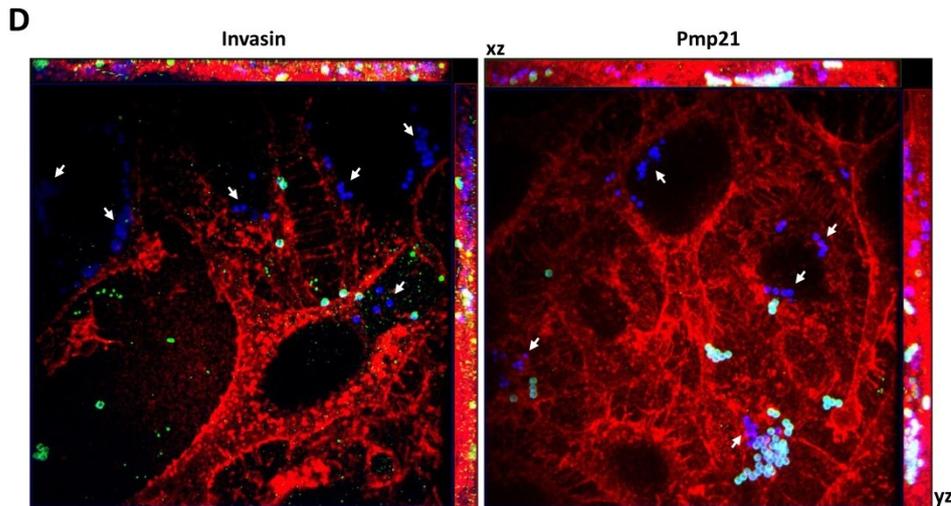
Die Quantifizierung der Adhäsion der proteinbeschichteten Latexkügelchen bestätigte für die Negativkontrolle GST-His eine sehr geringe Bindung (ca. 300 Latexkügelchen/1000 HEp-2) bei einer Inkubation für 1 h bei 4 °C bzw. für 1-2 h bei 37 °C. Nach 4 h bei 37 °C wurde eine im Vergleich dazu etwas stärkere, aber dennoch relativ geringe Adhäsion (700 Latexkügelchen/1000 HEp-2) festgestellt. Invasin-beladene Latexkügelchen zeigten als Positivkontrolle bereits bei 4 °C eine deutliche Bindung (2600 Kügelchen/1000 HEp-2) sowie eine stärkere Adhäsion bei 37 °C, wobei die Adhäsivität von 1 h bis 2 h stark zunahm und nach 4 h Inkubation abnahm (ca. 3600, 5100 bzw. 4200 Kügelchen/1000 HEp-2). Der letzte Wert ist eventuell dadurch zu erklären, dass die Invasin-beschichteten Latexkügelchen zu diesem Zeitpunkt massiv internalisiert worden waren, was ihre mikroskopische Quantifizierung möglicherweise erschwerte. Für den chlamydialen Translation-Elongationsfaktor EF-Tu als weitere Proteinkontrolle wurde zunächst eine schwächere

Bindung bei 4 °C festgestellt (1500 Kügelchen/1000 HEp-2), die während einer Inkubation bei 37 °C stetig zunahm (3400-3800 Kügelchen/1000 HEp-2). Somit wurden erstmalig adhäsive Eigenschaften für das chlamydiale EF-Tu gefunden. Interessanterweise wurde bereits in früheren Studien für das EF-Tu verschiedener Bakterien eine Oberflächenlokalisation sowie eine Funktion bei der bakteriellen Adhäsion an Humanzellen publiziert (Granato, Bergonzelli et al. 2004; Barel, Hovanessian et al. 2008). Folglich wäre eine Funktion von EF-Tu auch bei der chlamydialen Adhäsion durchaus denkbar. Pmp21-beladene Latexkügelchen zeigten eine schwache Adhäsion bei 4 °C (1000 Kügelchen/1000 HEp-2) und einen zeitabhängigen stetigen Anstieg der Bindungsstärke bei 37 °C (2300-4200 Kügelchen/1000 HEp-2). Diese Adhäsionsanalysen bestätigen die adhäsiven Eigenschaften von Invasin, EF-Tu und Pmp21 und deuten auf eine schnellere Adhäsionskinetik von Invasin im Vergleich zu EF-Tu und Pmp21 hin.

Parallel zur Adhäsionsanalyse wurde die Internalisierungsrate der proteinbeschichteten Latexkügelchen bei 4 °C und 37 °C untersucht (Abb. 4.16 B, C). Für GST-His-beschichtete Kügelchen wurde eine sehr schwache Internalisierung bei beiden getesteten Temperaturen beobachtet (max. 7 % internalisierte Latexkügelchen), während EF-Tu-beladene Kügelchen keine signifikante Internalisierung aufwiesen (max. 2 %). Die Positivkontrolle Invasin zeigte keine Internalisierung der Latexkügelchen bei 4 °C, jedoch wurde bei 37 °C bereits nach 1 h eine deutliche Aufnahme der Invasin-beschichteten Kügelchen festgestellt (ca. 60 %). Die weitere Endozytose von Invasin-beladenen Kügelchen im zeitlichen Verlauf resultierte in einer Internalisierungsrate von ca. 90 % nach 4 h. Dies stimmt mit publizierten Daten überein (Dersch and Isberg 1999). Für Pmp21-beschichtete Latexkügelchen wurde erst nach einer Inkubation für 2 h bei 37 °C eine schwache Aufnahme nachgewiesen (10 %). Eine signifikante Internalisierung der Latexkügelchen war nach 4 h zu beobachten (32 %). Mittels WGA-Färbung der humanen Zellmembran und anschließender konfokaler Spinning-Disc MIP (maximum intensity projection) Aufnahmen konnte eine intrazelluläre Lokalisation von Invasin- bzw. Pmp21-beschichteten Latexkügelchen eindeutig bestätigt werden (Abb. 4.16 D). Insgesamt wurde festgestellt, dass Pmp21 eine signifikante Internalisierung von Latexkügelchen vermittelte, wobei der Internalisierungsprozess deutlich langsamer und schwächer ausfiel als für das bereits beschriebene Invasin von *Y. pseudotuberculosis*.

Zusammenfassend bestätigten diese Experimente eine Pmp21-vermittelte Internalisierung von Latexkügelchen in Humanzellen, wobei die Invasin-vermittelte Endozytose deutlich effektiver war als bei Pmp21.





**Abbildung 4.16: Internalisierung von Invasin- und Pmp21-beschichteten Latexkugeln.**

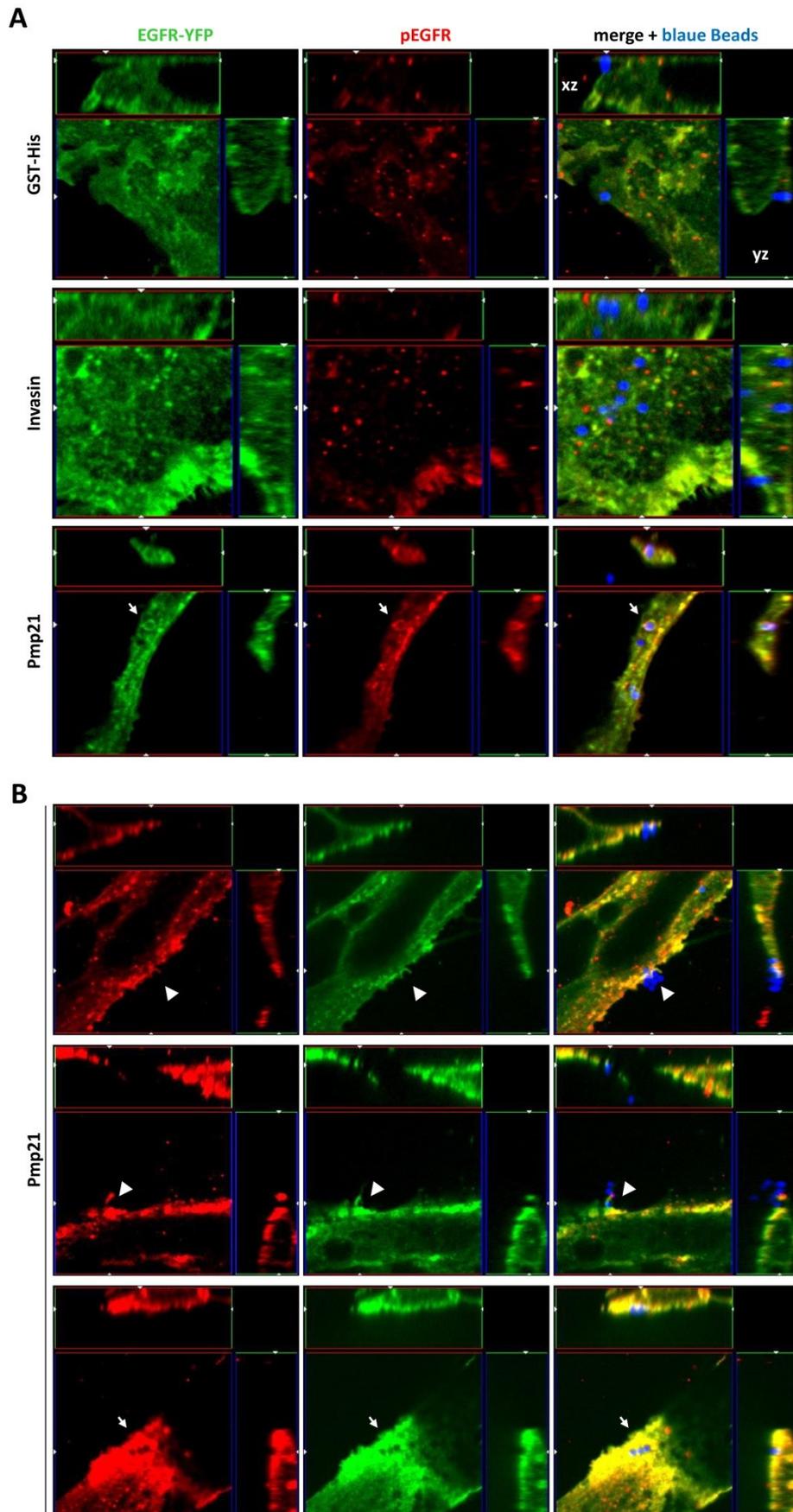
**A) B)** Mikroskopische Auswertung der Adhäsions- (A) und Internalisierungsanalysen (B). Grünfluoreszierende Latexkugeln wurden mit 200 µg/ml rekombinantem Protein gekoppelt. HEp-2 Zellen wurden mit einem 5-fachen Überschuss an proteinbeschichteten Latexkugeln für 1 h bei 4 °C bzw. 1-4 h bei 37 °C inkubiert und anschließend unter mikroskopischer Beobachtung mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit 3 % PFA für 20 min bei 4 °C, um die Färbung von intrazellulären Latexkugeln zu verhindern. Extrazelluläre Latexkugeln wurden mit den spezifischen Antikörpern Maus- $\alpha$ -GST (1:50), Kaninchen- $\alpha$ -Invasin (1:20), Ziege- $\alpha$ -EF-Tu (unverd.) und Kaninchen- $\alpha$ -M-Pmp21 (1:20) und sekundären Alexa594-gekoppelten  $\alpha$ -Maus,  $\alpha$ -Kaninchen bzw.  $\alpha$ -Ziege Antikörpern (1:200) detektiert. Für jeweils 1000 Zellen wurden die daran gebundenen Latexkugeln (A) sowie die internalisierten Kugeln (B) mikroskopisch bestimmt (n = 3).

**C)** Repräsentative konfokale Spinning-Disk MIP Aufnahmen des Internalisierungsexperiments. Pfeile markieren die internalisierten Latexkugeln.

**D)** Konfokale Spinning-Disk MIP Aufnahmen von HEp-Zellen mit proteinbeschichteten blauen Latexkugeln nach einer Inkubation für 4 h bei 37 °C. Die Durchführung erfolgte wie oben beschrieben. Abweichend dazu wurde die Detektion der extrazellulären Kugeln mit sekundären Alexa488-gekoppelten Antikörpern (1:200) durchgeführt. Ferner wurde die Zellmembran 30 min bei 30 °C mit Alexa594-markiertem WGA (1:1000) gefärbt (rot). Pfeile markieren die internalisierten Latexkugeln.

#### 4.3.4 Rekrutierung von phosphoEGFR um internalisierte Pmp21-beschichtete Latexkugeln

Es stellte sich auf Grund der bisherigen Untersuchungen von Pmp21 die Frage, ob eine Verbindung zwischen der spezifischen Pmp21-EGFR-Interaktion und der beobachteten Internalisierung von Pmp21-beschichteten Latexkugeln vorliegt. Hierzu wurde überprüft, ob eine Rekrutierung von EGFR-Molekülen um die internalisierten Pmp21-Kugeln erfolgt. Des Weiteren wurde analysiert, ob die Interaktion mit Pmp21 zu einer Phosphorylierung und somit Aktivierung von EGFR-Molekülen führt, wie es bereits für die Bindung des natürlichen Liganden EGF beschrieben wurde (Sorkin and Goh 2008).



**Abbildung 4.17: Rekombinantes Pmp21 führt zu einer Rekrutierung und Aktivierung von EGFR.**

**A) B)** Repräsentative konfokale Spinning-Disk MIP Aufnahmen von Internalisierungsanalysen. Blau-fluoreszierende Latexkügelchen wurden mit 200 µg/ml rekombinantem Protein gekoppelt. Die Transfektion von

CHO K1 Zellen wurde mittels TurboFect durchgeführt. Die transfizierten Zellen wurden mit einem 5-fachen Überschuss an proteinbeschichteten Latexkügelchen für 4 h bei 37 °C inkubiert, anschließend mit TBS gewaschen und mit 3 % PFA fixiert. Die Immunofluoreszenz-Analyse erfolgte mit  $\alpha$ -phosphoEGFR (1:400) und dem sekundären Alexa594-gekoppelten  $\alpha$ -Maus Antikörper (1:200). Markierung von EGFR-Ansammlungen an der Eintrittsstelle von Latexkügelchen durch Pfeilspitzen bzw. um internalisierte Kügelchen durch Pfeile.

GST-His-beladene Latexkügelchen wurden als Negativkontrolle mit EGFR-YFP-exprimierenden CHO K1 Zellen inkubiert und anschließend die Lokalisation von EGFR-YFP bzw. phosphoEGFR mikroskopisch untersucht (Abb. 4.17 A). Hierbei wurde ein punktiertes unregelmäßiges Signal für EGFR-YFP und phosphoEGFR in den Zellen identifiziert ohne eine offensichtliche Akkumulation von Signalen im Bereich von vereinzelt identifizierten Kügelchen. Rekombinantes Invasin induzierte, wie zuvor beobachtet, eine massive Internalisierung von proteinbeschichteten Latexkügelchen, jedoch führte dies weder zu einer Ansammlung von EGFR-YFP noch zu einer verstärkten Phosphorylierung von EGFR um die internalisierten Kügelchen. Im Gegensatz dazu war eine deutliche Verstärkung des Fluoreszenzsignals für EGFR-YFP sowie für phosphoryliertes EGFR an der Adhäsionsstelle von Pmp21-beschichteten Latexkügelchen und um internalisierte Pmp21-beschichtete Kügelchen zu beobachten (Abb. 4.17, Pfeilspitzen). Folglich rekrutiert Pmp21 spezifisch EGFR an die Adhäsionsstelle und induziert eine Phosphorylierung dieser Moleküle. Eine Akkumulation von phosphoEGFR wurde auch um internalisierte Latexkügelchen identifiziert (Abb. 4.17, Pfeile), was auf eine Funktion der Pmp21-EGFR-Verbindung nicht nur während der Adhäsion, sondern auch während der Internalisierung hindeuten könnte. Interessanterweise wurden an der Eintrittsstelle von Pmp21-beladenen Kügelchen häufig Cupförmige Ausstülpungen der Zellmembran identifiziert, die sowohl positiv für EGFR-YFP, als auch für phosphoEGFR Signale waren. Folglich geht der Internalisierungsprozess mit lokalen Membrandeformationen einher. Welche zellulären Prozesse hierbei aktiviert werden, bleibt zu klären.

Zusammenfassend bestätigen die mikroskopischen Untersuchungen, dass Pmp21 über eine Interaktion und anschließende Aktivierung von EGFR die Internalisierung von Latexkügelchen induziert.

#### 4.4 PmpD vermittelt Internalisierung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig eine gemeinsame Funktion der Pmps von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* als bakterielle Adhäsine gezeigt werden. Des Weiteren wurde beobachtet, dass rekombinantes Pmp21 die Internalisierung von proteinbeschichteten Latexkügelchen in eukaryotische Zellen vermittelt. Da Pmp21 von *C. pneumoniae* und das

*C. trachomatis* Ortholog PmpD eine 33 %ige Aminosäureidentität aufweisen (Abb. 1.5 C), wäre eine gemeinsame Funktion dieser beiden Adhäsine im Internalisierungsprozess durchaus denkbar. Daher sollte untersucht werden, ob rekombinantes PmpD von *C. trachomatis* Serovar E eine Internalisierung von Latexkügelchen bewirkt und ob ebenfalls eine Interaktion zwischen EGFR und PmpD vorliegt.

#### **4.4.1 Rekombinantes PmpD vermittelt die Internalisierung proteinbeschichteter Latexkügelchen**

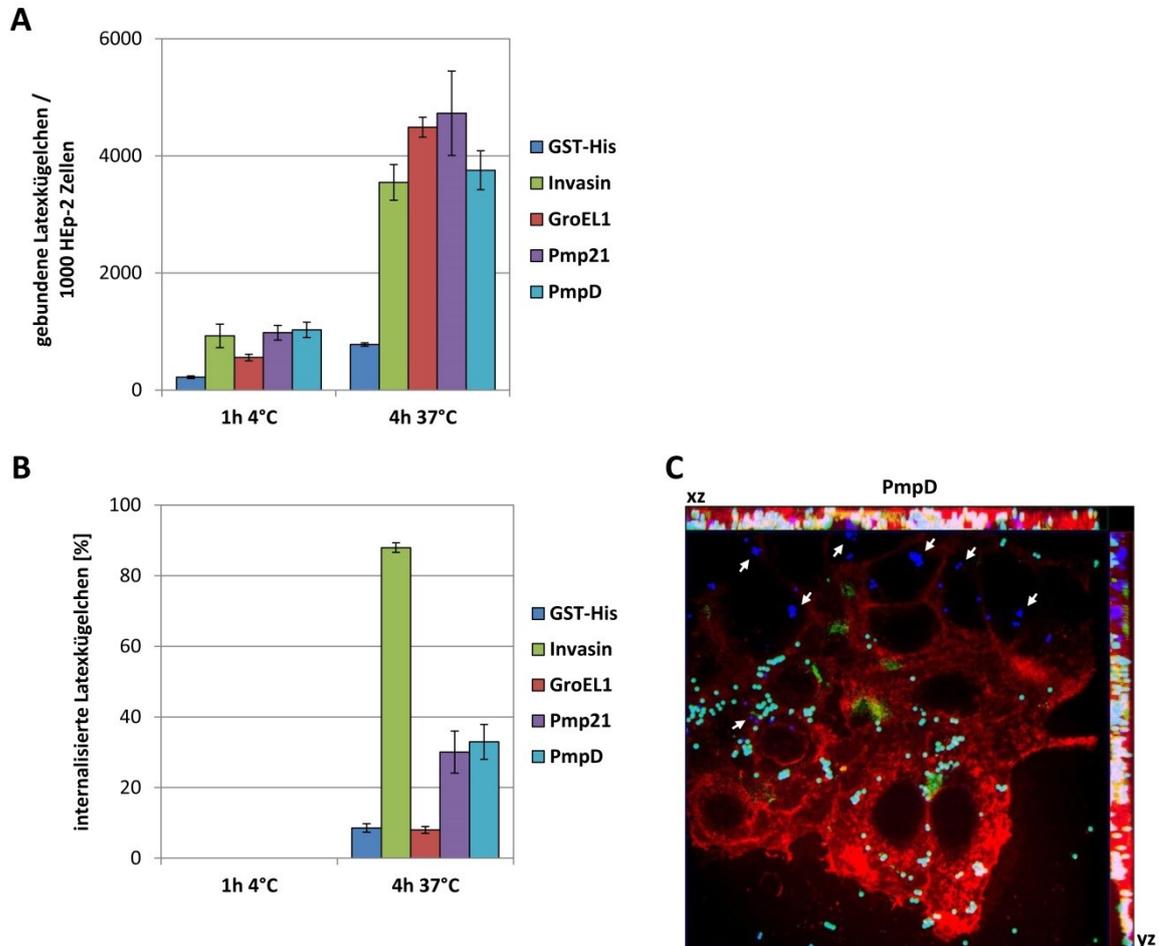
Um eine potentielle PmpD-vermittelte Internalisierung zu untersuchen, wurden Adhäsions- und Internalisierungsanalysen sowohl bei einer Temperatur von 4 °C, bei der nur Adhäsionsprozesse, aber keine Internalisierungsprozesse stattfinden sollten, als auch bei 37 °C durchgeführt.

GST-His-beschichtete Latexkügelchen zeigten als Negativkontrolle eine geringe Bindung an HEp-2 Zellen sowohl bei 4 °C als auch 37 °C (200 bzw. 700 Kügelchen/1000 HEp-2) (Abb. 4.18 A). Bei einer Inkubation bei 4 °C wurde für die rekombinanten Proteine Invasin von *Y. pseudotuberculosis*, GroEL1 und Pmp21 von *C. pneumoniae* und PmpD von *C. trachomatis* eine nur schwache Adhäsion bestimmt (900, 600, 1000 bzw. 1000 Kügelchen/1000 HEp-2). Dagegen zeigten diese Proteine nach einer Inkubation für 4 h bei 37 °C eine signifikante Adhäsion an Humanzellen (3500, 4500, 4700 bzw. 3800 Kügelchen/1000 HEp-2), was die Funktionalität dieser getesteten rekombinanten Adhäsine bestätigte. Die adhäsiven Eigenschaften des chlamydialen Chaperons GroEL1 wurden bereits zuvor beschrieben (Wuppermann, Molleken et al. 2008).

Parallel zu der Adhäsionsanalyse wurde der Anteil an internalisierten Latexkügelchen bestimmt (Abb. 4.18 B). Nach einer Inkubation bei 4 °C wurden keine aufgenommenen Kügelchen in den Zellen beobachtet. GST-His und GroEL1-beschichtete Latexkügelchen wiesen eine sehr schwache Internalisierung nach einer Inkubation bei 37 °C auf (jeweils 8 %). Im Gegensatz dazu wurde für Invasin-, Pmp21- und PmpD-beladene Latexkügelchen eine signifikante Internalisierung bei 37 °C identifiziert. Dabei führte Invasin zu einer sehr starken Aufnahme von Latexkügelchen (88 %) wie zuvor schon beobachtet (Abb. 4.16 B). Im Vergleich dazu wurde für Pmp21-beschichtete Latexkügelchen eine um den Faktor 3 schwächere Internalisierungsrate bestimmt (30 %). Interessanterweise erzielten PmpD-beladene Kügelchen eine ähnlich starke Aufnahme in Humanzellen (33 %). Die internalisierten PmpD-beschichteten Latexkügelchen konnten nach differenzieller Anfärbung

mit einem Antikörper in konfokalen Spinning-Disc MIP Aufnahmen eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 4.18 C).

Zusammenfassend ergab diese Untersuchung, dass PmpD von *C. trachomatis* eine vergleichbare Internalisierungsstärke wie das Ortholog Pmp21 von *C. pneumoniae*, aber eine deutlich schwächere Internalisierung als Invasin von *Y. pseudotuberculosis* vermittelt.



**Abbildung 4.18: Internalisierung von PmpD-beschichteten Latexkugeln.**

**A) B)** Mikroskopische Auswertung der Adhäsions- (A) und Internalisierungsanalysen (B). Die Analysen wurden wie in Abb. 4.16 beschrieben durchgeführt. Die Detektion von GroEL1 erfolgte über den Kaninchen- $\alpha$ -GroEL1 Antikörper (1:50) und von PmpD über den Maus- $\alpha$ -VSV Antikörper (1:50) sowie sekundären Alexa594-gekoppelten  $\alpha$ -Kaninchen bzw.  $\alpha$ -Maus Antikörpern (1:200).

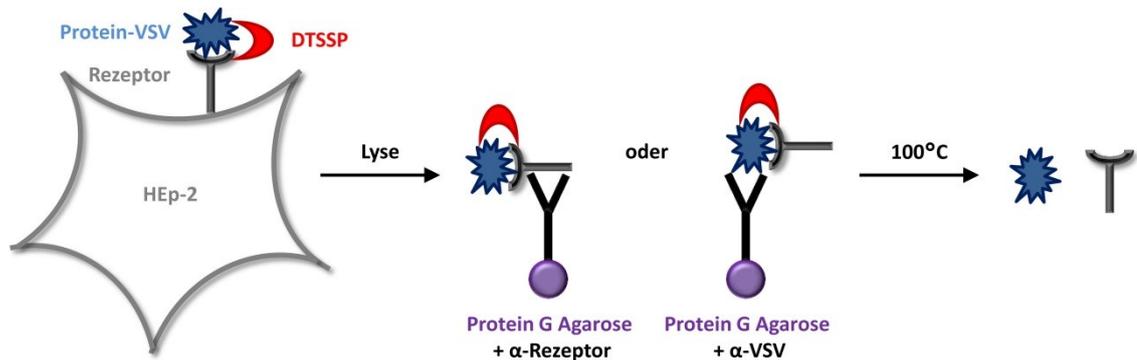
**C)** Konfokale Spinning-Disc MIP Aufnahmen von HEP-2 Zellen mit PmpD-beschichteten blauen Latexkugeln nach einer Inkubation für 4 h bei 37 °C. Die Detektion der extrazellulären Latexkugeln erfolgte mit dem  $\alpha$ -VSV Antikörper (1:50) und dem Alexa488-gekoppelten  $\alpha$ -Maus Antikörper (1:200). Mittels WGA (1:1000) wurde die Zellmembran angefärbt. Pfeile markieren internalisierte Kugeln.

#### 4.4.2 Rekombinantes PmpD interagiert nicht mit EGFR *in vitro*

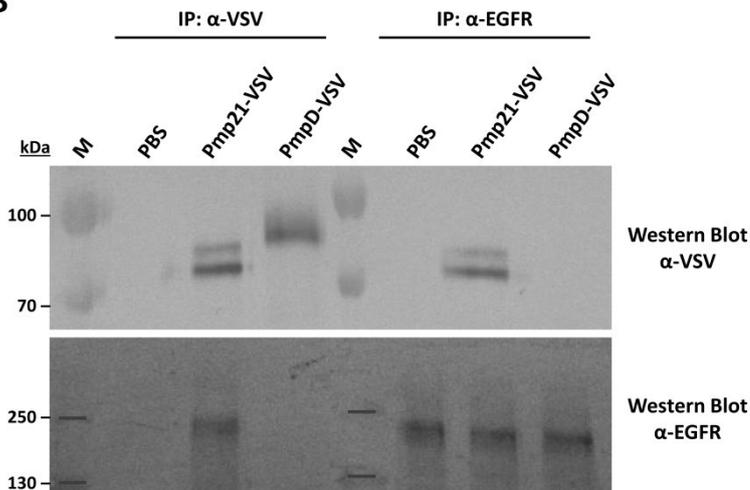
Die bisherigen Daten zeigen, dass rekombinantes Pmp21 sowie PmpD die Internalisierung von proteinbeschichteten Latexkugeln induzieren. Ferner wurde mit mehreren

unterschiedlichen experimentellen Ansätzen gezeigt, dass Pmp21 über eine Interaktion mit dem humanen EGF-Rezeptor Adhäsion und Internalisierung vermittelt (Moelleken, Becker et al. 2013). Daher stellte sich die Frage, ob auch PmpD mit EGFR interagiert. Um die Interaktion von rekombinantem Pmp21 und PmpD mit endogenem EGFR von HEP-2 Zellen zu untersuchen, wurde ein Rezeptor-Pulldown unter Verwendung des membranimpermeablen Crosslinkers DTSSP durchgeführt (Abb. 4.19 A).

**A**



**B**



**Abbildung 4.19: PmpD interagiert im Gegensatz zu Pmp21 nicht mit EGFR.**

**A)** Schematische Darstellung des Rezeptor-Pulldown Experiments. HEP-2 Zellen einer konfluenten 25 cm<sup>2</sup> Flasche wurden mit 200 µg rekombinantem Pmp21-VSV oder PmpD-VSV für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Nach dem „Crosslink“ der extrazellulär gebundenen Proteine mit 8 mM DTSSP für 30 min bei RT wurde der Crosslinker entfernt und die Reaktion durch Zugabe von 50 mM Tris pH 7,5 abgestoppt. Die Zellen wurden in 500 µl Phospho-Lysis-Puffer mit Proteaseinhibitor für 10 s bei 10 % Leistung mit dem Ultraschallstab auf Eis sonifiziert. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurde das Zellysate mit 2 µg α-VSV oder α-EGFR Antikörper für 1 h bei 4 °C vorinkubiert und anschließend 50 µl Protein-G-Agarose hinzugefügt. Nach 24 h bei 4 °C wurde das Lysat/Agarose-Gemisch mit PBS gewaschen und die Antikörper/Antigen-Komplexe mittels 100 µl Glycin pH 2,5 von der Protein-G-Agarose abgelöst. Das Eluat wurde mit 10 µl 1 M Tris pH 9 neutralisiert und mit 38,75 µl Protein-Ladepuffer und 15,5 µl DTT gekocht, wobei der „Crosslink“ aufgehoben wurde. 30 µl der Probe wurden auf ein SDS-Gel geladen.

**B)** Westernblot-Analyse des Rezeptor-Pulldowns mittels α-VSV (1:500) und α-EGFR (1:300) Antikörpern. Theor. MW: Pmp21-VSV 51 kDa, PmpD-VSV 68kDa. M: Größenstandard

Zunächst wurde eine Immunpräzipitation mit einem  $\alpha$ -VSV Antikörper durchgeführt, um die rekombinanten Proteine Pmp21-VSV bzw. PmpD-VSV sowie die daran gebundenen Rezeptormoleküle zu isolieren (Abb. 4.19 B, linke Seite). Die PBS-Kontrolle zeigte keinerlei unspezifische Banden in der Westernblot-Analyse mit  $\alpha$ -VSV. Die beiden rekombinanten Proteine Pmp21-VSV und PmpD-VSV wurden in gleichen Mengen in beiden Eluaten mit  $\alpha$ -VSV detektiert. Dabei liefen beide Proteine 20-30 kDa höher als erwartet. Wurde nun eine Westernblot-Analyse mit einem EGFR-Antikörper durchgeführt, so konnte nur für das Eluat mit rekombinantem Pmp21-VSV eine EGFR-Bande auf der Höhe von ca. 200 kDa detektiert werden. Dabei lief das EGFR-Protein, wie zuvor beobachtet, aufgrund der starken Glykosylierung höher als erwartet (theor. MW: 150 kDa). Interessanterweise wurde keine EGFR-Bande für die Probe mit PmpD-VSV identifiziert.

In einem analogen Experiment wurde eine Immunpräzipitation mit einem monoklonalen  $\alpha$ -EGFR Antikörper durchgeführt, um den endogenen EGFR und die damit vernetzten Liganden zu isolieren (Abb. 4.19 B, rechte Seite). Wurden die Eluate nun im Westernblot mit  $\alpha$ -EGFR analysiert, konnten in allen drei Proben gleiche Mengen an EGFR detektiert werden. In einer Westernblot-Analyse mit  $\alpha$ -VSV wurde nur eine Bande auf der Höhe von ca. 80 kDa in der Probe mit Pmp21-VSV detektiert.

Zusammenfassend zeigte dieses Experiment, dass rekombinantes Pmp21 mit endogenem EGFR von HEp-2 Zellen interagiert, während keine Assoziation zwischen PmpD und EGFR nachgewiesen werden konnte. Folglich beruht die PmpD-vermittelte Internalisierung vermutlich nicht auf einer Interaktion mit EGFR. Somit bedarf es weiterer Untersuchungen zur Identifikation des humanen Interaktionspartners von PmpD.

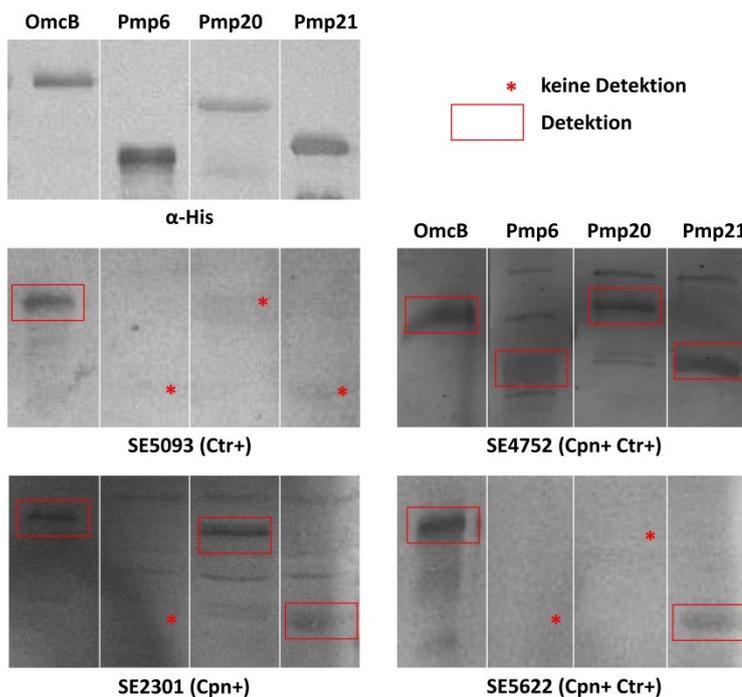
## 4.5 Die Pmps von *C. pneumoniae* zeigen eine variable klonale

### Expression

In vorangegangenen Arbeiten wurden Unterschiede in der Pmp-spezifischen Antikörper-Antwort in Patienten mit einer genitalen *C. trachomatis* Infektion dokumentiert (Tan, Hsia et al. 2009). Dies wurde als Konsequenz einer differenziellen Expression der chlamydialen Pmps beschrieben. Tatsächlich wurde eine Variabilität in der Pmp-Expression von *C. trachomatis* unter Zellkulturbedingungen beobachtet (Tan, Hsia et al. 2010; Carrasco, Tan et al. 2011). Somit könnten die Pmps von *C. trachomatis* potentiell eine Rolle bei der Umgehung der Immunantwort des Wirtes spielen. Im Folgenden wurde untersucht, ob dies auch für *C. pneumoniae* Pmps zutrifft.

### 4.5.1 *C. pneumoniae*-infizierte Menschen besitzen verschiedene Antikörperprofile gegen Pmps

Um zu prüfen, ob die Pmps von *C. pneumoniae* ebenfalls zu einer variablen Immunantwort in infizierten Patienten führen, wurde die spezifische Reaktivität von Patientenseren gegenüber rekombinanten Pmps untersucht (Abb. 4.20). Hierzu wurden exemplarisch Pmp6, Pmp20 und Pmp21 als repräsentative Proteine verschiedener Pmp-Subtypen ausgewählt. Als Kontrolle diente das am zweitstärksten in *C. pneumoniae* exprimierte Protein OmcB, welches als hochkonserviertes Protein von Chlamydien eine starke Immunogenität in Menschen aufweist (Wang, Zhang et al. 2010). Um eine möglichst native Faltung der rekombinanten Proteine im Westernblot zu ermöglichen, wurden die auf einer Blotmembran immobilisierten rekombinanten Proteine renaturiert.



**Abbildung 4.20: Patientenseren zeigen unterschiedliche Reaktivität gegen *C. pneumoniae* Pmps.**

1  $\mu$ g rekombinantes Protein wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit einem Guanidin-HCl-Gradienten (3.7.10.1) auf der Membran renaturiert. Die Ladekontrolle der eingesetzten Proteine erfolgte mittels  $\alpha$ -His (1:2500) und AP-konjugiertem  $\alpha$ -Maus Antikörper (1:7500). Die Immunreaktivität der Proteine wurde mit humanen Seren (1:1000) und AP-konjugiertem  $\alpha$ -Mensch Antikörper (1:7500) analysiert. Die verwendeten Seren stammen von *C. pneumoniae*- und/oder *C. trachomatis*-positiven Patienten und wurden vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene in Düsseldorf zur Verfügung gestellt. M: Größenstandard

Die Ladekontrolle der rekombinanten Proteine OmcB, Pmp6, Pmp20 und Pmp21 mit Hilfe des  $\alpha$ -His Antikörpers zeigte deutliche Hauptbanden mit leichten Intensitätsunterschieden (Abb. 4.20). Zur Kontrolle wurde ein Serum von einem *C. trachomatis*-infizierten Patienten verwendet, um eine Kreuzreaktivität von *C. trachomatis* spezifischen Antikörpern zu

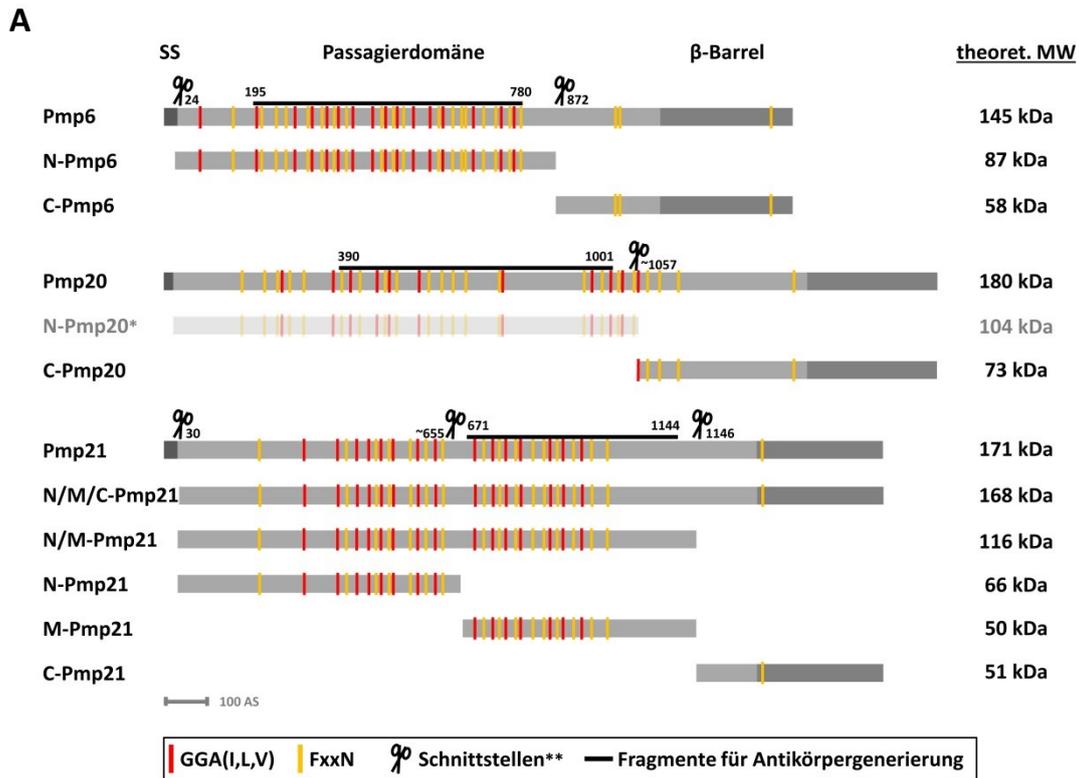
überprüfen. Hierbei wurde nur das *C. pneumoniae* OmcB detektiert, was dadurch zu erklären ist, dass OmcB stark konserviert in den chlamydialen Spezies vorliegt (Wagels, Rasmussen et al. 1994). Eine Kreuzreaktivität mit *C. pneumoniae* Pmps konnte somit ausgeschlossen werden. Nun wurde die Reaktivität der Seren von drei *C. pneumoniae*-positiven Patienten getestet. Hierbei wurden Unterschiede in der Pmp-Detektion sichtbar, während das OmcB mit allen drei Seren detektiert wurde. So zeigten zwei Patientenserum keine Reaktivität gegen Pmp6 (SE2301) bzw. gegen Pmp6 und Pmp20 (SE5622), wohingegen alle drei Pmps mittels Serum SE4752 detektiert wurden.

Aus dieser nicht-repräsentativen serologischen Analyse ging demnach hervor, dass Pmps ebenso wie das Adhäsion OmcB stark immunreaktiv zu sein scheinen. Ferner wiesen die untersuchten Seren von *C. pneumoniae* infizierten Patienten verschiedene Pmp-spezifische Antikörper-Profile auf.

#### **4.5.2 Pmp6, Pmp20 und Pmp21 werden während der Infektion prozessiert**

Um Expressions- und Lokalisationsanalysen für *C. pneumoniae* Pmps durchführen zu können, bedarf es spezifischer Antikörper. Daher wurde die Spezifität der antigengereinigten  $\alpha$ -Pmp Antikörper überprüft, indem Gesamtzellproteinproben von *C. pneumoniae* infizierten HEP-2 Zellen zu verschiedenen Infektionszeitpunkten in Westernblot-Analysen untersucht wurden (Abb. 4.21 B).

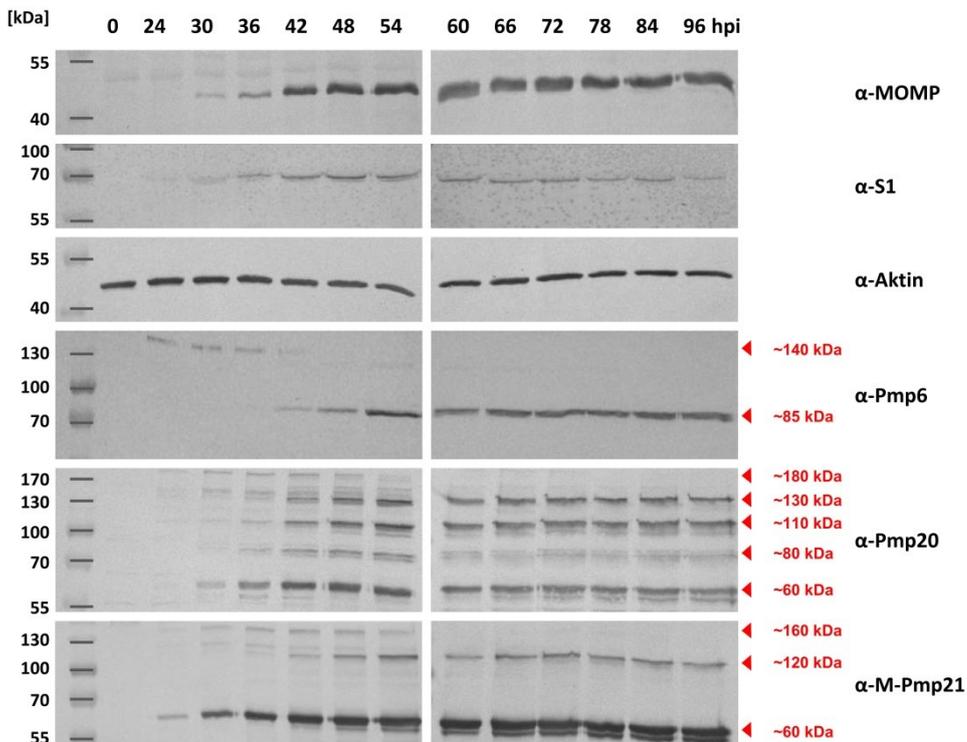
Zur Ladekontrolle wurden die Proben mit  $\alpha$ -Aktin entwickelt, was eine gleichmäßige Beladung der SDS-Gele bestätigte. Die Detektion mit dem  $\alpha$ -S1 Antikörper, gerichtet gegen ein konstitutiv exprimiertes intrachlamydiales Protein, diente der Überprüfung der Anzahl chlamydialer Partikel. Hierbei konnte ein Anstieg der Bandenintensität von 24 zu 42 hpi beobachtet werden, der auf die starke Replikation der Chlamydien in diesem Zeitraum zurückzuführen ist. Nach etwa 48 hpi beginnt die Redifferenzierung der RBs zu EBs, weshalb das S1-Signal dann nahezu konstant blieb. Zur Kontrolle der Expression eines chlamydialen Oberflächenproteins wurde der  $\alpha$ -MOMP Antikörper eingesetzt. Für MOMP konnte eine Bande nach 30 hpi detektiert werden, deren Intensität bis 42 hpi kontinuierlich zunahm und dann auf einem konstanten Level blieb.



\* nicht-identifiziertes, putatives Fragment

\*\* Schnittstellen für Pmp6 und Pmp20 (Vandahl *et al.*, 2002) und für Pmp21 (Wehrl *et al.*, 2004) mittels Massenspektrometrie identifiziert

**B**



**Abbildung 4.21: Polyklonale Pmp-Antikörper zeigen eine spezifische Detektion von Vollängen-Pmps und prozessierten Pmp-Fragmenten im Westernblot.**

**A)** Schematische Darstellung der bislang publizierten Schnittstellen von Pmp6, Pmp20 und Pmp21 in *C. pneumoniae* (Vandahl, Pedersen *et al.* 2002; Wehrl, Brinkmann *et al.* 2004). Theoretische Molekulargewichte der Pmp-Fragmente wurden rechts dargestellt. Die für die Generierung der polyklonalen Antikörper verwendeten rekombinanten Pmp-Fragmente (Herstellung: E. Schmidt, K. Mölleken) wurden mit schwarzen Linien markiert.

**B)** Westernblot-Analyse von Zelllysaten. Jeweils 2 kleine Zellkulturflaschen wurden mit *C. pneumoniae* (MOI=20) für unterschiedliche Zeitpunkte infiziert. Die Zellen wurden aus den Flaschen gekratzt und mit 150 µl Phospho-Lysis-Puffer, 57,5 µl Protein-Ladepuffer und 23 µl DTT aufgekocht. 30 µl der Ganzzellproteinproben wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit einem Guanidin-HCl-Gradienten (3.7.10.1) auf der Membran renaturiert. Zur Detektion wurden  $\alpha$ -MOMP (1:200),  $\alpha$ -S1 (1:500),  $\alpha$ -Aktin (1:2000) und die antigengereinigten Antikörper  $\alpha$ -Pmp6 (1:200),  $\alpha$ -Pmp20 (1:200) und  $\alpha$ -M-Pmp21 (1:200) verwendet. Theor. MW: MOMP 42 kDa, S1 62 kDa, Aktin 42 kDa, Pmps siehe A). M: Größenstandard

Unter Verwendung des  $\alpha$ -Pmp6 Antikörpers wurde zwischen 24 und 42 hpi eine Bande auf der Höhe von ca. 140 kDa detektiert, während ab 42 hpi eine 85 kDa-Proteinbande nachgewiesen wurde. Nach dem Molekulargewicht zu urteilen könnte es sich bei der oberen Bande um das Volllängenprotein handeln, während die untere Bande vermutlich das Fragment N-Pmp6 repräsentiert (vgl. Abb. 4.21 A). Das C-Pmp6 Fragment konnte nicht detektiert werden, da der Antikörper (siehe schwarze Linie) nur den N-terminalen Bereich von Pmp6 erkennt. Folglich korrelieren diese Resultate mit den zuvor identifizierten Schnittstellen von Pmp6 (Vandahl, Pedersen et al. 2002).

Für Pmp20 wurde ein komplexes Bandenmuster detektiert, das sich aus fünf Banden zusammensetzte, welche teilweise als Doppelbanden auftraten. Während die oberste Bande (ca. 180 kDa) zwischen 24 und 54 hpi nachgewiesen wurde, wurden die vier unteren Banden (ca. 130, 110, 80 und 60 kDa) ab 30 hpi detektiert. Bei der 180 kDa-Bande könnte es sich vermutlich um das Volllängenprotein Pmp20 handeln (vgl. Abb. 4.21 A). Da für Pmp20 bislang nur eine putative Schnittstelle festgestellt werden konnte (Vandahl, Pedersen et al. 2002), war eine Zuordnung der übrigen Fragmente von Pmp20 im Westernblot nicht möglich. Bei der Inkubation mit  $\alpha$ -M-Pmp21 konnten drei deutliche Proteinbanden detektiert werden, wobei die untere als Doppelbande identifiziert wurde. Die oberste Bande auf der Höhe von ca. 160 kDa wurde zwischen 24 und 54 hpi nachgewiesen, während die mittlere Bande (ca. 120 kDa) ab 36 hpi und die unterste Bande (ca. 60 kDa) bereits ab 24 hpi bis zum Ende des Infektionszyklus (96 hpi) identifiziert wurden. Wie in anderen Studien beschrieben (Vandahl, Pedersen et al. 2002; Wehrl, Brinkmann et al. 2004; Moelleken, Schmidt et al. 2010) handelt es sich bei der 160 kDa-Bande potentiell um N/M/C-Pmp21, bei der 120 kDa-Bande um das N/M-Pmp21 Fragment und bei der Doppelbande auf der Höhe von ca. 60 kDa um M-Pmp21 (vgl. Abb. 4.21 A). Eine Detektion von N-Pmp21 und C-Pmp21 war auf Grund der Lage der Epitope für den  $\alpha$ -M-Pmp21 Antikörper nicht möglich.

Somit konnte in diesen Analysen gezeigt werden, dass die polyklonalen Pmp-Antikörper spezifisch sowohl die Volllängenproteine als auch prozessierte Fragmente der Pmps detektieren. Interessanterweise wurden deutliche Unterschiede in der Anzahl und Höhe der jeweiligen Pmp-Proteinbanden sowie in der zeitlichen Prozessierung der verschiedenen Pmps identifiziert, was auf mögliche unterschiedliche Funktionen hindeuten könnte.

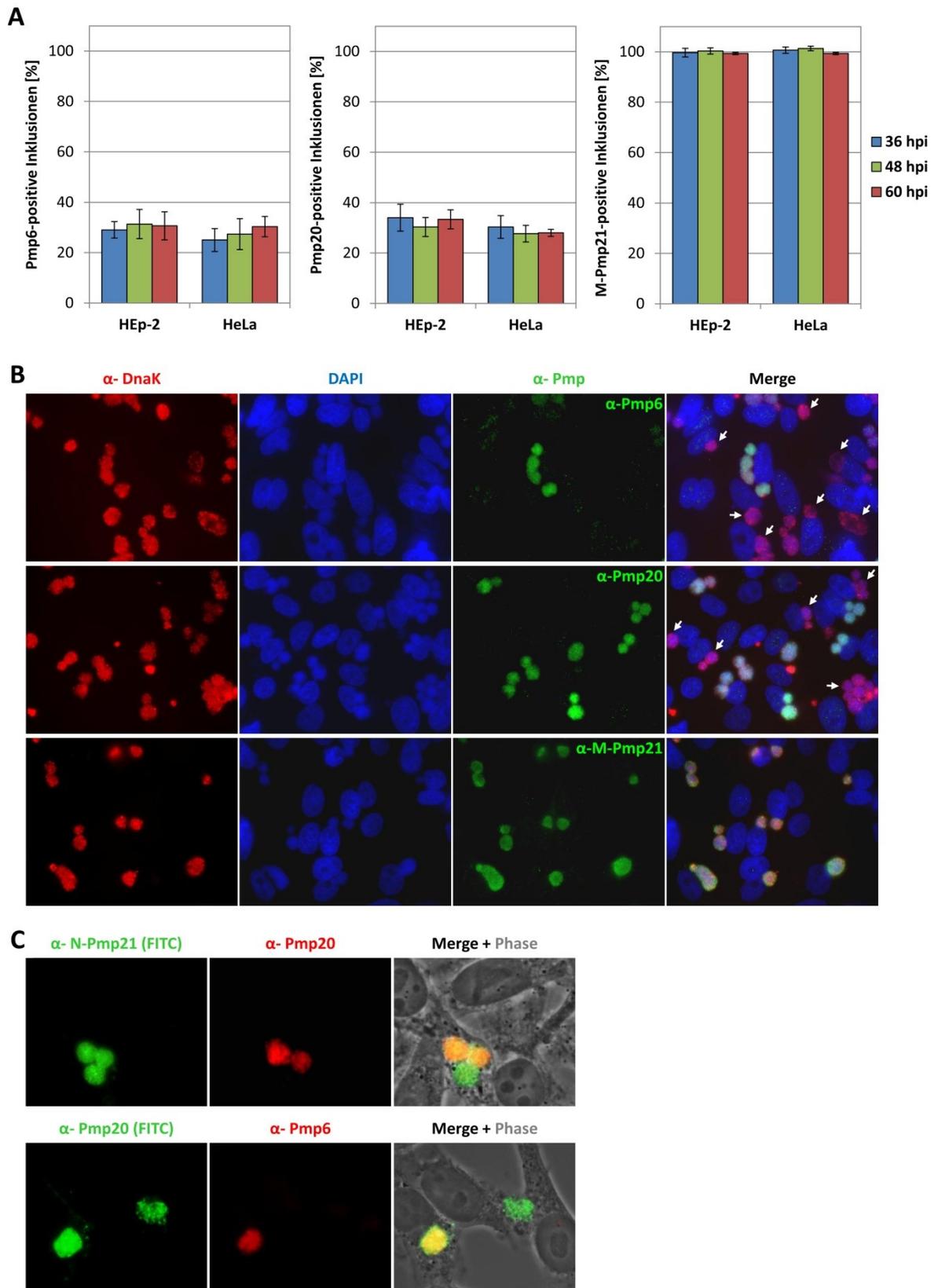
### 4.5.3 Nicht in allen Inklusionen werden alle Pmps exprimiert

Auf Grund der differentiellen Reaktivität von Patientenseren gegen repräsentative Pmps von *C. pneumoniae* wäre eine variable Expression von *C. pneumoniae* Pmps durchaus denkbar. Daher wurde im Folgenden mit den im Westernblot getesteten Pmp-Antikörpern die Expression der Pmps in *C. pneumoniae*-infizierten Humanzellen mikroskopisch bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit PFA fixiert und mit Triton permeabilisiert, um die Zellmembranen der Humanzelle und die Inklusionsmembran für die Antikörper durchgängig zu machen (Knudsen, Madsen et al. 1999; Moelleken, Schmidt et al. 2010). Um eventuelle Zelllinien-spezifische Unterschiede zu identifizieren, wurden sowohl HEp-2 als auch HeLa Zellen untersucht. Zur Detektion aller Inklusionen wurde ein Antikörper gegen das konstitutiv exprimierte, chlamydiale „Heat Shock“ Protein DnaK eingesetzt (Birkelund, Mygind et al. 1996).

Eine Doppelfärbung mit  $\alpha$ -DnaK und  $\alpha$ -Pmp6 Antikörpern zeigte, dass Pmp6 nicht in allen chlamydialen Einschlüssen detektierbar war (Abb. 4.22 A, B). Dabei wurde unabhängig vom analysierten Zeitpunkt oder der verwendeten humanen Zelllinie für ca. 25-30 % der DnaK-positiven Einschlüsse ein Pmp6-Signal identifiziert. Mit dem  $\alpha$ -Pmp20-Antikörper wurden in ca. 30-35 % der gebildeten Einschlüsse Pmp20 detektiert. Im Gegensatz dazu färbte der  $\alpha$ -M-Pmp21 Antikörper alle 1000 analysierten, mit  $\alpha$ -DnaK identifizierten Inklusionen an. Folglich wiesen Pmp6 und Pmp20 eine differenzielle Expression *in vitro* auf, wohingegen Pmp21 konstitutiv in allen Inklusionen unabhängig vom Infektionszeitpunkt und der verwendeten epithelialen Zelllinie exprimiert wurde.

Aufgrund dieser Beobachtung stellte sich die Frage, ob die Pmps unabhängig von einander oder miteinander gekoppelt in einer Inklusion exprimiert werden. Hierzu wurde ein bestimmter Pmp-Antikörper in einer Doppelfärbung mit einem anderen, FITC-markierten Pmp-Antikörper eingesetzt (Abb. 4.22 C). Bei der kombinierten Färbung mit  $\alpha$ -Pmp20 und  $\alpha$ -N-Pmp21-FITC wurden Pmp20-positive und -negative Inklusionen identifiziert, während Pmp21 in allen Inklusionen detektiert wurde. Wurde mit  $\alpha$ -Pmp6 und  $\alpha$ -Pmp20-FITC gefärbt, konnten Inklusionen identifiziert werden, die positiv für Pmp20 und negativ für Pmp6 waren (und *vice versa*). Folglich besteht keine Abhängigkeit zwischen der Expression von Pmp6, Pmp20 und Pmp21.

Zusammenfassend zeigten diese Expressionsanalysen, dass *C. pneumoniae* Pmps eine variable, über den Infektionszeitraum stabile Expression aufwiesen, die sowohl unabhängig von anderen Pmps als auch von der infizierten Zelle war.



**Abbildung 4.22: *C. pneumoniae* Pmps weisen eine differenzielle Expression auf.**

**A)** Quantifizierung der Expression von Pmp6, Pmp20 und Pmp21 in *C. pneumoniae* infizierten Zellen. Nach einer Infektion (MOI=20) für 36, 48 bzw. 60 h wurden die HEp-2 bzw. HeLa Zellen für 10 min bei RT mit 3 % PFA fixiert und für 10 min bei RT mit 0,2 % Triton permeabilisiert. Die Färbung aller chlamydialen Einschlüsse erfolgte mittels  $\alpha$ -DnaK (1:50) und dem Alexa594-gekoppelten  $\alpha$ -Maus Antikörper. Die Detektion der Pmps wurde mittels  $\alpha$ -Pmp6,  $\alpha$ -Pmp20 und  $\alpha$ -M-Pmp21 (jeweils 1:20) und dem Alexa594-gekoppelten  $\alpha$ -Kaninchen

Antikörper durchgeführt. Die humane und chlamydiale DNA wurde mittels DAPI (1:1000) gefärbt. Für 1000 DnaK-positive Inklusionen wurde der Anteil an Pmp-positiven Inklusionen mikroskopisch bestimmt. Für die Quantifizierung wurden Inklusionen mit einer starken sowie schwachen Pmp-Expression als Pmp-positiv deklariert (n=3).

**B)** Repräsentative mikroskopische Aufnahmen (63 x Vergrößerung) der chlamydialen Einschlüsse nach 48 hpi. Färbung siehe A. Pfeile markieren Inklusionen, die mit  $\alpha$ -DnaK, jedoch nicht mit einem  $\alpha$ -Pmp-Antikörper detektiert wurden.

**C)** Überlagerung von Phasenkontrast- und Fluoreszenz-Bildern (63 x Vergrößerung) 48 h infizierter HEp-2 Zellen. Die Immundetektion erfolgte indirekt mit einem  $\alpha$ -Pmp-Antikörper und einem sekundären Alexa594-markierten Antikörper (rot) und anschließend direkt mit einem FITC-konjugierten Pmp-Antikörper (grün).

## 4.6 Pmps von *C. pneumoniae* weisen inter- und intramolekulare Wechselwirkungen auf

Für natives, aus EBs isoliertes PmpD von *C. trachomatis* konnte erstmalig eine Interaktion nachgewiesen werden (Swanson, Taylor et al. 2009). Hierbei bestanden die identifizierten Oligomere aus dem Volllängenprotein sowie zwei prozessierten Fragmenten. Da die Pmps von *C. pneumoniae* einen ähnlichen Proteinaufbau aufweisen und ebenfalls einer komplexen Prozessierung unterliegen, wäre eine ähnliche Oligomerisierung durchaus denkbar. Im Folgenden wurde mittels verschiedener experimenteller Ansätze überprüft, ob eine mögliche inter- bzw. intramolekulare Interaktion zwischen den Pmps von *C. pneumoniae* vorliegt.

### 4.6.1 Pmp-Fragmente liegen bakterienassoziiert sowie löslich vor

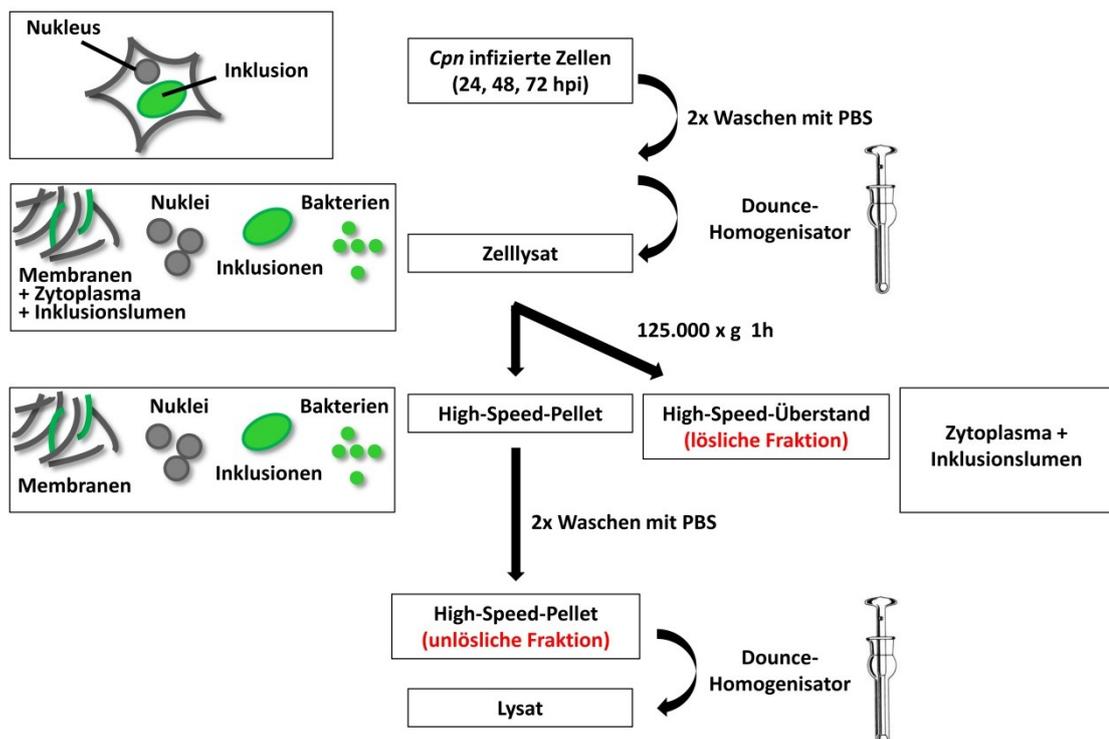
Da für Pmp6, Pmp20 und Pmp21 eine Prozessierung während der *C. pneumoniae* Infektion bestätigt wurde, stellte sich zunächst die Frage, ob die prozessierten Pmp-Fragmente weiterhin bakterienassoziiert bleiben oder sekretiert werden. Hierzu wurde eine Fraktionierung von *C. pneumoniae* infizierten HEp-2 Zellen mittels Ultrazentrifugation durchgeführt (Abb. 4.23 A). Dabei sollten die unlöslichen Fraktionen humane und chlamydiale Membranen, Zellkerne, und Bakterien beinhalten, während sich in den löslichen Fraktionen das humane Zytosol sowie das Inklusionslumen befinden sollten.

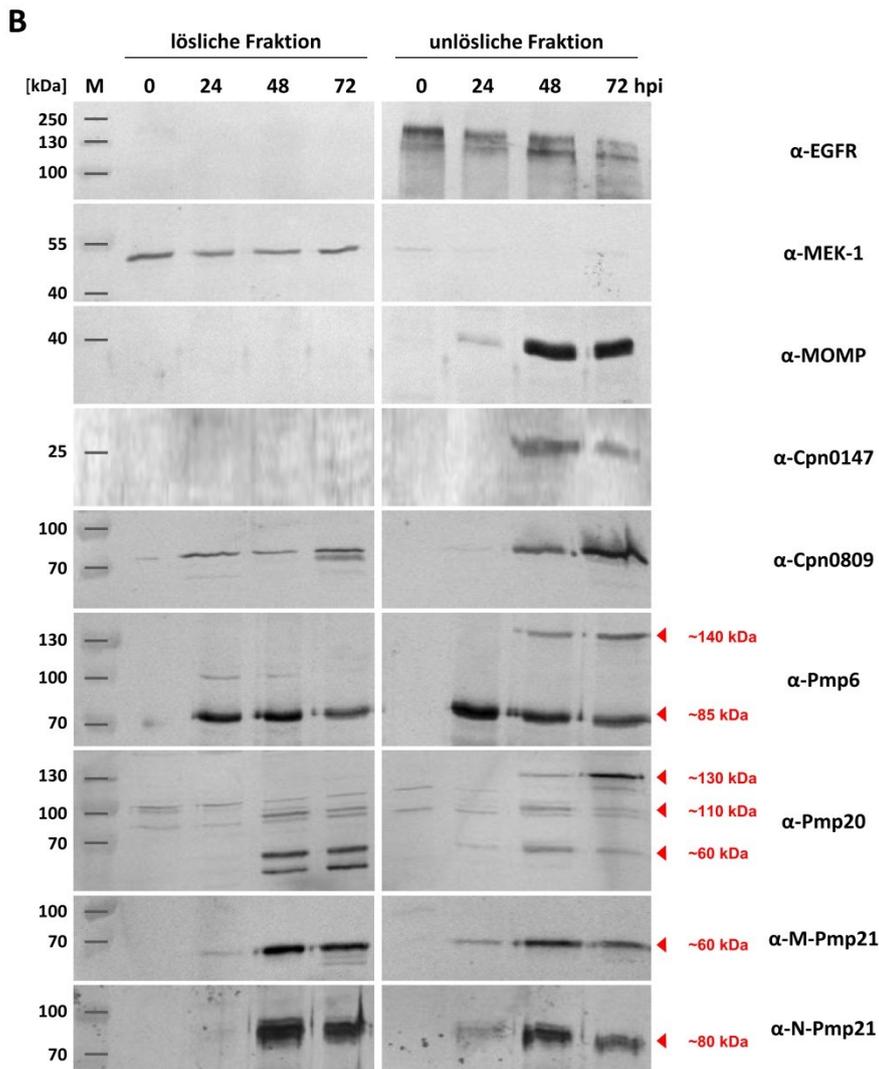
Um die Reinheit der Fraktionen zu kontrollieren wurden zunächst Westernblot-Analysen mit verschiedenen Antikörpern gegen humane und chlamydiale Markerproteine durchgeführt (Abb. 23 B). Das humane Transmembranprotein EGFR wurde als Positivkontrolle für die unlöslichen Fraktionen verwendet, die alle membranöse Bestandteile von Humanzellen beinhalten sollten. Tatsächlich wurde mit dem  $\alpha$ -EGFR Antikörper nur in den unlöslichen Fraktionen eine Doppelbande auf der Höhe von ca. 200 kDa detektiert. Im Gegensatz dazu wurde das zytoplasmatische Markerprotein MEK-1 hauptsächlich in den löslichen Fraktionen

nachgewiesen, während nur sehr geringe Mengen auch in den unlöslichen Fraktionen zu beobachten waren. Als chlamydiale Positivkontrolle für die unlöslichen Fraktionen wurde das Membranprotein MOMP genutzt. Wie zu erwarten wurde MOMP nach 24 hpi, dem Beginn der chlamydialen Replikationsphase, zunächst schwach und anschließend in höheren Mengen ausschließlich in den unlöslichen Fraktionen detektiert. Auch das Inklusionsmembran-Protein Cpn0147 (Herbst 2011) wurde nach 48 hpi exklusiv in den unlöslichen Fraktionen identifiziert. Ferner detektierte ein Antikörper gegen das putativ sekretierte Cpn0809 (Herbst 2011) eine Proteinbande sowohl in der löslichen als auch in der unlöslichen Fraktion, was auf eine Sekretion dieses chlamydialen Proteins hindeutet. Folglich konnte mittels humaner und chlamydialer Markerproteine eine deutliche Trennung von löslichen und unlöslichen Bestandteilen infizierter Humanzellen bestätigt werden.

Unter Verwendung des  $\alpha$ -Pmp6 Antikörpers wurde sowohl in allen löslichen als auch unlöslichen Fraktionen eine deutliche Bande auf der Höhe von ca. 85 kDa identifiziert, was auf eine teilweise Sekretion dieses Fragments hinweist. Zusätzlich dazu wurde nur in den unlöslichen Fraktionen eine höhere Bande (ca. 140 kDa) nach 48 hpi detektiert. Nach dem Molekulargewicht zu urteilen, repräsentieren diese Proteine vermutlich das Volllängenprotein und das prozessierte N-Pmp6 Fragment (vgl. Abb. 4.21). Da das Volllängenprotein einen  $\beta$ -Barrel als Membrananker aufweist, erklärt dies die ausschließliche Lokalisation in der unlöslichen Fraktion.

## A





**Abbildung 4.23: Detektion von Pmp-Fragmenten in löslichen und unlöslichen Fraktionen von *C. pneumoniae* infizierten HEp-2 Zellen.**

**A)** Schematische Darstellung des Fraktionierungsexperiments. Konfluente HEp-2 Zellen (32 kleine Zellkulturflaschen) wurden mit *C. pneumoniae* infiziert und nach 24, 48 bzw. 72 hpi in 7 ml PBS + Complete-Protease-Inhibitor-Cocktail abgekratzt. Die Zellyse erfolgte mit einem Dounce-Homogenisator auf Eis (20x grobe und 20x feine Pistill). Das Gesamtzelllysate wurde bei 125.000 x g für 1 h bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand entsprach der löslichen Fraktion. Die Pellet-Fraktion wurde nach zweimaligem Waschen in 7 ml PBS + Proteaseinhibitor resuspendiert und mit einem Dounce-Homogenisator auf Eis (20x grobe und 20x feine Pistill) homogenisiert. Von den löslichen Fraktionen und Pellet-Fraktionen wurde die gleiche Gesamtproteinmenge (jeweils 4 µg) auf ein SDS-Gel geladen.

**B)** Westernblot-Analysen der löslichen und unlöslichen Fraktionen. Die Detektion erfolgte mittels α-EGFR (1:300), α-MEK-1 (1:200), α-MOMP (1:200), α-Cpn0147 (1:100), α-Cpn0809 (1:50), α-Pmp6 (1:200), α-Pmp20 (1:200), α-M-Pmp21 (1:200) und α-N-Pmp21 (1:500) Antikörpern. Theor. MW: EGFR 134 kDa, MEK-1 45 kDa, MOMP 42 kDa, Cpn0147 15 kDa, Cpn0809 50 kDa, Pmps siehe Abb. 4.21 A. M: Größenstandard

Für Pmp20 wurden im Westernblot drei spezifische Banden (bei ca. 130, 110 und 60 kDa), sowie einige schwache unspezifische Banden identifiziert (vgl. Abb. 4.21). Das 130 kDa-Protein wurde ausschließlich in den unlöslichen Fraktionen ab 48 hpi identifiziert. Somit handelt es sich hierbei vermutlich um ein membranverankertes Protein. Dagegen wurde das

60 kDa-Fragment von Pmp20 als Doppelbande hauptsächlich in den löslichen Fraktionen ab 48 hpi detektiert. Folglich wird dieses Pmp20-Fragment sehr stark von den Bakterien sekretiert. Interessanterweise wurde nur die obere Bande der Doppelbande in geringen Mengen auch in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen, was auf eine partielle Bakterienassoziation hinweist.

Unter Verwendung des M-Pmp21 Antikörpers wurde eine Bande auf der Höhe von ca. 60 kDa von 24 hpi bis 72 hpi detektiert, die in beiden Fraktionen mit ähnlicher Intensität auftrat. Der N-Pmp21 Antikörper führte zur Detektion einer Bande auf der Höhe von ca. 80 kDa, wobei diese nach 24 hpi zuerst in den unlöslichen Fraktion und nach 48 hpi deutlich stärker in der löslichen Fraktion identifiziert wurde. Folglich liegen die Fragmente N-Pmp21 und M-Pmp21 sowohl bakterienassoziiert als auch löslich vor.

Zusammenfassend zeigte dieses Fraktionierungsexperiment, dass prozessierte Pmp-Fragmente sowohl bakterienassoziiert als auch löslich im Inklusionslumen und/oder im Zytosol vorkommen. Ähnliche Daten wurden durch Lokalisationsstudien für PmpD von *C. trachomatis* erhalten, das mittels Fraktionierung und Immunfluoreszenz-Mikroskopie bakterienassoziiert und partiell im Inklusionslumen identifiziert wurde (Kiselev, Skinner et al. 2009; Swanson, Taylor et al. 2009). Die Beobachtung, dass *C. pneumoniae* Pmp-Fragmente ohne  $\beta$ -Barrel, wie z.B. N-Pmp6, N-Pmp21 und M-Pmp21, partiell bakterienassoziiert bleiben, könnte in der Tat ein erster Hinweis auf eine Interaktion zwischen prozessierten Pmp-Fragmenten und membranverankerten Vollängen-Pmps sein.

#### **4.6.2 Lokalisationsanalysen von Pmp6, Pmp20 und Pmp21 in EBs durch Behandlung mit Detergenzien**

Um die biochemischen Wechselwirkung der Pmp-Fragmente mit der chlamydialen Oberfläche genauer zu untersuchen, wurden im Folgenden Löslichkeitsexperimente von EB-Oberflächenproteinen mit unterschiedlichen Detergenzien durchgeführt (Abb. 4.24).

Da es sich bei S1 um ein intrachlamydiales Protein handelt, konnte es nicht durch Behandlung mit Detergenzien aus den EBs in den löslichen Überstand überführt werden. Dies belegt zugleich die Intaktheit der EBs nach dieser Prozedur. Das integrale Membranprotein MOMP war nach Inkubation der EBs mit PBS und dem nichtionischen Detergenz Triton ausschließlich in der Pelletfraktion nachweisbar. Auch nach einer Behandlung mit dem anionischen Detergenz Sarkosyl verblieb MOMP größtenteils im Pellet. MOMP ist ein Bestandteil des über Disulfidbrücken quervernetzten cOMC, der als Triton- und Sarkosyl-unlöslich beschrieben wurde (Caldwell, Kromhout et al. 1981). Nach einer Inkubation mit

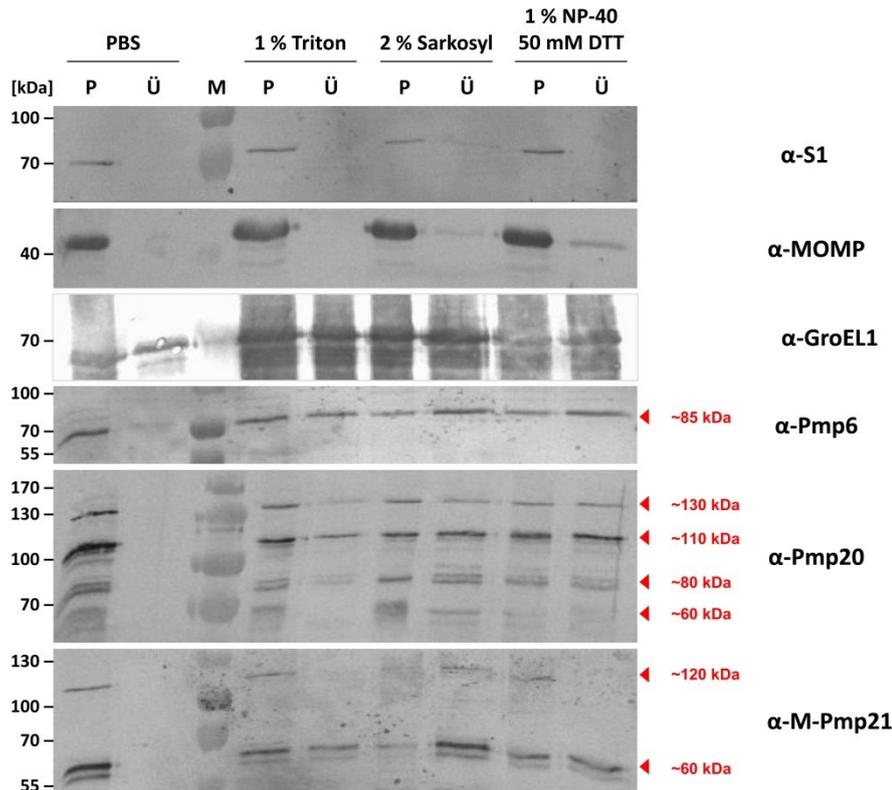
dem nichtionischen Detergenz NP-40 sowie einer Behandlung mit dem reduzierenden Reagenz DTT konnten geringe Mengen an MOMP in der Überstand-Fraktion detektiert werden. Somit konnte die Solubilisierung von MOMP durch diese Behandlung verstärkt werden. Dies korreliert mit Solubilisierungsanalysen von chlamydialen Oberflächenproteinen von *C. psittaci*, wobei nur unter reduzierenden Bedingungen MOMP effizient aus dem cOMC gelöst werden konnte (Everett and Hatch 1995). Das auf der Oberfläche von EBs identifizierte Chaperon GroEL1 wurde bereits durch Waschen mit PBS zu ca. 50 % von der EB-Oberfläche abgelöst. Dieses Solubilisierungsverhalten wurde bereits in früheren Studien beschrieben (Wuppermann, Molleken et al. 2008). Auch die Behandlung mit Detergenzien führte zu einer 50 %igen Überführung von GroEL1 in den löslichen Überstand.

Unter Verwendung des  $\alpha$ -Pmp6 Antikörpers wurde eine spezifische Bande auf der Höhe von ca. 85 kDa detektiert, die zuvor als potentiell N-Pmp6 Fragment beschrieben wurde (vgl. Abb. 4.21). Nach einer Inkubation mit PBS wurde nur eine geringfügige Ablösung von N-Pmp6 von der chlamydialen Oberfläche nachgewiesen, während N-Pmp6 durch die Triton-Behandlungen zu 50 % in den löslichen Überstand überführt wurde. Im Vergleich dazu resultierte eine Inkubation mit Sarkosyl bzw. mit NP-40 und DTT in einer etwas stärkeren Solubilisierung von N-Pmp6.

Mit dem  $\alpha$ -Pmp20 Antikörper konnten Bandenmuster detektiert werden, die bereits in vorherigen Analysen beobachtet wurden (vgl. Abb. 4.21). Die Pmp20-Fragmente konnten nicht durch Abwaschen mit PBS in Lösung gebracht werden. Eine Behandlung mit Triton resultierte in einer schwachen Solubilisierung. Dabei wurde das 60 kDa-Fragment von Pmp20 im Vergleich zu den übrigen Fragmenten deutlich schwächer abgelöst. Des Weiteren führte eine Inkubation der EBs mit Sarkosyl generell zu einer effektiveren Solubilisierung aller Pmp20-Fragmente. Mittels NP-40 und DTT wurde ebenfalls eine ähnlich starke Ablösung der Pmp-Fragmente erzielt, wobei erneut das 60 kDa-Fragment von Pmp20 schwach solubilisiert wurde.

Mit dem  $\alpha$ -M-Pmp21 Antikörper wurde ein 120 kDa-Fragment, das zuvor als potentielles N/M-Pmp21-Protein beschrieben wurde, und ein 60 kDa-Fragment, das vermutlich das M-Pmp21-Protein repräsentiert, detektiert (vgl. Abb. 4.21). Mittels PBS konnten diese Fragmente nicht von der EB-Oberfläche gewaschen werden. Eine Inkubation mit Triton führte zu einer nahezu 50 %igen Solubilisierung des putativen M-Pmp21-Fragmentes, während das putative N/M-Pmp21-Fragment deutlich schwächer abgelöst wurde. Sarkosyl löste beide Pmp21-Fragmente am effektivsten von der chlamydialen Oberfläche. Eine Behandlung mit NP-40 und DTT resultierte in einer starken Ablösung von M-Pmp21, während das N/M-Pmp21-Fragment schwach solubiliert wurde.

Zusammenfassend zeigten diese Löslichkeitsexperimente, dass die Pmp-Fragmente unterschiedlich stark bakterienassoziiert vorliegen. Während einige Fragmente nahezu unlöslich in Triton, Sarkosyl oder NP-40 + DTT waren und folglich eine starke EB-Assoziation zeigten, konnten andere Pmp-Fragmente signifikant mit Detergenzien von der chlamydialen Oberfläche abgelöst werden. Es könnte spekuliert werden, dass die verschiedenen Pmp-Fragmente vermutlich über differenzielle Wechselwirkungen ionischer und anionischer Art mit den chlamydialen Partikeln assoziiert sind.



**Abbildung 4.24: Detergenzienbehandlung von *C. pneumoniae* EBs.**

Gradientengereinigte *C. pneumoniae* EBs ( $10^5$  IFU) wurden für 1 h bei 37 °C mit 150 µl PBS, 1 % Triton X-100 (nichtionisches Detergenz), 2 % Sarkosyl (anionisches Detergenz) oder 1 % NP-40 + 50 mM DTT (nichtionisches Detergenz + reduzierendes Reagenz) behandelt und die Proben anschließend für 1 h bei 100.000 x g zentrifugiert. Die 150 µl Überstand (Ü) wurden in ein separates Reaktionsgefäß überführt und das Pellet (P) in 150 µl PBS aufgenommen. Die Fraktionen wurden mit Protein-Ladepuffer und DTT gekocht und 20 µl der Proben mittels Westernblot analysiert. Die Detektion erfolgte mit α-S1 (1:500), α-MOMP (1:200), α-GroEL1 (1:500), α-Pmp6 (1:200), α-Pmp20 (1:200) und α-M-Pmp21 (1:200) Antikörpern. Theor. MW: S1 62 kDa, MOMP 42 kDa, GroEL1 58 kDa, Pmps siehe Abb. 4.21 A. M: Größenstandard

### 4.6.3 Pmp21 interagiert mit sich selbst in Hefe-Zwei-Hybrid Analysen

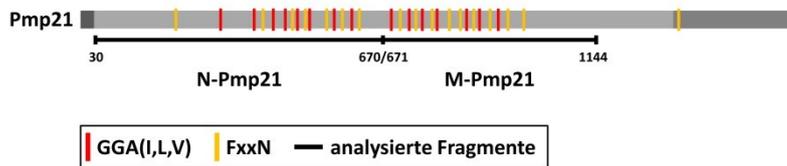
Um weitere Hinweise auf eine mögliche Selbstinteraktion von Pmps zu erhalten, wurden exemplarisch für das *C. pneumoniae* Pmp21 Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen zur Untersuchung von intramolekularen Wechselwirkungen durchgeführt. Hierzu wurden die während einer

chlamydialen Infektion natürlich vorkommenden Fragmente N-Pmp21 und M-Pmp21 analysiert (Wehrl, Brinkmann et al. 2004; Moelleken, Schmidt et al. 2010) (Abb. 4.25 A).

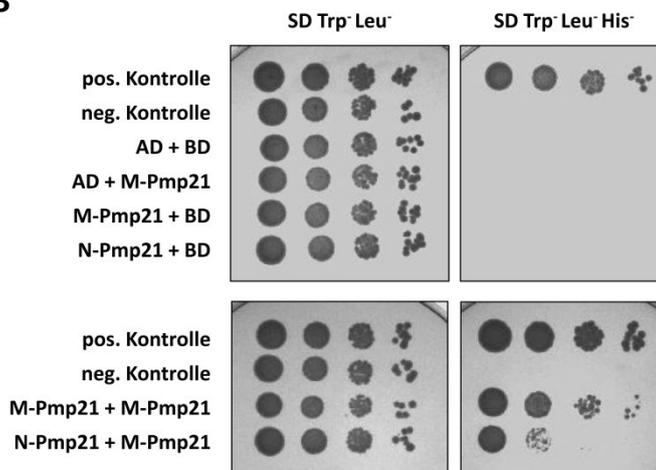
Die seriellen Tropftests auf SD Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> Medium ergaben, dass alle Fusionsprotein-exprimierenden Hefen ein ähnliches Wachstum aufwiesen (Abb. 4.25 C, oben). Hefezellen, die BD-M-Pmp21 zusammen mit AD-M-Pmp21 exprimierten, zeigten ein deutliches Wachstum auf SD Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Medium, was auf eine Selbstinteraktion von M-Pmp21 weist (Abb. 4.25 C, unten). Im Vergleich dazu führte eine Expression des AD-N-Pmp21 Fusionsproteins zusammen mit BD-M-Pmp21 zu einem schwächeren Wachstum. Folglich besteht auch eine schwache Interaktion zwischen den beiden Pmp21-Fragmenten N-Pmp21 und M-Pmp21.

Zusammenfassend deuteten die Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen auf eine intramolekulare Interaktion von Pmp21 hin, wobei eine stärkere Interaktion von M-Pmp21 mit sich selbst als zwischen M-Pmp21 und N-Pmp21 nachgewiesen wurde.

**A**



**B**



**Abbildung 4.25: M-Pmp21 interagiert mit sich selbst und mit N-Pmp21 in Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen.**

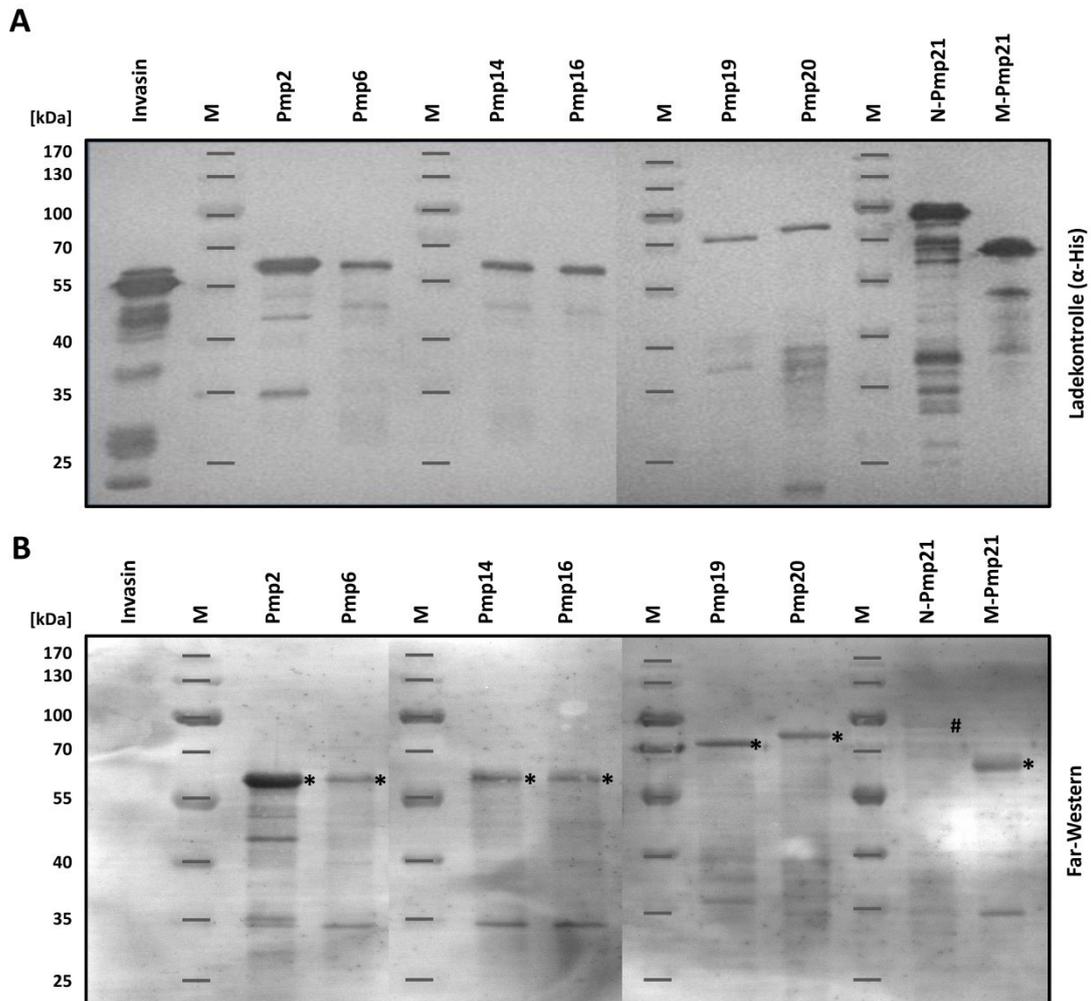
Die Analysen wurden wie in Abb. 4.14 beschrieben durchgeführt.

**A)** Schematische Darstellung der beiden Pmp21-Fragmente N-Pmp21 und M-Pmp21.

**B)** Serielle Tropftests zur Wachstumsanalyse von Hefezellen. Positivkontrolle: p53 + SV40 T-Antigen; Negativkontrolle: Lamin C + SV40 T-Antigen

#### 4.6.4 Interaktion von rekombinanten Pmps analysiert mittels Far-Westernblots und Co-Immunpräzipitation

Die bisherigen Daten ergaben Hinweise für eine intramolekulare Interaktion von Pmp21 (Abb. 4.25). Um dies zu verifizieren, wurde die Interaktion von rekombinant hergestelltem M-Pmp21 mit sich selbst sowie mit dem rekombinanten N-terminalen Fragment von Pmp21 mittels Far-Westernblot-Analysen überprüft. Ferner wurde untersucht, ob rekombinantes M-Pmp21 mit repräsentativen Pmps aller sechs Pmp-Subtypen von *C. pneumoniae* interagiert.



**Abbildung 4.26: Untersuchung von Pmp-Pmp-Interaktionen mittels Far-Westernblot.**

**A)** Ladekontrolle der eingesetzten rekombinanten His-Fusionsproteine. Es wurde jeweils 1  $\mu\text{g}$  der rekombinanten „Prey“-Proteine in einem SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und mittels abnehmenden Guanidin-HCl-Gradienten auf der Membran renaturiert. Die Detektion erfolgte mittels  $\alpha$ -His (1:2500) und sekundärem AP-gekoppeltem  $\alpha$ -Maus-Antikörper (1:7500). Theor. MW: Invasin 50 kDa, Pmp2 50 kDa, Pmp6 61 kDa, Pmp14 65 kDa, Pmp16 66 kDa, Pmp19 68 kDa, Pmp20 65 kDa, N-Pmp21 70 kDa, M-Pmp21 50 kDa. M: Größenstandard

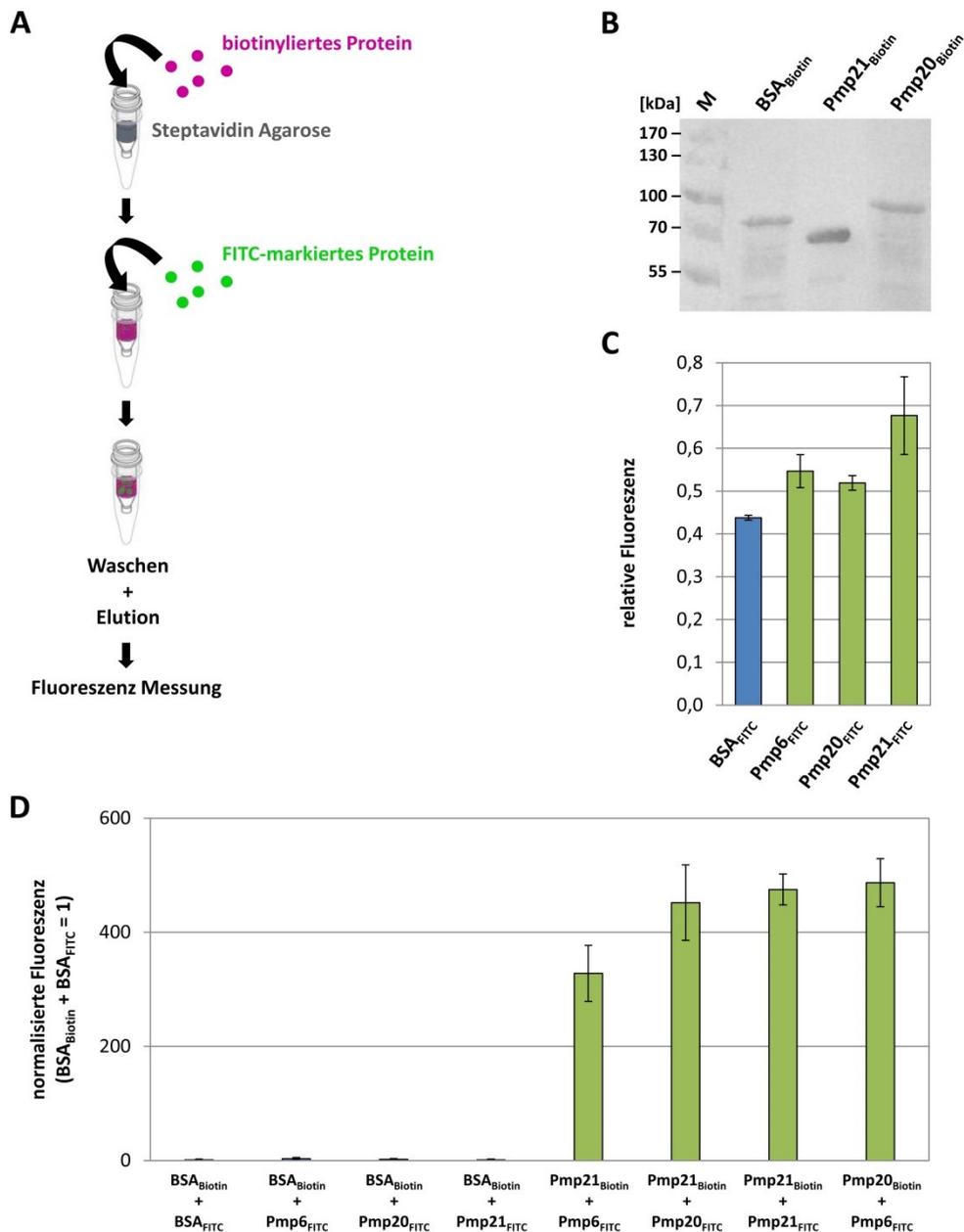
**B)** Far Westernblot zur Interaktionsanalyse: Die auf der Blotmembran renaturierten „Prey“-Proteine (siehe A) wurden mit 3 ml 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Sulfo-NHS-Biotin-markiertem M-Pmp21 („Bait“-Protein) über Nacht bei 4  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Detektion des Far Westernblots erfolgte mit AP-gekoppeltem Streptavidin (1:1000). Markierung der signifikanten Interaktionen von dem „Bait“-Protein M-Pmp21 mit den Vollängen-„Prey“-Proteinen durch \* und der schwachen Interaktion von M-Pmp21 mit N-Pmp21 durch #.

Die Ladekontrolle im  $\alpha$ -His-Westernblot zeigte für die „Prey“-Proteine deutliche Mengenunterschiede (Abb. 4.26 A). Für Invasin, Pmp2, N-Pmp21 und M-Pmp21 wurden ähnlich starke Vollängenproteinbanden detektiert. Im Vergleich dazu zeigten Pmp6, Pmp14 sowie Pmp16 zwei- bis dreifach schwächere und Pmp19 sowie Pmp20 drei- bis vierfach schwächere Bandenintensitäten. Für alle „Prey“-Proteine wurden zusätzliche Degradationsbanden unterhalb der Vollängenbanden detektiert.

Das biotinylierte M-Pmp21-Protein zeigte keinerlei Wechselwirkung mit der Negativkontrolle Invasin (Abb. 4.26 B). Im Gegensatz dazu interagierte M-Pmp21 relativ stark mit Pmp2 sowie M-Pmp21, weniger stark mit Pmp6, Pmp14, Pmp16, Pmp19 sowie Pmp20 und nur sehr schwach mit N-Pmp21. Hierbei wurden sowohl die Vollängenproteine als auch die Degrاداتionsbanden detektiert. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Proteinbeladung bedeutet dies, dass biotinyliertes M-Pmp21 ähnliche Interaktionsstärken zu Pmp2, Pmp6, Pmp14, Pmp16, Pmp19, Pmp20 und zu sich selbst aufweist. Die schwache Interaktion zwischen M-Pmp21 und N-Pmp21 korreliert mit den Ergebnissen der Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen (Abb. 4.25).

Um die Pmp-Pmp-Interaktionen in einem weiteren experimentellen Ansatz zu verifizieren, wurde eine Co-Immunpräzipitation von biotinylierten und NHS-Fluorescein-markierten Pmps durchgeführt (Abb. 4.27 A). Hierzu wurden exemplarisch die rekombinanten Proteine Pmp6, Pmp20 und Pmp21 (entspricht M-Pmp21) in verschiedenen Kombinationen untersucht. Aus Materialgründen wurden nicht alle theoretisch möglichen Kombinationen getestet, sondern beispielhaft die Interaktion von Pmp21<sub>Biotin</sub> mit Pmp6<sub>FITC</sub>, Pmp20<sub>FITC</sub> und Pmp21<sub>FITC</sub> sowie zwischen Pmp20<sub>Biotin</sub> und Pmp6<sub>FITC</sub> überprüft.

Die Kontrolle der Proteinbiotinylierung zeigte vergleichbare Bandenintensitäten für BSA und Pmp20 und eine zweifach stärkere Proteinbande für Pmp21 (Abb. 4.27 B). Die Fluoreszenz-Messung ergab, dass BSA<sub>FITC</sub>, Pmp6<sub>FITC</sub> sowie Pmp20<sub>FITC</sub> eine ähnlich starke FITC-Markierung aufwiesen (rel. Fluoreszenz 0,45-0,54), während die FITC-Fluoreszenz von Pmp21<sub>FITC</sub> etwas höher ausfiel (rel. Fluoreszenz 0,68) (Abb. 4.27 C). Folglich war die Effizienz der Biotinylierung und FITC-Markierung von rekombinantem Pmp21 etwas stärker im Vergleich zu den anderen Proteinen.



**Abbildung 4.27: Co-Immünpräzipitation von rekombinanten *C. pneumoniae* Pmps.**

**A)** Schematische Darstellung des experimentellen Ansatzes. Rekombinantes Protein wurde entweder mit EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin oder NHS-Fluorescein in einem 20-fachen molaren Überschuss markiert. Pro Ansatz wurden 100  $\mu$ l Streptavidin Agarose mit 150  $\mu$ g biotinyliertem Protein vorinkubiert und anschließend 150  $\mu$ g FITC-markiertes Protein hinzugegeben. Nach einer Inkubation für 2 h bei RT wurde die Agarose gewaschen und die gebundenen Proteine mit 100  $\mu$ l 8 M Guanidin-HCl pH 1,5 eluiert. Die Eluate wurden mittels NanoDrop bei 493 nm analysiert.

**B)** Western blot zur Überprüfung der Biotinylierung der Inputproteine. Es wurden 2  $\mu$ g biotinyliertes Protein in einem SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Die Detektion erfolgte mit AP-gekoppeltem Streptavidin (1:1000). Theor. MW: BSA 66 kDa, M-Pmp21 50 kDa, Pmp20 65 kDa. M: Größenstandard

**C)** Kontrolle der FITC-Markierung der Inputproteine durch Fluoreszenz-Messung mittels NanoDrop bei 493 nm (n=3). Dargestellt ist jeweils die relative Fluoreszenz als der Quotient Fluoreszenz ( $A_{493nm}$ ) / Proteinkonzentration ( $mg\ ml^{-1}$ ).

**D)** Fluoreszenz-Quantifizierung der Eluate (n=3). Dargestellt ist die normalisierte Fluoreszenz mit  $BSA_{Biotin} + BSA_{FITC} = 1$ .

Im experimentellen Ansatz diente die Immunpräzipitation der Kombination  $BSA_{\text{Biotin}}+BSA_{\text{FITC}}$  als Negativkontrolle und zeigte kaum detektierbare Fluoreszenz, d.h. keine Interaktion (Abb. 4.27 D). Gleiches konnte auch für die Ansätze beobachtet werden, in denen  $BSA_{\text{Biotin}}$  mit  $Pmp6_{\text{FITC}}$ ,  $Pmp20_{\text{FITC}}$  oder  $Pmp21_{\text{FITC}}$  inkubiert wurde. Folglich interagierten die FITC-markierten Pmps weder mit biotinyliertem BSA noch mit dem Säulenmaterial. Im Gegensatz dazu zeigten  $Pmp6_{\text{FITC}}$ ,  $Pmp20_{\text{FITC}}$  oder  $Pmp21_{\text{FITC}}$  eine signifikante Interaktion mit den biotinylierten Pmps. Dabei wurde für die Kombination  $Pmp21_{\text{Biotin}}+Pmp6_{\text{FITC}}$  eine etwas schwächere Fluoreszenz nachgewiesen (norm. Fluoreszenz 330), während  $Pmp21_{\text{Biotin}}+Pmp20_{\text{FITC}}$ ,  $Pmp21_{\text{Biotin}}+Pmp21_{\text{FITC}}$  und  $Pmp20_{\text{Biotin}}+Pmp6_{\text{FITC}}$  eine vergleichbare Fluoreszenz zeigten (norm. Fluoreszenz 450-480). Folglich wurden signifikante Interaktionen zwischen rekombinantem Pmp21 mit sich selbst und mit den rekombinanten *C. pneumoniae* Pmps Pmp6 und Pmp20 sowie zwischen Pmp6 und Pmp20 nachgewiesen. Zusammenfassend konnte in zwei unabhängigen experimentellen Ansätzen gezeigt werden, dass rekombinante *C. pneumoniae* Pmps miteinander interagieren. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob dies auch *in vivo* zutrifft.

#### 4.6.5 *C. pneumoniae* Pmps interagieren *in vivo* miteinander

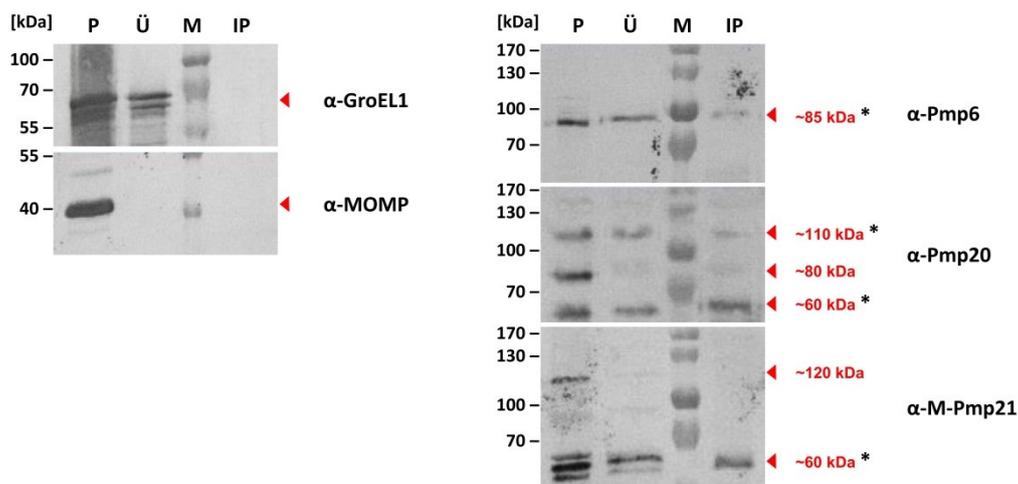
Die biochemisch gezeigten Pmp-Pmp-Interaktionen sollten im Folgenden mittels Co-Immunpräzipitation *in vivo* untersucht werden. Hierzu wurden EBs mittels Phospho-Lysis-Puffer aufgeschlossen, um eine möglichst effiziente Solubilisierung von Proteinen zu erzielen, ohne dabei Protein-Protein-Interaktionen zu beeinträchtigen. Anschließend wurde die lösliche Fraktion mit dem  $\alpha$ -M-Pmp21-Antikörper inkubiert und die Protein-Antikörper-Komplexe immunpräzipitiert und mit verschiedenen Antikörpern im Westernblot analysiert (Abb. 4.28). Das EB-oberflächenexponierte Chaperon GroEL1 wurde partiell mittels Phospho-Lysis-Puffer von den *C. pneumoniae* EBs abgelöst und in den löslichen Überstand überführt. Bei einer Co-Immunpräzipitation mit dem  $\alpha$ -M-Pmp21-Antikörper konnte kein GroEL1 Protein im Eluat detektiert werden. Folglich fand keine Interaktion von GroEL1 mit dem immunpräzipitierten M-Pmp21, dem verwendeten Antikörper oder dem Säulenmaterial statt. Das membranintegrale Protein MOMP konnte nicht mittels Phospho-Lysis-Puffer solubilisiert werden und befand sich nur im Pellet. Dies bestätigt die Integrität des chlamydialen Außenmembrankomplexes, der durch Behandlung mit nichtionischen Detergenzen nicht effektiv aufgelöst werden kann (Everett and Hatch 1995).

Mittels  $\alpha$ -M-Pmp21 wurde eine 60 kDa-Bande, die zuvor als putatives M-Pmp21 beschrieben wurde (vgl. Abb. 4.21), verstärkt in der Pelletfraktion und im Überstand detektiert. Folglich fand eine erfolgreiche partielle Solubilisierung des putativen M-Pmp21 Fragmentes statt. Im

Gegensatz dazu blieb ein 120 kDa-Protein, welches vermutlich das N/M-Pmp21-Fragment darstellt, im Pellet zurück. Nach der Immunpräzipitation mittels  $\alpha$ -M-Pmp21 wurde im Eluat das M-Pmp21 Fragment nachgewiesen. Dies belegte eine erfolgreiche Isolierung des Zielproteins.

Für Pmp6 wurde eine deutliche Bande auf der Höhe von ca. 85 kDa sowohl in der Pellet-Fraktion als auch in der Überstand-Probe detektiert. Dies bedeutet, dass das putative N-Pmp6-Fragment erfolgreich solubilisiert wurde (vgl. Abb. 4.21). Im Eluat der Pmp21-Immunpräzipitation wurde eine schwache Bande für N-Pmp6 nachgewiesen. Im  $\alpha$ -Pmp20-Westernblot konnte eine Solubilisierung von zwei Pmp20-Fragmenten (ca. 110 und 60 kDa) bestätigt werden, während das 80 kDa Fragment größtenteils im Pellet verblieb. Die beiden solubilisierten Pmp20-Fragmente wurden erfolgreich mit  $\alpha$ -M-Pmp21 immunpräzipitiert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass M-Pmp21 mit N-Pmp6 und den 110kDa- und 60kDa-Fragmenten von Pmp20 *in vivo* interagiert. Folglich wurden *in vivo* und *in vitro* Hinweise für intermolekulare Interaktionen von *C. pneumoniae* Pmps gefunden, was auf mögliche hetero- und homooligomere Pmp-Strukturen auf der chlamydialen Oberfläche hinweisen könnte.



**Abbildung 4.28: Co-Immunpräzipitation zum Nachweis von Pmp-Pmp-Interaktionen *in vivo*.**

*C. pneumoniae* EBs ( $10^5$  IFU) wurden mit 150  $\mu$ l Phospho-Lysis-Puffer + Proteaseinhibitor für 30 min bei 37  $^{\circ}$ C inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 1 h bei 100.000 x g wurde das resultierende Pellet in 150  $\mu$ l PBS resuspendiert (P). Der lösliche Überstand (Ü) wurde mit 2  $\mu$ g  $\alpha$ -M-Pmp21-Antikörper vorinkubiert und anschließend 50  $\mu$ l Protein-G-Agarose hinzugefügt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4  $^{\circ}$ C wurden die Antikörper-Antigen-Komplexe mit 100  $\mu$ l Glycin pH 2,5 eluiert (IP) und die Fraktionen zu Proteinproben verarbeitet und mittels Westernblot analysiert. Die Detektion erfolgte mit  $\alpha$ -GroEL1 (1:500),  $\alpha$ -MOMP (1:200),  $\alpha$ -Pmp6 (1:200),  $\alpha$ -Pmp20 (1:200) und  $\alpha$ -M-Pmp21 (1:200) und AP-konjugiertem  $\alpha$ -Kaninchen Antikörper. Theor. MW: GroEL1 58 kDa, MOMP 42 kDa, Pmps siehe Abb. 4.21 A. Markierung aller detektierten Proteinbanden durch Pfeile und der erfolgreich immunpräzipitierten Proteine durch \*. M: Größenstandard

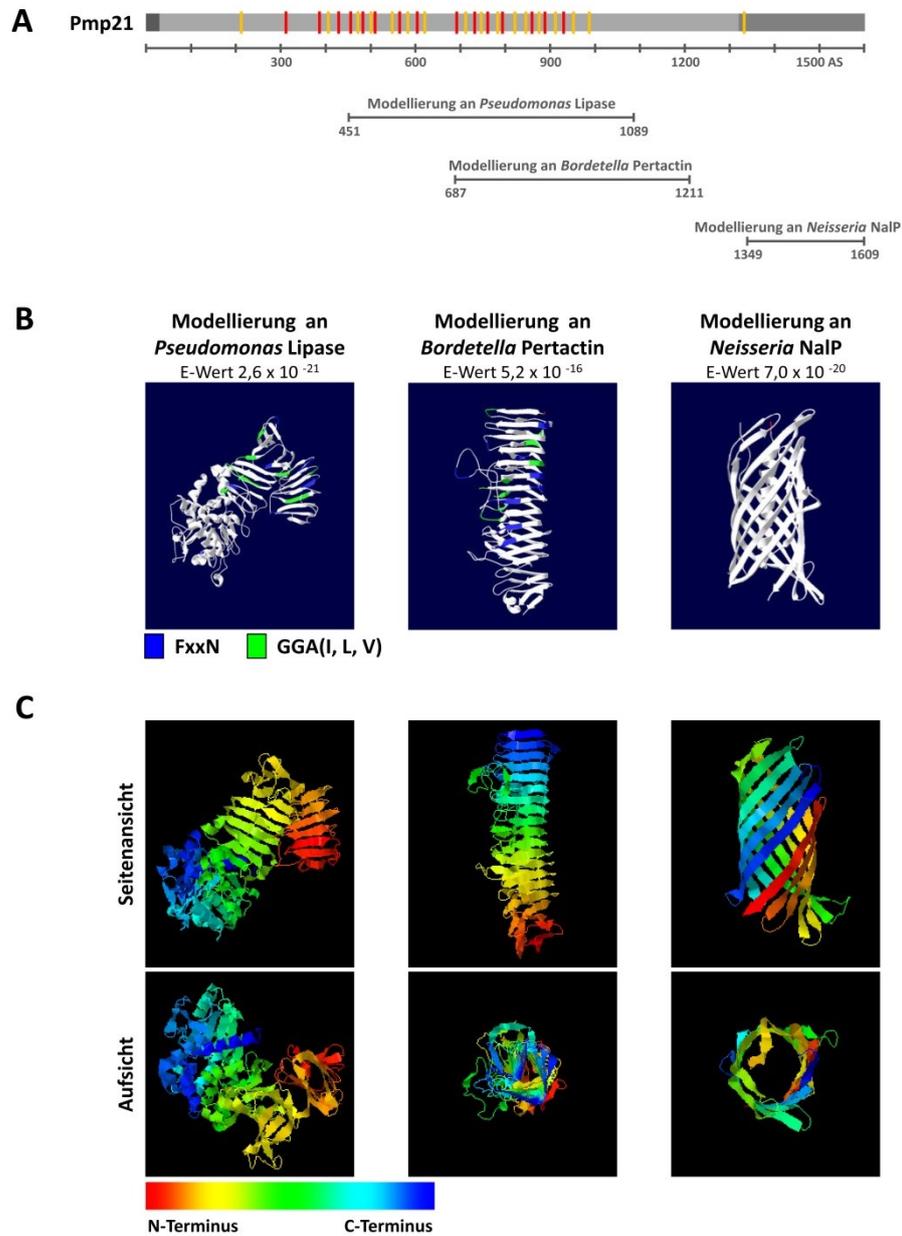
#### 4.6.6 Strukturvorhersage für Pmps

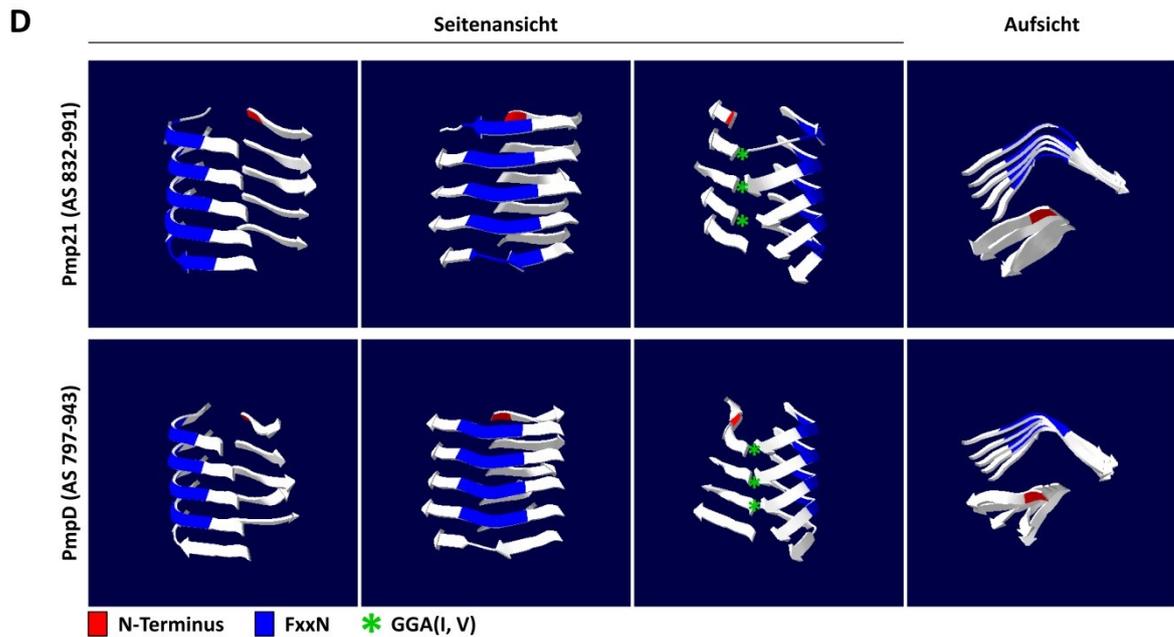
Um eine eventuelle Korrelation zwischen der Interaktion von *C. pneumoniae* Pmps und strukturellen Merkmalen der Pmps zu untersuchen, wurden Strukturvorhersagen durchgeführt. Hierzu wurden die Aminosäuresequenzen der Vollängen-Pmps mit dem Phyre-Server (Protein Homology/analogY Recognition Engine) sowie dem Programm BetaWrapPro analysiert.

In der Analyse von Pmp21 mit dem Phyre-Server zeigten bestimmte Pmp21-Abschnitte bei den Modellierungen an einer Typ-I-sekretierten Lipase von *Pseudomonas* bzw. an Pertactin von *Bordetella* die höchsten E-Werte ( $2,6 \times 10^{-21}$  respektive  $5,2 \times 10^{-16}$ ) (Abb. 4.29 A, B, C). Die Modellierung des Abschnittes AS 451-1089 von Pmp21 an der *Pseudomonas* Lipase wies einen  $\alpha$ -helikalen Bereich, gefolgt einer  $\beta$ -Faltblatt-Domäne auf. Die  $\beta$ -Faltblätter bildeten dabei in parallel verlaufenden Strängen eine rechtsgängig gewundene Helix. Der an Pertactin modellierte Abschnitt AS 687-1211 von Pmp21 zeigte ausschließlich eine rechtsgängige Helix aus  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen, die als  $\beta$ -Helix beschrieben wurde (Bryan, Starner-Kreinbrink et al. 2011). Die Aufsicht-Perspektive verdeutlichte ferner die Dreiecksform dieser sogenannten  $\beta$ -Helix. Folglich wies der überlappende Bereich (AS 687-1089) der beiden modellierten Strukturen von Pmp21 eine  $\beta$ -helikale Konformation und somit eine strukturelle Ähnlichkeit auf. Interessanterweise handelt es sich hierbei etwa um den Proteinabschnitt von Pmp21, der als M-Pmp21 Fragment beschrieben wurde (vgl. Abb. 4.21 A). Leider lieferte die Strukturvorhersage mit dem Phyre-Server keine vollständige Modellierung des N-Pmp21 Fragmentes. Die Modellierung von Pmp21 an der *Pseudomonas* Lipase gab jedoch erste Hinweise auf eine  $\alpha$ -helikale Konformation eines Abschnittes von N-Pmp21. Der Vollständigkeit wegen wurde auch die C-terminale Domäne von Pmp21 mittels Phyre analysiert, was zu einer Modellierung an der  $\beta$ -Barrel-Domäne der Serin-Protease NalP von *Neisseria* führte (Abb. 4.29 A, B, C). Zusammenfassend konnte für Pmp21 eine Drei-Domänen-Struktur, bestehend aus einer potentiell  $\alpha$ -helikalen, einer zentralen  $\beta$ -helikalen und einer C-terminalen  $\beta$ -Barrel Struktur, vorhergesagt werden. Eine ähnliche Strukturvorhersage wurde ebenfalls für die übrigen chlamydialen Pmps erhalten (Daten nicht gezeigt), was auf gemeinsame strukturelle Merkmale der Pmps hindeutet.

Zur weiteren Analyse der vorhergesagten  $\beta$ -helikalen Struktur wurden die Vollängen-Pmps von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* Pmps mittels BetaWrapPro untersucht. Hierbei wurde die Anwesenheit einer  $\beta$ -helikalen Kernstruktur in der Passagierdomäne aller Pmps nachgewiesen (Anhang Abb. 6.2). Interessanterweise war diese Struktur in den meisten Pmps mittig bzw. in der ersten Hälfte der Passagierdomäne lokalisiert, während in den längeren Pmps (Pmp6, Pmp20, Pmp21, PmpB, PmpC und PmpD) die Kernstruktur in der zweiten Hälfte der

Passagierdomäne lag. Ferner wurde die  $\beta$ -helikale Region stets in Proteinbereichen identifiziert, die eine hohe Anzahl an FxxN und GGA(I, L, V) Motiven aufwiesen.





**Abbildung 4.29: Strukturvorhersage für Pmps mittels Phyre und BetaWrapPro.**

**A) B) C)** Modellierung von Pmp21 mit dem Phyre-Server (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>). Der Phyre-Server nutzt eine Bibliothek von bekannten Proteinstrukturen aus den Datenbanken SCOP (Structural Classification of Proteins) und PDB (Protein Data Bank). Die vom Benutzer eingereichte Sequenz wird gegen diesen Datensatz verglichen und dadurch ein spezifisches Profil erstellt. Im Anschluss wird mittels Strukturvorhersageprogrammen die sekundäre Struktur des eingereichten Proteins modelliert und diese schließlich mit den Datenbanken verglichen um einen E-Wert zu erhalten. Strukturvorhersagen mit einem E-Wert  $<0,001$  haben eine hohe Aussagewahrscheinlichkeit (Kelley and Sternberg 2009). Darstellung der modellierten Proteinabschnitte von Pmp21 in **A)** und der entsprechenden Proteinstrukturen mit Angabe der Pmp-spezifischen Motive in **B)** und der N- und C-Termini in **C)**.

**D)** 3D-Modellierung für das *C. pneumoniae* Pmp21 und das *C. trachomatis* PmpD mittels BetaWrapPro (<http://groups.csail.mit.edu/cb/betawrappro/>). Dieses Programm führt zur Erkennung von Motiven, die zu einer rechtsgängigen  $\beta$ -helikalen Faltung führen. Dabei wird ein Strukturmodell erstellt, das nicht auf einem Sequenzvergleich basiert, sondern auf einer paarweisen Analyse von Aminosäure-Wahrscheinlichkeiten (Bradley, Cowen et al. 2001; Cowen, Bradley et al. 2002; McDonnell, Menke et al. 2006). Sterne markieren die GGA(I, L, V) Motive.

Bei näherer Betrachtung der 3D-Modelle der  $\beta$ -helikalen Kernstruktur, beispielsweise von Pmp21 und PmpD (Abb. 4.29 B), konnte beobachtet werden, dass die Pmp-spezifischen Aminosäuremotive FxxN und GGA(I, L, V) in den Ecken der dreiecksförmigen  $\beta$ -Helix lagen. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass alle chlamydialen Pmps eine  $\beta$ -helikale Kernstruktur in der Passagierdomäne aufweisen. Es besteht die Hypothese, dass sich solche  $\beta$ -helikalen Kernstrukturen nach dem Transport der Passagierdomäne aus dem Periplasma auf die Zelloberfläche zuerst falten und danach als „Keim“ für die weitere Strukturbildung der Passagierdomäne dienen (Renn and Clark 2008). Da die gleichmäßige Struktur von parallel-verlaufenden  $\beta$ -Helices eine Interaktion von Monomeren zu oligomeren Strukturen favorisieren kann (Bryan, Starner-Kreinbrink et al. 2011), könnte spekuliert

werden, dass die rechtsgängige  $\beta$ -helikale Struktur der Pmps potentiell als Interaktionsplattform dient.

## 4.7 Lokalisation der Fragmente M-Pmp21 und N-Pmp21 in der Infektion

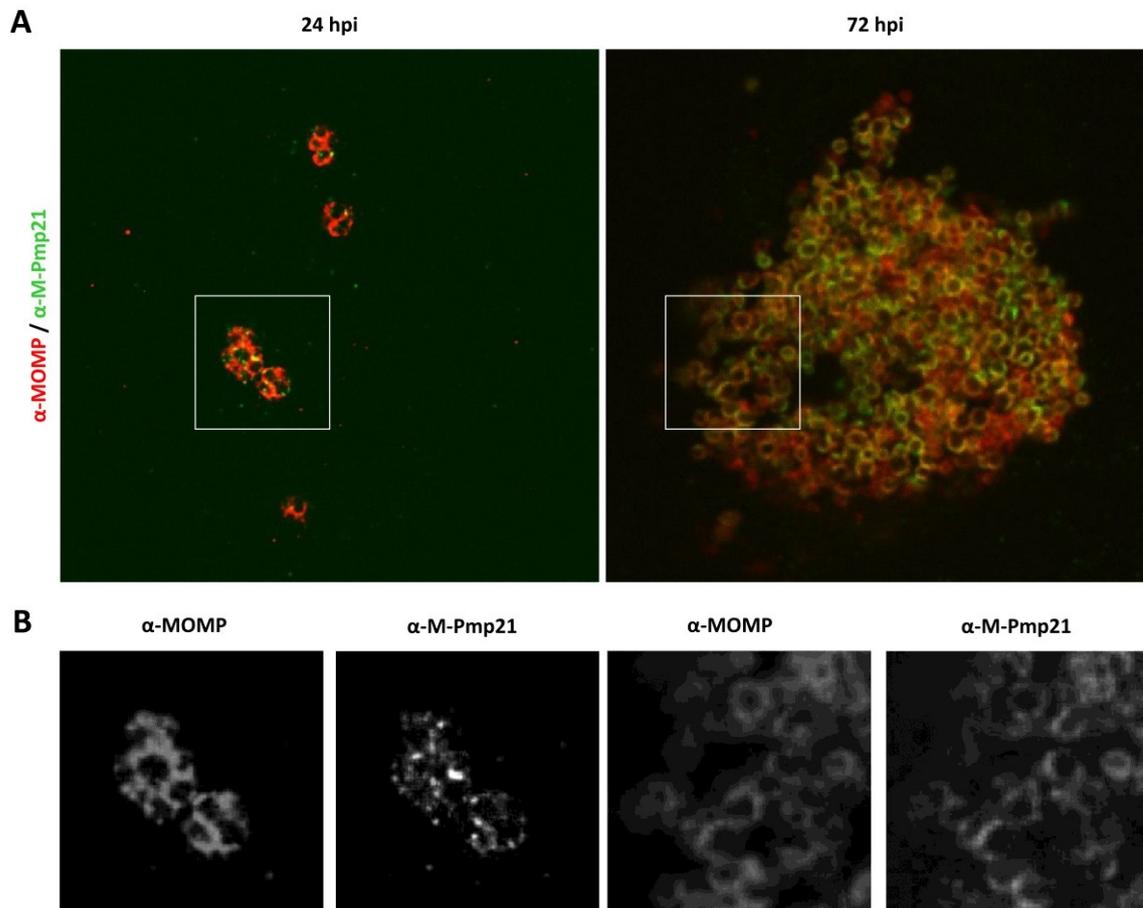
In früheren Studien wurde für die meisten Pmps (Pmp1, Pmp2, Pmp6, Pmp8, Pmp9, Pmp10, Pmp11, Pmp13, Pmp14, Pmp15, Pmp16, Pmp20 und Pmp21) von *C. pneumoniae* eine Oberflächenlokalisierung nachgewiesen (Montigiani, Falugi et al. 2002; Vandahl, Pedersen et al. 2002). Ferner wurden mittels Fraktionierungsexperimenten eine Bakterienassoziation sowie eine partielle Sekretion von einigen Pmp-Fragmenten von Pmp6, Pmp20 und Pmp21 identifiziert (Abb. 4.23). Um die Lokalisation der Pmps detaillierter zu analysieren, wurden exemplarisch die beiden Pmp21-Fragmente M-Pmp21 und N-Pmp21 während der Infektion mikroskopisch untersucht.

### 4.7.1 M-Pmp21 und M-Pmp21-tragende Pmp21-Fragmente sind auf der Bakterienoberfläche exponiert

Der  $\alpha$ -M-Pmp21-Antikörper wurde genutzt, um zu überprüfen, wo M-Pmp21 bzw. M-Pmp21-haltige Pmp21-Fragmente in der Infektion lokalisieren. Hierfür wurden die Zellen mit 3 % PFA fixiert und mit 0,2 % Triton permeabilisiert, um die Zellmembranen der Humanzelle und die Inklusionsmembran für den Antikörper durchgängig zu machen, jedoch eine Färbung von intrachlamydialen Proteinen zu verhindern (Knudsen, Madsen et al. 1999; Wuppermann, Molleken et al. 2008; Moelleken, Schmidt et al. 2010). Die mikroskopischen Analysen wurden mit dem Konfokalmikroskop durchgeführt, um Bilder aus einer schmalen Schicht um die Fokusebene zu erhalten.

Für M-Pmp21 bzw. M-Pmp21-haltige Pmp21-Fragmente konnte unter PFA-Fixierung ein spezifisches Signal in der chlamydialen Inklusion sowohl früh (24 hpi) als auch spät (72 hpi) in der Infektion detektiert werden (Abb. 4.30). Dies bedeutet, dass M-Pmp21 bzw. M-Pmp21-haltige Pmp21-Fragmente auf der Oberfläche chlamydialer EBs zugänglich sind. Die Signale für M-Pmp21 hatten eine ringförmige Struktur, die 24 hpi punktförmig und nach 72 hpi größtenteils durchgängig mit einigen Unterbrechungen war. Ferner war die Signalintensität für M-Pmp21 zum späteren Zeitpunkt der Infektion deutlich stärker, was auf eine höhere Expression von Pmp21 in EBs, welche die dominierende Form 72 hpi darstellen, im Vergleich zu RBs, die sich 24 hpi in der Replikationsphase befinden, hinweist. Die Co-Färbung von  $\alpha$ -

M-Pmp21 mit  $\alpha$ -MOMP zeigte eine partielle oder vollständige Colokalisation von M-Pmp21 mit dem EB-oberflächenzugänglichen Protein MOMP. Dies korreliert mit früheren Lokalisationsanalysen von Pmp21 unter Verwendung des  $\alpha$ -M-Pmp21 Antikörpers, wobei jedoch keine Konfokalmikroskopie durchgeführt wurde (Moelleken, Schmidt et al. 2010).



**Abbildung 4.30: M-Pmp21 bzw. M-Pmp21-haltige Pmp21-Fragmente lokalisieren auf der chlamydialen Oberfläche während der Infektion.**

**A)** HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* infiziert und 24 hpi bzw. 72 hpi für 10 min mit 3 % PFA fixiert und mit 0,2 % Triton permeabilisiert. Die Färbung erfolgte mit Maus- $\alpha$ -MOMP-Antikörper (1:50) und Kaninchen- $\alpha$ -M-Pmp21 (1:20) und sekundären Alexa488-gekoppeltem  $\alpha$ -Maus und Alexa594-gekoppeltem  $\alpha$ -Kaninchen Antikörpern (1:200). Die mikroskopische Untersuchung erfolgte mit dem Konfokalmikroskop LSM 510.

**B)** Vergrößerung der Ausschnitte aus A.

#### 4.7.2 Expression, Lokalisation und Bedeutung von N-Pmp21 für die chlamydiale Infektion

In konfokalmikroskopischen Analysen wurde eine ausschließliche Lokalisation von N-Pmp21 innerhalb der Inklusionen von *C. pneumoniae* identifiziert. Zusätzlich dazu wurde mittels Immunogold-Elektronenmikroskopie eine Bakterienassoziation von N-Pmp21 sowie eine Lokalisation auf vesikulären Strukturen im Inklusionslumen nachgewiesen (Wehrl, Brinkmann

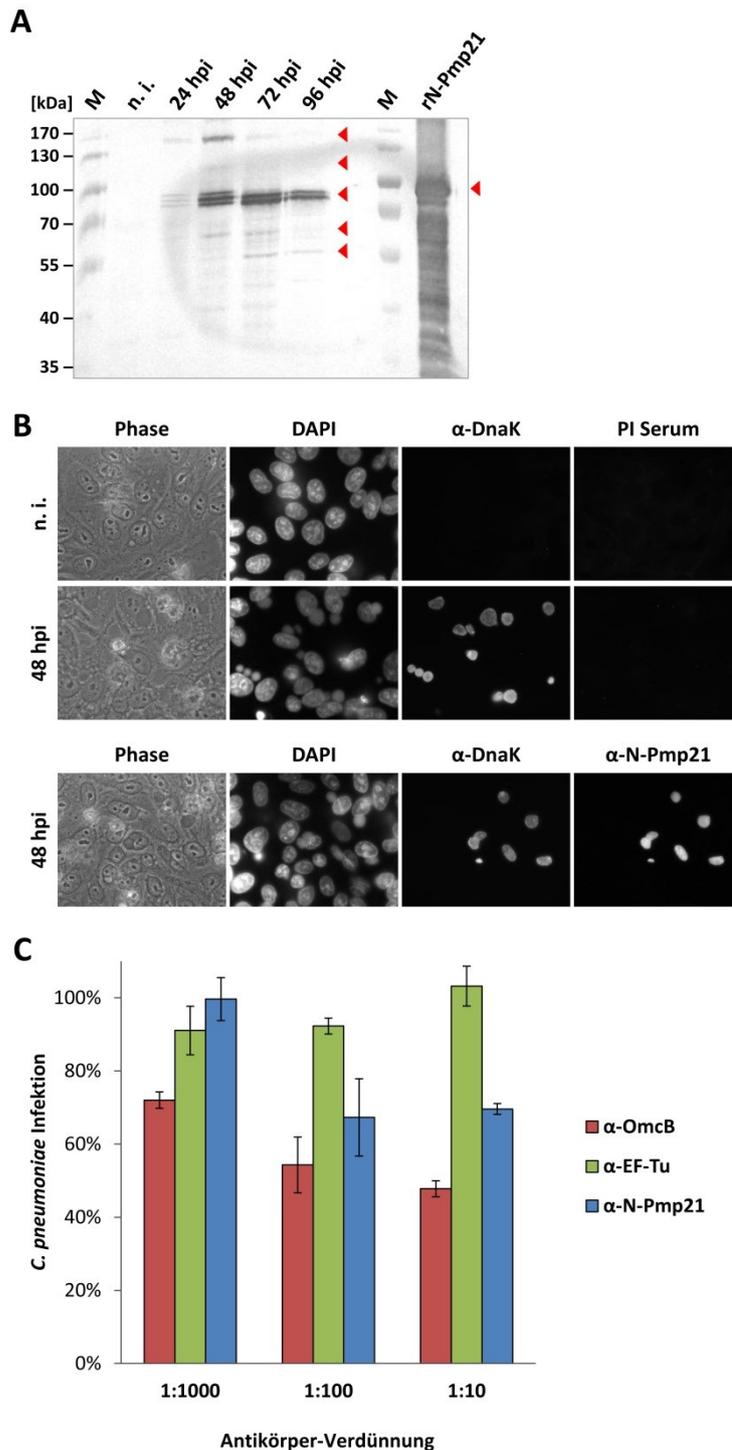
et al. 2004). Um die Lokalisation von N-Pmp21 in der Infektion detaillierter zu überprüfen, wurde ein polyklonaler Antikörper gegen His6-markiertes rekombinantes N-Pmp21 generiert. Dieser Antikörper wurde zunächst mittels Westernblot und Immunfluoreszenzmikroskopie auf seine Spezifität untersucht.

Zur Westernblotanalyse wurden HEp-2 Zellen für vier unterschiedliche Zeitpunkte mit *C. pneumoniae* infiziert und die Gesamtzellysate mit dem finalen  $\alpha$ -N-Pmp21 Serum überprüft (Abb. 4.31 A). Hierbei detektierte der  $\alpha$ -N-Pmp21 Antikörper erstmalig 24 hpi eine Dreifachbande, jedoch verschwand die obere Bande 72 hpi. Diese Banden liefen auf der Höhe von ca. 80 kDa und damit höher als nach dem theoretischen Molekulargewicht von N-Pmp21 (66 kDa) zu erwarten, jedoch auf derselben Höhe wie das rekombinante N-Pmp21 (theor. MW: 70 kDa). Da keine Banden in der Proteinprobe von uninfizierten Humanzellen nachgewiesen werden konnten, ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um eine spezifische Detektion von N-Pmp21 handelt. Ferner wurden schwache Banden auf der Höhe von ca. 160 kDa, 120 kDa, 70 kDa und 55 kDa identifiziert. Nach dem Molekulargewicht zu urteilen könnte es sich bei dem 160 kDa-Protein um das Volllängen-Pmp21 handeln, während das 120 kDa-Protein vermutlich das N/M-Fragment von Pmp21 repräsentiert (vgl. Abb. 4.21). Die Identität der beiden kleineren Proteine blieb unklar.

Das Prä-Immunsereum führte zu keiner unspezifischen Färbung von HEp-2 Zellen bzw. zu keiner Detektion der chlamydialen Inklusionen (Abb. 4.31 B). Auch bei der Inkubation nicht-infizierter HEp-2 Zellen mit dem finalen  $\alpha$ -N-Pmp21 Serum konnten keine Signale nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu detektierte das finale  $\alpha$ -N-Pmp21 Serum in 48 h infizierten HEp-2 Zellen alle chlamydialen Einschlüsse.

Zusammenfassend konnte die Spezifität des  $\alpha$ -N-Pmp21 Antikörpers im Westernblot sowie in Immunfluoreszenz-Analysen bestätigt werden.

In früheren Studien wurden für rekombinantes N-Pmp21 adhäsive Eigenschaften nachgewiesen (Schmidt 2009; Moelleken, Schmidt et al. 2010). Um die Bedeutung von N-Pmp21 im chlamydialen Infektionsprozess zu analysieren, wurden Antikörper-Neutralisationsexperimente durchgeführt, bei denen die infektiösen EBs entweder mit dem Prä-Immunsereum oder mit dem finalen  $\alpha$ -N-Pmp21 Serum vorinkubiert wurden. Der Antikörper sollte hierbei an das N-Pmp21 Protein auf der chlamydialen Oberfläche binden und dieses somit blockieren, so dass keine Beteiligung am Infektionsprozess erfolgen kann (Abb. 4.31 C).



**Abbildung 4.31: Analyse der Expression, Lokalisation und Bedeutung von N-Pmp21 für die Infektion.**

**A)** Westernblots zur Überprüfung der Expression von N-Pmp21. Jeweils 2 kleine Zellkulturflaschen wurden mit *C. pneumoniae* (MOI=20) für unterschiedliche Zeitpunkte infiziert. Die Zellen wurden geerntet und für die Westernblot-Analyse aufgearbeitet. Zur Kontrolle wurde 1  $\mu$ g rekombinantes N-Pmp21 (rN-Pmp21) geladen. Die Detektion erfolgte mit dem finalen  $\alpha$ -N-Pmp21 Serum des Kaninchens SA6997 (1:1000) und dem AP-gekoppeltem  $\alpha$ -Kaninchen Antikörper (1:7500). Pfeile markieren die detektierten Proteinbanden. M: Größenstandard

**B)** Phasenkontrast- und Immunfluoreszenzaufnahmen (63 x Vergrößerung) von nichtinfizierten und *C. pneumoniae* infizierten HEp-2 Zellen (48 hpi) nach Methanol-Fixierung. Die Färbung erfolgte mittels  $\alpha$ -DnaK (1:50) und Prä-Immunsersum bzw.  $\alpha$ -N-Pmp21-Serum (1:100). Die DNA wurde mit DAPI (1:1000) gefärbt.

C) Die Durchführung des Neutralisations-Experiments erfolgte wie in Abb. 4.13 C beschrieben (n=3). Dargestellt ist die relative Infektion im Vergleich zur jeweiligen Präimmunserum-Kontrolle.

Der gegen das extrazelluläre Adhäsion gerichtete  $\alpha$ -OmcB Antikörper zeigte als Positivkontrolle eine konzentrationsabhängige Inhibierung der Infektion. Dabei resultierte eine Vorinkubation mit dem 1:10-verdünnten  $\alpha$ -OmcB Serum in einer Restinfektion von 50 %. Als Negativkontrolle diente Serum gegen das intrachlamydiale Protein EF-Tu. So vorbehandelte EBs zeigten keine signifikant veränderte Infektiosität. Bei einer 1:10-Verdünnung des  $\alpha$ -EF-Tu Serums wurde beispielsweise eine Infektionsrate von 103 % festgestellt. Eine Vorbehandlung von *C. pneumoniae* EBs mit dem  $\alpha$ -N-Pmp21 Serum führte zu einer konzentrationsabhängigen Inhibierung der Infektion. Dabei bewirkte eine 1:10-Verdünnung des Antikörpers eine Verminderung der Infektiosität auf 70 %.

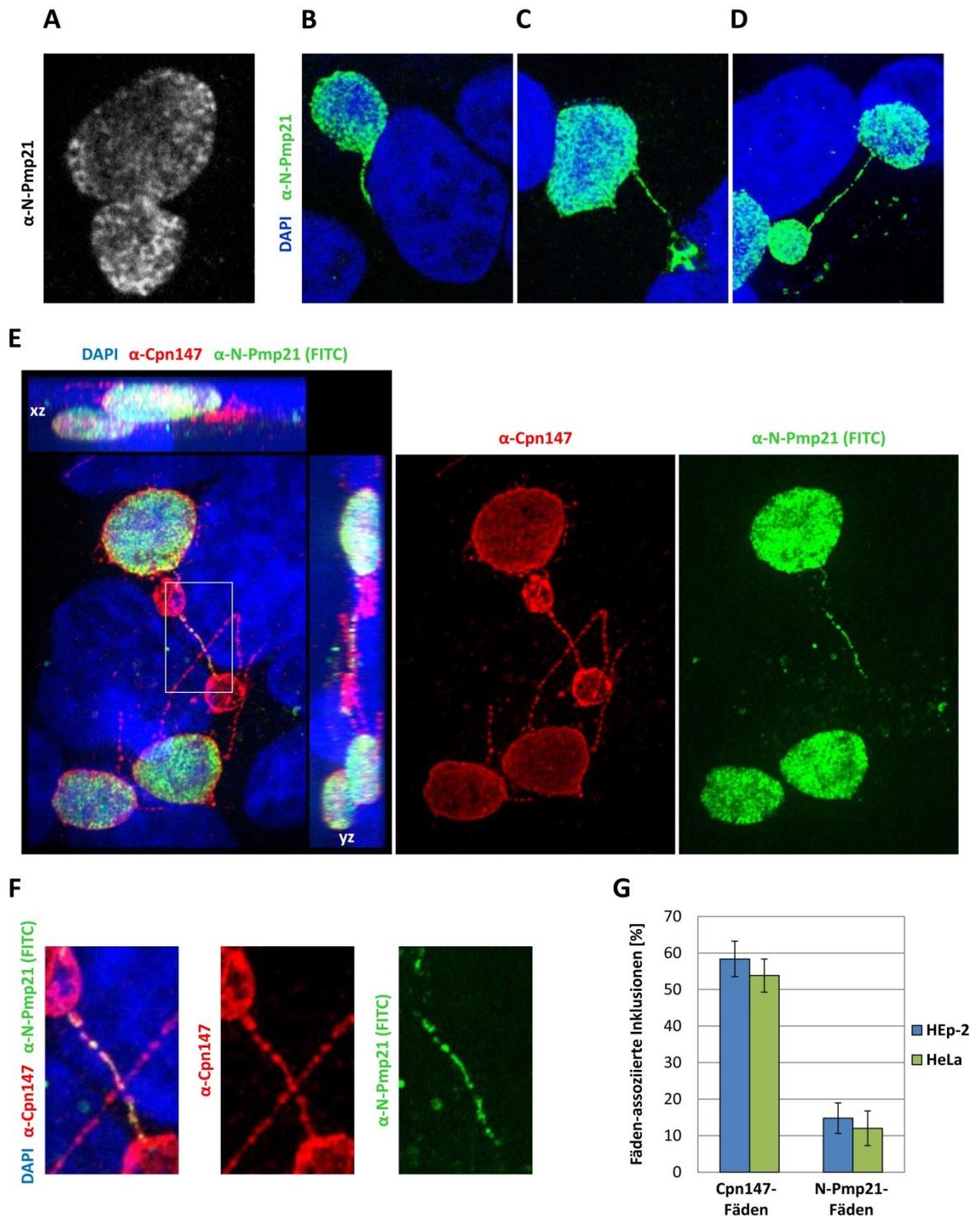
Zusammenfassend konnte mit diesem Antikörper-Neutralisationsexperiment gezeigt werden, dass die Blockierung des N-Pmp21 Proteins auf der EB-Oberfläche mittels Antikörpern zu einer Inhibierung der chlamydialen Infektion führte. Somit konnte eine essentielle Bedeutung von N-Pmp21 im Infektionsprozess aufgezeigt werden.

### 4.7.3 N-Pmp21 und N-Pmp21-tragende Pmp21-Fragmente sind

#### **bakterienassoziiert und auf Fäden im humanen Zytosol lokalisiert**

Um die Lokalisierung von N-Pmp21 bzw. N-Pmp21-haltigen Pmp21-Fragmenten in der Infektion detaillierter zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenz-Analysen mit dem antigengereinigten  $\alpha$ -N-Pmp21 Antikörper durchgeführt.  $\alpha$ -N-Pmp21 führte zu einer deutlichen Färbung der Bakterien in den chlamydialen Einschlüssen, wobei klare Ringstrukturen identifiziert wurden (Abb. 4.32 A). Interessanterweise wurden bei vielen Inklusionen fadenartige Strukturen nachgewiesen, die von der Inklusion ausgehend in das Zytosol der Humanzelle ragten. Die detaillierte Untersuchung der Morphologie der N-Pmp21-positiven Fäden wies drei verschiedene Phänotypen auf (Abb. 4.32 B-D). So wurden Fäden identifiziert, (1) die am Zellkern anlagen, (2) die eine normale Inklusion und eine abberante bzw. „leere“ Inklusion verbanden und (3) die zwei normale Inklusionen miteinander verknüpften. Da diese Morphologien bislang nicht mit den  $\alpha$ -M-Pmp21,  $\alpha$ -Pmp6 und  $\alpha$ -Pmp20 Antikörpern detektiert wurden (vgl. Abb. 4.22 B) (Moelleken, Schmidt et al. 2010), ist möglicherweise nur das N-Pmp21-Protein als einziges Pmp21-Fragment mit den fadenartigen Strukturen assoziiert. Allerdings zeigte der  $\alpha$ -N-Pmp21 Antikörper eine deutlich intensivere Färbung der Bakterien als die anderen  $\alpha$ -Pmp Antikörper, sodass man nicht

vollkommen ausschließen kann, dass mit besseren Antikörpern auch andere Pmps auf den Fäden detektiert worden wären.



**Abbildung 4.32: N-Pmp21 zeigt eine partielle Lokalisation auf fadenartigen Strukturen.**

**A) B) C) D)** Repräsentative Spinning-Disc Aufnahmen von  $\alpha$ -N-Pmp21 gefärbten Inklusionen. HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* (MOI=20) infiziert und 48 hpi für 10 min bei RT mit 3 % PFA fixiert und mit 0,2 % Triton permeabilisiert. Die Färbung erfolgte mit  $\alpha$ -N-Pmp21 (1:100) und sekundärem Alexa488-gekoppeltem  $\alpha$ -Kaninchen Antikörper (1:200). Mittels DAPI wurde die chlamydiale und humane DNA angefärbt.

**E)** Co-Färbung von infizierten HEp-2 Zellen (48 hpi) mit  $\alpha$ -Cpn147 (1:50) und Alexa594-gekoppeltem  $\alpha$ -Kaninchen Antikörper und FITC-markiertem  $\alpha$ -N-Pmp21 (1:100). Die DNA wurde mit DAPI angefärbt.

**F)** Ausschnittsvergrößerung aus E.

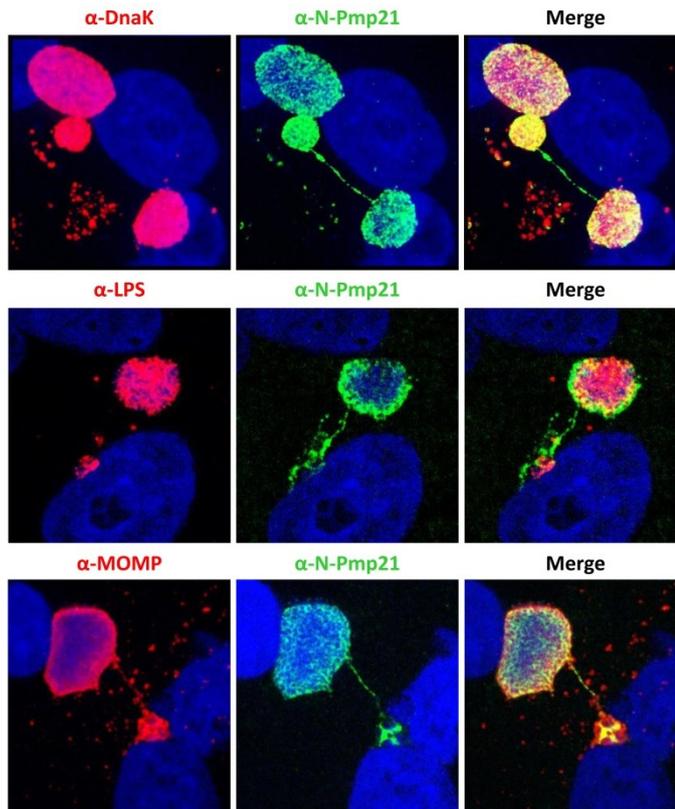
**G)** Quantifizierung der Inklusionen in infizierten HEp-2 und HeLa Zellen (48 hpi), die mit min. einem Faden assoziiert waren. Die Detektion der Fäden erfolgte mittels  $\alpha$ -Cpn0147 bzw.  $\alpha$ -N-Pmp21 (n=3).

Diese Fäden wurden in früheren Studien als sogenannte IncA-beladene Fibern beschrieben, die nicht nur das Inklusionsmembranprotein IncA, sondern auch Komponenten der chlamydialen Außenmembran aufwiesen (Brown, Skeiky et al. 2002). Ferner wurde eine Faden-Assoziation ebenfalls für das potentielle Inc-Protein Cpn0147 identifiziert und detaillierter untersucht (Herbst 2011). Um zu überprüfen, ob es sich bei den mit  $\alpha$ -N-Pmp21 detektierten Fäden tatsächlich um Cpn0147-positive Fibern handelt, wurde eine Co-Färbung durchgeführt (Abb. 4.32 E). Cpn0147 lokalisierte wie zu erwarten in der Inklusionsmembran sowie in zahlreichen Fäden, die von der Inklusionsmembran ausgingen. Im Gegensatz dazu wurde N-Pmp21 nur auf wenigen Fibern detektiert, wobei eine Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale eine deutliche Co-Lokalisation zeigte. Ferner schienen die Fäden nicht kontinuierlich gefärbt zu sein, sondern eine Anreicherung von punktförmigen Strukturen darzustellen (Abb. 4.32 F).

Eine Quantifizierung der Inklusionen, die mindestens eine Fiber aufwiesen, bestätigte, dass deutlich mehr Inklusionen mit Cpn0147-positiven Fäden (ca. 55-60 %) vorlagen als mit N-Pmp21-positiven Fäden (ca. 10-15 %) (Abb. 4.32 G). Folglich ist N-Pmp21 nur partiell mit den Cpn0147-positiven Fibern assoziiert.

Um zu überprüfen, ob andere chlamydiale Proteine auf diesen Fäden lokalisiert sind, wurden weitere Co-Färbungen durchgeführt (Abb. 4.33). Dabei zeigte das intrachlamydiale Protein DnaK ausschließlich eine Lokalisation in den chlamydialen Inklusionen. Für das chlamydiale LPS wurde eine Lokalisation in den Inklusionen sowie eine partielle Co-Lokalisation mit den N-Pmp21-positiven Fäden identifiziert, während die Detektion des oberflächenlokalisierten MOMP eine vollständige Überlagerung mit dem N-Pmp21-Signal auf den Fäden zeigte. Folglich wurden nur Komponenten der chlamydialen Außenmembran auf den Fibern detektiert, was mit früheren Beobachtungen korreliert (Brown, Skeiky et al. 2002).

Zusammenfassend zeigten diese Analysen, dass N-Pmp21, wie auch andere Komponenten der chlamydialen Außenmembran, partiell mit Fäden assoziiert sind, die von chlamydialen Inklusionen ausgehen und verschiedene Morphologien aufweisen.

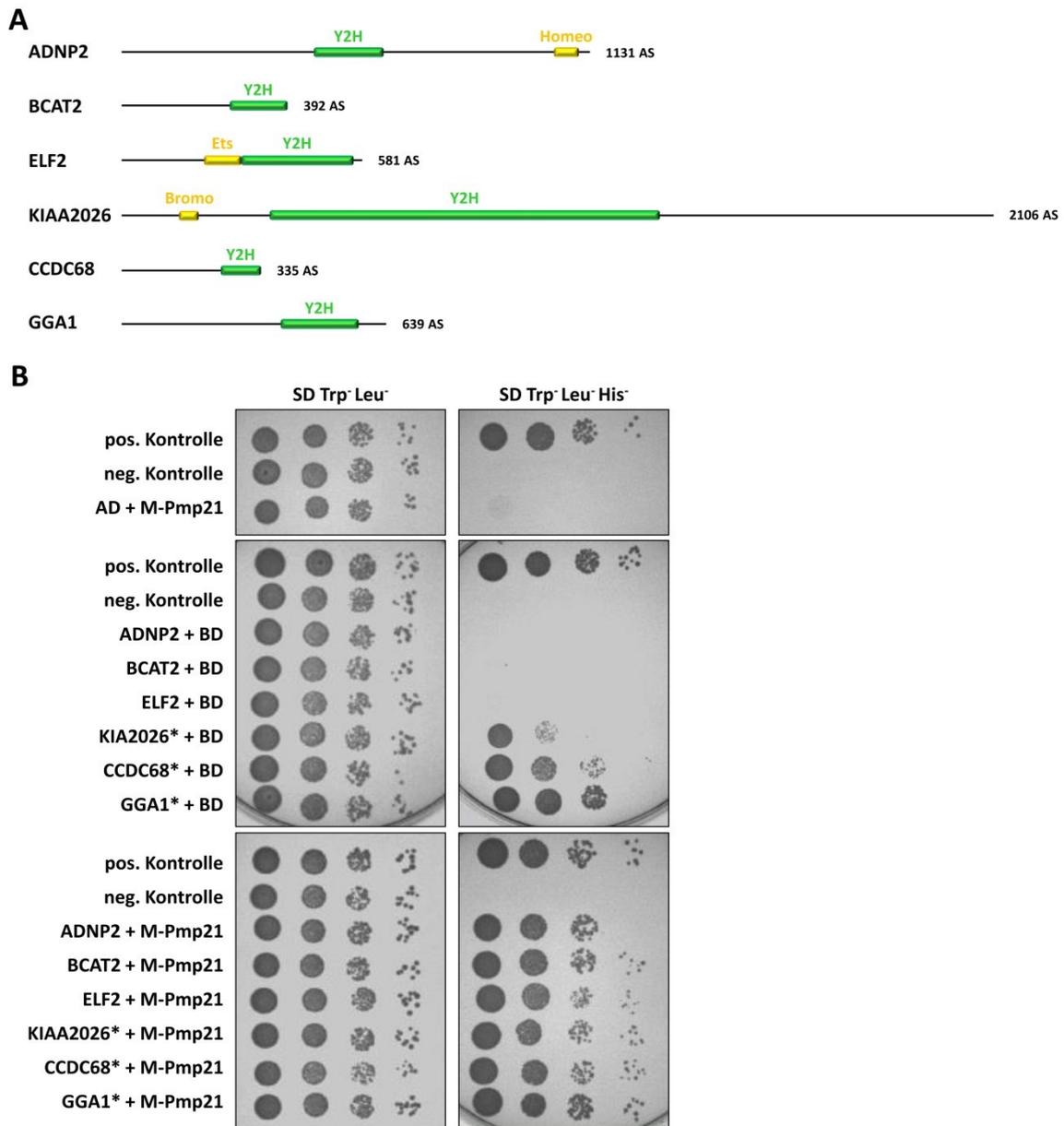


**Abbildung 4.33: Komponenten der chlamydialen Außenmembran lokalisieren partiell auf Fibern.**

Co-Färbung von infizierten HEp-2 Zellen (48 hpi) mit  $\alpha$ -N-Pmp21 (1:100) in Kombination mit  $\alpha$ -DnaK (1:50),  $\alpha$ -LPS (1:20) oder  $\alpha$ -MOMP (1:50). Die DNA wurde mit DAPI angefärbt. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte mit dem Konfokalmikroskop.

## 4.8 Die Suche nach weiteren potentiellen Interaktionspartnern von M-Pmp21

Da N-Pmp21 wie auch andere Komponenten der chlamydialen Außenmembran im Zytosol der infizierten Wirtszelle detektiert wurden, wäre es durchaus möglich, dass weitere Pmp-Fragmente diese Lokalisation aufweisen. Dann wäre eine Effektorfunktion dieser Proteine in der infizierten Zelle denkbar (Swanson, Taylor et al. 2009). Interessanterweise wurden im Rahmen eines Hefe-Zwei-Hybrid-Screens durch die Firma Hybrigenics eine Interaktion des M-Fragmentes von Pmp21 mit den intrazellulären humanen Proteinen ADNP2 (Activity-dependent neuroprotective protein 2), BCAT2 (Branched chain aminotransferase), ELF2 (Ets-related factor 2), KIAA2026 (uncharacterized protein), CCDC68 (Coiled-coil domain containing protein 68) und GGA1 (Golgi-localized, Gamma-ear-containing, Arf-binding protein 1) identifiziert. Um die Interaktionen von M-Pmp21 mit den identifizierten Fragmenten der potentiellen humanen Interaktionspartner zu verifizieren, wurden direkte Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen durchgeführt.



**Abbildung 4.34: Potentielle Interaktion von M-Pmp21 mit intrazellulären humanen Proteinen.**

**A)** Schematische Darstellung der potentiellen humanen Interaktionspartner von M-Pmp21 und der im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen identifizierten Fragmente (Y2H). Diese Fragmente wurden als AD-Fusionsproteine in den direkten Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen (siehe B) eingesetzt. ADNP2, ELF2 und KIAA2026 weisen jeweils eine DNA-bindende Region (Homeodomäne, Ets-Domäne bzw. Bromodomäne) auf. Die Länge der Vollängenproteine ist jeweils rechts aufgeführt. AS: Aminosäuren.

**B)** Serielle Tropftests zur Wachstumsanalyse von Hefezellen. Die Analysen wurden wie in Abb. 4.14 beschrieben durchgeführt. Positivkontrolle: p53 + SV40 T-Antigen; Negativkontrolle: Lamin C + SV40 T-Antigen; \*: Autoaktivität.

Die seriellen Tropftests zur Wachstumsanalyse auf SD Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> Medium bestätigten, dass alle Fusionsprotein-exprimierenden Hefen ein vergleichbares Wachstum zeigten (Abb. 4.34 B, linke Spalte). Die KIAA2026-, CCDC68- und GGA1-Konstrukte zeigten unterschiedlich starke Autoaktivität als AD-Fusionsprotein im Hefe-Zwei-Hybrid-System (Abb. 4.34 B, mit \* markiert). Während die Autoaktivität des KIAA2026-Konstruktes relativ schwach ausfiel,

zeigten die Konstrukte CCDC68 und GGA1 eine starke Autoaktivierung. Hefezellen, die M-Pmp21 zusammen mit den humanen Proteinen ADNP2, BCAT2 und ELF2 exprimierten, zeigten ein deutliches Wachstum auf SD Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Medium, was auf eine Interaktion zwischen den AD- und BD-Fusionsproteinen hindeutet (Abb. 4.34 B, unten rechts). Das Wachstum von KIAA2026+M-Pmp21-exprimierenden Hefezellen war auf dem Selektivmedium SD Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> His<sup>-</sup> signifikant stärker als von KIAA2026+BD-exprimierenden Zellen. Unter Berücksichtigung der Autoaktivität des KIAA2026-Konstruktes konnte somit eine Interaktion zwischen KIAA2026 und M-Pmp21 im Hefe-Zwei-Hybrid-System nachgewiesen werden. Leider konnte keine eindeutige Aussage über die Interaktion von CCDC68 bzw. GGA1 mit M-Pmp21 aufgrund der starken Autoaktivität gemacht werden. Hier bedarf es weiterer Experimente zur Untersuchung der Interaktion.

Ob eine Interaktion zwischen Pmp21 und den humanen Proteinen ADNP2, BCAT2, ELF2 und KIAA2026 *in vivo* besteht und welche biologische Funktion diese Interaktion ausübt, bleibt im Weiteren zu prüfen.

## 5 Diskussion

Chlamydien binden wie viele andere pathogene Organismen über einen komplexen Adhäsionsmechanismus an Wirtszellen und leiten ihre eigene Internalisierung durch die Stimulation von zellulären Signalwegen ein. Obwohl diese essentiellen Schritte der chlamydialen Infektion seit vielen Jahren intensiv untersucht wurden, ist das Zusammenwirken von bakteriellen Liganden bzw. Effektoren und den korrespondierenden Rezeptoren der Wirtszelle nur ansatzweise verstanden. Da eine Blockierung der Adhäsion und Internalisierung einen inhibitorischen Effekt auf die Etablierung der chlamydialen Infektion ausüben kann, werden unter anderem Komponenten des chlamydialen Außenmembrankomplexes (cOMC), die potentiell als Adhäsine bzw. Invasine fungieren könnten, als wichtige Kandidaten für die Generierung von Impfstoffen favorisiert.

Im Rahmen von Adhäsionsstudien wurde für das Adhäsion OmcB von *C. pneumoniae*, *C. caviae* und *C. trachomatis* L1 gezeigt, dass es an Glykosaminoglykane der Wirtszelle bindet (Fadel and Eley 2008; Moelleken and Hegemann 2008). Da diese Interaktion vermutlich reversibel ist, könnten die infektiösen EBs über die weitreichenden polymeren GAG-Strukturen bis zur spezifischen Adhäsionsstelle auf der Oberfläche der Humanzellen gelangen (Carabeo and Hackstadt 2001). Potentielle Kandidaten für eine spezifische Interaktion mit einem humanen Rezeptor könnten die Mitglieder der Pmp-Proteinfamilie darstellen. Hierbei handelt es sich um eine große, bioinformatisch identifizierte Familie von putativen Autotransporter-Proteinen, die 9 Mitglieder in *C. trachomatis* und 21 Mitglieder in *C. pneumoniae* umfasst, welche in 6 Subtypen eingeteilt wurden (Grimwood and Stephens 1999). Die Relevanz der Pmps wird durch die Tatsache unterstrichen, dass die *pmp* Genfamilie über 5 % der Codierungskapazität des chlamydialen Genoms repräsentiert. In früheren Analysen wurden adhäsive Eigenschaften für die drei *C. pneumoniae* Pmps Pmp6, Pmp20 und Pmp21 identifiziert sowie die Wichtigkeit dieser Proteine für die chlamydiale Infektion nachgewiesen (Moelleken, Schmidt et al. 2010). Allerdings war die Identität der zellulären Rezeptoren zum damaligen Zeitpunkt noch unklar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktion der Pmps im Infektionsprozess aus verschiedenen Perspektiven zu betrachten und so zu einem besseren Verständnis der spezifischen Interaktion von Chlamydien mit der Wirtszelle beizutragen.

## 5.1 Charakterisierung der Adhäsionsfunktion von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* Pmps

Die Oberflächenproteine Pmp6, Pmp20 und Pmp21 von *C. pneumoniae* wurden als repräsentative Proteine der Pmp-Subtypen PmpG/I, PmpB/C repektive PmpD in früheren Studien als bakterielle Adhäsine identifiziert, die eine Bindung an humane Epithelzellen vermitteln. Für diese Funktion wurden die Pmp-charakteristischen Motive GGA(I,L,V) und FxxN als essentiell beschrieben. Die Wichtigkeit der Pmps für die Infektiösität von *C. pneumoniae* EBs wurde dadurch bestätigt, dass die Blockierung der humanen Rezeptoren durch eine Vorbehandlung der Humanzellen mit rekombinantem Pmp6, Pmp20 bzw. Pmp21 die anschließende *C. pneumoniae* Infektion deutlich reduziert (Schmidt 2009; Moelleken, Schmidt et al. 2010). Ferner neutralisiert eine Behandlung der infektiösen EBs mit einem gegen Pmp21 gerichteten Antikörper die anschließende chlamydiale Infektion signifikant (Wehrl, Brinkmann et al. 2004; Schmidt 2009; Moelleken, Schmidt et al. 2010). Ein ähnliches Resultat wurde ebenfalls mit einem PmpD-spezifischen Antikörper erzielt, der die Infektiösität aller getesteten *C. trachomatis* Serovare inhibierte (Crane, Carlson et al. 2006). Jedoch blieb bislang unklar, ob die Pmps der anderen Subtypen von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* ebenfalls als Adhäsine fungieren und eine wichtige Funktion bei der chlamydialen Infektion ausüben. Zwar wurden signifikante Aminosäureidentitäten zwischen paralogen (23 % - 49 %) und orthologen (23 - 39 %) Pmps eines Pmp-Subtyps gefunden, was auf eine gemeinsame Funktion deuten könnte, jedoch wiesen Pmps verschiedener Subtypen mit Aminosäureidentitäten von 13 % bis höchstens 24 % eine starke Heterogenität auf, die eine unterschiedliche Biologie suggerieren könnte (Abb. 1.5).

Basierend auf diesen Befunden bestand das primäre Ziel dieser Arbeit darin, die Rolle der Pmps im chlamydialen Adhäsionsgeschehen näher zu betrachten. Hierzu wurden repräsentative Kandidaten der sechs Pmp-Subtypen von *C. pneumoniae* und alle neun *C. trachomatis* Serovar E Pmps ausgewählt und in zwei unabhängigen Adhäsionsstudien untersucht. Während alle analysierten Pmps von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* vergleichbare adhäsive Eigenschaften im Hefe-Adhäsionstest aufwiesen, zeigten die korrespondierenden rekombinanten Pmps aus *E. coli*, die auf Latexkügelchen präsentierte wurden, eine unterschiedlich starke Adhäsivität an Epithelzellen (Abschnitt 4.1). Die Tatsache, dass die in dieser Arbeit bestimmte relative Adhäsionsstärke der rekombinanten Proteine Pmp6, Pmp20 und Pmp21 mit der aus vorherigen Studien korrelierte (Pmp6 > Pmp20 > Pmp21) (Moelleken, Schmidt et al. 2010), bestätigt die Reproduzierbarkeit der Bead-Adhäsionsexperimente. Daher stellte sich die Frage, warum die Ergebnisse des Hefe-Adhäsionstest von denen des Bead-Adhäsionsexperiments

abweichen. Diskrepante Beobachtungen wurden bereits in früheren Adhäsionsstudien für das potentielle *C. pneumoniae* Adhäsins Cpn0676 gemacht (Murra 2009). Hierbei wurde für Cpn0676-präsentierende Hefezellen eine moderate Bindung an Humanzellen identifiziert, während rCpn0676-beschichtete Latexkügelchen keinerlei Adhäsion aufwiesen. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte eine unterschiedlich effektive Faltung einiger Proteine in den beiden experimentellen Ansätzen sein. Während die Aga2p-Fusionsproteine ihre potentiell native Faltung bei der Translokation auf die Hefezelloberfläche einnehmen, erhalten die aus *E. coli* aufgereinigten, jedoch zunächst denaturierten Proteine ihre funktionelle Konformation durch Renaturierung bei der Dialyse. Bei diesem Prozess könnte es eventuell zu Fehlfaltungen der rekombinanten Proteine und somit zur Generierung von funktionsunfähigen oder funktionseingeschränkten Proteinen kommen. Daher ist eine Absicherung der Bead-Adhäsionsdaten durch Hefe-Adhäsionstests durchaus wichtig, da ein negativer Befund in den Bead-Adhäsionsexperimenten durch Fehlfaltung der rekombinanten Proteine resultieren könnte.

Die Pmp-charakteristischen Motive, die in allen hier analysierten Pmp-Fragmenten reichlich vorkommen (Abb. 4.1), wurden als essentiell für die Adhäsivität der Pmps beschrieben (Schmidt 2009; Moelleken, Schmidt et al. 2010). In der Tat adhärten rekombinante Pmp-Fragmente mit vielen Motiven, wie z.B. Pmp6, Pmp19 und PmpD, tendenziell stärker an Epithelzellen als Pmp-Fragmente mit wenigen Motiven, wie z.B. Pmp2 und PmpH (Abb. 4.5, Abb.4.7). Dennoch bleibt unklar, ob die Motive direkt am Adhäsionsprozess beteiligt sind und/oder die funktionelle Konformation der Pmps aufrechterhalten. Für eine strukturelle Beteiligung der Pmp-charakteristischen Motive könnte sprechen, dass diese in der modellierten Proteinstruktur der Pmps häufig in den „Ecken“, den sogenannten Turns, der  $\beta$ -helikalen Passagierdomäne lokalisiert waren (Abb. 4.29). Besonders in der Aufsichtsperspektive der modellierten Pmp-Struktur kam der pyramidenförmige Querschnitt, ähnlich der Struktur des *B. pertussis* Adhäsins Pertactin, zur Geltung (Vandahl, Pedersen et al. 2002; Vretou, Giannikopoulou et al. 2003; Henderson, Navarro-Garcia et al. 2004). Während jedoch die chlamydialen Pmps distinkte repetitive Motive aufweisen, zeigt Pertactin eine 12-fache Wiederholung von degenerierten, 20-34 Aminosäuren langen Sequenzen, die erst nach der Auflösung der 3D-Struktur von Pertactin identifiziert wurden (Kajava 2012). Interessanterweise tragen diese repetitiven Sequenzen, die vermutlich für die  $\beta$ -helikale Struktur von Pertactin verantwortlich sind, viele kleine unpolare (Glycin, Alanin) und große unpolare (Isoleucin, Leucin, Valin, Phenylalanin, Tryptophan) Aminosäuren, wobei die Seitenketten dieser Aminosäuren in das Innere der  $\beta$ -Helix ragen (Kajava, 2012). Da diese Aminosäuren auch Bestandteile der Pmp-spezifischen Motive GGA(I,L,V) und FxxN sind,

wäre eine ähnliche Anordnung der Aminosäureseitenketten in den Pmps denkbar. Des Weiteren bestätigte eine detaillierte Sequenzuntersuchung der *C. trachomatis* Pmps eine häufige räumliche Nähe der GGAI-Motive zu Cysteinen, was auf eine nichtwillkürliche und Struktur-relevante Verteilung dieser Pmp-charakteristischen Motive hinweist (Gomes, Nunes et al. 2006). Diese Indizien schließen eine direkte Beteiligung der Motive am Adhäsionsprozess jedoch nicht aus. So könnte die korrekte Faltung der Pmps als Prärequisit für eine Motiv-vermittelte Adhäsion dienen.

Interessanterweise weisen neben den chlamydialen Pmps auch andere Adhäsine pathogener Organismen eine signifikante Anzahl an GGA(I,L,V), GGAX oder FxxN Motiven auf (Abb. 5.1). Bislang wurde jedoch eine Beteiligung der Tetrapeptid-Motive an den adhäsiven Eigenschaften dieser Proteine nicht untersucht. Während die chlamydialen Pmps hauptsächlich FxxN und GGAI Motive und nur wenige GGAL und GGAV tragen (Abb. 4.1), sind die prevalentesten Motive in rOmpA von *R. rickettsii* FxxN und GGAV. Bei näherer Betrachtung der Lokalisation der Motive in rOmpA fällt auf, dass diese vorwiegend in einer 70-75 Aminosäuren langen Sequenz vorliegen, die sich 12-mal in der ersten Hälfte des Proteins wiederholt. Für das oberflächenlokalisierte und immunodominante rOmpA wurde eine kritische Funktion bei der bakteriellen Adhäsion an die Wirtszelle beschrieben, da sowohl rOmpA-spezifische Antikörper als auch rekombinantes rOmpA Protein die *R. rickettsii* Infektion signifikant inhibieren (Li and Walker 1998). Der Autotransporter rOmpB von *R. rickettsii* besitzt vorwiegend FxxN Motive und weist bis auf den C-terminalen  $\beta$ -Barrel keine signifikante Sequenzähnlichkeit zu rOmpA auf (Blanc, Ngwamidiba et al. 2005). Zusätzlich zur Adhäsions-Funktion wurde für rOmpB eine Rolle bei der bakteriellen Internalisierung identifiziert. So induzieren rekombinante *E. coli* Bakterien, die rOmpB auf ihrer Oberfläche präsentieren, durch ihre Adhäsion eine lokale Aktin-Polymerisation und Membrandeformation, die zu einer Aufnahme der Bakterien in Vero Zellen führt (Uchiyama 2003). In Pertactin von *B. pertussis* lokalisieren drei aneinander gereihte GGAV Motive neben dem zentral im Protein angeordneten RGD-Motiv, während die übrigen Motive in der zweiten Hälfte des Proteins vorliegen. Pertactin bewirkt eine Bindung und Internalisierung von Bakterien in eukaryotische Zellen über das RGD-Motiv (Leininger, Ewanowich et al. 1992). Diese Interaktion könnte über Integrin-Moleküle auf der Oberfläche der Wirtszelle erfolgen, wofür jedoch noch kein Beweis erbracht wurde (Otsuka, Han et al. 2012). Auch für FHA (Filamentous haemagglutinin) wurde bereits die Proteinstruktur aufgeklärt, die eine überwiegend  $\beta$ -helikale Struktur ähnlich wie Pertactin aufweist (Clantin, Hodak et al. 2004). In FHA konnten drei verschiedene Adhäsion-vermittelnde Proteinregionen identifiziert werden: eine Heparin-bindende Domäne, eine Kohlenhydrat-bindende Domäne und ein RGD-Motiv,

das eine spezifische Bindung an CR3 Integrine von Makrophagen ermöglicht (van den Berg, Beekhuizen et al. 1999). Interessanterweise befinden sich diese Bindestellen in der N-terminalen Hälfte von FHA, wo die meisten GGA(L,V) und GGAX Motive lokalisiert sind.

Viele Adhäsine besitzen sich wiederholende Aminosäuresequenzen, die als potentielle Bindungsstellen favorisiert werden (Girard and Mourez 2006). So besitzen die adhäsiven Autotransporter Ag43, AIDA-I und TibA beispielsweise 20-30fache imperfekte Wiederholungen von kurzen Sequenzen (ca. 19 Aminosäuren), während das *Rickettsia* Protein rOmpA (12x 70-75 Aminosäuren) und das *Salmonella enterica* Adhäsion ShdA (9x 63 Aminosäuren und 3x 102 Aminosäuren) deutlich längere Sequenzwiederholungen aufweisen (Girard and Mourez 2006). Auch der trimere Autotransporter YadA von *Yersinia enterocolitica* zeigt eine achtfache Wiederholung der Sequenz Ser-Val-Ala-Ile-Gly-X-X-Ser bevorzugt in den Bindedomänen und angrenzenden Bereichen, die potentiell an der Bindung von Collagen beteiligt sind (Tahir, Kuusela et al. 2000; Nummelin, Merckel et al. 2004). Die Wiederholung von Bindestellen in einem Adhäsion könnte die gleichzeitige Assoziation mit mehreren Rezeptor-Molekülen oder mit mehreren Bindetaschen eines Rezeptor-Moleküls und somit eine stärkere Affinität zur Wirtszelle ermöglichen (Girard and Mourez 2006; Marsh and Helenius 2006).

Adhesin	Organismus	Motive	Sekretion
rOmpA (P15921)	<i>Rickettsia rickettsii</i>	10x GGAV, 13x FxxN	Va
rOmpB (Q53047)	<i>Rickettsia rickettsii</i>	1x GGAL, 4x GGAX, 9x FxxN	Va
YfaL (P45508)	<i>Escherichia coli</i>	6x GGA(I,V), 7x FxxN	Va
Pertactin (P14283)	<i>Bordetella pertussis</i>	3x GGAV, 4x GGAX, 1x FxxN	Va
FHA (P12255)	<i>Bordetella pertussis</i>	10x GGA(L,V), 6x GGAX, 1x FxxN	Vb
BadA (CAF26961)	<i>Bartonella henselae</i>	5x GGAX, 6x FxxN	Vc
Hag (AAx56613)	<i>Moraxella catarrhalis</i>	6x FxxN	Vc

**Abbildung 5.1: Sekretierte Proteine mit adhäsiven Eigenschaften und einer signifikanten Anzahl an GGA(I,L,V), GGAX bzw. FxxN Motiven.**

Dargestellt ist jeweils die Accession-Nummer des Adhäsions, der bakterielle Ursprungsorganismus, die Anzahl der Motive im Volllängenprotein sowie der Sekretionstyp. Va (klassischer Autotransporter), Vb (Zwei-Komponenten-Sekretionsweg), Vc (trimerer Autotransporter).

Die Adhäsion-Funktion der chlamydialen Pmps korreliert mit vorherigen Studien über die Pmp-Proteinfamilie. So zeigten Untersuchungen der Genexpressionsprofile von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* eine Hochregulation vieler *pmp*-Gene in der zweiten Hälfte des chlamydialen

Entwicklungszyklus, die Phase der beginnenden Redifferenzierung von RBs zu EBs (Murra 2005; Nunes, Gomes et al. 2007). Diese späte Expression deutet auf eine frühzeitige Beladung der heranreifenden EBs mit Pmps und somit auf eine essentielle Funktion der Pmps in den infektiösen EBs hin. Interessanterweise wurde mittels RT-PCR für alle *pmp*-Gene, Gene mit Frameshift-Mutationen inbegriffen, eine Transkription in *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* detektiert (Grimwood, Olinger et al. 2001; Nunes, Gomes et al. 2007; Tan, Hsia et al. 2010). Folglich investieren Chlamydien bemerkenswert viel Energie in die *pmp* Expression, obgleich vermutlich nicht jedes *pmp*-Gen vollständig transkribiert wird. Dies könnte suggerieren, dass die unvollständigen mRNAs eventuell eine regulatorische Funktion ausführen oder doch zu Proteinen translatiert werden, die möglicherweise eine bislang unbekannte Funktion in Chlamydien besitzen. Ferner wäre es durchaus möglich, dass die Mutationen in den *pmp*-Genen aus evolutionärer Sicht „jung“ sind und daher noch nicht durch weitere Mutationen verändert wurden.

Ebenfalls konform zur Adhäsion-Funktion ist die Autotransporter-Struktur der Pmps, die eine Translokation der Proteine vom Zytoplasma auf die bakterielle Zelloberfläche ermöglichen könnte. Besonders nennenswert ist hierbei, dass, obwohl der Typ-V (oder Autotransporter) Sekretionsmechanismus in Gram-negativen Pathogenen weit verbreitet ist, die chlamydialen Pmps bis dato als einzige Typ-V-sekretierte Proteine außerhalb der *Proteobacteria* identifiziert wurden (Henderson and Lam 2001). Tatsächlich konnten die meisten Pmps von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* in unabhängigen Studien auf der chlamydialen Oberfläche identifiziert werden, was auf eine erfolgreiche Translokation der Proteine, möglicherweise über den Autotransporterweg, hinweist (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; Liu, Afrane et al. 2010; Moelleken, Schmidt et al. 2010; Tan, Hsia et al. 2010). Für die große Proteinfamilie der Autotransporter Gram-negativer Bakterien wurde eine Vielzahl von Funktionen in der bakteriellen Pathogenese, wie Proteolyse, Cytotoxizität, Serum-Resistenz, Adhäsion sowie Invasion, gefunden (Henderson and Lam 2001; Henderson, Navarro-Garcia et al. 2004; Girard and Mourez 2006). In der Tat wurde den chlamydialen Pmps bereits in früheren Studien eine Beteiligung in der chlamydialen Adhäsion/Internalisierung (Wehrl, Brinkmann et al. 2004; Crane, Carlson et al. 2006; Schmidt 2009; Moelleken, Schmidt et al. 2010) und der Umgehung des Wirts-Immunsystems (Pedersen, Christiansen et al. 2001; Tan, Hsia et al. 2010; Carrasco, Tan et al. 2011; Wheelhouse, Sait et al. 2012) zugeschrieben. Darüber hinaus wurde über weitere potentielle Funktionen der löslichen PmpD-Fragmente von *C. trachomatis* in der Manipulation der Genexpression der Wirtszelle, Apoptose und

Immunsuppression spekuliert, wofür es jedoch bislang keine direkten Beweise gibt (Swanson, Taylor et al. 2009).

Im Rahmen der Adhäsionsstudien mit rekombinaten *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* Pmps wurden verschiedene Bindungsstärken der einzelnen Pmps an epitheliale (HEp-2, HeLa) und endotheliale (HUVEC) Zelllinien bestimmt, wobei jedes Pmp ein eigenes Adhäsionsprofil aufwies. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese einer Pmp-vermittelten Nischen-Adaption im Rahmen der chlamydialen Pathogenese (Gomes, Nunes et al. 2006; Nunes, Gomes et al. 2007; Jeffrey, Suchland et al. 2010; Tan, Hsia et al. 2010; Borges, Nunes et al. 2012). Durch eine differenzielle Expression der Pmps, die bereits für Pmps von *C. abortus* (Wheelhouse, Sait et al. 2012), *C. trachomatis* (Tan, Hsia et al. 2010) und nun auch für *C. pneumoniae* (diese Arbeit, siehe weiter unten) identifiziert wurde, und die erhöhte Mutationsrate der *pmp* Gene (Myers, Mathews et al. 2009; Jeffrey, Suchland et al. 2010; Borges, Nunes et al. 2012) könnte ein individuelles Pmp-Repertoire generiert werden. Dies könnte die Spezifität der chlamydialen Adhäsion an verschiedene Zelltypen und Gewebe unterstützen. Eine ähnliche Bindungsdiversität wird durch die Als (Agglutinin-like sequence) Proteine von *Candida albicans* realisiert, die eine Adhäsion an Epithelzellen, Endothelzellen, Collagen, Fibronectin und Laminin vermitteln (Sheppard, Yeaman et al. 2004). Die Als-Proteinfamilie ist charakterisiert durch eine N-terminale Signalsequenz, eine zentrale Bindedomäne mit Tandem-Wiederholungen und einen C-terminalen GPI-Anker und weist eine strukturelle Ähnlichkeit zu Invasin von *Y. pseudotuberculosis* auf (Frank, Ramsook et al. 2010). Interessanterweise wurde für die acht *ALS* Gene eine differentielle Expression unter verschiedenen Wachstumsbedingungen sowie eine erhöhte Mutationsrate festgestellt, die zu einer Modifikation des Als-Proteinrepertoires von *C. albicans* und so zu einer Anpassung an verschiedene Nischen im Wirt beisteuern (Hoyer, Fundyga et al. 2001).

Die identifizierte Bindung der Pmps (Abb. 4.8), aber auch des chlamydialen Adhäsins OmcB (Molleken and Hegemann 2008) an HUVECs korrelieren mit der Infizierbarkeit von Endothelzellen mit *C. pneumoniae* (Belland, Ouellette et al. 2004). Die Infektion dieser Zellen führt zu einer NF- $\kappa$ B Aktivierung und somit zu einer verstärkten Expression von proinflammatorischen Faktoren (Krull, Klucken et al. 1999; Wuppermann, Molleken et al. 2008). In *in vitro* Studien wurden Pmp20 und Pmp21 als Mediatoren der NF- $\kappa$ B-vermittelten Cytokin-Produktion in Endothelzellen identifiziert (Niessner, Kaun et al. 2003). Eine Entzündung bzw. Verletzung der Endothelzellschicht wird in der medizinischen Forschung als mögliche Ursache für die Bildung von Athereosklerose vermutet (Response-to-injury-Hypothese) (Mörl, Haders et al. 1998). Folglich könnte *C. pneumoniae*, eventuell durch eine

Beteiligung der Pmps, in der Ausbildung von Atherosklerose entweder als potentieller Auslöser oder als Risikofaktor involviert sein.

## 5.2 Welchen Beitrag leisten die Pmps zur chlamydialen

### Adhäsion?

Da die Ergebnisse des Hefeoberflächen-Präsentationssystems sowie die Adhäsionstests mit rekombinanten Proteinen auf eine signifikante Adhäsivität der Pmps von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* hinweisen, wurde in dieser Arbeit auch die Relevanz der Pmps für die chlamydiale Infektion durch Protein-Neutralisationsexperimente untersucht. Hierbei schirmt das rekombinante Protein den spezifischen Rezeptor gegen das natürliche Adhäsins auf der Oberfläche des EBs ab. Somit ist der humane Rezeptor nicht mehr an der Adhäsion beteiligt, was demnach zu einer Reduktion der Bindung des EBs und folglich auch zu einer reduzierten Infektion führt. Eine Vorbehandlung der Humanzellen mit rekombinanten *C. pneumoniae* oder *C. trachomatis* Pmps führte zu einer signifikanten Verminderung der jeweiligen chlamydialen Infektion, wobei die Infektiosität der EBs auf 50-60 % durch *C. pneumoniae* Pmps und auf 30-60 % durch *C. trachomatis* Pmps reduziert wurde. Interessanterweise inhibierten die rekombinanten Pmps Pmp2, Pmp6 und Pmp21 von *C. pneumoniae* und PmpG und PmpD von *C. trachomatis* als repräsentative Proteine der beiden Pmp-Subtypen G/I und D die chlamydiale Infektion Spezies-spezifisch, was auf unterschiedliche Adhäsionsmechanismen bzw. humane Rezeptoren der *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* Pmps hindeutet. Eine weitere wichtige Kernaussage der Untersuchungen war, dass Pmp21 und Pmp6 von *C. pneumoniae* sowie PmpD und PmpG von *C. trachomatis* überlappende Funktionen im chlamydialen Infektionsprozess aufwiesen, während Pmp21 und OmcB in unterschiedlichen Bindungsmechanismen involviert zu sein scheinen, die jedoch teilweise miteinander assoziiert sind (Abschnitt 4.2).

In früheren Analysen des *C. pneumoniae* Adhäsins Pmp21 führte die Vorbehandlung von HEp-2 Zellen mit 200 µg/ml rekombinatem M-Pmp21 Protein zu einer Infektionsreduktion auf 40 %, während eine Restinfektion von 50 % nach Inkubation der Humanzellen mit rekombinatem Pmp6 und Pmp20 identifiziert wurde (Schmidt 2009; Moelleken, Schmidt et al. 2010). Bei gleicher Proteinkonzentration resultierte eine Vorinkubation mit rekombinatem Pmp21 in verschiedenen Neutralisationsexperimenten dieser Arbeit in einer Restinfektion von 40-55 %, während Pmp6 und Pmp20 die Infektion auf 50-60 % reduzierten (Abb. 4.9; Abb. 4.11; Abb. 4.12; Abb. 4.13). Somit wurden die Resultate der Protein-Neutralisationsexperimente aus vorherigen Studien in dieser Arbeit bestätigt. In früheren Antikörper-Neutralisationsstudien führte eine Inkubation der infektiösen EBs mit einem

polyklonalen Antikörper gegen M-Pmp21 von *C. pneumoniae* oder gegen PmpD von *C. trachomatis* L2 zu einer Reduktion der jeweiligen Infektion auf ca. 20 %, während eine Präinkubation mit einem Antikörper gegen N-Pmp21 in einer Reduktion der *C. pneumoniae* Infektion auf ca. 10 % resultierte (Wehrl, Brinkmann et al. 2004; Crane, Carlson et al. 2006; Moelleken, Schmidt et al. 2010). Allerdings ist zu beachten, dass in diesen drei Studien die Restinfektion nach der Antikörper-Inkubation nicht auf die Präimmunsereum-Kontrolle normalisiert wurde. Unter Berücksichtigung der potentiell inhibitorischen Wirkung des Präimmunsereums wären vermutlich moderatere Neutralisationswerte zu erwarten. Auch in dieser Arbeit konnte eine Infektionsneutralisation unter Verwendung der polyklonalen  $\alpha$ -M-Pmp21 oder  $\alpha$ -N-Pmp21 Antikörper bestätigt werden. Hier resultierte eine Inkubation mit  $\alpha$ -M-Pmp21 in einer Reduktion der *C. pneumoniae* Infektion auf 20 % und mit  $\alpha$ -N-Pmp21 in einer Reduktion auf 40 %. Die Normalisierung der Neutralisationswerte auf die entsprechenden Präimmunsereum-Kontrollen ergab eine Restinfektion von 60 % nach Behandlung mit  $\alpha$ -M-Pmp21 und von 70 % nach einer  $\alpha$ -N-Pmp21-Inkubation (Abb. 4.13, Abb. 4.31). In allen Antikörper-Neutralisationsstudien schirmte der gebundene Antikörper das jeweilige Pmp-Adhäsion auf der Oberfläche der EBs ab, so dass dieses nicht mehr an der Infektion beteiligt war, was zu einer verminderten Infektion führte. Somit konnte in unabhängigen Studien die Wichtigkeit der Pmps für die chlamydiale Infektion verifiziert werden.

Um den Adhäsionsbeitrag zweier Pmps aus unterschiedlichen Pmp-Subtypen im Infektionsgeschehen näher zu betrachten, wurden Pmp6 (Subtyp G/I) und Pmp21 (Subtyp D) von *C. pneumoniae* bzw. PmpG (Subtyp G/I) und PmpD (Subtyp D) von *C. trachomatis* alleine oder in Kombination in Protein-Neutralisationsexperimenten eingesetzt (Abb. 4.12). Hierbei war es unerheblich, ob die rekombinanten Pmps alleine oder mit einem zweiten Pmp verwendet wurden. Der inhibitorische Effekt auf die chlamydiale Infektion war stets additiv und nur von der eingesetzten Proteinmenge abhängig, was auf eine überlappende Funktion der Pmps einer Chlamydien-Spezies hindeutet. Somit wäre die Nutzung desselben Wirtszellrezeptors für diese Pmps durchaus denkbar. Bereits frühere Neutralisationsanalysen mit rekombinantem Pmp6 und Pmp21 von *C. pneumoniae* hatten auf eine überlappende Funktion der beiden Proteine hingedeutet (Moelleken, Schmidt et al. 2010). Interessanterweise zeigte rekombinantes Pmp6 in der Neutralisationskinetik ein anderes Verhalten als Pmp21 (Moelleken, Schmidt et al. 2010) (diese Arbeit), was auf unterschiedliche Bindungsaffinitäten der Pmps beruhen könnte. Unklar ist jedoch, in welcher Form die rekombinanten Pmps, aber auch die chlamydialen Pmps *in vivo* an den potentiellen Rezeptor binden. Erste Hinweise auf eine Oligomerisierung von *C. trachomatis* PmpD sowie Pmp6, Pmp20 und Pmp21 von

*C. pneumoniae* favorisieren oligomere Adhäsions-Strukturen (Swanson, Taylor et al. 2009) (diese Arbeit, siehe weiter unten). Durch die Bereitstellung vieler Rezeptorbindestellen und die daraus resultierende stärkere Bindung bzw. die Rekrutierung vieler Rezeptormoleküle an die chlamydiale Eintrittsstelle könnte die Pmp-Oligomerisierung möglicherweise sogar essentiell für eine effektive Pmp-vermittelte Adhäsion an die Wirtszelle sein.

Mit Hilfe von drei unabhängigen experimentellen Ansätzen konnte in dieser Arbeit belegt werden, dass die gemeinsame Blockierung der Pmp21- und OmcB-vermittelten Adhäsionswege zu einem synergistisch inhibitorischen Effekt auf die *C. pneumoniae* Infektion führt. Während beispielsweise eine Präinkubation der Humanzellen mit rekombinantem M-Pmp21 alleine zu einer Restinfektion von 50 % und mit OmcB alleine zu einer Restinfektion von 60 % führte, reduzierten beide rekombinanten Proteine zusammen die Infektion auf 30 % (Abb. 4.13). Dabei schienen die beiden Adhäsionswege jedoch nicht vollständig von einander getrennt, sondern teilweise miteinander verknüpft zu sein. Dies korreliert mit früheren Hypothesen über einen zweistufigen Adhäsionsmechanismus von Chlamydien. Die initiale Interaktion der EBs vieler, aber nicht aller *Chlamydia* Spezies mit der Wirtszelle erfolgt vermutlich über reversible, elektrostatische Bindungen an Heparinsulfat-ähnliche Glykosaminglykane, die als ausgedehnte Zuckerbäume in das extrazelluläre Umfeld humaner Zellen reichen (Davis and Wyrick 1997; Carabeo and Hackstadt 2001; Dautry-Varsat, Subtil et al. 2005). Dieser OmcB-vermittelte Prozess könnte die infektiösen EBs auf eine „Bind-and-Release“ Weise in räumlich Nähe zur eukaryotischen Zelloberfläche bringen (Fadel and Eley 2007; Fadel and Eley 2008; Moelleken and Hegemann 2008). Der zweite Schritt der chlamydialen Adhäsion besteht wahrscheinlich aus einer irreversiblen und spezifischeren Bindung durch Pmp-Adhäsine an einen Rezeptor. Da keine vollständige Inhibierung der *C. pneumoniae* Infektion durch Blockierung von OmcB und Pmp21 möglich war, ist die Beteiligung weiterer chlamydialer Adhäsine wahrscheinlich.

### **5.3 Die Interaktion von Pmp21 mit seinem humanen**

#### **Interaktionspartner EGFR**

Diverse Pathogene nutzen integrale Membranproteine der Wirtszelle wie Integrine, Cadherine, Selektine und CEACAMs (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules) als Rezeptoren für ihre Adhäsion und in manchen Fällen für ihre Zellinvasion (Pizarro-Cerda and Cossart 2006). Bereits frühere Untersuchungen der Adhäsion von *C. psittaci* und *C. trachomatis* an eukaryotische Zellen wiesen auf Proteine bzw. Glykoproteine der Wirtszelle als potentielle Rezeptoren für chlamydiale Liganden hin. So führte eine milde Trypsin-Behandlung der

Wirtszellen sowie eine Inkubation mit Cycloheximid, einem Inhibitor der eukaryotischen Translation, zu einer reversiblen Inhibierung der Bindung und Internalisierung von EBs (Byrne 1976; Byrne and Moulder 1978; Bose and Paul 1982). In folgenden Studien wurde eine Involvement verschiedener humaner Zelloberflächen-Proteine im Adhäsions- und Internalisierungsprozess bestimmter *Chlamydia* Spezies postuliert, wie z.B. Apolipoprotein E4, CFTR, FGFR, Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, PDGFR und PDI/Östrogen-Rezeptor (Puolakkainen, Kuo et al. 2005; Elwell, Ceesay et al. 2008; Gerard, Fomicheva et al. 2008; Ajonuma, Fok et al. 2010; Hall, Schell et al. 2011; Kim, Jiang et al. 2011). Allerdings konnte bis dato eine direkte Interaktion zwischen diesen Rezeptoren und spezifischen chlamydialen Liganden nicht erbracht werden.

In neusten Studien von Dr. Katja Mölleken wurde beispielhaft für Pmp21 nach einem potentiellen humanen Rezeptor gesucht. Pmp21 wurde als Prototyp der chlamydialen Pmps ausgewählt, da es das bislang am besten funktionell untersuchte Pmp aller chlamydialen Spezies darstellt. Darüber hinaus stellt es das am stärksten exprimierte Protein der Pmp-Familie von *C. pneumoniae* dar (Murra 2005), dessen Oberflächenlokalisierung, Prozessierung und Adhäsions-Funktion in verschiedenen Arbeiten analysiert wurde (Vandahl, Pedersen et al. 2002; Wehrl, Brinkmann et al. 2004; Moelleken, Schmidt et al. 2010). Dr. Katja Mölleken identifizierte nun in einem biochemischen Ansatz mit Hilfe eines Biotin-Pulldown Experiments den humanen EGFR (epidermal growth factor receptor) als zellulären Rezeptor für Pmp21. Darauf basierende Experimente dieser Arbeit wurden in die Publikation Moelleken, Becker et al. 2013 aufgenommen.

Mittels Pulldown-Experimenten konnte eine direkte Interaktion zwischen rekombinantem Pmp21 und zellulärem EGFR bzw. Pmp21 von chlamydialen EBs und EGFR von Humanzellen bestätigt werden, während Integrin- $\beta$ 1 und der humane Transferrin-Rezeptor als Interaktionspartner für Pmp21 ausgeschlossen wurden (Moelleken, Becker et al. 2013). Eine direkte Interaktion von Pmp21 und EGFR wurde in Hefe-Zwei-Hybrid Analysen verifiziert, wobei eine vorwiegende Beteiligung der zweiten Ligandenbindestelle von EGFR nachgewiesen wurde (Abb. 4.14). Dies korreliert mit früheren Hefe-Zwei-Hybrid-Experimenten zur Untersuchung der Interaktion zwischen EGFR und seinem natürlichen Liganden EGF, der ebenfalls eine stärkere Bindung an die zweite Ligandenbindestelle aufweist (Santra, Reed et al. 2002). Dies ist potentiell dadurch zu erklären, dass das Ligand-Rezeptor-Interface aus drei Interaktionsstellen besteht, wobei eine Verbindung zur ersten Ligandenbindestelle (LB1) und zwei Verknüpfungen zur zweiten Ligandenbindestelle (LB2) ausgebildet werden (Ogiso, Ishitani et al. 2002). Interessanterweise weisen alle natürlichen Liganden von EGFR, wie z.B. EGF, TGF $\alpha$ , HB-EGF, Amphiregulin, Betacellulin, Epregeulin

und Epigen, eine charakteristische Konsensussequenz mit sechs konservierten Cysteinen auf, die über folgende Interaktionen drei Disulfidbrücken ausbilden: C1-C3, C2-C4, C5-C6 (Harris, Chung et al. 2003; Wouters, Rigoutsos et al. 2005). Da eine solche Proteinkonformation für Pmp21 bislang nicht nachgewiesen werden konnte, bleibt der strukturelle Interaktionsmechanismus zwischen Pmp21 und EGFR bislang noch ungeklärt. Allerdings weist Pmp21 eine beträchtliche Anzahl an Cysteinen auf (Anhang Abb. 6.3), sodass eine Ausbildung von Disulfidbrücken durchaus möglich wäre.

Um die Funktion von EGFR in der chlamydialen Adhäsion nachzuweisen, wurde die Bindung von Pmp21-beschichteten Latexkügelchen bzw. *C. pneumoniae* EBs an CHO K1 Zellen überprüft, die keine endogene EGFR-Expression aufweisen. Tatsächlich wurde keine spezifische Adhäsion der Pmp21-beschichteten Latexkügelchen an die EGFR-negativen Zellen identifiziert. Eine ektope Expression von EGFR-YFP in CHO-K1 Zellen komplementierte diesen Phänotyp und resultierte in einer stärkeren Adhäsion dieser Latexkügelchen (Abb. 4.15). Ferner führte die Expression von EGFR-YFP in CHO K1 Zellen zu einer 265 %igen Erhöhung der Adhäsion und zu einem 365 %igen Anstieg der Internalisierung von *C. pneumoniae* EBs. Dies resultierte in einer Erhöhung der Infektion in EGFR-YFP-exprimierenden Zellen um 180 % im Vergleich zu YFP-exprimierenden Zellen (Moelleken, Becker et al. 2013). Folglich macht die Expression von EGFR in CHO K1 Zellen diese anfälliger für eine Invasion durch *C. pneumoniae*.

Da Neutralisationsexperimente auf eine überlappende Funktion von Pmp6 und Pmp21 hindeuten (Abb. 4.12) (Moelleken, Schmidt et al. 2010), wäre es durchaus denkbar, dass eine Interaktion zwischen EGFR und weiteren *C. pneumoniae* Pmps vorliegt, was jedoch in Interaktionsstudien belegt werden müsste. Ferner bedarf es weiterer Untersuchungen, ob die Pmp-spezifischen Motive GGA(I,L,V) und FxxN an der Erkennung und Bindung von EGFR beteiligt sind.

Interessanterweise repräsentiert Pmp21 den ersten identifizierten EGFR-Liganden pathogenen Ursprungs. Zwar wurde eine Beteiligung des EGF-Rezeptors an der Bindung und der zellulären Aufnahme des Influenza A Virus, Hepatitis C Virus und HCMV (Human cytomegalovirus) postuliert, jedoch konnte bislang keine direkte Interaktion zwischen EGFR und einem viralen Adhäsion bzw. Invasin identifiziert werden (Chan, Nogalski et al. 2009; Eierhoff, Hrinicius et al. 2010; Diao, Pantua et al. 2012).

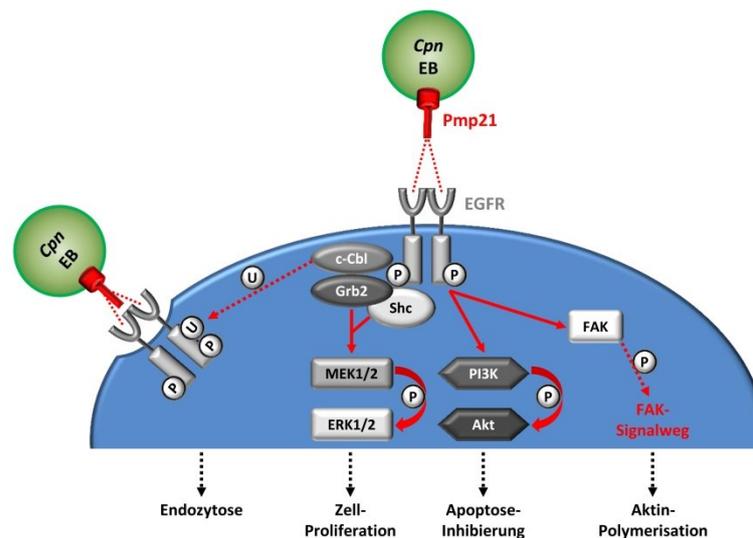
## 5.4 Ist Pmp21 von *C. pneumoniae* ein bakterielles Invasin?

Eine weitere zentrale Beobachtung dieser Arbeit war, dass rekombinantes Pmp21 als Invasin fungiert und die Aufnahme von proteinbeschichteten Latexkügelchen in humane Epithelzellen vermittelt (Abb. 4.16). Mit Hilfe dieses experimentellen Ansatzes konnte bereits die funktionelle Domäne des Invasin-Proteins von *Y. pseudotuberculosis* identifiziert werden, die für die Bindung an  $\beta$ 1-Integrin-Rezeptoren und die Internalisierung in humane Zellen verantwortlich ist (Dersch and Isberg 1999). Ferner wurde eine Ansammlung von EGFR- und phospho-EGFR-Molekülen an der Eintrittsstelle sowohl von Pmp21-beschichteten Latexkügelchen als auch von chlamydialen EBs beobachtet (Abb. 4.17) (Moelleken, Becker et al. 2013). Interessanterweise blieb diese Assoziation auch während der Internalisierung der Latexkügelchen und EBs erhalten. Dies weist auf eine Pmp21-vermittelte Rekrutierung und Aktivierung von EGFR während der chlamydialen Adhäsion und Internalisierung hin. Folglich stellt der ubiquitär exprimierte EGF-Rezeptor nicht nur den zellulären Interaktionspartner von Pmp21 dar, sondern auch das fehlende Verbindungsstück zwischen chlamydialer Adhäsion und Internalisierung in die Wirtszelle.

Im Folgenden stellte sich die Frage, ob diese EGFR-vermittelte Internalisierung über den klassischen Grb2-abhängigen Endozytoseweg führt. Aktiviertes EGFR bewirkt in der Regel eine Rekrutierung des Adaptorproteins Grb2, wobei Grb2 an die Phosphotyrosine an Position 1068/1086 der intrazellulären Domäne von EGFR bindet. Im Anschluss interagiert die Ubiquitin Ligase c-Cbl sowohl mit dem gebundenen Grb2 als auch mit dem phosphorylierten Tyr1045 von EGFR und führt letztlich zur Endozytose des ubiquitinierten Rezeptors (Sorkin and Goh 2008; Madshus and Stang 2009). In der Tat konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von EGFR sowie die Rekrutierung der Adaptorproteine Grb2 und c-Cbl an den phosphorylierten EGFR essentiell für die *C. pneumoniae* Infektion ist (Moelleken, Becker et al. 2013).

Des Weiteren konnte bestätigt werden, dass durch Inkubation der Humanzellen mit rekombinantem Pmp21 oder mit *C. pneumoniae* EBs eine EGFR-vermittelte Aktivierung der ERK1/2-Kinase induziert wird. Interessanterweise führte die chemische Blockierung von MEK1/2, der Upstream-Kinasen von ERK, zu einer Inhibierung der Internalisierung von chlamydialen Partikeln, während die Bindung der Bakterien nicht beeinflusst war (Moelleken, Becker et al. 2013). Dies korreliert mit früheren Analysen der zellulären Aktivierungsprozesse während einer *C. pneumoniae* Infektion (Abb. 5.2). So wurde im Infektionsmodell mit Epithelzellen eine MEK-abhängige Phosphorylierung von ERK1/2, eine Phosphatidylinositol-3-Kinase-abhängige Phosphorylierung von Akt sowie eine Phosphorylierung des Adaptorproteins Shc bereits während der ersten Minuten einer

*C. pneumoniae* Invasion dokumentiert. Darüber hinaus wurde eine Aktivierung der Tyrosinkinase FAK identifiziert, die weitere Effektoren an die Eintrittsstelle der Bakterien rekrutieren könnte (Coombes and Mahony 2002). Durch die potentielle Aktivierung verschiedener Signalwege über die Bindung und Aktivierung von EGFR könnte *C. pneumoniae* Einfluss auf zahlreiche zelluläre Prozesse ausüben, wie z.B. die Zellproliferation, -migration und -differenzierung und die Regulation der Apoptose (Ceresa 2011). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass *C. pneumoniae* die Zellproliferation von glatten Gefäßmuskelnzellen stimuliert (Miller, Selzman et al. 2000). Ferner konnte auch eine verstärkte Proliferation von infizierten vaskulären Endothelzellen nachgewiesen werden, wobei der Transkriptionsfaktor EGR-1 (Early growth response-1) als Mediator identifiziert wurde (Rupp, Hellwig-Burgel et al. 2005). Interessanterweise kann die Expression von EGR-1 durch EGFR über die MEK/ERK- und PI3K/Akt-vermittelten Signalwege stimuliert werden (Cheng, Chang et al. 2013), was eine Verbindung zwischen der *C. pneumoniae*-induzierter EGFR-Aktivierung und der Stimulation der Zellproliferation darstellen könnte.



**Abbildung 5.2: Modell der Pmp21/EGFR-aktivierte Signalwege während der Adhäsion und Internalisierung von *C. pneumoniae* EBs.**

Die Bindung von bakterienassoziiertem Pmp21 (und eventuell anderer Pmps) führt zur Rekrutierung und Phosphorylierung von EGFR. Der aktivierte EGFR rekrutiert die Adaptorproteine Grb2 und Shc, die wiederum den MEK-Signalweg aktivieren (Coombes and Mahony 2002; Moelleken, Becker et al. 2013). Die rekrutierte Ubiquitin Ligase c-Cbl führt zur Mono- und Polyubiquitinierung von EGFR und könnte eventuell die Internalisierung des Adhäsionskomplexes induzieren (Le Roy and Wrana 2005; Yarden and Shilo 2007; Madhus and Stang 2009). Ferner finden weitere, potentiell durch EGFR-vermittelte Aktivierungsprozesse von FAK, PI3K und Akt statt (Prenzel, Fischer et al. 2001; Coombes and Mahony 2002). Eine Aktivierung dieser Signalwege könnte Auswirkungen auf die Proliferation der Wirtszelle, auf apoptotische Prozesse und die Polymerisation von Aktin haben. Hypothetische Signalwege sind mit gepunkteten Linien markiert.

Phosphorylierungsereignisse während der frühen Phase der chlamydialen Infektion stellen vermutlich eine zentrale Rolle im Invasionsprozess dar (Dautry-Varsat, Subtil et al. 2005). So

konnte im Rahmen der chlamydialen Adhäsion und Internalisierung eine Tyrosin-Phosphorylierung zahlreicher eukaryotischer Proteine identifiziert werden, wobei die Kinetik und das Profil der Phosphorylierung Spezies-spezifisch war (Krull, Kramp et al. 2004; Virok, Nelson et al. 2005).

Die Endozytose von EGFR kann je nach Stärke der EGF-Stimulation über einen schnellen Clathrin-vermittelten oder einen verlangsamten Clathrin-unabhängigen Weg erfolgen (Sigismund, Woelk et al. 2005; Woelk, Sigismund et al. 2007; Sigismund, Argenzio et al. 2008; Madhus and Stang 2009). So internalisiert EGFR, wenn die Stimulation über geringe Konzentrationen von EGF erfolgt, über eine Clathrin-abhängige Endozytose, während bei hohen EGF-Konzentrationen EGFR ubiquitiniert und hauptsächlich *via* Cholesterol-reicher Lipid Rafts aufgenommen wird (Sigismund, Woelk et al. 2005). Da eine Akkumulation von aktivierten EGFR-Molekülen um Pmp21-beschichtete Latexkugeln und *C. pneumoniae* EBs identifiziert wurde (Moelleken, Becker et al. 2013), stellte sich die Frage, über welchen Weg diese endozytotischen Prozesse erfolgen. Die Tatsache, dass internalisierte EBs keine Rekrutierung des Transferrin-Rezeptors, eines klassischen Markers für Clathrin-vermittelte Endozytose, induzierten, weist auf einen Clathrin-unabhängigen Internalisierungsprozess hin (Moelleken, Becker et al. 2013). Darüber hinaus wurden Lipid Raft-positive Strukturen 1 hpi um *C. pneumoniae* EBs identifiziert, die ebenfalls positiv für EGFR waren (Fechtner 2013). Die Wichtigkeit der Lipid-Rafts für die chlamydiale Infektion wurde dadurch bestätigt, dass die Zerstörung der Integrität von Lipid Rafts durch die Depletion von Cholesterol mittels Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin einen negativen Einfluss auf die *C. pneumoniae* Internalisierung hatte (Korhonen, Puolakkainen et al. 2012). Auch die Störung der lateralen Organisation der Lipid Rafts durch die cholesterolbindenden Agenzien Nystatin und Filipin resultierte in einer verminderten Aufnahme der EBs (Korhonen, Puolakkainen et al. 2012). Zusammenfassend weisen diese Beobachtungen darauf hin, dass die Akkumulation von Lipid Rafts essentiell für die Internalisierung von *C. pneumoniae* EBs ist und einher geht mit einer Akkumulation des Pmp21-Rezeptors EGFR. Die Bedeutung von Lipid Rafts in der chlamydialen Internalisierung wurde bislang kontrovers diskutiert. Zwar wurden internalisierte *C. trachomatis* EBs mittels Transmissionselektronenmikroskopie in Strukturen beobachtet, die „Clathrin-coated pits“ ähnelten (Wyrick, Choong et al. 1989), jedoch konnte für *C. trachomatis* und *C. caviae* GPIC gezeigt werden, dass die chlamydiale Internalisierung unabhängig von der Clathrin-vermittelten Endozytosemaschinerie erfolgt (Boleti, Benmerah et al. 1999). Ferner wurde gezeigt, dass die Einschlüsse von *C. trachomatis* Serovar L2 5 hpi mit Lipid Rafts angereichert sind (Jutras, Abrami et al. 2003). Zudem wurde für *C. caviae* GPIC eine Akkumulation von Lipid Rafts und Aktin an der Eintrittsstelle mikroskopisch nachgewiesen (Subtil, Wyplosz et

al. 2004). Die Akkumulation solcher Lipid Raft-positiven Strukturen an der Eintrittsstelle in die Wirtszelle könnte das Clustern von spezifischen Rezeptoren wie dem EGFR und dessen Signaltransduktion fördern und somit zu einer effektiveren Aufnahme des Bakteriums führen (Simons and Toomre 2000; Lafont, Abrami et al. 2004).

Das intensiv untersuchte Invasin von *Y. pseudotuberculosis* ist für eine effiziente Internalisierung des Bakteriums und auch des rekombinanten Proteins in die Wirtszelle verantwortlich (Dersch and Isberg 1999; Alrutz, Srivastava et al. 2001; Isberg and Barnes 2001). Ein Vergleich der Kristall-Strukturen von Invasin und dem natürlichen Integrin-Liganden Fibronectin zeigte, dass beide Liganden unterschiedliche Proteinstrukturen aufweisen. Dennoch erkennen beide Proteine teilweise überlappende Regionen von Integrin (Hamburger, Brown et al. 1999). Die höhere Affinität von Invasin basiert vermutlich auf der Ausbildung von zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen zum Rezeptor und der stabileren Konformation im Vergleich zum flexiblen Fibronectin (Gustavsson, Armulik et al. 2002). Darüber hinaus bewirkt Invasin durch Selbst-Interaktion eine Clusterung der gebundenen  $\beta$ 1-Integrin-Rezeptoren, was in einer sehr hohen Internalisierungseffizienz resultiert. Dies wird durch die Beobachtung bestätigt, dass homologe Invasin-Proteine von *Y. enterocolitica*, EHEC und EPEC, die keine Dimerisierungsdomäne aufweisen, eine schwächere Aufnahme in die Wirtszelle erzielen (Dersch and Isberg 1999).

In den Internalisierungsstudien dieser Arbeit bewirkte rekombinantes Pmp21 eine deutlich schwächere Internalisierung von Latexkügelchen als Invasin von *Y. pseudotuberculosis*. So wurde eine signifikante Anzahl an internalisierten Pmp21-beschichteten Latexkügelchen erst nach 4 h identifiziert, während eine Internalisierung von Invasin-beschichteten Kügelchen bereits nach 1 h zu beobachten war. Ferner war nach 4 h die maximale Anzahl internalisierter Pmp21-Kügelchen um den Faktor 3 geringer als bei Invasin-Kügelchen (Abb. 4.16). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Pmp21/EGFR-Interaktion nicht sehr stabil ist und/oder dass nicht ausreichend viele EGFR-Moleküle für eine hocheffiziente Internalisierung rekrutiert werden. Zwar lieferte diese Arbeit erste Hinweise für eine Oligomerisierung von *C. pneumoniae* Pmps, die eine Clusterung von EGFR-Molekülen favorisieren könnte, jedoch bleibt zu überprüfen, inwieweit dies ausschlaggebend für die Internalisierungseffizienz ist. Vielleicht ist die Anwesenheit weiterer Fragmente von Pmp21 und/oder von anderen Pmps essentiell für eine korrekte Pmp-Oligomerisierung und somit für eine effiziente Akkumulation von EGFR-Molekülen und eine erfolgreiche Internalisierung.

Interessanterweise beruht sowohl die  $\beta$ 1-Integrin-vermittelte Endozytose von *Y. pseudotuberculosis* als auch die chlamydiale Internalisierung auf einer Aktin-abhängigen, lokalen Membrandeformation sowie der Aktivierung von Tyrosin-Kinasen (Dautry-Varsat,

Subtil et al. 2005; Pizarro-Cerda and Cossart 2006). So initiiert *Y. pseudotuberculosis* unter anderem die Aktivierung der Tyrosin-Kinasen Src und FAK sowie des MEK/ERK-Signalweges (Eitel, Heise et al. 2005), was auf zentrale Parallelen zwischen der *Yersinia* und *Chlamydia* Infektion hinweist.

Die meisten Adhäsine und Invasine von pathogenen Bakterien sind mit der bakteriellen Oberfläche verbunden. Während bei Gram-positiven Bakterien diese Proteine mit der Zellwand verknüpft sind, erfolgt die Verankerung bei Gram-negativen Bakterien häufig über eine C-terminale Proteindomäne, dem  $\beta$ -Barrel. Eine Ausnahme stellt InlB (Internalin B) von *L. monocytogenes* dar, das über eine schwache, nicht-kovalente Bindung mit der Zellwand assoziiert ist und als lösliches Molekül spontan freigesetzt werden kann (Niemann, Schubert et al. 2004). Während oberflächenlokalisiertes InlB die bakterielle Internalisierung über eine Interaktion mit HGF-R/Met (Hepatocyte growth factor receptor) vermittelt, wird sekretiertes InlB mit der Induktion von „Membrane ruffling“ und der Aktivierung von HGF-R/Met-abhängigen Signalprozessen in Verbindung gesetzt (Bierne and Cossart 2002; Ireton 2007). Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine partielle Sekretion von Pmp-Fragmenten mittels Fraktionierung von infizierten Zellen identifiziert werden (Abb. 4.23). Folglich könnten lösliche Pmp-Fragmente während der Freisetzung der infektiösen EBs aus der lysierten Wirtszelle entlassen werden, eventuell an Nachbarzellen binden und dort EGFR-vermittelte Signalwege induzieren. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass rekombinantes Pmp21 in löslicher Form eine massive Aktivierung von EGFR in Epithelzellen auslöst (Moelleken, Becker et al. 2013).

## **5.5 Welche Funktion übt das Ortholog PmpD in der chlamydialen Adhäsion/Internalisierung aus?**

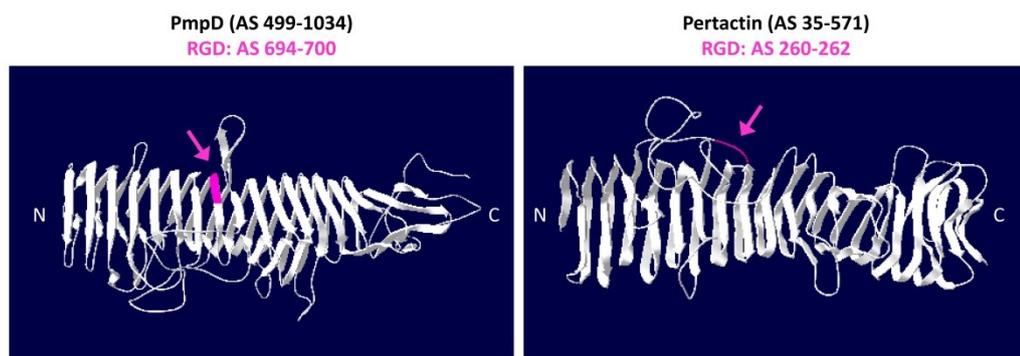
Da Pmp21 von *C. pneumoniae* eine 33 %ige Aminosäureidentität zum *C. trachomatis* Serovar E Ortholog PmpD aufweist (Abb. 1.5), ist eine gemeinsame Funktion im Adhäsions- und Internalisierungsprozess von Chlamydien durchaus denkbar. In der Tat konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass rekombinantes PmpD eine vergleichbar starke Adhäsion und Internalisierung wie Pmp21 vermittelt (Abb. 4.18). Ferner konnte mittels Protein- und Antikörper-Neutralisationsstudien die Wichtigkeit von PmpD für die *C. trachomatis* Serovar E Infektion verifiziert werden (Abb. 4.10) (Crane, Carlson et al. 2006). Jedoch scheint der PmpD-vermittelte Endozytoseprozess im Gegensatz zur Pmp21-vermittelten Internalisierung unabhängig von EGFR zu verlaufen, da keine Interaktion zwischen PmpD und EGFR *in vitro* identifiziert werden konnte (Abb. 4.19). Des Weiteren konnte weder eine Rekrutierung noch

eine Aktivierung von EGFR-Molekülen um internalisierte *C. trachomatis* Serovar E EBs beobachtet werden (persönliche Mitteilung, Dr. Katja Mölleken). Passend zu diesen Ergebnissen wurde in früheren Studien eine EGFR-unabhängige Infektion durch *C. trachomatis* Serovar L2 dokumentiert (Elwell, Ceesay et al. 2008; Kim, Jiang et al. 2011). Jedoch dürfen diese Daten nur unter Vorbehalt herangezogen werden, da in beiden Studien eventuell nicht mit *C. trachomatis* L2, sondern versehentlich mit *C. muridarum* gearbeitet wurde (persönliche Mitteilung, Dr. Joanne Engel). So führte eine Reduktion von EGFR in HeLa Zellen mittels RNA-Interferenz sowie eine Vorbehandlung der Humanzellen mit einem EGFR-Antikörper zu keiner Veränderung der Bindungs- und Internalisierungseffizienz von *C. trachomatis* L2 EBs (Elwell, Ceesay et al. 2008). Ferner wurde keine Aktivierung von EGFR durch *C. trachomatis* L2 identifiziert, während die Rezeptoren PDGFR und FGFR um internalisierte *C. trachomatis* EBs rekrutiert und aktiviert wurden (Elwell, Ceesay et al. 2008; Kim, Jiang et al. 2011). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass freigesetztes FGF2 an *C. trachomatis* EBs bindet und somit als Brückenelement die Bindung zwischen EBs und dem FGF-Rezeptor fördert (Kim, Jiang et al. 2011). Allerdings ist der chlamydiale Rezeptor von FGF2 bislang noch unbekannt. Auch der chlamydiale Ligand von PDGFR und weiterer potentieller Rezeptoren von *C. trachomatis* ist noch nicht identifiziert. Zusammenfassend zeigen diese Beobachtungen, dass *C. trachomatis* vermutlich nicht über eine Interaktion mit dem humanen EGFR, sondern über einen anderen Rezeptor die Internalisierung induziert. Dabei könnten PmpD und möglicherweise auch die übrigen *C. trachomatis* Pmps eine wichtige Funktion als bakterielle Liganden spielen.

Die potentiell unterschiedliche Rezeptor-Nutzung von Pmp21 und PmpD korreliert mit dem Ergebnis der Protein-Neutralisationsanalysen, in denen rekombinante Pmps von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* keine Kreuzneutralisation zeigten (Abb. 4.11). Ersten Indizien für einen Spezies-spezifischen Adhäsionsmechanismus der chlamydialen Pmps lieferten Crane *et al.* in einem Neutralisationsexperiment mit einem Antiserum gegen PmpD von *C. trachomatis* L2 (Crane, Carlson et al. 2006). Interessanterweise inhibierte dieser Antikörper die Infektion aller getesteten *C. trachomatis* Serovare (A, Ba, C, D, E, F, G, K, L2), wobei der stärkste inhibitorische Effekt bei der *C. trachomatis* L2 Infektion identifiziert wurde. Jedoch konnte keinerlei Neutralisation der *C. muridarum* Infektion beobachtet werden. Ferner erfolgte in immunofluoreszenzmikroskopischen Analysen mit dem PmpD-Antiserum eine spezifische Antikörper-Erkennung aller *C. trachomatis* Serovare in infizierten HeLa Zellen, während keine Detektion von *C. muridarum* MoPn, *C. pneumoniae* und *C. caviae* GPIC erfolgte. Daher wurde PmpD als pan-neutralisierendes, aber Spezies-spezifisches Antigen bezeichnet (Crane, Carlson et al. 2006). Dieses spezifische Neutralisationsverhalten des PmpD-Antikörpers

könnte dadurch erklärt werden, dass PmpD hochkonserviert in allen *C. trachomatis* Serovaren vorliegt (99 % Identität), während die Aminosäureidentität zu den orthologen Pmps von *C. muridarum* (71 %), *C. pneumoniae* (33 %) und *C. caviae* GPIC (37 %) deutlich geringer ausfällt. Diese Resultate zusammen mit der Spezies-spezifischen Infektionsneutralisation durch rekombinante Pmps von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* lassen vermuten, dass die divergente Evolution der Pmps eine Anpassung der beiden Pathogene an unterschiedliche humane Rezeptoren bewirkt hat.

Ferner wiesen vergleichende Analysen der Phosphorylierungsprozesse während einer chlamydialen Infektion auf signifikante Unterschiede im frühen Infektionsgeschehen von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* hin. So induziert *C. pneumoniae* eine Phosphorylierung der MAPK (Mitogen-activated protein kinase) Mitglieder ERK1/2, p38 und JNK in Endothelzellen (Krull, Kramp et al. 2004). In Epithelzellen wurde eine Aktivierung von MEK1/2 und ERK1/2, den Downstream-Kinasen von EGFR, während einer *C. pneumoniae* Infektion bestätigt (Coombes and Mahony 2002; Moelleken, Becker et al. 2013). Im Gegensatz dazu wurde keine MAPK-Aktivierung im Rahmen einer *C. trachomatis* K, E und L2 Infektion in Endothelzellen identifiziert (Krull, Kramp et al. 2004). Anhand des direkten Vergleiches der Tyrosin-Phosphorylierungsprofile von infizierten Epithelzellen wurde eine Eingruppierung der chlamydialen Spezies in vier Kategorien durchgeführt: (i) *C. trachomatis* A-H, (ii) *C. trachomatis* L1-L3, (iii) *C. muridarum* und (iv) *C. pneumoniae*/*C. caviae* (Virok, Nelson et al. 2005). Folglich zeigen *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* nicht nur spezies-spezifische Unterschiede in der Pmp-vermittelten Rezeptor-Nutzung, sondern auch in der subsequenten Aktivierung von Signalprozessen in der Wirtszelle.



**Abbildung 5.3: Unterschiedliche Lokalisation des RGD-Motivs in PmpD und Pertactin.**

Modellierung der zentralen Domänen von *C. trachomatis* PmpD (Volllängenprotein: 1530 AS) und *B. pertussis* Pertactin (Volllängenprotein: 910 AS) mit dem Phyre-Server (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>). Pfeile markieren die RGD-Motive.

Damit stellt sich natürlich die Frage, an welchen humanen Rezeptor das Pmp21-Ortholog PmpD während der chlamydialen Adhäsion und Internalisierung bindet. Da PmpD ein RGD-

Motiv (Aminosäuresequenz: Arginin, Glycin, Asparaginsäure) innerhalb der Passagierdomäne aufweist, wäre eine Interaktion mit Integrinen auf der humanen Oberfläche durchaus denkbar (Swanson, Taylor et al. 2009). Integrine stellen eine Superfamilie von Zelladhäsion-Rezeptoren dar, die extrazelluläre Matrixkomponenten, Komponenten der Zelloberfläche sowie lösliche Liganden binden und im Folgenden das Signal in das Zellinnere weiterleiten (Takada, Ye et al. 2007). Die RGD-Sequenz repräsentiert ein generelles Integrin-Bindemotiv, wobei nicht alle Proteine, die ein RGD tragen, adhäsive Eigenschaften aufweisen (Henderson, Navarro-Garcia et al. 2004; Girard and Mourez 2006). Überraschenderweise besitzt das Integrin-bindende Protein Invasin von *Y. pseudotuberculosis* kein vollständiges RGD-Motiv, sondern nur einen Asparaginsäure-Rest, der für die Bindung verantwortlich ist (Hamburger, Brown et al. 1999). Das RGD-Motiv in Pertactin von *B. pertussis* bewirkt eine Bindung und aktive Aufnahme des Bakteriums in eukaryotische Zellen (Leininger, Ewanowich et al. 1992). Diese Interaktion könnte über Integrin-Moleküle auf der Oberfläche der Wirtszelle erfolgen, wofür allerdings noch kein Beweis erbracht wurde (Otsuka, Han et al. 2012). Die Region um das RGD-Motiv von *B. pertussis* FHA wurde als Interaktionsstelle für CR3 (complement receptor 3) Integrine auf Leukozyten identifiziert (Locht, Bertin et al. 1993). Strukturvorhersagen deuten darauf hin, dass das RGD-Motiv von PmpD nicht auf einem hervorstehenden Loop wie bei den *Bordetella* Adhäsinen Pertactin und FHA präsentiert ist (Leininger, Ewanowich et al. 1992; Kajava, Cheng et al. 2001; Henderson, Navarro-Garcia et al. 2004), sondern vermutlich auf einem  $\beta$ -Faltblatt lokalisiert (Abb. 5.3). Ob das Motiv dennoch die gleiche adhäsive Funktion wie in Pertactin erfüllt, bleibt zu klären.

## 5.6 Mögliche Konsequenzen der proteolytischen Prozessierung von Pmps für die chlamydialen Infektion

Die meisten chlamydialen Pmps weisen eine Signal-Peptidase-Schnittstelle auf (Abb. 4.1), die theoretisch eine Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz während der Translokation über die innere Membran ermöglicht. Ferner wurde für Pmp6 und Pmp21 von *C. pneumoniae* sowie für PmpD, PmpE, PmpF und PmpG von *C. trachomatis* eine weitere Schnittstelle vor der  $\beta$ -Barrel-Domäne biochemisch identifiziert, die eine Abtrennung der Passagierdomäne erlaubt (Vandahl, Pedersen et al. 2002; Wehrl, Brinkmann et al. 2004; Saka, Thompson et al. 2011). Darüber hinaus wurden zusätzliche Schnittstellen innerhalb der Passagierdomäne von Pmp20 und Pmp21 von *C. pneumoniae* und PmpB, PmpD, PmpF, PmpG, PmpH und PmpI von *C. trachomatis* dokumentiert, wobei sich die Position und Anzahl der Schnittstellen je nach Pmp deutlich unterscheiden kann (Vandahl, Pedersen et al. 2002; Swanson, Taylor et al. 2009; Saka,

Thompson et al. 2011). Unter Verwendung der polyklonalen Antikörper  $\alpha$ -Pmp6,  $\alpha$ -Pmp20 und  $\alpha$ -Pmp21 wurde eine spezifische Detektion von Vollängen-Pmps und prozessierten Pmp-Fragmenten im Westernblot identifiziert (Abb. 4.21). Für Pmp6 wurden sowohl das ca. 140 kDa große Vollängenprotein sowie das N-terminale Fragment detektiert, was mit den bereits publizierten Schnittstellen korreliert (Vandahl, Pedersen et al. 2002; Wehrl, Brinkmann et al. 2004). Im Gegensatz dazu zeigte Pmp20 mit fünf identifizierten Fragmenten ein deutlich komplexeres Prozessierungsmuster. Da für Pmp20 bislang nur eine putative Schnittstelle festgestellt wurde (Vandahl, Pedersen et al. 2002), war eine Zuordnung der Fragmente im Westernblot nur teilweise möglich. Das bislang am besten analysierte Pmp21 zeigte wie erwartet im Westernblot drei Proteinbanden, die mit den publizierten Schnittstellen korrelieren (Vandahl, Pedersen et al. 2002; Wehrl, Brinkmann et al. 2004; Moelleken, Schmidt et al. 2010).

Bei näherer Betrachtung der Prozessierungsprofile der *C. pneumoniae* Pmps (Abb. 4.21) konnten folgende Beobachtungen gemacht werden: (i) Pmp6, Pmp20 und Pmp21 wiesen signifikante Unterschiede im zeitlichen Verlauf ihrer Prozessierung auf. Während bereits nach 24 hpi das M-Fragment für Pmp21 detektiert werden konnte, erfolgte eine erkennbare Prozessierung von Pmp20 nach 30 hpi und von Pmp6 sogar erst nach 42 hpi. Diese asynchrone proteolytische Spaltung der verschiedenen *C. pneumoniae* Pmps könnte auf verschiedene Funktionen der Pmp-Fragmente im zeitlichen Verlauf der chlamydialen Infektion hindeuten. (ii) Die analysierten Pmps von *C. pneumoniae* unterlagen einer massiven Prozessierung, sodass im Verlauf der Infektion die prozessierten Fragmente im Vergleich zu den Vollängenproteinen die dominanten Formen darstellten. Diese deutliche Akkumulation von Pmp-Fragmenten während der chlamydialen Infektion wurde bereits in früheren Studien für *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* und *C. abortus* beschrieben (Wehrl, Brinkmann et al. 2004; Swanson, Taylor et al. 2009; Moelleken, Schmidt et al. 2010; Wheelhouse, Sait et al. 2012) und könnte auf eine zentrale Rolle der prozessierten Pmp-Fragmente im Infektionsgeschehen deuten. (iii) Die prozessierten Pmp-Fragmente von Pmp20 und Pmp21 traten im Westernblot teilweise als Doppelbanden auf (Abb. 4.21; Abb. 4.24). Eine ähnliche Beobachtung wurde auch für PmpD von *C. trachomatis* gemacht, jedoch nicht weiter erörtert (Swanson, Taylor et al. 2009). Hierbei könnte es sich um unterschiedlich stark glykosylierte Pmp-Fragmente handeln, wie es bereits für Pmps von *C. abortus* postuliert wurde (Vretou, Giannikopoulou et al. 2001). Dabei wurde vermutet, dass die beobachtete N-Glykosylierung der Pmps eine mögliche Funktion in der korrekten Faltung und Prozessierung dieser Proteine ausübt. Um diese Hypothese zu überprüfen, könnte man die Proteinextrakte von *C. pneumoniae* infizierten Zellen

einer Deglykosylierung unterziehen und anschließend die Proben im Westernblot auf Unterschiede im Pmp-spezifischen Bandenmuster kontrollieren.

Eine weitere Erklärung für das Auftreten der Pmp-Doppelbanden wäre die Nutzung von benachbarten Schnittstellen, die eine Prozessierung der Pmps in einem bestimmten Proteinabschnitt garantieren. Tatsächlich konnten für PmpF und PmpG von *C. trachomatis* nahe beieinander liegende putative Schnittstellen, die einen Abstand von weniger als 30 Aminosäuren aufzeigten, identifiziert werden (Saka, Thompson et al. 2011). Mit dieser hypothetischen Strategie könnten Chlamydien eine korrekte Pmp-Prozessierung gewährleisten und somit die potentiell wichtige Funktion der Pmp-Fragmente sichern.

Daher stellt sich die Frage, ob die Pmps nicht nur in der frühen Phase der Infektion als Adhäsine/Invasine fungieren, sondern auch im weiteren Verlauf der Infektion möglicherweise in prozessierter Form eine wichtige Rolle ausüben. Tatsächlich konnten sowohl für Pmp6, Pmp20 und Pmp21 von *C. pneumoniae*, als auch für PmpD von *C. trachomatis* und Pmp18D von *C. abortus* lösliche Pmp-Fragmente identifiziert werden, die eine partielle Sekretion vermutlich in das Inklusionslumen aufwiesen (Kiselev, Stamm et al. 2007; Kiselev, Skinner et al. 2009; Swanson, Taylor et al. 2009; Wheelhouse, Sait et al. 2012). Ferner wäre auch eine Sekretion in das Zytosol der Wirtszelle durchaus denkbar, obwohl bis dato keine mikroskopische Detektion von Pmps außerhalb der chlamydialen Inklusion erfolgreich war. Interessanterweise führte eine frühere Studie unter Verwendung von Perfringolysin O, das selektiv die Plasmamembran von infizierten Zellen permeabilisiert, jedoch die Inklusionsmembran nicht angreift, unter anderem zur Identifizierung von *C. pneumoniae* Pmps im Zytosol der Wirtszelle (Kleba and Stephens 2008). Um welche *C. pneumoniae* Pmps es sich hierbei handelt und ob auch Pmps in der zytosolischen Fraktion von *C. trachomatis* infizierten Zellen detektiert werden konnten, wurde allerdings nicht beschrieben.

Falls eine Translokation von prozessierten Pmp-Fragmenten in das eukaryotische Zytosol erfolgen wäre, wäre eine Effektorfunktion dieser Proteine in der infizierten Zelle durchaus denkbar (Swanson, Taylor et al. 2009). Tatsächlich konnte durch direkte Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen eine Interaktion des M-Pmp21 Fragmentes mit den intrazellulären humanen Proteinen ADNP2, BCAT2, ELF2 und KIAA2026 nachgewiesen werden (Abb. 4.34). Diese Wechselwirkungen müssen allerdings noch *in vivo* bestätigt werden. Für das Homeobox-Protein ADNP2, das sowohl im Zytosol als auch in Mitochondrien zahlreicher Zelltypen lokalisiert ist, wurde eine Funktion in der zellulären Überlebensfähigkeit unter oxidativem Stress postuliert (Kushnir, Dresner et al. 2008). Das ubiquitär exprimierte BCAT2 Protein lokalisiert vorwiegend in Mitochondrien, aber auch im Zytosol und im Nukleus und spielt eine wichtige Rolle in der Biosynthese und dem Katabolismus der essentiellen Aminosäuren

Leucin, Isoleucin und Valin (Brosnan and Brosnan 2006). Der Transkriptionsfaktor ELF2 wurde hauptsächlich im Nukleus, aber auch im Zytsol identifiziert und ist als Mitglied der Ets-Proteinfamilie involviert in der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Oncogenese (Wasylyk, Hagman et al. 1998). Des Weiteren wurde eine potentielle Rolle in der Regulation der T-Zell-Proliferation für ELF2 beschrieben (Wilkinson, Neale et al. 1997). Über das bislang nicht charakterisierte humane Protein KIAA2026 ist nur die Anwesenheit einer Bromodomäne bekannt (Abb. 4.34 A). Bromodomänen interagieren spezifisch mit acetyliertem Lysin, das beispielsweise in Histonen vorkommt. Diese Erkennung resultiert häufig in einer Protein-Histon-Assoziation und Chromatin-Remodelierung (Muller, Filippakopoulos et al. 2011). Eine Wechselwirkung von M-Pmp21 mit diesen vier potentiellen Interaktionspartnern könnte folglich verschiedene Funktionen in der Stress-Antwort der infizierten Zelle, im Aminosäurestoffwechsel, in der Zellteilung und -differenzierung, in der Regulation des Immunsystems sowie in der Genexpression ausüben. Welche biologischen Funktionen durch diese Protein-Protein-Interaktion tatsächlich realisiert werden, muss in weiteren Analysen untersucht werden.

## **5.7 Die differenzielle Expression der *C. pneumoniae* Pmps und ihr potentieller Einfluss im Infektionsgeschehen**

In vorangegangenen Studien wurde eine starke serologische Reaktion gegen individuelle oder multiple Pmps für Seren von Patienten mit einer genitalen *C. trachomatis* Infektion dokumentiert (Tan, Hsia et al. 2009). Interessanterweise wurden Unterschiede in der Pmp-spezifischen Antikörper-Antwort der Patienten festgestellt, wobei die Antikörper-Profile in Korrelation mit dem Geschlecht der Patienten sowie dem klinischen Verlauf der Erkrankung gebracht wurden. Dieses Phänomen wurde als Konsequenz einer differenziellen Expression der chlamydialen Pmps erklärt (Tan, Hsia et al. 2009). In der Tat konnte in folgenden Immunofluoreszenzanalysen unter Zellkulturbedingungen gezeigt werden, dass nicht in alle Inklusionen in *C. trachomatis* Serovar E und *C. abortus* infizierten Zellen alle Pmps gleichermaßen vorkommen (Tan, Hsia et al. 2010; Carrasco, Tan et al. 2011; Wheelhouse, Sait et al. 2012). Somit könnten die Pmps von *C. trachomatis* und *C. abortus* potentiell eine Rolle bei der Umgehung der Immunantwort des Wirtes spielen. Da dieser Mechanismus möglicherweise eine generelle Strategie von Chlamydien zum Schutz vor der Erkennung durch das Immunsystem ist, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob auch *C. pneumoniae* Pmps dazu beisteuern. Tatsächlich zeigten *C. pneumoniae* infizierte Patienten verschiedene Pmp-spezifische Antikörper-Profile, wobei Pmp21 von allen drei getesteten Seren erkannt wurde (Abb. 4.20).

Des Weiteren zeigten Pmp6 und Pmp20 eine differentielle Expression (ca. 30 % positive Inklusionen) in infizierten Zellen, während Pmp21 in allen Inklusionen exprimiert wurde. Dieses Phänomen wurde unabhängig von der verwendeten Zelllinie und von der Infektionsdauer beobachtet (Abb. 4.22). Ferner erfolgt die Regulation der Expression von Pmp6, Pmp20 und Pmp21 vermutlich unabhängig voneinander, was für die Pmps von *C. trachomatis* erstmalig beschrieben wurde (Tan, Hsia et al. 2010). Neben der potentiellen Rolle der Pmps in der Umgehung des Immunsystems des Wirtes wurde über eine mögliche Beteiligung der Pmps in der Nischen-Adaption spekuliert. So konnten unterschiedliche Bindungsstärken für rekombinanten *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* Pmps an verschiedene Zelltypen bestimmt werden (Abb. 4.8). In Kombination mit einer variablen Expression der Pmps könnte dies eine Feinregulierung der Bindungsspezifität von infektiösen EBs repräsentieren.

Überraschenderweise zeigten die Pmps von *C. trachomatis*, *C. abortus* und *C. pneumoniae* starke quantitative Unterschiede in der On/Off-Frequenz der einzelnen Pmps (Abb. 5.4). Während für *C. trachomatis* Pmps, die jeweils in mindestens 90 % der Inklusionen exprimiert wurden, eine relativ geringe Off-Frequenz identifiziert werden konnten (Tan, Hsia et al. 2010), wurde eine deutlich stärkere Heterogenität und Off-Frequenz für die Pmp-Expression von *C. abortus* und *C. pneumoniae* bestimmt (Abb. 4.22) (Wheelhouse, Sait et al. 2012). So zeigten die Pmps des G/I-Subtyps von *C. abortus* eine Expression in 29 - 83 % der Inklusionen und Pmp18D eine konstante Expression in nahezu allen Inklusionen. Im Gegensatz dazu waren 31 bzw. 33 % der *C. pneumoniae* Inklusionen positiv für Pmp6 und Pmp20, wohingegen keine Pmp21-negativen Inklusionen identifiziert werden konnten. Diese signifikanten Unterschiede in der Pmp-Expression der drei *Chlamydia* Spezies könnten möglicherweise durch die unterschiedliche Anzahl der *pmp*-Gene in diesen Organismen erklärt werden. Während *C. trachomatis* mit nur 9 *pmp*-Genen eine moderate Off-Frequenz der Pmps aufweist, zeigen *C. abortus* und *C. pneumoniae* mit 18 bzw. 21 *pmp*-Genen eine deutlich höhere Variabilität. Somit könnte die Expansion der *pmp*-Gene im chlamydialen Genom einen größeren Spielraum für Änderungen in der Pmp-Expression ermöglichen, ohne dass die essentielle Funktion der Pmps in der chlamydialen Adhäsion eingeschränkt ist.

Interessanterweise waren die orthologen Proteine PmpD, Pmp18D und Pmp21 in nahezu allen Inklusionen detektierbar, was auf eine wichtige Rolle dieses Pmp-Subtyps in der chlamydialen Infektion hindeutet. Die kritische Funktion von PmpD von *C. trachomatis* Serovar E, aber auch von PmpA und PmpI wird dadurch bestätigt, dass diese Proteine in Anwesenheit des Antibiotikums Penicillin eine unveränderte Expression in der *C. trachomatis* Infektion aufweisen, während die Transkription der übrigen *pmp*-Gene herunterreguliert ist

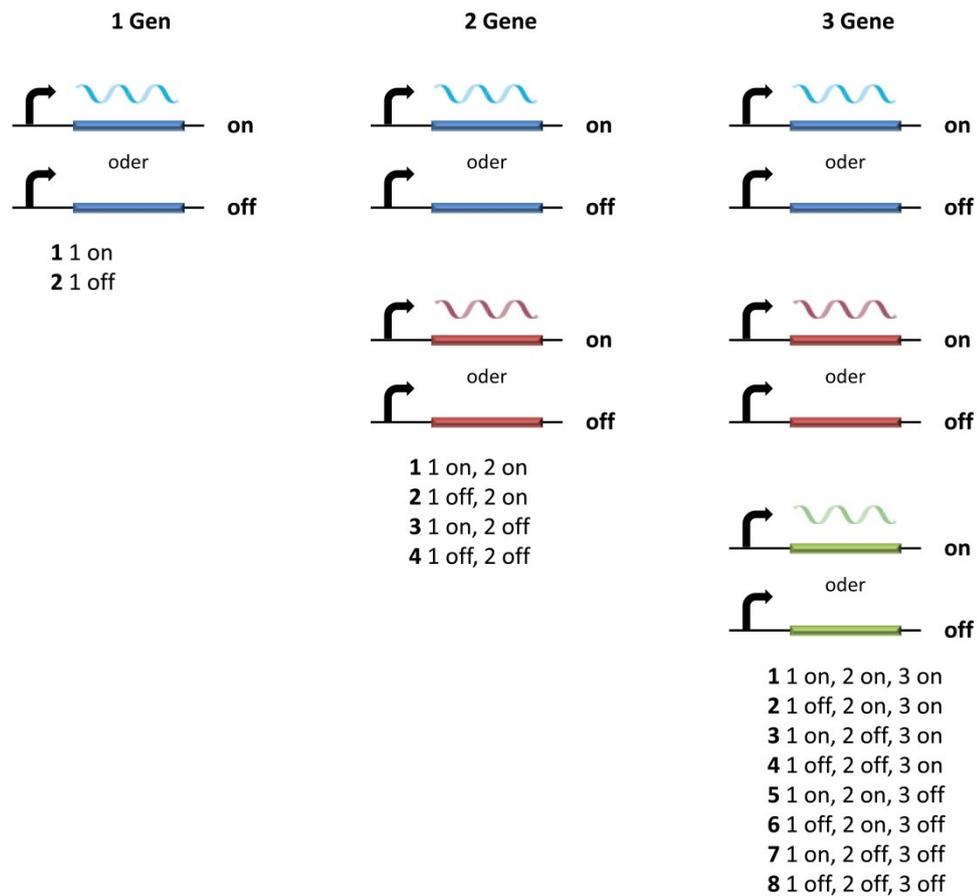
(Carrasco, Tan et al. 2011). In der Analyse der serologischen Reaktion von Patientenserum gegen rekombinante Pmps von *C. trachomatis* wurden PmpB, PmpC, PmpD und PmpI im Immunoblot am häufigsten erkannt (Tan, Hsia et al. 2009). Dies korreliert mit Studien von Nunes et al., die mittels Dot-Blot-Analysen eine signifikante Reaktivität von Serum aus *C. trachomatis*-positiven Patienten gegen rekombinantes PmpD identifizieren konnten (Nunes, Gomes et al. 2007). Ferner konnten ebenfalls die orthologen Proteine Pmp18D und Pmp21 als immunogene Proteine in *C. abortus*-infizierten Tieren bzw. in *C. pneumoniae*-infizierten Patienten bestätigt werden (Bunk, Susnea et al. 2008; Marques, Souda et al. 2010; Villegas, Sorlozano et al. 2010) (diese Arbeit). Die relativ hohe Prävalenz von spezifischen Antikörpern gegen PmpD, Pmp18D und Pmp21 könnte auf die niedrige Off-Frequenz dieser Proteine, auf eine erhöhte Expression während der chlamydialen Infektion oder eventuell auf eine optimale Epitop-Zugänglichkeit für Antikörper zurückzuführen sein.

Organismus	positive Inklusionen [%]					
	Pmp-Subtyp: A	B/C	D	E/F	G/I	H
<i>C. trachomatis</i> E	PmpA: 99-99,9	PmpB: 95-90 PmpC: 95-90	PmpD: 99-99,9	PmpE: 95-90 PmpF: 98-99	PmpG: 90-99 PmpI: 99-99,5	PmpH: 98-99
<i>C. abortus</i>	n.a.	n.a.	Pmp18D: 98	n.a.	Pmp10G: 83 Pmp13G: 29 Pmp16G: 56 Pmp17G: 45	n.a.
<i>C. pneumoniae</i>	n.a.	Pmp20: 33	Pmp21: 100	n.a.	Pmp6: 31	n.a.

**Abbildung 5.4: Übersicht über die differenzielle Expression der Pmps in drei *Chlamydia* Spezies.**

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Inklusionen, die nach PFA-Fixierung mittels Immunofluoreszenzmikroskopie als positiv für die angegebenen Pmps bestimmt wurden. Die dargestellten Werte repräsentieren die Expression der Pmps von *C. trachomatis* Serovar E 42 hpi in HeLa Zellen (Tan, Hsia et al. 2010), *C. abortus* 60 hpi in McCoy Zellen (Wheelhouse, Sait et al. 2012) und *C. pneumoniae* 60 hpi in HEP-2 Zellen (diese Arbeit). n.a.: nicht analysiert.

Die experimentell nachgewiesene differenzielle Expression der chlamydialen Pmps könnte als Strategie zur antigenen Variation, d.h. zur Umgehung des Immunsystems des Wirtes durch Variation von Antigenen, dienen. Diese Strategie wird von vielen invasiven Bakterien, Pilzen, Protozoen und Viren genutzt (Deitsch, Lukehart et al. 2009). Betroffen sind hierbei meist Oberflächenstrukturen der pathogenen Organismen, wie z.B. die Typ IV Pili und Opaque-Proteine von *Neisseria* Spezies, Flagellenproteine von *S. typhimurium*, Glykoproteine von *Trypanosoma brucei*, Als-Adhäsine von *C. albicans* und das Hüllenprotein ENV von HIV-1 (van der Woude and Baumler 2004; Hayes, Diez et al. 2008; Deitsch, Lukehart et al. 2009).



**Abbildung 5.5: Das Verhältnis von Gen-Anzahl und Phänotyp-Anzahl in der Phasen Variation.**

Dargestellt sind der Expressionsstatus (on bzw. off) verschiedener Gene und die Anzahl an möglichen Phänotypen (Kombinationen). Die Anzahl der Phänotypen kann mit der Formel  $2^N$  berechnet werden, mit  $N$ =Anzahl der unabhängig regulierten Gene. Folglich gilt: je höher die Anzahl der variablen Gene, desto höher die theoretische Diversität (modifiziert nach Deutsch et al. 2009).

Antigene Variation kann durch sogenannte „Phasen Variation“, DNA-Rekombination oder epigenetische Modifikation realisiert werden (Deutsch, Lukehart et al. 2009). Für die differenzielle Expression der chlamydialen Pmps wurde bereits zuvor der Mechanismus einer „Phasen Variation“ in Erwägung gezogen, der durch Regulation der RNA-Translation zu einem An- bzw. Ausschalten individueller Gene führen könnte (Tan, Hsia et al. 2010). Eine freie Kombination der Pmps könnte auf diese Weise in einer erheblichen Anzahl an diversen Phänotypen resultieren (Abb. 5.5). Bislang ist jedoch der molekulare Mechanismus der „Phasen Variation“ der Pmps vollkommen unklar. Eine mögliche Methode zur weiteren Aufklärung der differenziellen Expression der Pmps wäre die immunologische Aufreinigung von EBs über ein bestimmtes Pmp auf ihrer Oberfläche und die anschließende Infektion von Humanzellen mit diesen EBs. Eine Wiederholung dieser Prozedur für mehrere Infektionsrunden und die fortwährende Immunofluoreszenz-Analyse der Pmp-Expression

könnte Rückschlüsse darauf geben, ob das Pmp-Profil einer bestimmten EB-Population über mehrere Generationen konstant bleibt oder sich verändert.

## 5.8 Inter- und intramolekulare Wechselwirkungen zwischen

### Pmps als Basis von oligomeren Adhäsionsstrukturen

In vorangegangenen Studien konnte erstmalig ein Hinweis auf Homo-Oligomere für natives, aus EBs isoliertes PmpD von *C. trachomatis* nachgewiesen werden (Swanson, Taylor et al. 2009). Hierbei bestanden die oligomeren Strukturen aus dem PmpD-Volllängenprotein sowie zwei prozessierten PmpD-Fragmenten. Da auch die Pmps von *C. pneumoniae* einer komplexen Prozessierung unterliegen, wäre auch hier eine Oligomerisierung durchaus denkbar. Die Tatsache, dass Fragmente von Pmp6, Pmp20 und Pmp21 ohne  $\beta$ -Barrel weiterhin bakterienassoziiert vorlagen, deutet auf eine Interaktion mit membranverankerten Pmps oder anderen chlamydialen Proteinen hin (Abb. 4.23). Dieses Phänomen der EB-Assoziation von Pmp-Fragmenten wurde bereits in vorherigen Studien für Pmps von *C. trachomatis* und Pmp21 von *C. pneumoniae* dokumentiert (Wehrl, Brinkmann et al. 2004; Kiselev, Skinner et al. 2009; Swanson, Taylor et al. 2009; Liu, Afrane et al. 2010; Moelleken, Schmidt et al. 2010). Interessanterweise konnte *via* Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen eine Interaktion des M-Fragmentes von Pmp21 mit sich selbst sowie eine schwächere Interaktion zwischen M-Pmp21 und N-Pmp21 nachgewiesen werden (Abb. 4.25). Diese intramolekularen Wechselwirkungen von Pmp21 sowie die Interaktion von Pmp21 mit Pmp6 und Pmp20 konnten mittels Far-Westernblots und Co-Immunopräzipitation-Analysen mit rekombinanten Proteinen verifiziert werden (Abb. 4.26; 4.27). Final belegte eine erfolgreiche Immunopräzipitation von Pmp21 mit Pmp6 und Pmp20 eine Interaktion von Fragmenten verschiedener Pmps *in vivo* (Abb. 4.28). Folglich könnte in der Tat die Bakterienassoziation von *C. pneumoniae* Pmp-Fragmenten auf einer Wechselwirkung zwischen prozessierten Formen und membranverankerten Volllängenproteinen basieren, wie es bereits für PmpD von *C. trachomatis* postuliert wurde (Swanson, Taylor et al. 2009). Dabei könnte nicht nur eine Homooligomerisierung, sondern auch eine Heterooligomerisierung zwischen verschiedenen Pmps erfolgen.

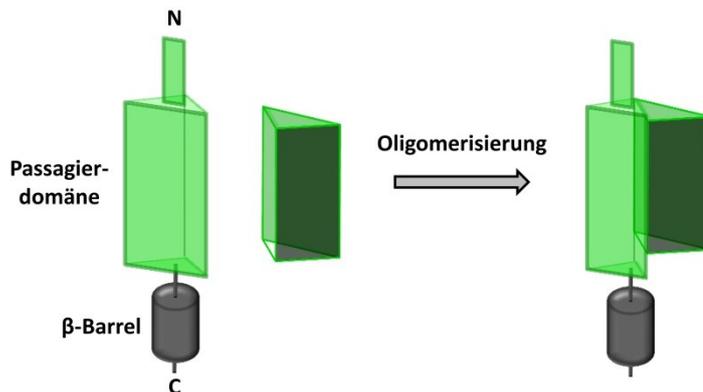
Daher stellte sich die Frage, welche Art von Wechselwirkungen die Bindung von Pmp-Fragmenten an die EB-Oberfläche ermöglicht. Während einige Pmp-Fragmente nahezu unlöslich in Triton, Sarkosyl oder NP-40 + DTT waren und folglich eine starke EB-Assoziation zeigten, konnten andere Pmp-Fragmente signifikant mit Detergenzien und teilweise sogar mit PBS von der chlamydialen Oberfläche abgelöst werden. (Abb. 4.24). Diese Resultate deuten zum einen auf eine Beteiligung von schwachen nichtionischen und stärkeren

ionischen Wechselwirkungen sowie auf eine potentielle Quervernetzung durch Disulfidbrücken hin.

Ein mögliches Indiz für die Ausbildung von intramolekularen Disulfidbindungen könnte das erhöhte elektrophoretische Laufverhalten von rekombinanten Pmps sein (Abb. 4.4; Abb. 4.6) (Schmidt 2009; Swanson, Taylor et al. 2009). Da zahlreiche Pmps als Bestandteile des hochgradig Cystein-vernetzten cOMC identifiziert wurden (Tanzer, Longbottom et al. 2001; Wehrl, Brinkmann et al. 2004; Birkelund, Morgan-Fisher et al. 2009; Liu, Afrane et al. 2010), ist eine Assoziation der Pmp-Fragmente über Disulfidbrücken mit der chlamydialen Oberfläche durchaus denkbar. Der Cystein-Gehalt der Pmps von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* reicht von 0,6 % (Pmp2) bis 2,1 % (PmpI) (Anhang Abb. 6.3). Somit sind die Pmps Cystein-reich im Vergleich zu Autotransportern anderer Bakterien (Yen, Peabody et al. 2002).

Während eine signifikante Selbstinteraktion von M-Pmp21 mittels Hefe-Zwei-Hybrid- und Far-Western-Analysen nachgewiesen wurde, konnte nur eine schwache Interaktion zwischen M-Pmp21 und N-Pmp21 identifiziert werden (Abb. 4.25; Abb. 4.26). In früheren Solubilisierungsexperimenten konnte eine deutliche Ablösung von N-Pmp21 durch Sarkosyl bzw. SDS von der EB-Oberfläche erzielt werden, sodass nur noch eine geringe Menge von N-Pmp21 (ca. 5 %) in der unlöslichen Pelletfraktion zu identifizieren war (Wehrl, Brinkmann et al. 2004). Dies weist auf eine schwache Interaktion des N-terminalen Fragmentes von Pmp21 mit der chlamydialen Oberfläche hin. Ein möglicher Grund hierfür könnte der strukturelle Unterschied zwischen N-Pmp21 und M-Pmp21 sein, der mittels Strukturvorhersagen für diese Fragmente bestimmt wurde (Abb. 4.29 A). Während für N-Pmp21 eine eher globuläre Konformation vorhergesagt wurde, zeigte M-Pmp21 ausschließlich eine rechtsgewundene  $\beta$ -Helix. Dies würde die Hypothese unterstützen, dass die rechtsgängige  $\beta$ -helikale Struktur als potentielle Interaktionsplattform für die beobachteten Wechselwirkungen zwischen Pmps fungiert (Abb. 5.6). In der Tat wurde postuliert, dass die gleichmäßige Struktur von parallelverlaufenden  $\beta$ -Helices eine Aggregation von Monomeren zu oligomeren Strukturen favorisieren kann, wie es bereits bei Prionen und Amyloid-Proteinen beobachtet wurde (Bryan, Starner-Kreinbrink et al. 2011). Ohne einen Mechanismus, der die Ausbildung von intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen blockiert, würden  $\beta$ -helikale Peptide spontan zu multimeren Fibern assoziieren. Interessanterweise wurde für die meisten rechts- bzw. linksgängigen  $\beta$ -helikalen Proteine eine sogenannte „ $\beta$ -Helix Cap“ an beiden Proteinenden identifiziert, die eine Aggregation von  $\beta$ -Helices verhindern soll (Richardson and Richardson 2002). So resultierte beispielsweise eine Deletion dieser amphipatischen Schleifenstruktur im N-Terminus von Pertactin, das eigentlich eine geringe Neigung zur Aggregation aufweist

(Junker, Besingi et al. 2009), zu einer deutlichen Aggregation des mutierten Pertactins bereits während der Protein-Aufreinigung (Bryan, Starner-Kreinbrink et al. 2011). Möglicherweise könnte eine Prozessierung der Pmps auf der chlamydialen Oberfläche einen ähnlichen Effekt auslösen. So könnte beispielsweise die Freisetzung von M-Pmp21 durch proteolytische Abspaltung des globulären N-Pmp21 und des C-terminalen  $\beta$ -Barrels zu einer Oligomerisierung von M-Pmp21-Molekülen bzw. potentiell auch zu einer Interaktion mit anderen Pmp-Fragmenten führen.



**Abbildung 5.6: Potentielle Oligomerisierung von chlamydialen Pmps.**

Das dargestellte Oligomerisierungs-Modell beruht auf den Interaktionsstudien für PmpD von *C. trachomatis* (Swanson, Taylor et al. 2009) und Pmp21 von *C. pneumoniae* (diese Arbeit). Das Modell zeigt die potentielle Interaktion zwischen den  $\beta$ -helikalen Domänen eines Volllängen-Pmps (hell grün) und eines prozessierten Pmp-Fragmentes (dunkel grün).

Für über 97 % aller Autotransporter konnte eine  $\beta$ -helikale Struktur der Passagierdomäne analog zur Struktur von Pertactin von *B. pertussis* vorhergesagt werden (Bradley, Cowen et al. 2001; Cowen, Bradley et al. 2002; Junker, Schuster et al. 2006). Interessanterweise lieferte die Aufklärung der Kristallstrukturen von *Helicobacter pylori* VacA (Vacuolating toxin) und *Haemophilus influenzae* Hap (Haemophilus adhesion protein) erste Indizien für eine Oligomerisierung dieser Autotransporter (Nishimura, Tajima et al. 2010). Das multifunktionelle Toxin VacA wird als 140 kDa Protoxin produziert und während der Sekretion in das aktive Toxin (90 kDa) prozessiert. Diese Form aggregiert im Folgenden spontan zu einem dodekameren Komplex, wobei die Interaktion vermutlich über eine Oligomerisierungsregion erfolgt. Eine Insertion des VacA-Komplexes in die Plasmamembran von Epithel- oder Immunzellen kann zu einer Depolarisierung des Membranpotentials, Apoptose oder Inhibierung der Antigen-Präsentation führen (Gangwer, Mushrush et al. 2007; Sewald, Fischer et al. 2008). Im Gegensatz dazu verfügt das Hap Adhäsion vermutlich über zwei Interaktionsregionen, die zu einer Selbstassoziation von löslichen Hap-Monomeren in trans-Konfiguration führen. Die daraus resultierende interzelluläre Oligomerisierung fördert die Biofilmformation und anschließende Invasion in Epithelzellen (Meng, Spahich et al. 2011).

Es stellt sich die Frage, welche biologische Funktion eine Oligomerisierung der chlamydialen Pmps im Infektionsgeschehen ausüben könnte. Möglicherweise fungieren die resultierenden Pmp-Oligomere als komplexe Adhäsionsstrukturen mit vielen Rezeptor-Bindestellen. Dadurch könnte sowohl die Bindungsaffinität erhöht als auch die Rekrutierung vieler Rezeptor-Moleküle ermöglicht werden, was letztlich eine stabile Adhäsion fördern würde (Girard and Mourez 2006; Marsh and Helenius 2006). Eine Rezeptor-Clusterung könnte ferner regulatorische Effekte auf die EGFR-vermittelten Signalwege haben (Abulrob, Lu et al. 2010).

## **5.9 Identifikation einer neuen zellulären Lokalisation des N-terminalen Fragmentes von Pmp21**

Während das M-Fragment von Pmp21 mit einem spezifischen Antikörper ausschließlich auf der chlamydialen Oberfläche lokalisiert wurde, zeigte das N-terminale Fragment von Pmp21 sowohl eine Assoziation mit der bakteriellen Oberfläche als auch eine Lokalisation auf sogenannten „Fibern“. Diese Fäden ragten von Inklusionen aus in das Zytosol der Humanzellen und lagen häufig am Zellkern an bzw. verbanden zwei Inklusionen oder eine normale Inklusion und eine „leere“ Inklusion. Auf den Fibern konnten Komponenten der chlamydialen Außenmembran und der Inklusionsmembran detektiert werden (Abb. 4.32). Erste Hinweise für diese außergewöhnliche Lokalisation von N-Pmp21 fanden sich bereits in einer früheren Studie mittels Elektronenmikroskopie (Wehrl, Brinkmann et al. 2004). Da die beobachteten Fibern eine Vesikel-ähnliche Struktur aufwiesen und unter anderem chlamydiale Außenmembrankomponenten wie z.B. LPS und MOMP trugen, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um vesikuläre Strukturen aus der chlamydialen Außenmembran handeln könnte (Brown, Skeiky et al. 2002). Die Tatsache, dass auch Inklusionsmembranproteine in diesen fadenartigen Strukturen identifiziert wurden, weist auf eine zwischenzeitliche Verschmelzung der chlamydialen Außenmembran-Vesikel mit der Inklusionsmembran und anschließende Freisetzung in das Zytosol der Humanzelle hin (Rockey, Scidmore et al. 2002). Obwohl Hinweise auf diese chlamydialen Vesikel bereits in verschiedenen Studien berichtet wurden, bleibt ihre physiologische Rolle bislang unklar (Brown, Skeiky et al. 2002; Rockey, Scidmore et al. 2002; Giles, Whittimore et al. 2006).

Eine mögliche Funktion der chlamydialen Fibern könnte die Weitergabe von Chlamydien auf die Tochterzelle der infizierten Wirtszelle sein, da Fibern gelegentlich zwischen Inklusionen benachbarter Humanzellen beobachtet wurden (diese Arbeit) (Brown, Skeiky et al. 2002). Es besteht das hypothetische Modell, dass die fadenartigen Strukturen an der Ausbildung von

sekundären Inklusionen beteiligt sind, die zunächst als leere Inklusionen vorliegen. Möglicherweise werden einzelne Chlamydien über einen bis dato unbekanntem Transportmechanismus von der Ursprungsinklusion über eine Fiber in die sekundäre Inklusion transferiert. Nach mehrfachen Replikationsrunden ist schließlich auch der Sekundäreinschluss mit Chlamydien gefüllt und unterscheidet sich kaum noch von der primären Inklusion. Diese potentielle Verbreitungsstrategie wurde dadurch belegt, dass sowohl in *C. pneumoniae*- als auch in *C. trachomatis*-infizierten Humanzellen vereinzelt EBs auf den Fäden detektiert wurden (Suchland, Rockey et al. 2005; Herbst 2011). Eine weitere potentielle Rolle der chlamydialen Fäden wäre eine Interaktion von Fiberkomponenten mit dem Zellkern der Wirtszelle. Hierfür liegen bislang keine Beweise vor, jedoch macht die räumliche Nähe zwischen Fibern und Nukleus eine Wechselwirkung durchaus denkbar. Interessanterweise wurde bioinformatisch eine putative NLS (nuclear localization signal) Sequenz nicht nur für *C. trachomatis* PmpD (Swanson, Taylor et al. 2009), sondern auch innerhalb des N-Pmp21 Fragmentes vorhergesagt (Anhang Abb. 6.4) (Kosugi, Hasebe et al. 2009). So könnte dieses Motiv eine Translokation von N-Pmp21 in den eukaryotischen Kern ermöglichen.

## 6 Anhang

### A

Pmp-Subtyp:		G/I							H	E/F			A	B/C	D	
Pmp1	Pmp2	Pmp6	Pmp7	Pmp8	Pmp9	Pmp11	Pmp13	Pmp14	Pmp15	Pmp16	Pmp18	Pmp19	Pmp20	Pmp21		
100%	30%	31%	34%	35%	34%	33%	29%	19%	21%	20%	20%	18%	21%	23%	Pmp1	
	100%	33%	36%	39%	38%	39%	32%	20%	18%	17%	17%	18%	24%	22%	Pmp2	
		100%	35%	36%	37%	33%	35%	22%	21%	22%	23%	23%	21%	21%	Pmp6	
			100%	40%	41%	39%	31%	21%	18%	21%	21%	21%	21%	23%	Pmp7	
				100%	44%	40%	32%	22%	22%	20%	23%	23%	24%	23%	Pmp8	
					100%	42%	33%	19%	22%	22%	21%	22%	21%	22%	Pmp9	
						100%	32%	22%	20%	20%	17%	23%	22%	21%	Pmp11	
							100%	22%	22%	19%	20%	22%	20%	21%	Pmp13	
								100%	21%	22%	20%	21%	19%	18%	Pmp14	
									100%	38%	34%	19%	21%	18%	Pmp15	
										100%	49%	18%	19%	21%	Pmp16	
											100%	17%	19%	22%	Pmp18	
												100%	21%	17%	Pmp19	
													100%	17%	Pmp20	
														100%	Pmp21	

Mittelwert
26%

### B

A	B/C			D	E/F			G/I	H	
PmpA	PmpB	PmpC	PmpD	PmpE	PmpF	PmpG	PmpI	PmpH		
100%	19%	16%	19%	16%	14%	17%	17%	19%	PmpA	
	100%	43%	16%	15%	17%	19%	18%	18%	PmpB	
		100%	15%	13%	15%	19%	16%	17%	PmpC	
			100%	18%	15%	22%	19%	19%	PmpD	
				100%	23%	21%	16%	16%	PmpE	
					100%	17%	17%	16%	PmpF	
						100%	25%	18%	PmpG	
							100%	19%	PmpI	
								100%	PmpH	

Mittelwert
18%

### C

Pmp-Subtyp:		G/I							H	E/F			A	B/C	D	
Pmp1	Pmp2	Pmp6	Pmp7	Pmp8	Pmp9	Pmp11	Pmp13	Pmp14	Pmp15	Pmp16	Pmp18	Pmp19	Pmp20	Pmp21		
18%	18%	22%	19%	21%	21%	20%	18%	20%	19%	18%	18%	32%	20%	17%	PmpA	
	21%	22%	22%	22%	22%	21%	20%	20%	20%	18%	17%	18%	39%	17%	PmpB	
		19%	20%	19%	20%	23%	20%	19%	16%	17%	17%	14%	30%	16%	PmpC	
			20%	18%	17%	20%	22%	19%	20%	21%	18%	17%	18%	33%	PmpD	
				19%	18%	21%	19%	19%	18%	17%	18%	16%	28%	27%	PmpE	
					14%	15%	21%	16%	20%	19%	18%	16%	28%	26%	PmpF	
						28%	30%	28%	28%	28%	29%	32%	21%	21%	PmpG	
							23%	24%	28%	25%	27%	27%	26%	26%	PmpI	
								21%	19%	23%	19%	17%	18%	18%	PmpH	

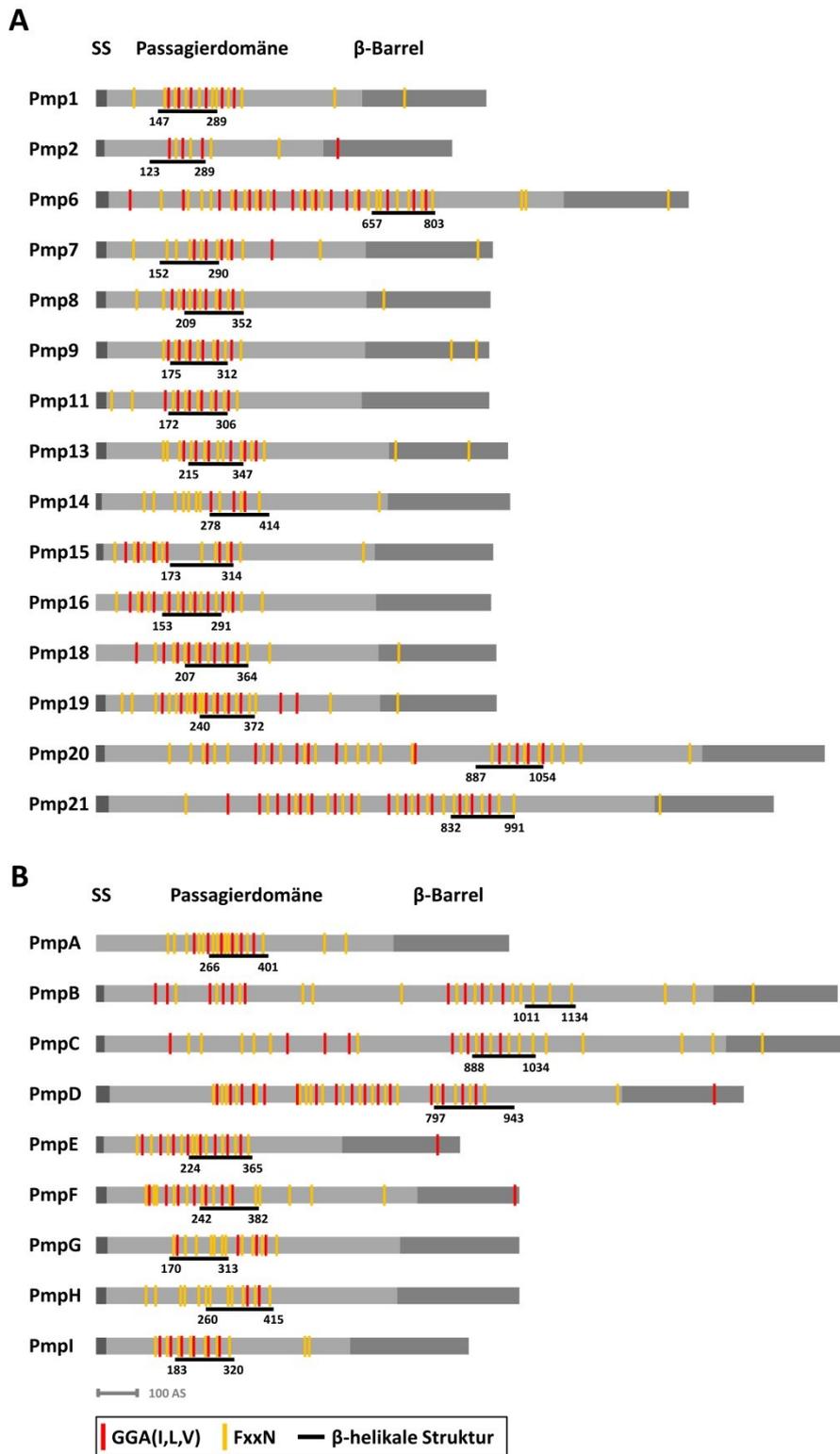
Mittelwert
21%

Farbskalierung	
rot	≥25%
gelb	>15%
grün	≤15%

Abbildung 6.1: Aminosäureidentitäten der Vollängen-Pmps von *C. pneumoniae* CWL029 und *C. trachomatis* Serovar E/150.

Die multiplen Sequenzalignments wurden mit ClustalW2 durchgeführt. Identitäten oberhalb des Grenzwertes von 25 % gelten als Hinweis für eine strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit von Proteinen (Grimwood and Stephens 1999). Farbskalierung: Werte, die größer oder gleich 25 % sind, wurden rot hinterlegt; diejenigen, die kleiner oder gleich 15 % sind, wurden grün hinterlegt. Alle Werte zwischen diesen beiden Grenzen sind gelb markiert (modifiziert nach Domröse 2012). Die Mittelwerte wurden jeweils aus allen farblich markierten Identitätswerten einer Tabelle berechnet.



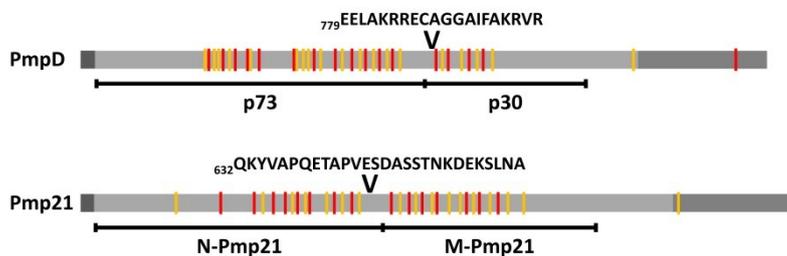
**Abbildung 6.2:** Alle Pmps von *C. pneumoniae* (A) und *C. trachomatis* (B) weisen eine  $\beta$ -helikale Kernstruktur in der Passagierdomäne auf.

Eine Untersuchung der *C. pneumoniae* (A) und *C. trachomatis* (B) Vollängen-Pmps mittels BetaWrapPro führte zur Erkennung einer  $\beta$ -helikalen Kernstruktur (schwarze Linie mit den entsprechenden N- und C-terminalen Aminosäuren). Die charakteristische Drei-Domänen-Struktur der Pmps mit der N-terminalen Signalsequenz (SS), der Passagierdomäne und der C-terminalen  $\beta$ -Barrel-Domäne ist durch graue Rechtecke angezeigt. Die Tetrapeptid Motive GGA(I, L, V) und FxxN sind durch rote und gelbe Linien markiert.

A		B		C	
<i>Cpn</i> Pmp	Cysteine	<i>Ctr</i> Pmp	Cysteine	Protein	Cysteine
Pmp1	14 (1,5 %)	PmpA	9 (0,9 %)	MOMP	9 (2,3 %)
Pmp2	5 (0,6 %)	PmpB	20 (1,1 %)	OmcA	15 (16,7 %)
Pmp6	20 (1,4 %)	PmpC	15 (0,8 %)	OmcB	34 (6,1 %)
Pmp7	10 (1,1 %)	PmpD	26 (1,7 %)	GroEL	5 (0,9 %)
Pmp8	9 (1,0 %)	PmpE	15 (1,6 %)	EF-Tu	3 (0,8 %)
Pmp9	10 (1,1 %)	PmpF	13 (1,3 %)	DnaK	2 (0,3 %)
Pmp11	8 (0,9 %)	PmpG	15 (1,5 %)	S1	3 (0,5 %)
Pmp13	13 (1,3 %)	PmpH	14 (1,4 %)		
Pmp14	15 (1,5 %)	PmpI	18 (2,1 %)		
Pmp15	9 (1,0 %)				
Pmp16	12 (1,3 %)				
Pmp18	13 (1,4 %)				
Pmp19	10 (1,1 %)				
Pmp20	15 (0,9 %)				
Pmp21	19 (1,2 %)				

**Abbildung 6.3: Der Cystein-Gehalt der Pmps und anderer chlamydialer Proteine.**

Dargestellt ist die Anzahl der Cysteine sowie der prozentuale Cystein-Anteil in den Vollängen-Pmps von *C. pneumoniae* (A) und *C. trachomatis* (B) und in extra- und intrachlamydialen Proteinen (C).



**Abbildung 6.4: Bioinformatische Vorhersage von NLS-Motiven in PmpD und Pmp21.**

Mit Hilfe des Programms „cNLS Mapper“ (Kosugi, Hasebe et al. 2009) wurden NLS-Sequenzen für PmpD innerhalb des p30-Fragmentes und für Pmp21 innerhalb des N-terminalen Fragmentes vorhergesagt, die dem klassischen Importin- $\alpha/\beta$ -Transportweg unterliegen. Dabei wurde für beide putativen Motive ein Score von 4 erzielt. Es gilt generell: Je höher der Score, desto stärker die NLS-Aktivität. Proteine mit einem Score von 8-10 sind ausschließlich im Nukleus lokalisiert, während ein Score von 6-8 auf eine partielle Lokalisation im Nukleus und ein Score von 3-5 auf eine Lokalisation im Nukleus und im Zytosol hinweist. Cytoplasmatische Proteine weisen einen Score von 1-2 auf.

## Literaturverzeichnis

- Abdelrahman, Y. M. and R. J. Belland (2005). "The chlamydial developmental cycle." FEMS Microbiol Rev **29**(5): 949-59.
- Abdul-Sater, A. A., E. Koo, et al. (2009). "Inflammasome-dependent caspase-1 activation in cervical epithelial cells stimulates growth of the intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis*." J Biol Chem **284**(39): 26789-96.
- 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.
- Abulrob, A., Z. Lu, et al. (2010). "Nanoscale imaging of epidermal growth factor receptor clustering: effects of inhibitors." J Biol Chem **285**(5): 3145-56.
- Airenne, S., H. M. Surcel, et al. (1999). "*Chlamydia pneumoniae* infection in human monocytes." Infect Immun **67**(3): 1445-9.
- Aitken, I. D. and D. Longbottom (2007). "Chlamydial abortion." Diseases of Sheep **4**(16): 105-112.
- 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., 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.
- Andraws, R., J. S. Berger, et al. (2005). "Effects of antibiotic therapy on outcomes of patients with coronary artery disease: a meta-analysis of randomized controlled trials." Jama **293**(21): 2641-7.
- Balin, B. J. and D. M. Appelt (2001). "Role of infection in Alzheimer's disease." J Am Osteopath Assoc **101**(12 Suppl Pt 1): S1-6.
- Barel, M., A. G. Hovanessian, et al. (2008). "A novel receptor - ligand pathway for entry of *Francisella tularensis* in monocyte-like THP-1 cells: interaction between surface nucleolin and bacterial elongation factor Tu." BMC Microbiol **8**: 145.
- Batteiger, B. E., W. Tu, et al. (2010). "Repeated *Chlamydia trachomatis* genital infections in adolescent women." J Infect Dis **201**(1): 42-51.
- Batteiger, B. E., F. Xu, et al. (2010). "Protective immunity to *Chlamydia trachomatis* genital infection: evidence from human studies." J Infect Dis **201** Suppl 2: S178-89.
- Beatty, W. L. (2006). "Trafficking from CD63-positive late endocytic multivesicular bodies is essential for intracellular development of *Chlamydia trachomatis*." J Cell Sci **119**(Pt 2): 350-9.
- Beatty, W. L. (2008). "Late endocytic multivesicular bodies intersect the chlamydial inclusion in the absence of CD63." Infect Immun **76**(7): 2872-81.
- Beckett, E. L., S. Phipps, et al. (2012). "TLR2, but not TLR4, is required for effective host defence against *Chlamydia* respiratory tract infection in early life." PLoS One **7**(6): e39460.
- 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.
- Bertelli, C., F. Collyn, et al. (2010). "The *Waddlia* genome: a window into chlamydial biology." PLoS One **5**(5): e10890.
- Beswick, E. J., A. Travelstead, et al. (2003). "Comparative studies of glycosaminoglycan involvement in *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis* invasion of host cells." J Infect Dis **187**(8): 1291-300.
- Bierne, H. 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.

- Birkelund, S., M. Morgan-Fisher, et al. (2009). "Analysis of proteins in Chlamydia trachomatis L2 outer membrane complex, COMC." *FEMS Immunol Med Microbiol* **55**(2): 187-95.
- Birkelund, S., P. Mygind, et al. (1996). "Characterization of two conformational epitopes of the Chlamydia trachomatis serovar L2 DnaK immunogen." *Infect Immun* **64**(3): 810-7.
- Bishop, N. E. (2003). "Dynamics of endosomal sorting." *Int Rev Cytol* **232**: 1-57.
- Blanc, G., M. Ngwamidiba, et al. (2005). "Molecular evolution of rickettsia surface antigens: evidence of positive selection." *Mol Biol Evol* **22**(10): 2073-83.
- Boder, E. T. and K. D. Wittrup (1997). "Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries." *Nat Biotechnol* **15**(6): 553-7.
- Boleti, H., A. Benmerah, et al. (1999). "Chlamydia infection of epithelial cells expressing dynamin and Eps15 mutants: clathrin-independent entry into cells and dynamin-dependent productive growth." *J Cell Sci* **112**(Pt 10): 1487-96.
- Borges, V., A. Nunes, et al. (2012). "Directional evolution of Chlamydia trachomatis towards niche-specific adaptation." *J Bacteriol* **194**(22): 6143-53.
- Bose, S. K. and R. G. Paul (1982). "Purification of Chlamydia trachomatis lymphogranuloma venereum elementary bodies and their interaction with HeLa cells." *J Gen Microbiol* **128**(6): 1371-9.
- Bradley, P., L. Cowen, et al. (2001). "BETAWRAP: successful prediction of parallel beta-helices from primary sequence reveals an association with many microbial pathogens." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(26): 14819-24.
- Brosnan, J. T. and M. E. Brosnan (2006). "Branched-Chain Amino Acids: Enzyme and Substrate Regulation." *J Nutr* **136**: 207S-11S.
- Brown, D. A. and E. London (1998). "Functions of lipid rafts in biological membranes." *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**: 111-36.
- Brown, W. J., Y. A. Skeiky, et al. (2002). "Chlamydial antigens colocalize within IncA-laden fibers extending from the inclusion membrane into the host cytosol." *Infect Immun* **70**(10): 5860-4.
- Brumell, J. H. and M. A. Scidmore (2007). "Manipulation of rab GTPase function by intracellular bacterial pathogens." *Microbiol Mol Biol Rev* **71**(4): 636-52.
- Brunham, R. C. and J. Rey-Ladino (2005). "Immunology of Chlamydia infection: implications for a Chlamydia trachomatis vaccine." *Nat Rev Immunol* **5**(2): 149-61.
- Bryan, A. W., Jr., J. L. Starner-Kreinbrink, et al. (2011). "Structure-based prediction reveals capping motifs that inhibit beta-helix aggregation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(27): 11099-104.
- Buchholz, K. R. and R. S. Stephens (2006). "Activation of the host cell proinflammatory interleukin-8 response by Chlamydia trachomatis." *Cell Microbiol* **8**(11): 1768-79.
- Bulut, Y., E. Faure, et al. (2002). "Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway." *J Immunol* **168**(3): 1435-40.
- Bunk, S., I. Susnea, et al. (2008). "Immunoproteomic identification and serological responses to novel Chlamydia pneumoniae antigens that are associated with persistent C. pneumoniae infections." *J Immunol* **180**(8): 5490-8.
- Burton, M. J. and D. C. Mabey (2009). "The global burden of trachoma: a review." *PLoS Negl Trop Dis* **3**(10): e460.
- Byrne, G. I. (1976). "Requirements for ingestion of Chlamydia psittaci by mouse fibroblasts (L cells)." *Infect Immun* **14**(3): 645-51.
- Byrne, G. I. and J. W. Moulder (1978). "Parasite-specified phagocytosis of Chlamydia psittaci and Chlamydia trachomatis by L and HeLa cells." *Infect Immun* **19**(2): 598-606.
- Byrne, G. I. and D. M. Ojcius (2004). "Chlamydia and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen." *Nat Rev Microbiol* **2**(10): 802-8.

- Caldwell, H. D., J. Kromhout, et al. (1981). "Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*." *Infect Immun* **31**(3): 1161-76.
- Caldwell, H. D. and L. J. Perry (1982). "Neutralization of *Chlamydia trachomatis* infectivity with antibodies to the major outer membrane protein." *Infect Immun* **38**(2): 745-54.
- Campbell, L. A. and C. C. Kuo (2006). Interactions of *Chlamydia* with the Host Cells that Mediate Attachment and Uptake. *Chlamydia Genomics and Pathogenesis*. P. M. Bavoil and P. B. Wyrick. Norfolk, UK, Horizon Bioscience: 505-522.
- Capmany, A. and M. T. Damiani (2010). "Chlamydia trachomatis intercepts Golgi-derived sphingolipids through a Rab14-mediated transport required for bacterial development and replication." *PLoS One* **5**(11): e14084.
- 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.
- Carlson, J. H., S. F. Porcella, et al. (2005). "Comparative genomic analysis of *Chlamydia trachomatis* oculotropic and genitotropic strains." *Infect Immun* **73**(10): 6407-18.
- Carrasco, J. A., C. Tan, et al. (2011). "Altered developmental expression of polymorphic membrane proteins in penicillin-stressed *Chlamydia trachomatis*." *Cell Microbiol* **13**(7): 1014-25.
- CDC (2012). "Summary of Notifiable Diseases — United States, 2010." *Morbidity and Mortality Weekly Report* **59**(53).
- Cecil, J. A., M. R. Howell, et al. (2001). "Features of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infection in male Army recruits." *J Infect Dis* **184**(9): 1216-9.
- Ceresa, B. P. (2011). Endocytic Trafficking of the Epidermal Growth Factor Receptor in Transformed Cells. *Breast Cancer – Carcinogenesis, Cell Growth and Signalling Pathways*: 48-72.
- Chan, G., M. T. Nogalski, et al. (2009). "Activation of EGFR on monocytes is required for human cytomegalovirus entry and mediates cellular motility." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(52): 22369-74.
- Chang-Ileto, B., S. G. Frere, et al. (2012). "Acute manipulation of phosphoinositide levels in cells." *Methods Cell Biol* **108**: 187-207.
- Chen, J. C., J. P. Zhang, et al. (1996). "Structural requirements of heparin binding to *Chlamydia trachomatis*." *J Biol Chem* **271**(19): 11134-40.
- Chen, J. C. R. and R. S. Stephens (1997). "Chlamydia Trachomatis Glycosaminoglycan Dependent and Independent Attachment to Eukaryotic Cells." *Microbial Pathogenesis* **22** (1): 23-30.
- Cheng, J. C., H. M. Chang, et al. (2013). "Egr-1 mediates epidermal growth factor-induced downregulation of E-cadherin expression via Slug in human ovarian cancer cells." *Oncogene* **32**(8): 1041-9.
- Cheng, Y., W. Boll, et al. (2007). "Cryo-electron tomography of clathrin-coated vesicles: structural implications for coat assembly." *J Mol Biol* **365**(3): 892-9.
- Christian, J., J. Vier, et al. (2010). "Cleavage of the NF-kappaB family protein p65/RelA by the chlamydial protease-like activity factor (CPAF) impairs proinflammatory signaling in cells infected with *Chlamydiae*." *J Biol Chem* **285**(53): 41320-7.

- Christiansen, G., A. S. Pedersen, et al. (2000). "Potential relevance of Chlamydia pneumoniae surface proteins to an effective vaccine." *J Infect Dis* **181 Suppl 3**: S528-37.
- Clantin, B., H. Hodak, et al. (2004). "The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(16): 6194-9.
- 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., 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.
- Cocchiaro, J. L., Y. Kumar, et al. (2008). "Cytoplasmic lipid droplets are translocated into the lumen of the Chlamydia trachomatis parasitophorous vacuole." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(27): 9379-84.
- Cocchiaro, J. L. and R. H. Valdivia (2009). "New insights into Chlamydia intracellular survival mechanisms." *Cell Microbiol* **11**(11): 1571-8.
- Coler, R. N., A. Bhatia, et al. (2009). "Identification and characterization of novel recombinant vaccine antigens for immunization against genital Chlamydia trachomatis." *FEMS Immunol Med Microbiol* **55**(2): 258-70.
- Collingro, A., P. Tischler, et al. (2011). "Unity in Variety—The Pan-Genome of the Chlamydiae." *Mol. Biol. Evol.* **28**(12): 3253–3270.
- 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.
- Cortes, C., K. A. Rzomp, et al. (2007). "Chlamydia pneumoniae inclusion membrane protein Cpn0585 interacts with multiple Rab GTPases." *Infect Immun* **75**(12): 5586-96.
- Cossart, P. and P. J. Sansonetti (2004). "Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens." *Science* **304**(5668): 242-8.
- Cowen, L., P. Bradley, et al. (2002). "Predicting the beta-helix fold from protein sequence data." *J Comput Biol* **9**(2): 261-76.
- 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.
- Darville, T., J. M. O'Neill, et al. (2003). "Toll-like receptor-2, but not Toll-like receptor-4, is essential for development of oviduct pathology in chlamydial genital tract infection." *J Immunol* **171**(11): 6187-97.
- Dautin, N. and H. D. Bernstein (2007). "Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway." *Annu Rev Microbiol* **61**: 89-112.
- 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.
- Dean, D., R. J. Suchland, et al. (2000). "Evidence for long-term cervical persistence of Chlamydia trachomatis by omp1 genotyping." J Infect Dis **182**(3): 909-16.
- Deitsch, K. W., S. A. Lukehart, et al. (2009). "Common strategies for antigenic variation by bacterial, fungal and protozoan pathogens." Nat Rev Microbiol **7**(7): 493-503.
- Delevoeye, C., M. Nilges, et al. (2008). "SNARE protein mimicry by an intracellular bacterium." PLoS Pathog **4**(3): e1000022.
- 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.
- Diao, J., H. Pantua, et al. (2012). "Hepatitis C virus induces epidermal growth factor receptor activation via CD81 binding for viral internalization and entry." J Virol **86**(20): 10935-49.
- Doherty, G. J. and H. T. McMahon (2009). "Mechanisms of endocytosis." Annu Rev Biochem **78**: 857-902.
- Domröse, A. (2012). Bindungsverhalten chlamydialer Adhäsine. Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität. **Masterarbeit**.
- Dong, F., M. Pirbhai, et al. (2005). "Degradation of the proapoptotic proteins Bik, Puma, and Bim with Bcl-2 domain 3 homology in Chlamydia trachomatis-infected cells." Infect Immun **73**(3): 1861-4.
- Ehrlich, M., W. Boll, et al. (2004). "Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits." Cell **118**(5): 591-605.
- Eierhoff, T., E. R. Hrinicus, et al. (2010). "The epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes uptake of influenza A viruses (IAV) into host cells." PLoS Pathog **6**(9): e1001099.
- 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.
- Eko, F. O., B. A. Talin, et al. (2008). "Development of a Chlamydia trachomatis bacterial ghost vaccine to fight human blindness." Hum Vaccin **4**(3): 176-83.
- Elwell, C. A., A. Ceesay, et al. (2008). "RNA interference screen identifies Abl kinase and PDGFR signaling in Chlamydia trachomatis entry." PLoS Pathog **4**(3): e1000021.
- Engel, J. (2004). "Tarp and Arp: How Chlamydia induces its own entry." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(27): 9947-8.
- Entian, K. D., T. Schuster, et al. (1999). "Functional analysis of 150 deletion mutants in Saccharomyces cerevisiae by a systematic approach." Mol Gen Genet **262**(4-5): 683-702.
- Everett, K. D. and T. P. Hatch (1995). "Architecture of the cell envelope of Chlamydia psittaci 6BC." J Bacteriol **177**(4): 877-82.
- Fadel, S. and A. Eley (2007). "Chlamydia trachomatis OmcB protein is a surface-exposed glycosaminoglycan-dependent adhesin." J Med Microbiol **56**(Pt 1): 15-22.
- 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.
- Fan, J. and R. S. Stephens (1997). "Antigen conformation dependence of Chlamydia trachomatis infectivity neutralization." J Infect Dis **176**(3): 713-21.

- Fan, T., H. Lu, et al. (1998). "Inhibition of apoptosis in chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation." *J Exp Med* **187**(4): 487-96.
- Fechtner, T. (2013). Charakterisierung der neuen, potentiellen Adhäsine Yaa1, Yaa2 und Yaa3 von *Chlamydia pneumoniae*. *Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen*. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität. **Dissertation**.
- Fields, K. A. and T. Hackstadt (2002). "The chlamydial inclusion: escape from the endocytic pathway." *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 221-45.
- Fink, G. R., Hicks, J.B., Sherman, F. (1983). *Methods in yeast genetics, laboratory manual* Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Franchi, L., T. Eigenbrod, et al. (2009). "The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis." *Nat Immunol* **10**(3): 241-7.
- Frank, A. T., C. B. Ramsook, et al. (2010). "Structure and function of glycosylated tandem repeats from *Candida albicans* Als adhesins." *Eukaryot Cell* **9**(3): 405-14.
- 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.
- Gangwer, K. A., D. J. Musher, et al. (2007). "Crystal structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin p55 domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(41): 16293-8.
- Gerard, H. C., U. Dreses-Werringloer, et al. (2006). "*Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's brain." *FEMS Immunol Med Microbiol* **48**(3): 355-66.
- Gerard, H. C., E. Fomicheva, et al. (2008). "Apolipoprotein E4 enhances attachment of *Chlamydia pneumoniae* elementary bodies to host cells." *Microb Pathog* **44**(4): 279-85.
- 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.
- Giles, D. K., J. D. Whittimore, et al. (2006). "Ultrastructural analysis of chlamydial antigen-containing vesicles everting from the *Chlamydia trachomatis* inclusion." *Microbes Infect* **8**(6): 1579-91.
- Girard, V. and M. Mourez (2006). "Adhesion mediated by autotransporters of Gram-negative bacteria: structural and functional features." *Res Microbiol* **157**(5): 407-16.
- Gomes, J. P., A. Nunes, et al. (2006). "Polymorphisms in the nine polymorphic membrane proteins of *Chlamydia trachomatis* across all serovars: evidence for serovar Da recombination and correlation with tissue tropism." *J Bacteriol* **188**(1): 275-86.
- Granato, D., G. E. Bergonzelli, et al. (2004). "Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins." *Infect Immun* **72**(4): 2160-9.
- Grayston, J. T. (1992). "Infections caused by *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR [see comments]." *Clin Infect Dis* **15**(5): 757-61.
- Grayston, J. T. (2000). "Background and current knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis." *J Infect Dis* **181** Suppl 3: S402-10.
- Grayston, J. T., C. C. Kuo, et al. (1989). "*Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. Strain TWAR." *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 88-90.
- Gregory, W. W., M. Gardner, et al. (1979). "Arrays of hemispheric surface projections on *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis* observed by scanning electron microscopy." *J Bacteriol* **138**(1): 241-4.
- Grieshaber, N. A., E. R. Fischer, et al. (2004). "Chlamydial histone-DNA interactions are disrupted by a metabolite in the methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(19): 7451-6.
- Grieshaber, S. S., N. A. Grieshaber, et al. (2003). "*Chlamydia trachomatis* uses host cell dynein to traffic to the microtubule-organizing center in a p50 dynamitin-independent process." *J Cell Sci* **116**(Pt 18): 3793-802.

- Grieshaber, S. S., N. A. Grieshaber, et al. (2006). "Chlamydia trachomatis causes centrosomal defects resulting in chromosomal segregation abnormalities." *Traffic* **7**(8): 940-9.
- Grimwood, J., L. Olinger, et al. (2001). "Expression of Chlamydia pneumoniae polymorphic membrane protein family genes." *Infect Immun* **69**(4): 2383-9.
- Grimwood, J. and R. S. Stephens (1999). "Computational analysis of the polymorphic membrane protein superfamily of Chlamydia trachomatis and Chlamydia pneumoniae." *Microb Comp Genomics* **4**(3): 187-201.
- Gustavsson, A., A. Armulik, et al. (2002). "Role of the beta1-integrin cytoplasmic tail in mediating invasin-promoted internalization of Yersinia." *J Cell Sci* **115**(Pt 13): 2669-78.
- Hackstadt, T. (2000). "Redirection of host vesicle trafficking pathways by intracellular parasites." *Traffic* **1**(2): 93-9.
- Hackstadt, T. and H. D. Caldwell (1985). "Effect of proteolytic cleavage of surface-exposed proteins on infectivity of Chlamydia trachomatis." *Infect Immun* **48**(2): 546-51.
- Hackstadt, T., D. D. Rockey, et al. (1996). "Chlamydia trachomatis interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane." *Embo J* **15**(5): 964-77.
- Hackstadt, T., W. J. Todd, et al. (1985). "Disulfide-mediated interactions of the chlamydial major outer membrane protein: role in the differentiation of chlamydiae?" *J Bacteriol* **161**(1): 25-31.
- Hafner, L., K. Beagley, et al. (2008). "Chlamydia trachomatis infection: host immune responses and potential vaccines." *Mucosal Immunol* **1**(2): 116-30.
- Hahn, D. L., A. A. Azenabor, et al. (2002). "Chlamydia pneumoniae as a respiratory pathogen." *Front Biosci* **7**: e66-76.
- Hahn, D. L., A. Schure, et al. (2012). "Chlamydia pneumoniae-specific IgE is prevalent in asthma and is associated with disease severity." *PLoS One* **7**(4): e35945.
- 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.
- Hamburger, Z. A., M. S. Brown, et al. (1999). "Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein." *Science* **286**(5438): 291-5.
- Hammerschlag, M. R. (2000). "Chlamydia pneumoniae and the lung." *Eur Respir J* **16**(5): 1001-7.
- Harkinezhad, T., K. Verminnen, et al. (2009). "Prevalence of Chlamydophila psittaci infections in a human population in contact with domestic and companion birds." *J Med Microbiol* **58**(Pt 9): 1207-12.
- Harlow, E. and D. Lane (1999). *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, CHSL Press.
- Harris, R. C., E. Chung, et al. (2003). "EGF receptor ligands." *Exp Cell Res* **284**(1): 2-13.
- Hatch, T. P. (1996). "Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in chlamydiae?" *J Bacteriol* **178**(1): 1-5.
- Hayes, C. N., D. Diez, et al. (2008). "varDB: a pathogen-specific sequence database of protein families involved in antigenic variation." *Bioinformatics* **24**(21): 2564-5.
- Hegemann, J. H. and K. Moelleken (2012). Chlamydial adhesion and adhesins. *Intracellular Pathogens I: Chlamydiales*. M. Tan, Bavoil, P. Washington, DC, ASM Press.
- Heine, H., S. Gronow, et al. (2007). "Investigation on the agonistic and antagonistic biological activities of synthetic Chlamydia lipid A and its use in in vitro enzymatic assays." *J Endotoxin Res* **13**(2): 126-32.
- Henderson, I. R. and A. C. Lam (2001). "Polymorphic proteins of Chlamydia spp.--autotransporters beyond the Proteobacteria." *Trends Microbiol* **9**(12): 573-8.
- Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia, et al. (2004). "Type V protein secretion pathway: the autotransporter story." *Microbiol Mol Biol Rev* **68**(4): 692-744.
- Henriksen, L., M. V. Grandal, et al. (2013). "Internalization mechanisms of the epidermal growth factor receptor after activation with different ligands." *PLoS One* **8**(3): e58148.

- Herbst, F. (2011). Identifizierung und Charakterisierung potentieller neuer Effektorproteine aus *Chlamydia pneumoniae*. Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität. **Dissertation**.
- Heuer, D., A. Rejman Lipinski, et al. (2009). "Chlamydia causes fragmentation of the Golgi compartment to ensure reproduction." Nature **457**(7230): 731-5.
- 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.
- Hoyer, L. L., R. Fundyga, et al. (2001). "Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-albicans *Candida* and phylogenetic analysis of the ALS family." Genetics **157**(4): 1555-67.
- Hoymans, V. Y., J. M. Bosmans, et al. (2007). "Chlamydia pneumoniae-based atherosclerosis: a smoking gun." Acta Cardiol **62**(6): 565-71.
- Hu, V. H., E. M. Harding-Esch, et al. (2010). "Epidemiology and control of trachoma: systematic review." Trop Med Int Health **15**(6): 673-91.
- Huang, F., A. Khvorova, et al. (2004). "Analysis of clathrin-mediated endocytosis of epidermal growth factor receptor by RNA interference." J Biol Chem **279**(16): 16657-61.
- 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. (2007). "Entry of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* into mammalian cells." Cell Microbiol **9**(6): 1365-75.
- Isberg, R. R. and P. Barnes (2001). "Subversion of integrins by enteropathogenic *Yersinia*." J Cell Sci **114**(Pt 1): 21-28.
- Jantos, C. A., S. Heck, et al. (1997). "Antigenic and molecular analyses of different *Chlamydia pneumoniae* strains." J. Clin. Microbiol. **35**: 620-623.
- Jeffrey, B. M., R. J. Suchland, et al. (2010). "Genome sequencing of recent clinical *Chlamydia trachomatis* strains identifies loci associated with tissue tropism and regions of apparent recombination." Infect Immun **78**(6): 2544-53.
- 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.
- Johannessen, L. E., N. M. Pedersen, et al. (2006). "Activation of the epidermal growth factor (EGF) receptor induces formation of EGF receptor- and Grb2-containing clathrin-coated pits." Mol Cell Biol **26**(2): 389-401.
- Jorgensen, I., M. M. Bednar, et al. (2011). "The *Chlamydia* protease CPAF regulates host and bacterial proteins to maintain pathogen vacuole integrity and promote virulence." Cell Host Microbe **10**(1): 21-32.
- Junker, M., R. N. Besingi, et al. (2009). "Vectorial transport and folding of an autotransporter virulence protein during outer membrane secretion." Mol Microbiol **71**(5): 1323-32.
- Junker, M., C. C. Schuster, et al. (2006). "Pertactin beta-helix folding mechanism suggests common themes for the secretion and folding of autotransporter proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(13): 4918-23.
- 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.
- Kajava, A. V. (2012). "Tandem repeats in proteins: from sequence to structure." J Struct Biol **179**(3): 279-88.
- Kajava, A. V., N. Cheng, et al. (2001). "Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis* and related bacterial secretory proteins." Mol Microbiol **42**(2): 279-92.

- Kalman, S., W. Mitchell, et al. (1999). "Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*." Nat Genet **21**(4): 385-9.
- Karunakaran, K. P., J. Rey-Ladino, et al. (2008). "Immunoproteomic discovery of novel T cell antigens from the obligate intracellular pathogen *Chlamydia*." J Immunol **180**(4): 2459-65.
- Kawa, D. E. and R. S. Stephens (2002). "Antigenic topology of chlamydial PorB protein and identification of targets for immune neutralization of infectivity." J Immunol **168**(10): 5184-91.
- Kawana, K., A. J. Quayle, et al. (2007). "CD1d degradation in *Chlamydia trachomatis*-infected epithelial cells is the result of both cellular and chlamydial proteasomal activity." J Biol Chem **282**(10): 7368-75.
- Kazacic, M., V. Bertelsen, et al. (2009). "Epsin 1 is involved in recruitment of ubiquitinated EGF receptors into clathrin-coated pits." Traffic **10**(2): 235-45.
- Kazacic, M., K. Roepstorff, et al. (2006). "EGF-induced activation of the EGF receptor does not trigger mobilization of caveolae." Traffic **7**(11): 1518-27.
- 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.
- Kim, J. H., S. Jiang, et al. (2011). "*Chlamydia trachomatis* Co-opts the FGF2 signaling pathway to enhance infection." PLoS Pathog **7**(10): e1002285.
- 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.
- Kiselev, A. O., W. E. Stamm, et al. (2007). "Expression, processing, and localization of PmpD of *Chlamydia trachomatis* serovar L2 during the chlamydial developmental cycle." PLoS ONE **2**(6): e568.
- Kleba, B. and R. S. Stephens (2008). "Chlamydial effector proteins localized to the host cell cytoplasmic compartment." Infect Immun **76**(11): 4842-50.
- Klein, M., A. Kotz, et al. (2003). "Detection of *Chlamydia pneumoniae*-specific antibodies binding to the VD2 and VD3 regions of the major outer membrane protein." J Clin Microbiol **41**(5): 1957-62.
- Knowlton, A. E., H. M. Brown, et al. (2011). "*Chlamydia trachomatis* infection causes mitotic spindle pole defects independently from its effects on centrosome amplification." Traffic **12**(7): 854-866.
- 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.
- Kosugi, S., M. Hasebe, et al. (2009). "Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(25): 10171-6.
- Krull, M., A. C. Klucken, et al. (1999). "Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with *Chlamydia pneumoniae*." J Immunol **162**(8): 4834-41.
- Krull, M., J. Kramp, et al. (2004). "Differences in cell activation by *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis* infection in human endothelial cells." Infect Immun **72**(11): 6615-21.
- Krull, M., M. Maass, et al. (2005). "*Chlamydia pneumoniae*. Mechanisms of target cell infection and activation." Thromb Haemost **94**(2): 319-26.
- Kumar, S. and M. R. Hammerschlag (2007). "Acute respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae*: current status of diagnostic methods." Clin Infect Dis **44**(4): 568-76.
- Kumar, Y., J. Cocchiari, et al. (2006). "The obligate intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis* targets host lipid droplets." Curr Biol **16**(16): 1646-51.

- Kuo, C. C., H. H. Chen, et al. (1986). "Identification of a new group of *Chlamydia psittaci* strains called TWAR." *J Clin Microbiol* **24**(6): 1034-7.
- Kuo, C. C., L. A. Jackson, et al. (1995). "*Chlamydia pneumoniae* (TWAR)." *Clin Microbiol Rev* **8**(4): 451-61.
- 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.
- Kushnir, M., E. Dresner, et al. (2008). "Silencing of the ADNP-family member, ADNP2, results in changes in cellular viability under oxidative stress." *J Neurochem* **105**(2): 537-45.
- Kusumi, A., I. Koyama-Honda, et al. (2004). "Molecular Dynamics and Interactions for Creation of Stimulation-Induced Stabilized Rafts from Small Unstable Steady-State Rafts." *Traffic* **5**: 213-230.
- Lad, S. P., J. Li, et al. (2006). "Cleavage of p65/RelA of the NF-kappaB pathway by *Chlamydia*." *PNAS* **20**(8): 2933-2938.
- Lafont, F., L. Abrami, et al. (2004). "Bacterial subversion of lipid rafts." *Curr Opin Microbiol* **7**(1): 4-10.
- Lane, B. J., C. Mutchler, et al. (2008). "Chlamydial entry involves TARP binding of guanine nucleotide exchange factors." *PLoS Pathog* **4**(3): e1000014.
- Le Roy, C. and J. L. Wrana (2005). "Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(2): 112-26.
- Leininger, E., C. A. Ewanowich, et al. (1992). "Comparative roles of the Arg-Gly-Asp sequence present in the *Bordetella pertussis* adhesins pertactin and filamentous hemagglutinin." *Infect Immun* **60**(6): 2380-5.
- Li, H. and D. H. Walker (1998). "rOmpA is a critical protein for the adhesion of *Rickettsia rickettsii* to host cells." *Microb Pathog* **24**(5): 289-98.
- Liu, X., M. Afrane, et al. (2010). "Identification of *Chlamydia trachomatis* outer membrane complex proteins by differential proteomics." *J Bacteriol* **192**(11): 2852-60.
- Locht, C., P. Bertin, et al. (1993). "The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by virulent *Bordetella* spp." *Mol Microbiol* **9**(4): 653-60.
- Longbottom, D., M. Russell, et al. (1998). "Molecular cloning and characterization of the genes coding for the highly immunogenic cluster of 90-kilodalton envelope proteins from the *Chlamydia psittaci* subtype that causes abortion in sheep." *Infect Immun* **66**(4): 1317-24.
- Madshus, I. H. and E. Stang (2009). "Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking." *J Cell Sci* **122**(Pt 19): 3433-9.
- 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.
- Marques, P. X., P. Souda, et al. (2010). "Identification of immunologically relevant proteins of *Chlamydia abortus* using sera from experimentally infected pregnant ewes." *Clin Vaccine Immunol* **17**(8): 1274-81.
- Marsh, M. and A. Helenius (2006). "Virus entry: open sesame." *Cell* **124**(4): 729-40.
- Matsumoto, A. (1982). "Electron microscopic observations of surface projections on *Chlamydia psittaci* reticulate bodies." *J Bacteriol* **150**(1): 358-64.
- Matsumoto, A. (1982). "Surface projections of *Chlamydia psittaci* elementary bodies as revealed by freeze-deep-etching." *J Bacteriol* **151**(2): 1040-2.
- McCoy, A. J. and A. T. Maurelli (2006). "Building the invisible wall: updating the chlamydial peptidoglycan anomaly." *Trends Microbiol* **14**(2): 70-7.

- McDonnell, A. V., M. Menke, et al. (2006). "Fold recognition and accurate sequence-structure alignment of sequences directing beta-sheet proteins." *Proteins* **63**(4): 976-85.
- Meng, G., N. Spahich, et al. (2011). "Crystal structure of the Haemophilus influenzae Hap adhesin reveals an intercellular oligomerization mechanism for bacterial aggregation." *Embo J* **30**(18): 3864-74.
- Miller, S. A., C. H. Selzman, et al. (2000). "Chlamydia pneumoniae activates nuclear factor kappaB and activator protein 1 in human vascular smooth muscle and induces cellular proliferation." *J Surg Res* **90**(1): 76-81.
- Misaghi, S., Z. R. Balsara, et al. (2006). "Chlamydia trachomatis-derived deubiquitinating enzymes in mammalian cells during infection." *Mol Microbiol* **61**(1): 142-50.
- Mitchell, C. M., K. M. Hovis, et al. (2010). "Comparison of koala LPCoLN and human strains of Chlamydia pneumoniae highlights extended genetic diversity in the species." *BMC Genomics* **11**: 442.
- Miyashita, N., Y. Kanamoto, et al. (1993). "The morphology of Chlamydia pneumoniae." *J Med Microbiol* **38**(6): 418-25.
- Moelleken, K., E. Becker, et al. (2013). "The Chlamydia pneumoniae Invasin Protein Pmp21 Recruits the EGF Receptor for Host Cell Entry." *PLoS Pathog* **9**(4): e1003325.
- 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.
- Montigiani, S., F. Falugi, et al. (2002). "Genomic approach for analysis of surface proteins in Chlamydia pneumoniae." *Infect Immun* **70**(1): 368-79.
- Moore, E. R., E. R. Fischer, et al. (2008). "The chlamydial inclusion preferentially intercepts basolaterally directed sphingomyelin-containing exocytic vacuoles." *Traffic* **9**(12): 2130-40.
- Mörl, H., P. Haders, et al. (1998). *Koronare Herzkrankheit: Diagnostik und Therapie in der Praxis*, de Gruyter.
- Morrison, S. G. and R. P. Morrison (2005). "A predominant role for antibody in acquired immunity to chlamydial genital tract reinfection." *J Immunol* **175**(11): 7536-42.
- Moulder, J. W. (1993). "Why is Chlamydia sensitive to penicillin in the absence of peptidoglycan?" *Infect Agents Dis* **2**(2): 87-99.
- Muller, S., P. Filippakopoulos, et al. (2011). "Bromodomains as therapeutic targets." *Expert Rev Mol Med* **13**: e29.
- Murra, G. (2005). Untersuchungen zu DNA-Microarray-Studien des genomweiten Genexpressionsprofiles von Chlamydia pneumoniae. *Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen*. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität. **Diplomarbeit**.
- Murra, G. (2009). Identifizierung und Charakterisierung von Adhäsionsproteinen des humanpathogenen Erregers Chlamydia pneumoniae. *Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen*. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität. **Dissertation**.
- Murray, A. and M. E. Ward (1984). "Control mechanisms governing the infectivity of Chlamydia trachomatis for HeLa cells: the role of calmodulin." *J Gen Microbiol* **130**(Pt 1): 193-201.
- Myers, G. S., S. A. Mathews, et al. (2009). "Evidence that human Chlamydia pneumoniae was zoonotically acquired." *J Bacteriol* **191**(23): 7225-33.
- Mygind, P., G. Christiansen, et al. (1998). "Topological analysis of Chlamydia trachomatis L2 outer membrane protein 2." *J Bacteriol* **180**(21): 5784-7.
- Newhall, W. J. and R. B. Jones (1983). "Disulfide-linked oligomers of the major outer membrane protein of chlamydiae." *J Bacteriol* **154**(2): 998-1001.

- Nguyen, B. D., D. Cunningham, et al. (2011). "Lipooligosaccharide is required for the generation of infectious elementary bodies in *Chlamydia trachomatis*." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(25): 10284-9.
- Niemann, H. H., W. D. Schubert, et al. (2004). "Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view." Microbes Infect **6**(1): 101-12.
- Niessner, A., C. Kaun, et al. (2003). "Polymorphic membrane protein (PMP) 20 and PMP 21 of *Chlamydia pneumoniae* induce proinflammatory mediators in human endothelial cells in vitro by activation of the nuclear factor-kappaB pathway." J Infect Dis **188**(1): 108-13.
- Nishimura, K., N. Tajima, et al. (2010). "Autotransporter passenger proteins: virulence factors with common structural themes." J Mol Med (Berl) **88**(5): 451-8.
- Nogami, M., M. Yamazaki, et al. (2003). "Requirement of autophosphorylated tyrosine 992 of EGF receptor and its docking protein phospholipase C gamma 1 for membrane ruffle formation." FEBS Lett **536**(1-3): 71-6.
- 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.
- Nunes, A., J. P. Gomes, et al. (2007). "Comparative expression profiling of the *Chlamydia trachomatis* pmp gene family for clinical and reference strains." PLoS ONE **2**(9): e878.
- O'Connell, C. M., I. A. Ionova, et al. (2006). "Localization of TLR2 and MyD88 to *Chlamydia trachomatis* inclusions. Evidence for signaling by intracellular TLR2 during infection with an obligate intracellular pathogen." J Biol Chem **281**(3): 1652-9.
- Ogiso, H., R. Ishitani, et al. (2002). "Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains." Cell **110**(6): 775-87.
- Ojcius, D. M., T. Darville, et al. (2005). "Can chlamydia be stopped?" Sci Am **292**(5): 72-9.
- Oliver, D. C., G. Huang, et al. (2003). "A conserved region within the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain." Mol Microbiol **47**(5): 1367-83.
- Oomen, C. J., P. van Ulsen, et al. (2004). "Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter." Embo J **23**(6): 1257-66.
- Ossewaarde, J. M., A. de Vries, et al. (1996). "Application of a *Mycoplasma* group-specific PCR for monitoring decontamination of *Mycoplasma*-infected *Chlamydia* sp. strains." Appl Environ Microbiol **62**(2): 328-31.
- Otsuka, N., H. J. Han, et al. (2012). "Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in Japan." PLoS One **7**(2): e31985.
- 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.
- Pavelka, M. S., Jr. (2007). "Another brick in the wall." Trends Microbiol **15**(4): 147-9.
- Pedersen, A. S., G. Christiansen, et al. (2001). "Differential expression of Pmp10 in cell culture infected with *Chlamydia pneumoniae* CWL029." FEMS Microbiol Lett **203**(2): 153-9.
- Peterson, E. M., L. M. de la Maza, et al. (1998). "Characterization of a neutralizing monoclonal antibody directed at the lipopolysaccharide of *Chlamydia pneumoniae*." Infect Immun **66**(8): 3848-55.
- Pizarro-Cerda, J. and P. Cossart (2006). "Bacterial adhesion and entry into host cells." Cell **124**(4): 715-27.
- Pospischil, A., N. Borel, et al. (2009). "Aberrant chlamydial developmental forms in the gastrointestinal tract of pigs spontaneously and experimentally infected with *Chlamydia suis*." Vet Microbiol **135**(1-2): 147-56.
- Pospischil, A., R. Thoma, et al. (2002). "Abortion in woman caused by caprine *Chlamydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1)." Swiss Med Wkly **132**(5-6): 64-6.
- Prenzel, N., O. M. Fischer, et al. (2001). "The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification." Endocr Relat Cancer **8**(1): 11-31.

- 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.
- Rappoport, J. Z. (2008). "Focusing on clathrin-mediated endocytosis." Biochem J **412**(3): 415-23.
- Razani, B., S. E. Woodman, et al. (2002). "Caveolae: from cell biology to animal physiology." Pharmacol Rev **54**(3): 431-67.
- Read, T. D., R. C. Brunham, et al. (2000). "Genome sequences of Chlamydia trachomatis MoPn and Chlamydia pneumoniae AR39." Nucleic Acids Res **28**(6): 1397-406.
- Read, T. D., G. S. Myers, et al. (2003). "Genome sequence of Chlamydophila caviae (Chlamydia psittaci GPIC): examining the role of niche-specific genes in the evolution of the Chlamydiaceae." Nucleic Acids Res **31**(8): 2134-47.
- Renn, J. P. and P. L. Clark (2007). "Disulfide bond-mediated passenger domain stalling as a structural probe of autotransporter outer membrane secretion in vivo." Methods Enzymol **492**: 233-51.
- Renn, J. P. and P. L. Clark (2008). "A conserved stable core structure in the passenger domain beta-helix of autotransporter virulence proteins." Biopolymers **89**(5): 420-7.
- Reynolds, D. J. and J. H. Pearce (1991). "Endocytic mechanisms utilized by chlamydiae and their influence on induction of productive infection." Infect Immun **59**(9): 3033-9.
- Richardson, J. S. and D. C. Richardson (2002). "Natural beta-sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 2754-9.
- Riley, S. P., K. C. Goh, et al. (2010). "The Rickettsia conorii autotransporter protein Scal promotes adherence to nonphagocytic mammalian cells." Infect Immun **78**(5): 1895-904.
- Robertson, D. K., L. Gu, et al. (2009). "Inclusion biogenesis and reactivation of persistent Chlamydia trachomatis requires host cell sphingolipid biosynthesis." PLoS Pathog **5**(11): e1000664.
- Rockey, D. D., J. Lenart, et al. (2000). "Genome sequencing and our understanding of chlamydiae." Infect Immun **68**(10): 5473-9.
- Rockey, D. D., M. A. Scidmore, et al. (2002). "Proteins in the chlamydial inclusion membrane." Microbes Infect **4**(3): 333-40.
- Rohde, G., E. Straube, et al. (2010). "Chlamydial zoonoses." Dtsch Arztebl Int **107**(10): 174-80.
- Rosario, C. J. and M. Tan (2012). "The early gene product EUO is a transcriptional repressor that selectively regulates promoters of Chlamydia late genes." Mol Microbiol **84**(6): 1097-107.
- Roulston, J. E. (1995). "Chlamydial envelope components and pathogen-host cell interactions." Molecular Microbiology **15**(4): 607-616.
- Roux, A., C. Beloin, et al. (2005). "Combined inactivation and expression strategy to study gene function under physiological conditions: application to identification of new Escherichia coli adhesins." J Bacteriol **187**(3): 1001-13.
- Rupp, J., T. Hellwig-Burgel, et al. (2005). "Chlamydia pneumoniae infection promotes a proliferative phenotype in the vasculature through Egr-1 activation in vitro and in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(9): 3447-52.
- Rzomp, K. A., A. R. Moorhead, et al. (2006). "The GTPase Rab4 interacts with Chlamydia trachomatis inclusion membrane protein CT229." Infect Immun **74**(9): 5362-73.
- Rzomp, K. A., L. D. Scholtes, et al. (2003). "Rab GTPases are recruited to chlamydial inclusions in both a species-dependent and species-independent manner." Infect Immun **71**(10): 5855-70.

- Saikku, P., M. Leinonen, et al. (1988). "Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction." Lancet **2**(8618): 983-6.
- Saka, H. A., J. W. Thompson, et al. (2011). "Quantitative proteomics reveals metabolic and pathogenic properties of Chlamydia trachomatis developmental forms." Mol Microbiol **82**(5): 1185-203.
- Sambrook, J., T. Maniatis, et al. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor laboratory.
- Santra, M., C. C. Reed, et al. (2002). "Decorin binds to a narrow region of the epidermal growth factor (EGF) receptor, partially overlapping but distinct from the EGF-binding epitope." J Biol Chem **277**(38): 35671-81.
- Schachter, J. (1999). Infection and Disease Epidemiology. Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity. R. S. Stephens. Washington, D.C., ASM Press: 139-69.
- Schautteet, K., E. De Clercq, et al. (2011). "Chlamydia trachomatis vaccine research through the years." Infect Dis Obstet Gynecol **2011**: 963513.
- Schlessinger, J. (2002). "Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor." Cell **110**(6): 669-72.
- Schmidt, E. (2009). Charakterisierung des C. pneumoniae Adhäsins und Invasins Pmp21. Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität. **Dissertation**.
- Scidmore, M. A., D. D. Rockey, et al. (1996). "Vesicular interactions of the Chlamydia trachomatis inclusion are determined by chlamydial early protein synthesis rather than route of entry." Infect Immun **64**(12): 5366-72.
- Seabra, M. C. and C. Wasmeier (2004). "Controlling the location and activation of Rab GTPases." Curr Opin Cell Biol **16**(4): 451-7.
- Sewald, X., W. Fischer, et al. (2008). "Sticky socks: Helicobacter pylori VacA takes shape." Trends Microbiol **16**(3): 89-92.
- Shaw, E. I., C. A. Dooley, et al. (2000). "Three temporal classes of gene expression during the Chlamydia trachomatis developmental cycle." Mol Microbiol **37**(4): 913-25.
- Shen, Z. M., L. Wang, et al. (2001). "Delineation of functional regions within the subunits of the Saccharomyces cerevisiae cell adhesion molecule a-agglutinin." J Biol Chem **276**(19): 15768-75.
- Sheppard, D. C., M. R. Yeaman, et al. (2004). "Functional and structural diversity in the Als protein family of Candida albicans." J Biol Chem **279**(29): 30480-9.
- Sigismund, S., E. Argenzio, et al. (2008). "Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation." Dev Cell **15**(2): 209-19.
- 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 D. Toomre (2000). "Lipid rafts and signal transduction." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 31-9.
- Skipp, P., J. Robinson, et al. (2005). "Shotgun proteomic analysis of Chlamydia trachomatis." Proteomics **5**(6): 1558-73.
- Skowasch, D., K. Yeghiazaryan, et al. (2003). "Persistence of Chlamydia pneumoniae in degenerative aortic valve stenosis indicated by heat shock protein 60 homologues." J Heart Valve Dis **12**(1): 68-75.
- Somboonna, N., S. Mead, et al. (2008). "Discovering and differentiating new and emerging clonal populations of Chlamydia trachomatis with a novel shotgun cell culture harvest assay." Emerg Infect Dis **14**(3): 445-53.
- Soriani, M., P. Petit, et al. (2010). "Exploiting antigenic diversity for vaccine design: the chlamydia ArtJ paradigm." J Biol Chem **285**(39): 30126-38.
- Sorkin, A. and L. K. Goh (2008). "Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs." Exp Cell Res **314**(17): 3093-106.

- Spagnoli, L. G., S. Pucci, et al. (2007). "Persistent Chlamydia pneumoniae infection of cardiomyocytes is correlated with fatal myocardial infarction." Am J Pathol **170**(1): 33-42.
- Sriram, S., C. W. Stratton, et al. (1999). "Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis." Ann Neurol **46**(1): 6-14.
- Steinman, R. M., I. S. Mellman, et al. (1983). "Endocytosis and the recycling of plasma membrane." J Cell Biol **96**(1): 1-27.
- Steinman, R. M. and M. Pope (2002). "Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy." J Clin Invest **109**(12): 1519-26.
- Stephens, R. S., F. S. Fawaz, et al. (2000). "Eukaryotic cell uptake of heparin-coated microspheres: a model of host cell invasion by Chlamydia trachomatis." Infect Immun **68**(3): 1080-5.
- Stephens, R. S., S. Kalman, et al. (1998). "Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *chlamydia trachomatis*." Science **282**(5389): 754-9.
- Stephens, R. S., K. Koshiyama, et al. (2001). "Heparin-binding outer membrane protein of chlamydiae." Mol Microbiol **40**(3): 691-9.
- Stephens, R. S., G. Myers, et al. (2009). "Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of Chlamydia resolved." FEMS Immunol Med Microbiol **55**(2): 115-9.
- Stephens, R. S., M. R. Tam, et al. (1982). "Monoclonal antibodies to Chlamydia trachomatis: antibody specificities and antigen characterization." J Immunol **128**(3): 1083-9.
- Stothard, D. R., G. A. Toth, et al. (2003). "Polymorphic membrane protein H has evolved in parallel with the three disease-causing groups of Chlamydia trachomatis." Infect Immun **71**(3): 1200-8.
- Stuart, E. S., W. C. Webley, et al. (2003). "Lipid rafts, caveolae, caveolin-1, and entry by Chlamydiae into host cells." Exp Cell Res **287**(1): 67-78.
- Su, H., L. Raymond, et al. (1996). "A recombinant Chlamydia trachomatis major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 11143-8.
- 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.
- Suchland, R. J., D. D. Rockey, et al. (2005). "Development of secondary inclusions in cells infected by Chlamydia trachomatis." Infect Immun **73**(7): 3954-62.
- Suo, Y., S. J. Hardy, et al. (2011). "Orientation of SecA and SecB in complex, derived from disulfide cross-linking." J Bacteriol **193**(1): 190-6.
- 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.
- Tahir, Y. E., P. Kuusela, et al. (2000). "Functional mapping of the Yersinia enterocolitica adhesin YadA. Identification Of eight NSVAIG - S motifs in the amino-terminal half of the protein involved in collagen binding." Mol Microbiol **37**(1): 192-206.
- Takada, Y., X. Ye, et al. (2007). "The integrins." Genome Biol **8**(5): 215.
- 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.
- Tan, C., R. C. Hsia, et al. (2009). "Chlamydia trachomatis-infected patients display variable antibody profiles against the nine-member polymorphic membrane protein family." Infect Immun **77**(8): 3218-26.
- Tanzer, R. J., D. Longbottom, et al. (2001). "Identification of polymorphic outer membrane proteins of Chlamydia psittaci 6BC." Infect Immun **69**(4): 2428-34.
- 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.

- Thomson, N. R., C. Yeats, et al. (2005). "The Chlamydomonas abortus genome sequence reveals an array of variable proteins that contribute to interspecies variation." Genome Res **15**(5): 629-40.
- 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.
- Uchiyama, T. (2003). "Adherence to and invasion of Vero cells by recombinant Escherichia coli expressing the outer membrane protein rOmpB of Rickettsia japonica." Ann. NY Acad. Sci. **990**: 585-590.
- van den Berg, B. M., H. Beekhuizen, et al. (1999). "Role of Bordetella pertussis virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tract." Infect Immun **67**(3): 1056-62.
- van der Woude, M. W. and A. J. Baumler (2004). "Phase and antigenic variation in bacteria." Clin Microbiol Rev **17**(3): 581-611, table of contents.
- 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., J. A. Guttman, et al. (2007). "Invasive and adherent bacterial pathogens co-Opt host clathrin for infection." Cell Host Microbe **2**(5): 340-51.
- Villegas, E., A. Sorlozano, et al. (2010). "Serological diagnosis of Chlamydia pneumoniae infection: limitations and perspectives." J Med Microbiol **59**(Pt 11): 1267-74.
- Virok, D. P., D. E. Nelson, et al. (2005). "Chlamydial infection induces pathobiotype-specific protein tyrosine phosphorylation in epithelial cells." Infect Immun **73**(4): 1939-46.
- Vretou, E., P. Giannikopoulou, et al. (2003). "Antigenic organization of the N-terminal part of the polymorphic outer membrane proteins 90, 91A, and 91B of Chlamydomonas abortus." Infect Immun **71**(6): 3240-50.
- Vretou, E., P. Giannikopoulou, et al. (2001). "Polymorphic outer-membrane proteins of Chlamydomonas abortus are glycosylated." Microbiology **147**(Pt 12): 3303-10.
- Wagels, G., S. Rasmussen, et al. (1994). "Comparison of Chlamydia pneumoniae isolates by western blot (immunoblot) analysis and DNA sequencing of the omp 2 gene." J Clin Microbiol **32**(11): 2820-3.
- Wang, A., S. C. Johnston, et al. (2010). "A systemic network for Chlamydia pneumoniae entry into human cells." J Bacteriol.
- Wang, J., Y. Zhang, et al. (2010). "A genome-wide profiling of the humoral immune response to Chlamydia trachomatis infection reveals vaccine candidate antigens expressed in humans." J Immunol **185**(3): 1670-80.
- 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.
- Wasylyk, B., J. Hagman, et al. (1998). "Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway." Trends Biochem Sci **23**(6): 213-6.
- Watson, C. and N. J. Alp (2008). "Role of Chlamydia pneumoniae in atherosclerosis." Clin Sci (Lond) **114**(8): 509-31.
- Watson, M. W., P. R. Lambden, et al. (1989). "Chlamydia trachomatis 60 kDa cysteine rich outer membrane protein: sequence homology between trachoma and LGV biovars." FEMS Microbiol Lett **53**(3): 293-7.
- 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.
- Wells, A. (1999). "EGF receptor." Int J Biochem Cell Biol **31**(6): 637-43.
- Wells, T. J., M. Totsika, et al. (2010). "Autotransporters of Escherichia coli: a sequence-based characterization." Microbiology **156**(Pt 8): 2459-69.

- Wells, T. J., J. J. Tree, et al. (2007). "Autotransporter proteins: novel targets at the bacterial cell surface." *FEMS Microbiol Lett* **274**(2): 163-72.
- Welter-Stahl, L., D. M. Ojcius, et al. (2006). "Stimulation of the cytosolic receptor for peptidoglycan, Nod1, by infection with *Chlamydia trachomatis* or *Chlamydia muridarum*." *Cell Microbiol* **8**(6): 1047-57.
- Wheelhouse, N., M. Sait, et al. (2012). "Expression patterns of five polymorphic membrane proteins during the *Chlamydia abortus* developmental cycle." *Vet Microbiol* **160**(3-4): 525-9.
- Wheelhouse, N. M., M. Sait, et al. (2012). "Processing of *Chlamydia abortus* polymorphic membrane protein 18D during the chlamydial developmental cycle." *PLoS One* **7**(11): e49190.
- WHO (2001). "World Health Organisation: global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections - overview and estimates."
- Wilkinson, D. A., G. A. Neale, et al. (1997). "Elf-2, a rhombotin-2 binding ets transcription factor: discovery and potential role in T cell leukemia." *Leukemia* **11**(1): 86-96.
- Wilson, D. P., P. Timms, et al. (2006). "Type III secretion, contact-dependent model for the intracellular development of chlamydia." *Bull Math Biol* **68**(1): 161-78.
- Woelk, T., S. Sigismund, et al. (2007). "The ubiquitination code: a signalling problem." *Cell Div* **2**: 11.
- Wolf, K., E. Fischer, et al. (2000). "Ultrastructural analysis of developmental events in *Chlamydia pneumoniae*-infected cells." *Infect Immun* **68**(4): 2379-85.
- Woodman, P. G. and C. E. Futter (2008). "Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity." *Curr Opin Cell Biol* **20**(4): 408-14.
- Wouters, M. A., I. Rigoutsos, et al. (2005). "Evolution of distinct EGF domains with specific functions." *Protein Sci* **14**(4): 1091-103.
- Wu, Y., Q. Li, et al. (2007). "Detecting protein-protein interactions by Far western blotting." *Nat Protoc* **2**(12): 3278-84.
- 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.
- Wyrick, P. B. (2000). "Intracellular survival by *Chlamydia*." *Cell Microbiol* **2**(4): 275-82.
- Wyrick, P. B. (2010). "*Chlamydia trachomatis* persistence in vitro: an overview." *J Infect Dis* **201 Suppl 2**: S88-95.
- Wyrick, P. B., J. Choong, et al. (1989). "Entry of genital *Chlamydia trachomatis* into polarized human epithelial cells." *Infect Immun* **57**(8): 2378-89.
- Yao, Z., Y. Dolginov, et al. (2000). "Detection of partially phosphorylated forms of ERK by monoclonal antibodies reveals spatial regulation of ERK activity by phosphatases." *FEBS Lett* **468**(1): 37-42.
- Yarden, Y. and B. Z. Shilo (2007). "SnapShot: EGFR signaling pathway." *Cell* **131**(5): 1018.
- Yen, M. R., C. R. Peabody, et al. (2002). "Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria." *Biochim Biophys Acta* **1562**(1-2): 6-31.
- Ying, S., M. Pettengill, et al. (2007). "Host-Cell Survival and Death During *Chlamydia* Infection." *Curr Immunol Rev* **3**(1): 31-40.
- Ying, S., B. M. Seiffert, et al. (2005). "Broad degradation of proapoptotic proteins with the conserved Bcl-2 homology domain 3 during infection with *Chlamydia trachomatis*." *Infect Immun* **73**(3): 1399-403.
- Yu, H., K. P. Karunakaran, et al. (2012). "*Chlamydia muridarum* T cell antigens and adjuvants that induce protective immunity in mice." *Infect Immun* **80**(4): 1510-8.
- Zhang, J. P. and R. S. Stephens (1992). "Mechanism of *C. trachomatis* attachment to eukaryotic host cells." *Cell* **69**(5): 861-9.

- 
- Zhong, G., P. Fan, et al. (2001). "Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors." J Exp Med **193**(8): 935-42.
- Zoncu, R., R. M. Perera, et al. (2007). "Loss of endocytic clathrin-coated pits upon acute depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(10): 3793-8.
- Zrieq, R. (2009). The Dual Function of the Chlamydia pneumoniae Cpn0572 Protein in Modulating the Host Actin Cytoskeleton. Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität. **Dissertation**.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Taxonomie der Ordnung <i>Chlamydiales</i> .....	2
Abbildung 1.2: Prävalenz bakterieller, sexuell übertragbarer Krankheiten in den USA. ....	5
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von <i>C. pneumoniae</i> .....	6
Abbildung 1.4: Modell der chlamydialen Adhäsion und Internalisierung.....	7
Abbildung 1.5: Abgleich der Pmp-Subtypen von <i>C. pneumoniae</i> und <i>C. trachomatis</i> .....	21
Abbildung 1.6: Charakteristische Merkmale der chlamydialen Pmp Proteinfamilie.....	22
Abbildung 1.7: PmpD von <i>C. trachomatis</i> L2 wird in frühe unlösliche und späte lösliche Formen proteolytisch prozessiert.....	28
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Hefe-Oberflächen-Präsentationssystems.....	63
Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems.....	67
Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der analysierten Pmps.....	103
Abbildung 4.2: <i>C. pneumoniae</i> Pmp präsentierende Hefezellen binden an Humanzellen.....	105
Abbildung 4.3: <i>C. trachomatis</i> Pmp präsentierende Hefezellen adhären an Humanzellen....	108
Abbildung 4.4: Aufgereinigte <i>C. pneumoniae</i> Pmp-Proteinfragmente aus <i>E. coli</i> . ....	111
Abbildung 4.5: Adhäsion von <i>C. pneumoniae</i> rPmp-beschichteten Latexkügelchen an HEp-2 Zellen.....	113
Abbildung 4.6: Aufgereinigte <i>C. trachomatis</i> Pmp-Fragmente aus <i>E. coli</i> .....	114
Abbildung 4.7: Bindung von <i>C. trachomatis</i> rPmp beladenen Latexkügelchen an HeLa Zellen. ....	115
Abbildung 4.8: Bindung von <i>C. pneumoniae</i> und <i>C. trachomatis</i> rPmp beschichteten Latexkügelchen an epitheliale (HEp-2, HeLa) und endotheliale (HUVEC) Zellen. ....	117
Abbildung 4.9: Inhibierung der <i>C. pneumoniae</i> Infektion durch rekombinante Pmps. ....	120
Abbildung 4.10: Inhibierung der <i>C. trachomatis</i> Infektion durch rekombinante Pmps. ....	121
Abbildung 4.11: Rekombinante <i>C. pneumoniae</i> Pmps können keine <i>C. trachomatis</i> Infektion inhibieren und <i>vice versa</i> . ....	123
Abbildung 4.12: Infektionsneutralisations-Verhalten verschiedener rekombinanter Pmps alleine bzw. in einer 1:1 Kombination.....	125
Abbildung 4.13: Pmp21 und OmcB sind an zwei unterschiedlichen Adhäsionswegen beteiligt. ....	128
Abbildung 4.14: Pmp21 interagiert mit EGFR hauptsächlich über seine zweite Ligandenbindestelle.....	130
Abbildung 4.15: Pmp21-beschichtete Latexkügelchen binden nicht an EGFR-negative Zellen. ....	133

---

Abbildung 4.16: Internalisierung von Invasin- und Pmp21-beschichteten Latexkügelchen...	137
Abbildung 4.17: Rekombinantes Pmp21 führt zu einer Rekrutierung und Aktivierung von EGFR.....	138
Abbildung 4.18: Internalisierung von PmpD-beschichteten Latexkügelchen.....	141
Abbildung 4.19: PmpD interagiert im Gegensatz zu Pmp21 nicht mit EGFR. ....	142
Abbildung 4.20: Patientenseren zeigen unterschiedliche Reaktivität gegen <i>C. pneumoniae</i> Pmps.	144
Abbildung 4.21: Polyklonale Pmp-Antikörper zeigen eine spezifische Detektion von Vollängen-Pmps und prozessierten Pmp-Fragmenten im Westernblot.....	146
Abbildung 4.22: <i>C. pneumoniae</i> Pmps weisen eine differenzielle Expression auf. ....	149
Abbildung 4.23: Detektion von Pmp-Fragmenten in löslichen und unlöslichen Fraktionen von <i>C. pneumoniae</i> infizierten HEp-2 Zellen.....	152
Abbildung 4.24: Detergenzienbehandlung von <i>C. pneumoniae</i> EBs. ....	155
Abbildung 4.25: M-Pmp21 interagiert mit sich selbst und mit N-Pmp21 in Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen.....	156
Abbildung 4.26: Untersuchung von Pmp-Pmp-Interaktionen mittels Far-Westernblot. ....	157
Abbildung 4.27: Co-Immunpräzipitation von rekombinanten <i>C. pneumoniae</i> Pmps.....	159
Abbildung 4.28: Co-Immunpräzipitation zum Nachweis von Pmp-Pmp-Interaktionen <i>in vivo</i> . ....	161
Abbildung 4.29: Strukturvorhersage für Pmps mittels Phyre und BetaWrapPro. ....	164
Abbildung 4.30: M-Pmp21 bzw. M-Pmp21-haltige Pmp21-Fragmente lokalisieren auf der chlamydialen Oberfläche während der Infektion. ....	166
Abbildung 4.31: Analyse der Expression, Lokalisation und Bedeutung von N-Pmp21 für die Infektion.....	168
Abbildung 4.32: N-Pmp21 zeigt eine partielle Lokalisation auf fadenartigen Strukturen. ....	170
Abbildung 4.33: Komponenten der chlamydialen Außenmembran lokalisieren partiell auf Fibern. ....	172
Abbildung 4.34: Potentielle Interaktion von M-Pmp21 mit intrazellulären humanen Proteinen. ....	173
Abbildung 5.1: Sekretierte Proteine mit adhäsiven Eigenschaften und einer signifikanten Anzahl an GGA(I,L,V), GGAX bzw. FxxN Motiven.....	179
Abbildung 5.2: Modell der Pmp21/EGFR-aktivierten Signalwege während der Adhäsion und Internalisierung von <i>C. pneumoniae</i> EBs. ....	188
Abbildung 5.3: Unterschiedliche Lokalisation des RGD-Motivs in PmpD und Pertactin.....	193
Abbildung 5.4: Übersicht über die differenzielle Expression der Pmps in drei <i>Chlamydia</i> Spezies.....	199

---

Abbildung 5.5: Das Verhältnis von Gen-Anzahl und Phänotyp-Anzahl in der Phasen Variation.....	200
Abbildung 5.6: Potentielle Oligomerisierung von chlamydialen Pmps. ....	203
Abbildung 6.1: Aminosäureidentitäten der Vollängen-Pmps von <i>C. pneumoniae</i> CWL029 und <i>C. trachomatis</i> Serovar E/150. ....	206
Abbildung 6.2: Alle Pmps von <i>C. pneumoniae</i> und <i>C. trachomatis</i> weisen eine $\beta$ -helikale Kernstruktur in der Passagierdomäne auf.....	207
Abbildung 6.3: Der Cystein-Gehalt der Pmps und anderer chlamydialer Proteine.....	208
Abbildung 6.4: Bioinformatrische Vorhersage von NLS-Motiven in PmpD und Pmp21....	208

## Danksagung

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

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

Ein großes Dankeschön gilt auch Herrn Prof. Dr. R. Wagner für die bereitwillige Übernahme des Korreferats.

Dr. Katja Mölleken gilt ein besonderer Dank für die Einführung in die komplexe Welt der Chlamydien und ihre ständige Diskussionsbereitschaft bei Fragen und Problemen jeglicher Art. Ihre Ideen und Anregungen trugen maßgeblich zum Gelingen nicht nur dieser Arbeit, sondern der vieler Doktorandengenerationen bei.

Der gesamten Arbeitsgruppe im „Chlamydienlabor“ (Tim, Sonja, Rafat und Jan) und im „Hefelabor“ (Frauke, Boris, Sandra, Astrid, Steffi, Sebastian und Sören) danke ich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die vielen außeruniversitären Unternehmungen. Nicht zu vergessen, danke ich auch unserem Nachbarlabor (Visnja, Boris, Marcus und Eva) für den Einblick in die Pombe-Welt und Klaus Meyer für die Unterstützung am FACS-Gerät. Ich möchte mich hiermit für die schöne Zeit bedanken und wünsche euch alles Gute für eure Zukunft.

Ein großer Dank gilt allen Beteiligten der MOI-Graduiertenschule, insbesondere der Koordinatorin Dr. Inge Krümpelbeck, für die abwechslungsreiche Gestaltung der promotionsbegleitenden Veranstaltungen. Ich habe im Rahmen dieser Aktivitäten viel gelernt, vor allem dass es manchmal sehr wichtig ist, über den Tellerrand zu schauen.

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich dafür, dass sie immer für mich da waren und mich bei meinen beruflichen Entscheidungen unterstützt haben. Zum Schluss möchte ich mich bei meinem Freund Christian bedanken. Danke für deine unendliche Geduld und Liebe und dass du immer an mich glaubst.

## Eidesstattliche Erklärung

Düsseldorf, Mai 2013

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.



Elisabeth Becker