

**Charakterisierung der potentiellen Effektorproteine  
CPn0043, CPn0072 und CPn1054 aus *Chlamydia  
pneumoniae***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Sandra Vergin**

aus Herne

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

Koreferent: Prof. Dr. Eckhard Lammert

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2013

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserum Albumin
bzw	beziehungsweise
C-	Carboxy-
ca.	zirka
cm	Zentimeter
cOMC	chlamydialer Außenmembrankomplex
CPAF	<i>chlamydial protease/proteasome-like activity factor</i>
CRL	Cullin-RING Ubiquitin-Ligase
CSN	COP9 Signalosom
deion.	deionisiert
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
(DNA-) BD	(DNA-) Bindedomäne
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
EB	Elementarkörperchen ( <i>elementary body</i> )
ER	Endoplasmatisches Retikulum

et al.	und andere
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
hpi	Stunde(n) nach der Infektion ( <i>hours post infection</i> )
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
L	Liter
LGV	Lymphogranuloma Venereum
M	molar
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimolar
mm	Millimeter
modif.	modifiziert
MOI	Multiplizität der Infektion ( <i>multiplicity of infection</i> )
MOMP	<i>major outer membrane protein</i>
N-	Amino-
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PBS	physiologischer Phosphatpuffer
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PFA	para-Formaldehyd

RB	Retikularkörperchen ( <i>reticulate body</i> )
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
sog.	sogenannt
TTSS	Typ III-Sekretionssystem
U	Einheiten (Units)
u. a.	unter anderem
unpubl.	unpubliziert
Upm	Umdrehungen pro min
üN	über Nacht
$\mu\text{M}$	micromolar
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer

## Zusammenfassung

Chlamydien sind Gram-negative, obligat intrazelluläre Bakterien, die akute und chronische Erkrankungen bei Menschen und Tieren auslösen können. Die bedeutendsten humanpathogenen Erreger sind *Chlamydia (C.) trachomatis* und *C. pneumoniae*, aber auch für andere Spezies wie *C. psittaci* oder *C. abortus*, die primär Tiere als Wirt haben, ist eine Übertragung auf den Menschen beschrieben worden. Eine Infektion mit *C. trachomatis* führt in Abhängigkeit vom betreffenden Serovar zu Erkrankungen des Urogenitaltrakts oder zu einer chronischen Bindehautentzündung (Trachom), die bei Nichtbehandlung in einer Erblindung resultieren kann. *C. pneumoniae* infiziert die Atemwege und löst eine Pneumonie, Bronchitis oder Sinusitis aus. Zudem werden chronische Erkrankungen wie Asthma oder Atherosklerose mit einer *C. pneumoniae*-Infektion in Verbindung gebracht.

Der chlamydiale Entwicklungszyklus läuft vollständig innerhalb der eukaryotischen Wirtszelle ab, wobei die Bakterien über den gesamten Zeitraum hinweg innerhalb einer der Wirtszellmembran entstammenden Vakuole verbleiben, die als Inklusion bezeichnet wird. Durch die Manipulation von Wirtszellprozessen mittels sogenannter Effektorproteine, die ins Wirtszellzytosol sekretiert werden, schaffen die Bakterien eine für ihre Entwicklung optimale Umgebung. Da Chlamydien genetisch nicht manipulierbar sind, stellt die Identifizierung neuer Effektorproteine eine Herausforderung dar. Durch Nutzung des eukaryotischen Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) können beispielsweise chlamydiale Proteine identifiziert werden, welche grundlegende, zwischen der Hefezelle und der Humanzelle konservierte zelluläre Strukturen oder Signalwege beeinflussen und daher zu einem Wachstumsdefekt in Hefe führen. In einem in *S. cerevisiae* durchgeführten genomweiten Screen nach potentiellen neuen Effektoren konnten im Vorfeld zu dieser Arbeit 47 chlamydiale Proteine identifiziert werden, von denen drei im Rahmen der vorliegenden Dissertation weitergehend charakterisiert wurden.

Für das *Chlamydia*-spezifische, hypothetische Protein CPn0072 konnte unter Nutzung eines polyklonalen Antikörpers zu verschiedenen Infektionszeitpunkten eine Inklusionsmembran-assoziierte Lokalisation beobachtet werden. Dieses Ergebnis bestätigt bioinformatische Vorhersagen, nach denen CPn0072 sekretiert wird und es sich bei dem Protein um ein potentielles Inklusionsmembranprotein (Inc-Protein) handelt. Durch differentielle Permeabilisierung infizierter Zellen zeigte sich, dass CPn0072 von der zytosolischen Seite der Wirtszelle her zugänglich ist, wodurch es potentiell mit Wirtszellproteinen interagieren und eine Effektorfunktion ausüben könnte. Die Suche nach putativen humanen CPn0072-Interaktionspartnern unter Nutzung des Hefe-Zwei-Hybrid Systems und einer humanen cDNA-Bank lieferte vier Kandidaten, u. a. einen putativen Zink-Transporter. Es zeigte sich, dass CPn0072 über seinen Amino-Terminus mit dem Zink-Transporter interagiert. Die biochemische Bestätigung dieser Interaktion steht allerdings noch aus.

CPn1054 sowie CPn0043 gehören derselben *C. pneumoniae*-spezifischen hypothetischen Proteinfamilie mit insgesamt 19 Mitgliedern an und werden bioinformatisch als Inc-Proteine vorhergesagt. CPn1054 konnte in der frühen Infektion assoziiert mit Bakterien detektiert werden, während sich in der späten Infektion die für Inc-Proteine charakteristische Inklusionsmembran-assoziierte Lokalisation zeigte. Diese Beobachtung muss jedoch noch bestätigt werden. Auch CPn1054 ist von der zytosolischen Seite der Wirtszelle aus zugänglich, was für eine Effektorfunktion spricht. Der Versuch, CPn0043 mit einem Peptid-Antikörper in infizierten Zellen zu detektieren, schlug fehl. Die Suche nach humanen CPn1054-Interaktionspartnern mittels eines Hefe-Zwei-Hybrid Screens identifizierte insgesamt 14 Kandidaten. Zwei dieser putativen Interaktionspartner, COPS4 und COPS6, stellen Untereinheiten eines Multiproteinkomplexes namens COP9 Signalosom dar. Diese beiden Kandidaten gingen ebenfalls eine Interaktion mit CPn0043 ein. Die Interaktionen der beiden COP9 Untereinheiten mit CPn1054 bzw. CPn0043 konnten biochemisch verifiziert werden. Im Fall von CPn1054 konnte die mit den beiden Untereinheiten interagierende Domäne auf den Mittelteil des Proteins eingegrenzt werden. Immunfluoreszenz-Analysen ergaben keine eindeutigen Hinweise auf eine Wechselwirkung zwischen Chlamydien und dem COP9 Signalosom. Hingegen zeigten erste biochemische Analysen signifikante Veränderungen in der Expression von vier Untereinheiten des Komplexes im Verlauf einer Chlamydieninfektion, was zukünftig weiter abgeklärt werden muss. Das Proteinniveau von COPS1, COPS6 sowie COPS7 sank ab, während die COPS5-Expression deutlich anstieg. Da das COP9 Signalosom an vielen zellulären Signalwegen beteiligt ist, könnten über eine Beeinflussung dieses Komplexes diverse Abläufe innerhalb der infizierten Wirtszelle manipuliert werden, beispielsweise die Regulation des Proteinabbaus oder die Zellproliferation.

## Summary

Chlamydiae are Gram-negative and obligate intracellular bacteria which can cause mild but also serious infections in animals and humans. *Chlamydia (C.) trachomatis* and *C. pneumoniae* are the most important human pathogens among the chlamydiae, although other species like *C. psittaci* or *C. abortus* have been reported to be transmissible to humans. A *C. trachomatis* infection leads to an inflammation of the eye (trachoma) or to urogenital tract diseases, depending on the serovar. *C. pneumoniae* on the other hand causes pneumonia, bronchitis or sinusitis and has also been linked to chronic diseases like atherosclerosis or asthma.

During their strictly intracellular replication cycle chlamydiae reside inside a host membrane-derived vacuole termed the inclusion. By secreting so-called effector proteins into the host

cytosol and thereby manipulating host cell functions, the bacteria create a favourable environment allowing their development to proceed. The identification of new chlamydial effector proteins is hampered by the fact that the bacteria are genetically intractable. One approach to circumvent this problem is the use of eukaryotic model organisms like the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Given the fact that many cellular structures and processes are conserved from yeast to human, one can assume that chlamydial proteins affecting yeast growth also cause an effect in human cells and therefore represent possible effector proteins. In a previously conducted genome-wide screen in *S. cerevisiae*, 47 potential new effector proteins of *C. pneumoniae* could be identified. Three of these candidates were further characterized in the course of the present work.

The *Chlamydia*-specific hypothetical protein CPn0072 displayed an inclusion membrane-associated localization when detected in the infection via polyclonal antibodies. This is in agreement with bioinformatical predictions stating that CPn0072 is secreted via the Type III secretion system (TTSS) and that it represents a putative inclusion membrane protein (Inc protein). Furthermore, CPn0072 was accessible to antibodies from the cytosolic side of the host cell indicating that it may get in contact with host proteins. A search for possible human CPn0072 interaction partners via a yeast two-hybrid screen yielded four candidates, among them a putative zinc transporter. It could be shown that the interaction with this transporter is mediated by the CPn0072 amino terminus. The interaction awaits biochemical verification.

CPn1054 and CPn0043 are both members of the *C. pneumoniae*-specific hypothetical CPn1054 protein family and each represent a potential Inc protein. By using specific antisera, CPn1054 could be detected in association with bacteria early in the infection, while it displayed an Inc protein-like staining at later time points. This observation awaits verification. Furthermore, part of CPn1054 has been shown to be in contact with the host cytosol indicating an effector function of the protein. Antibodies generated against CPn0043 failed to detect the protein in infected cells. A yeast two-hybrid screen could identify 14 potential human interaction partners of CPn1054. Two of these, COPS4 and COPS6, are subunits of a multiprotein complex designated the COP9 signalosome. Besides the interaction with CPn1054, both subunits also showed an interaction with CPn0043. In the case of CPn1054, the interacting region could be mapped to the central part of the protein. While immunofluorescence analyses did not clearly hint at a connection between chlamydiae and the signalosome, preliminary biochemical analyses detected significant changes in the expression levels of several COP9 subunits during chlamydial infection. The expression levels of COPS1, COPS6 and COPS7 decreased whereas in contrast to that an increased expression of COPS5 could be detected. As the signalosome is a multifunctional complex, the bacteria could manipulate many different processes by interfering with its expression level, like for example protein degradation or the cell cycle.

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	I
Zusammenfassung.....	IV
Summary .....	V
Inhaltsverzeichnis.....	VII
1. Einleitung.....	- 1 -
1.1 Taxonomie der Chlamydien.....	- 1 -
1.2 Chlamydien-verursachte Erkrankungen .....	- 2 -
1.3 Der chlamydiale Entwicklungszyklus.....	- 3 -
1.3.1 Adhäsion und Internalisierung von Elementarkörperchen .....	- 5 -
1.3.2 Intrazelluläre Phase der Replikation.....	- 6 -
1.3.3 Redifferenzierung und Freisetzung infektiöser Elementarkörperchen.....	- 8 -
1.4 Interaktion von Pathogenen mit der Wirtszelle .....	- 9 -
1.4.1 Bakterielle Sekretionssysteme .....	- 9 -
1.4.2 Das chlamydiale Typ III-Sekretionssystem .....	- 12 -
1.4.3 Chlamydiale Effektorproteine .....	- 13 -
1.4.3.1 Wirtszellzytosol-lokalisierte Effektorproteine.....	- 13 -
1.4.3.2 Die Inklusionsmembran- (Inc-) Proteine .....	- 16 -
1.4.4 Methoden zur Identifizierung chlamydialer Effektorproteine .....	- 18 -
1.5 CPn0043, CPn0072 und CPn1054 sind potentielle chlamydiale Effektorproteine.....	- 19 -
1.5.1 CPn0072 ist ein hypothetisches, <i>Chlamydia</i> -spezifisches Protein .....	- 19 -
1.5.2 CPn0043 und CPn1054 sind Mitglieder einer <i>Chlamydia pneumoniae</i> -spezifischen, hypothetischen Proteinfamilie .....	- 20 -
1.6 Das COP9 Signalosom ist ein multifunktionseller Proteinkomplex .....	- 23 -
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit .....	- 25 -
2. Materialien .....	- 26 -
2.1 Gebrauchsmaterial .....	- 26 -

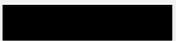
2.2 Chemikalien .....	- 26 -
2.3 Geräte .....	- 30 -
2.4 Enzyme .....	- 31 -
2.4.1 Restriktionsenzyme .....	- 31 -
2.4.2 weitere Enzyme .....	- 31 -
2.5 Fluoreszenzfarbstoffe .....	- 32 -
2.6 Antikörper .....	- 32 -
2.6.1 Primärantikörper .....	- 32 -
2.6.2 Sekundärantikörper .....	- 33 -
2.7 Kits .....	- 33 -
2.8 Größenstandards .....	- 33 -
2.8.1 DNA-Größenstandard .....	- 33 -
2.8.2 Protein-Größenstandard .....	- 34 -
2.9 Oligonukleotide .....	- 34 -
2.9.1 Oligonukleotide zur Klonierung .....	- 34 -
2.9.2 Oligonukleotide zur Sequenzierung .....	- 36 -
2.10 Plasmide .....	- 37 -
2.10.1 Ursprungsplasmide .....	- 37 -
2.10.2 klonierte Plasmide .....	- 38 -
2.11 Zellen und Zelllinien .....	- 40 -
2.11.1 Prokaryoten .....	- 40 -
2.11.2 Eukaryoten .....	- 40 -
2.12 Medien und Medienzusätze .....	- 41 -
2.12.1 Medien für <i>Escherichia coli</i> .....	- 41 -
2.12.2 Medien für <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	- 41 -
2.12.3 Zellkulturmedien .....	- 43 -

3. Methoden.....	- 44 -
3.1 Kultivierung und Manipulation von <i>Escherichia coli</i> .....	- 44 -
3.1.1 Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	- 44 -
3.1.2 Ein-Minuten-Transformation .....	- 44 -
3.1.3 Transformation durch Elektroporation .....	- 45 -
3.1.4 Plasmid-Minipräparation.....	- 45 -
3.1.5 Plasmid-Midipräparation.....	- 46 -
3.2 Kultivierung und Manipulation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	- 46 -
3.2.1 Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	- 46 -
3.2.2 Homologe Rekombination in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	- 47 -
3.2.3 Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	- 47 -
3.2.4 Hefe-Zwei-Hybrid Screen.....	- 48 -
3.2.5 Serieller Verdünnungstropftest.....	- 51 -
3.2.6 Gewinnung von Proteinlysate aus Hefekulturen .....	- 51 -
3.2.7 Vorbereitung von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen für die Mikroskopie.....	- 52 -
3.3 Zellbiologische Methoden .....	- 53 -
3.3.1 Kultivierung von Humanzellen in der Zellkultur .....	- 53 -
3.3.1.1 Herstellung aller Lösungen für die Zellkultur .....	- 53 -
3.3.1.2 Herstellung des Zellkulturmediums.....	- 53 -
3.3.1.3 Passagieren von adhärenen Humanzellen .....	- 54 -
3.3.1.3.1 Ablösen von adhärenen Humanzellen durch Trypsinbehandlung.....	- 54 -
3.3.1.3.2 Passage von adhärenen Humanzellen in Zellkulturflaschen.....	- 54 -
3.3.1.3.3 Passage von adhärenen Humanzellen in Gewebekulturplatten.....	- 54 -
3.3.1.4 Transfektion von adhärenen Humanzellen.....	- 55 -
3.3.1.5 Aktin-Färbung transfizierter Humanzellen .....	- 55 -
3.3.2 Chlamydienkultur .....	- 56 -

3.3.2.1 Herstellung des Chlamydienkultur-Mediums.....	- 56 -
3.3.2.2 Passage von Chlamydien in Gewebekulturplatten.....	- 56 -
3.3.2.3 Passage von Chlamydien in kleinen Zellkulturflaschen.....	- 56 -
3.3.2.4 Detektion chlamydialer Proteine mittels indirekter Immunfluoreszenz.....	- 57 -
3.3.2.5 Gewinnung von Gesamt-Proteinlysat aus infizierten Humanzellen.....	- 58 -
3.3.3 Test auf Kontamination durch <i>Mycoplasma</i> sp.....	- 58 -
3.4 Molekularbiologische Methoden .....	- 59 -
3.4.1 Restriktionsspaltung von DNA.....	- 59 -
3.4.2 PCR zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten für homologe Rekombination.....	- 60 -
3.4.3 PCR auf Hefezellen .....	- 61 -
3.4.4 Agarose-Gelelektrophorese .....	- 61 -
3.4.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel.....	- 62 -
3.4.6 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	- 62 -
3.4.7 DNA-Sequenzierung .....	- 62 -
3.5 Biochemische Methoden.....	- 62 -
3.5.1 Induktion der Genexpression in <i>E. coli</i> .....	- 62 -
3.5.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen .....	- 62 -
3.5.2.1 Aufarbeitung des Pellets aus einer 1 L Induktionskultur.....	- 62 -
3.5.2.2 Aufreinigung von Proteinen über den 6x Histidin-Rest.....	- 63 -
3.5.3 Dialyse von Proteinen.....	- 63 -
3.5.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels Bradford-Reagenz.....	- 63 -
3.5.5 Vorbereitung von Proben für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	- 64 -
3.5.6 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	- 64 -
3.5.6.1 Herstellung des Polyacrylamidgels.....	- 65 -
3.5.6.2 SDS-Gelelektrophorese .....	- 65 -
3.5.7 Färben eines Proteingels mit Coomassie Brilliantblau.....	- 66 -

3.5.8 Western Blot.....	- 66 -
3.5.8.1 Transfer der Proteine auf eine Membran .....	- 66 -
3.5.8.2 Antikörperreaktion auf der Membran .....	- 66 -
3.5.8.3 Detektion mittels Alkalischer Phosphatase .....	- 67 -
3.5.8.4 Detektion mittels Peroxidase .....	- 67 -
3.5.9 Far Western Blot.....	- 67 -
3.5.10 Ko-Immunpräzipitation .....	- 68 -
3.5.11 Aufreinigung polyklonaler Antikörperseren gegen säulengebundenes Antigen .....	- 69 -
3.5.12 Aufreinigung polyklonaler Antikörperseren gegen geblottetes Antigen .....	- 70 -
3.5.13 Abreicherung polyklonaler Antikörperseren gegen fixierte HEp2-Zellen .....	- 71 -
3.5.14 Test der Spezifität polyklonaler Antikörperseren .....	- 71 -
4. Ergebnisse.....	- 73 -
4.1 CPn0072.....	- 73 -
4.1.1 CPn0072 zeigt in der Infektion eine Inklusionsmembran-assoziierte Lokalisation und ist Wirtszellzytosol-exponiert.....	- 74 -
4.1.2 Identifizierung putativer CPn0072-Interaktionspartner mittels eines Hefe-Zwei-Hybrid Screens .....	- 79 -
4.1.3 SLC30A9 ist ein potentieller CPn0072-Interaktionspartner .....	- 82 -
4.1.4 Der CPn0072 N-Terminus vermittelt die Interaktion mit SLC30A9.....	- 84 -
4.1.5 Die Interaktion zwischen CPn0072 und SLC30A9 muss bestätigt werden .....	- 85 -
4.2 CPn1054.....	- 87 -
4.2.1 Bioinformatische Analyse der CPn1054-Proteinfamilie .....	- 88 -
4.2.2 Antigengereinigte CPn1054-Antikörperseren zeigen keine guten Signale in Immunfluoreszenz-Analysen .....	- 91 -
4.2.3 CPn1054 zeigt in der Infektion möglicherweise eine Inklusionsmembran-assoziierte Lokalisation.....	- 94 -
4.2.4 CPn1054 ist Wirtszellzytosol-exponiert.....	- 98 -
4.2.5 CPn1054 geht keine Selbst-Interaktion ein .....	- 99 -

4.2.6 Identifizierung putativer CPn1054-Interaktionspartner mittels eines Hefe-Zwei-Hybrid Screens .....	- 100 -
4.2.7 CPn1054 zeigt im Hefe-Zwei-Hybrid System eine starke Interaktion mit COPS4 und COPS6. -	107 -
4.2.8 Der Mittelteil des CPn1054-Proteins vermittelt die Interaktion mit COPS4 und COPS6 -	109 -
4.2.9 Die Interaktion von CPn1054 mit COPS4 und COPS6 konnte biochemisch bestätigt werden -	111 -
4.2.10 Ektopisch exprimiertes COPS4 und COPS6 assoziieren möglicherweise mit der Inklusionsmembran.....	- 114 -
4.2.11 Endogenes COPS5 zeigt keine Assoziation mit der Inklusion.....	- 117 -
4.2.12 Die Expression von COP9 Signalosom-Untereinheiten ist verändert in <i>C. pneumoniae</i> -infizierten Humanzellen .....	- 118 -
4.3 CPn0043.....	- 120 -
4.3.1 CPn0043 zeigt ebenfalls eine Interaktion mit COPS4 und COPS6.....	- 121 -
4.3.2 Die Interaktion von CPn0043 mit COPS4 und COPS6 konnte biochemisch bestätigt werden -	122 -
4.3.3 CPn0043 zeigt in Hefe ein anderes Lokalisationsmuster als CPn1054.....	- 124 -
4.3.4 CPn0043 konnte in der Infektion mittels eines Peptidantikörpers nicht detektiert werden.. -	126 -
5. Diskussion.....	- 130 -
5.1 CPn0072 als potentielles Effektorprotein .....	- 130 -
5.1.1 Potentielle humane CPn0072-Interaktionspartner bleiben fraglich.....	- 132 -
5.2 Mitglieder der CPn1054-Proteinfamilie als potentielle Effektorproteine.....	- 136 -
5.2.1 CPn1054 besitzt mehrere putative humane Interaktionspartner.....	- 140 -
5.2.2 Das COP9 Signalosom ist ein mögliches Ziel chlamydialer Effektorproteine .....	- 141 -
5.2.3 Welche Auswirkungen könnte eine Manipulation des COP9 Signalosoms haben?.....	- 145 -
5.3 Modell.....	- 150 -
5.4 Ausblick.....	- 152 -
Literaturverzeichnis.....	- 153 -

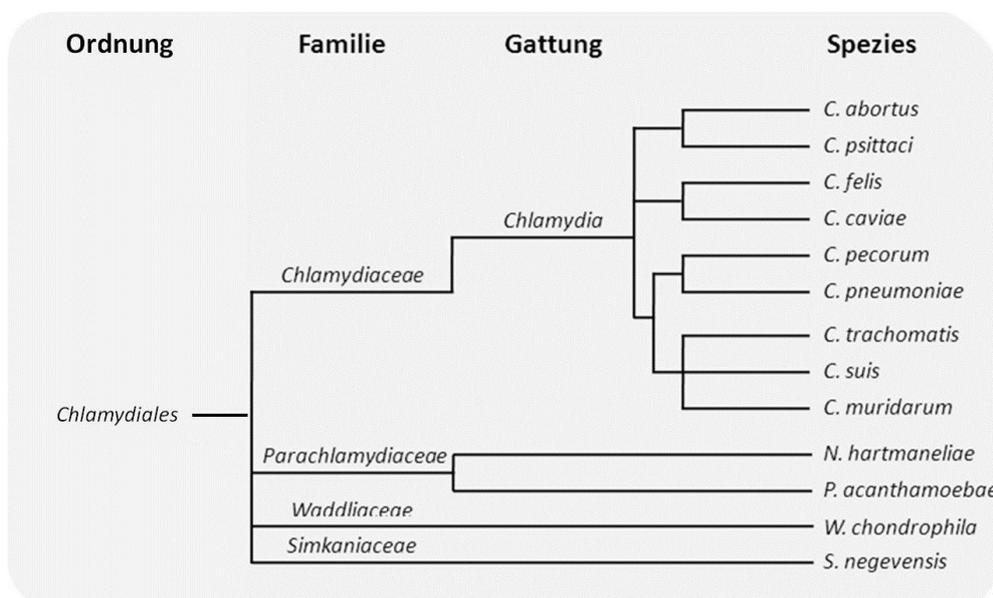


Abbildungsverzeichnis..... - 169 -  
Tabellenverzeichnis..... - 171 -  
Anhang ..... i

# 1. Einleitung

## 1.1 Taxonomie der Chlamydien

Bei den Chlamydien handelt es sich um Gram-negative Bakterien mit einem einzigartigen biphasischen Entwicklungszyklus. Aufgrund dieser Besonderheit wurden sie als eine eigene Ordnung, die *Chlamydiales*, klassifiziert (Storz & Page, 1971). Bis zum Jahr 1999 besaß die Ordnung *Chlamydiales* nur eine Familie, die *Chlamydiaceae*, sowie eine einzelne Gattung (*Chlamydia*) und vier Spezies (*Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* und *Chlamydia pecorum*). Basierend auf morphologischen Untersuchungen und der Analyse von rRNA-Sequenzen konnten noch weitere den *Chlamydiales* zuzuordnende Bakterien-Familien identifiziert werden: die *Parachlamydiaceae*, die *Waddliaceae* und die *Simkaniaceae* (Everett, Bush *et al.*, 1999; Rurangirwa, Dilbeck *et al.*, 1999). Des Weiteren erfolgte durch diese Autoren eine Aufspaltung der Gattung *Chlamydia* in *Chlamydia* und *Chlamydophila* mit der Addition weiterer Spezies (Everett, Bush *et al.*, 1999; Bush & Everett, 2001). Die Aufspaltung der *Chlamydia* in zwei Sub-Gattungen fand allerdings bei vielen Chlamydien-Forschern keine Akzeptanz, da sie nicht die Besonderheiten des chlamydialen Lebenszyklus berücksichtigt (Schachter, Stephens *et al.*, 2001). Um der Diskontinuität in der Taxonomie, hervorgerufen durch den parallelen Gebrauch beider Varianten in der Literatur, ein Ende zu setzen, forderten schließlich mehrere Wissenschaftler die Aufhebung dieser Einteilung (Stephens, Myers *et al.*, 2009; Greub, 2010). Die aktuell geltende Taxonomie der *Chlamydiales* ist in Abb. 1-1 dargestellt.



**Abb. 1-1: Taxonomie der Chlamydiales.**

Die Verbindungslinien spiegeln nicht die tatsächliche evolutionäre Distanz wider. Nach (Bush & Everett, 2001), modif. nach (Stephens, Myers *et al.*, 2009).

## 1.2 Chlamydien-verursachte Erkrankungen

Die Mitglieder der Gattung *Chlamydia* können Epithelzellen der Bindehaut, des Respirationstrakts sowie des Urogenitaltrakts, aber auch Makrophagen und Monozyten befallen und Infektionen beim Menschen und bei Tieren auslösen (Stratton & Sriram, 2003; Schauttet & Vanrompey, 2011). *Chlamydia psittaci* infiziert wild lebende und in Gefangenschaft lebende Vögel und löst eine sogenannte Psittakose aus. *C. psittaci* kann auf den Menschen übertragen werden und milde Grippe-ähnliche Symptome bis hin zu Pneumonie und Endokarditis zur Folge haben (Rodolakis & Mohamad, 2010). Häufig betroffen sind beispielsweise Mitarbeiter auf Geflügelfarmen, Tierärzte oder Menschen, die Vögel als Haustiere halten (Everett, 2000; Petrovay & Balla, 2008; Rodolakis & Mohamad, 2010). *Chlamydia abortus* infiziert Schafe, Ziegen und Kühe und führt bei diesen Tieren hauptsächlich zu Aborten. Ist eine Herde von Nutztieren mit *C. abortus* infiziert, so hat dies immense wirtschaftliche Schäden zur Folge (Kerr, Entrican *et al.*, 2005). Darüber hinaus können Infektionen auch auf den Menschen übertragen werden und Grippe-ähnliche Symptome oder Pneumonie auslösen. Schwangere, die mit *C. abortus* infiziert sind, sind dem Risiko einer Fehlgeburt ausgesetzt (Rodolakis & Mohamad, 2010). *Chlamydia felis*, das Hauskatzen infiziert, sowie *Chlamydia caviae*, das das Meerschwein als Wirt hat, verursachen das Auftreten von Konjunktivitis sowie Erkrankungen des Genitaltrakts (Everett, 2000). *Chlamydia pecorum* hat Wiederkäuer, Schweine und Koalas als Wirt; zu den Manifestationen einer Infektion zählen Konjunktivitis, Erkrankungen des Urogenitaltrakts und Unfruchtbarkeit (Fukushi & Hirai, 1992; Schauttet & Vanrompey, 2011). *C. felis*, *C. caviae* und *C. pecorum* werden als Spezies mit zoonotischem Potential betrachtet, wobei zur endgültigen Klärung noch weitere Studien notwendig sind (Rodolakis & Mohamad, 2010). *Chlamydia muridarum* infiziert kleine Nagetiere wie Mäuse und Hamster und löst Pneumonien aus, *Chlamydia suis* führt zu Pneumonien, Konjunktivitis und Aborten beim Schwein. Auch wenn einige der bisher genannten Spezies auf den Menschen übertragen werden können, so sind doch die bedeutenden humanpathogenen Erreger unter den Chlamydien *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydia pneumoniae*.

*Chlamydia trachomatis* wird in zwei humane Biovare unterteilt, den Biovar Trachoma sowie den Biovar LGV (Lymphogranuloma Venereum), welche wiederum jeweils mehrere Serovare beinhalten (Schachter & Caldwell, 1980). Die Serovare A-C bewirken das Auftreten von Trachomen (chronische Bindehautentzündung) und sind der Hauptverursacher von vermeidbarer Erblindung (Burton & Mabey, 2009). Während die Erkrankung in der industrialisierten Welt nahezu gar nicht mehr auftritt, ist sie endemisch in Ländern mit schlechten hygienischen Bedingungen, typischerweise Entwicklungsländern (Hu, Harding-Esch *et al.*, 2010). Die Serovare D-K werden sexuell übertragen und führen zu Erkrankungen des Urogenitaltrakts, beispielsweise Urethritis, Zervizitis oder Salpingitis (Vandahl, Birkelund *et al.*, 2004). Infektionen treten zumeist bei Jugendlichen im Alter zwischen 16 und 24 Jahren

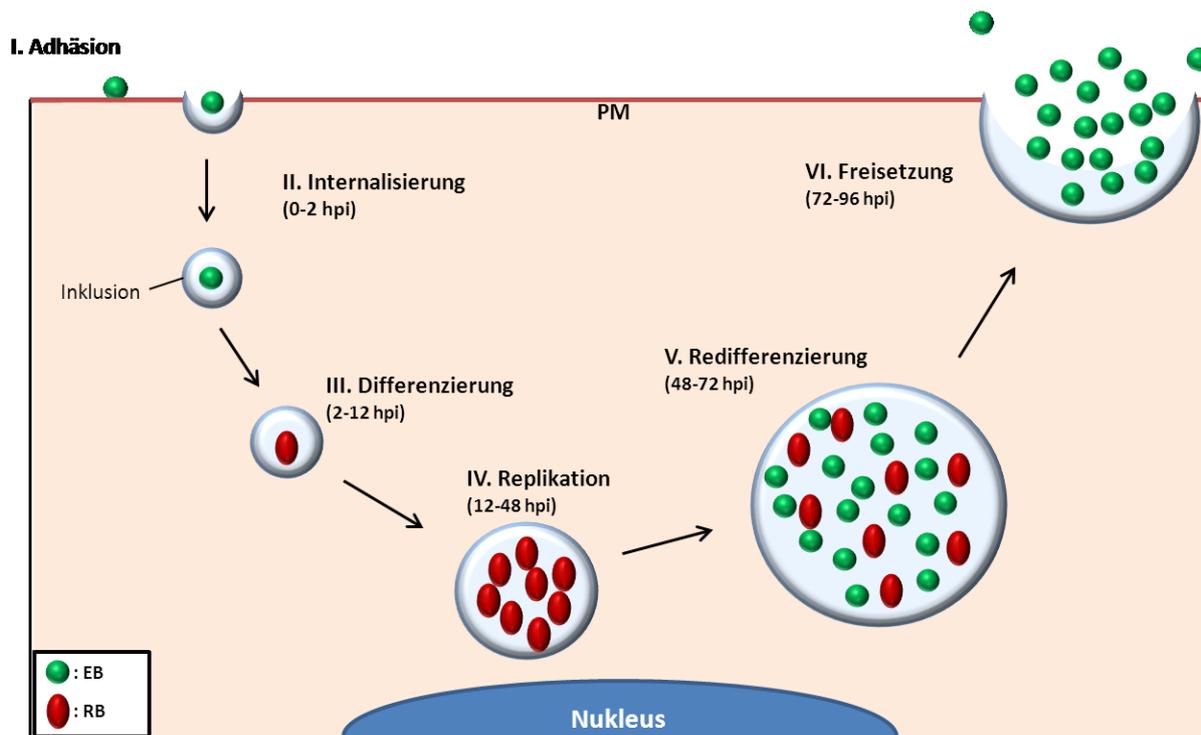
auf (Bébéar & de Barbeyrac, 2009). Eine asymptomatische und unbehandelte Infektion mit *C. trachomatis* D-K kann als Spätfolgen eine entzündliche Beckenerkrankung (*pelvic inflammatory disease*, PID), Eileiter- oder Bauchhöhlenschwangerschaften sowie Unfruchtbarkeit nach sich ziehen (Manavi, 2006). Bei *C. trachomatis*-Infektionen handelt es sich um die am häufigsten vorkommende bakterielle Ursache von sexuell übertragbaren Erkrankungen (Manavi, 2006). Die Serovare L1-L3 werden ebenfalls sexuell übertragen und lösen das sog. venerische Lymphgranulom (*Lymphogranuloma Venereum*, LGV) aus. Diese Serovare sind im Unterschied zu den Serovaren A-K invasiv und in der Lage, auf das lymphatische System überzugreifen und eine systemische Erkrankung auszulösen (Mabey & Peeling, 2002; Bébéar & de Barbeyrac, 2009). Lokal führen sie zur Zerstörung von Gewebe und zur Entstehung von Geschwüren (Mabey & Peeling, 2002). Neben den humanen *C. trachomatis* Biovaren gibt es zusätzlich noch den Biovar Nager, der aus Mäusen und Hamstern isoliert wurde.

*Chlamydia pneumoniae* kann eine Vielzahl von Zelltypen wie Epithelzellen der Lunge, Monozyten, Makrophagen, arterielle glatte Muskelzellen oder Endothelzellen des Blutgefäßsystems befallen (Hahn, Azenabor *et al.*, 2002; Belland, Oullette *et al.*, 2004). Eine Infektion verläuft in vielen Fällen asymptomatisch, kann jedoch auch mehr oder minder schwere Erkrankungen der oberen und unteren Atemwege auslösen (Hahn, Azenabor *et al.*, 2002). Es wird geschätzt, dass eine Chlamydien-Infektion verantwortlich für 10 % aller frei erworbenen Pneumonien und 5 % aller Bronchitis- und Sinusitis-Vorkommen ist (Grayston, 2000). *C. pneumoniae* wurde in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen, allerdings ist noch nicht geklärt, ob die Infektion Ursache für das Auftreten oder nur Folge dieser Krankheit ist (Belland, Oullette *et al.*, 2004). Eine *C. pneumoniae*-Infektion ist zudem mit dem Ausbruch bzw. dem Fortschreiten von Erkrankungen wie Asthma und Multipler Sklerose in Verbindung gebracht worden (Blasi, Tarsia & Aliberti, 2009; Stratton & Sriram, 2003). Infektionen treten zumeist im Kindes- oder Jugendalter auf, wie das Vorhandensein spezifischer Antikörper bei bis zu 50 % aller 20-Jährigen anzeigt. Mit zunehmendem Alter steigt der Anteil der Menschen, die seropositiv für *C. pneumoniae* sind, auf bis zu 80 % in der Gruppe der 65-Jährigen an (Grayston, 2000). Die hohe Durchseuchung der Bevölkerung wird auf eine Persistenz der Bakterien im Wirtsorganismus sowie auf häufige Reinfektionen zurückgeführt (Peeling & Brunham, 1996).

### 1.3 Der chlamydiale Entwicklungszyklus

Chlamydien besitzen einen einzigartigen biphasischen und obligat intrazellulären Entwicklungszyklus. Die Bakterien treten dabei in zwei unterschiedlichen morphologischen und funktionellen Formen auf: den infektiösen und metabolisch nicht aktiven Elementarkörperchen (*elementary bodies*, EBs) sowie den nicht infektiösen, metabolisch

aktiven Retikularkörperchen (*reticulate bodies*, RBs). Bei den RBs handelt es sich um die ausschließlich intrazellulär vorkommende, replikative Lebensform der Chlamydien, während EBs auch extrazellulär überdauern können. Der Infektionszyklus läuft wie in Abb. 1-2 dargestellt ab. Der Adhäsion eines EBs an die Wirtszelle folgt dessen Aufnahme oder Internalisierung innerhalb einer der Wirtszellmembran entstammenden Vakuole, die als Inklusion bezeichnet wird. Innerhalb der Inklusion findet die Differenzierung eines EBs zu einem metabolisch aktiven RB statt. Das Retikularkörperchen durchläuft mehrere Runden der Replikation durch Zellteilung, bis schließlich die Redifferenzierung der entstandenen RBs zu EBs einsetzt. Die Elementarkörperchen werden aus der Wirtszelle freigesetzt und können daraufhin neue Zellen infizieren. Die einzelnen Phasen des Entwicklungszyklus werden in den folgenden Unterkapiteln genauer betrachtet. Alle dort gemachten Zeitangaben beziehen sich auf den Lebenszyklus von *Chlamydia pneumoniae* (nach Wolf, Fischer *et al.*, 2000). Der Infektionszyklus von *Chlamydia trachomatis* ist vom Ablauf her identisch, vollzieht sich jedoch schneller und ist typischerweise nach 40-60 h beendet (Belland, Zhong *et al.*, 2003).



**Abb. 1-2: Überblick über den chlamydialen Entwicklungszyklus.**

Die Bakterien verbleiben während ihrer intrazellulären Vermehrung innerhalb der sog. Inklusion, die der Wirtszellmembran entstammt. Zeitangaben für *C. pneumoniae* nach (Wolf, Fischer *et al.*, 2000). PM: Plasmamembran EB: Elementarkörperchen RB: Retikularkörperchen.

### 1.3.1 Adhäsion und Internalisierung von Elementarkörperchen

Die infektiösen Elementarkörperchen besitzen einen Durchmesser von ca. 0,3 µm und sind gekennzeichnet durch ein stark kondensiertes Genom, vermittelt durch die Histon-ähnlichen Proteine HctA und HctB (AbdelRahman & Belland, 2005). Ein Charakteristikum der Chlamydien im Vergleich zu anderen Gram-negativen Bakterien ist die fehlende Peptidoglykanschicht in der äußeren Zellmembran, obgleich die Gene für die Peptidoglykanschicht im Chlamydien-Genom vorhanden und die Erreger Penicillin-sensitiv sind (Vandahl, Birkelund *et al.*, 2004). Die EBs erhalten ihre rigide Struktur, die für das extrazelluläre Überdauern notwendig ist, stattdessen durch die Vernetzung von Proteinen des äußeren Membrankomplexes (*Chlamydia outer membrane complex*, cOMC) über Disulfidbrücken (Vandahl, Birkelund *et al.*, 2004). Hieran sind hauptsächlich die Cystein-reichen Proteine MOMP (*major outer membrane protein*), OmcA (*outer membrane complex protein A*) und OmcB beteiligt (Newhall & Jones, 1983; Hatch, 1996).

Der erste Schritt im chlamydialen Infektionszyklus ist die Adhäsion eines EBs an die Wirtszelle. Dieser Prozess läuft vermutlich in zwei Stufen ab: zunächst findet eine reversible Bindung zwischen Bakterium und Humanzelle über elektrostatische Wechselwirkungen statt, bevor eine irreversible Interaktion mit einem oder mehreren Wirtszellrezeptoren eingegangen wird. Es konnte bereits einigen chlamydialen Proteinen eine Rolle im Adhäsionsprozess zugewiesen werden, weshalb diese Proteine auch als Adhäsine bezeichnet werden. Hierbei ist zu beachten, dass einige der an Adhäsion und/oder Internalisierung beteiligten chlamydialen Moleküle speziesspezifisch sind. MOMP aus *C. trachomatis*, das den höchsten Anteil aller Proteine des äußeren Membrankomplexes besitzt, geht elektrostatische Wechselwirkungen mit Heparansulfat-Proteoglykanen auf der Wirtszelloberfläche ein (Swanson & Kuo, 1994; Su, Raymond *et al.*, 1996). OmcB, das am zweithäufigsten vorkommende Protein des cOMC, bindet ebenfalls an Heparansulfat-Strukturen der Wirtszelle, was für *C. pneumoniae* sowie einzelne Serovare von *C. trachomatis* gezeigt werden konnte (Fadel & Eley, 2007; Moelleken & Hegemann, 2008). Mitglieder der polymorphen Membranprotein-Familie (*polymorphic membrane proteins*, pmp's) aus *C. pneumoniae* konnten als Adhäsine identifiziert werden (Wehrl, Brinkmann *et al.*, 2004; Moelleken, Schmidt & Hegemann, 2010; Elisabeth Becker, unpubl.). Außerdem konnten für das Chaperon GroEL1 aus *C. pneumoniae* und das Hitzeschockprotein Hsp70 von *C. trachomatis* eine Oberflächenlokalisation sowie adhäsive Eigenschaften nachgewiesen werden (Raulston, Davis *et al.*, 1993; Wuppermann, Moelleken *et al.*, 2008). Dr. Guido Murra aus unserer Arbeitsgruppe wies für die *C. pneumoniae*-Proteine CPn0677 und CPn0678 eine Rolle im Adhäsions- und Internalisierungsprozess nach (Guido Murra, 2010).

Einige Studien lieferten Hinweise auf mögliche Wirtszellrezeptoren, wobei wiederum verschiedene *Chlamydia*-Spezies unterschiedliche Rezeptoren nutzen. Heparansulfat-

Strukturen der Wirtszelle sind, wie bereits oben erwähnt, Bindungspartner für chlamydiale Proteine (Wuppermann, Hegemann & Jantos, 2001). Proteindisulfid-Isomerase (PDI), eine Komponente des Östrogenrezeptor-Komplexes, konnte assoziiert mit *C. trachomatis* EBs detektiert werden und scheint eine wichtige Rolle für den Adhäsionsprozess von *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* sowie *C. psittaci* zu spielen (Davis, Raulston *et al.*, 2002; Conant & Stephens, 2007). Zudem wird spekuliert, dass PDI durch ihre enzymatische Aktivität die Reduzierung der Disulfidbrücken des cOMC vermitteln könnte, was essentiell für eine erfolgreiche Internalisierung ist (Abromaitis & Stephens, 2009). Des Weiteren sind der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, der PDGFR (*platelet derived growth factor receptor*) und der Lektin-ähnliche LDL-Rezeptor (*low density lipoprotein*) in den Prozess der Adhäsion involviert (Puolakkainen, Kuo *et al.*, 2005; Elwell, Ceesay *et al.*, 2008; Campbell, Puolakkainen *et al.*, 2012). In unserer Arbeitsgruppe wurde der EGFR (*epidermal growth factor receptor*) als ein Rezeptor für Mitglieder der *C. pneumoniae* pmp-Familie identifiziert (Mölleken, Becker & Hegemann, 2013). Lipid-Mikrodomänen in der Wirtszellmembran, die reich an Cholesterin und Sphingolipiden sowie an Signaltransduktionsmolekülen sind, könnten ebenfalls eine Rolle bei der Adhäsion und Aufnahme eines Elementarkörperchens spielen. Diese Domänen konnten assoziiert mit an der Wirtszelle anhaftenden *C. trachomatis* EBs beobachtet werden, und ebenso in Assoziation mit *C. caviae* enthaltenden Inklusionen, nachdem die Internalisierung erfolgt ist (Jutras, Abrami *et al.*, 2003; Subtil, Wyplosz *et al.*, 2004). Möglicherweise befinden sich innerhalb der Mikrodomänen weitere, noch unidentifizierte Rezeptoren (Jutras, Abrami *et al.*, 2003).

Im Verlauf der Internalisierung modulieren Chlamydien das Aktin-Zytoskelett der Wirtszelle (Carabeo, Grieshaber *et al.*, 2002). Das in mehreren *Chlamydia*-Spezies konservierte Protein Tarp (*translocated actin-recruiting phosphoprotein*) wird bereits wenige Minuten nach der Adhäsion von den Bakterien in die Wirtszelle sekretiert, wo es die Rekrutierung von Aktin zu der Chlamydien-Eintrittsstelle bewirkt (Clifton, Fields *et al.*, 2004). Weiterhin konnte eine Rolle der GTPasen Rac und Cdc42, die für die Ausbildung und Organisation von Aktinfilamenten zuständig sind, im chlamydialen Internalisierungsprozess nachgewiesen werden, wobei Rac von mehreren *Chlamydia*-Spezies aktiviert wird, Cdc42 jedoch nur eine Rolle bei der Internalisierung von *C. psittaci* zu spielen scheint (Carabeo, Grieshaber *et al.*, 2004; Subtil, Wyplosz *et al.*, 2004). Die Zeitspanne von der Adhäsion eines Bakteriums an die Wirtszelle bis zur erfolgten Internalisierung beträgt ca. 2 h.

### 1.3.2 Intrazelluläre Phase der Replikation

Nach erfolgter Internalisierung wird die Inklusion entlang der Mikrotubuli zum Mikrotubuliorganisierenden Zentrum (*microtubule organizing center*, MTOC) transportiert, was im Fall von *C. trachomatis* in Abhängigkeit vom Motorprotein Dynein geschieht, und verbleibt in

einer perinukleären Region mit Nähe zum Golgi-Apparat (Clausen, Christiansen *et al.*, 1997; Grieshaber SS, Grieshaber NA *et al.*, 2003). Aufgrund fehlender endosomaler oder lysosomaler Marker kommt es zu keiner Fusion mit diesen Wirtszellkompartimenten und zu keiner Degradation der Chlamydien enthaltenden Vakuole. Innerhalb der Inklusion findet die Differenzierung des Elementarkörperchens zu einem Retikularkörperchen statt, die ca. 12 h nach Beginn der Infektion (*hours post infection*, hpi) abgeschlossen ist (Wolf, Fischer *et al.*, 2000). Das Retikularkörperchen ist mit einem Durchmesser von ca. 1 µm wesentlich größer als ein Elementarkörperchen und zeichnet sich durch ein dekondensiertes Genom und metabolische Aktivität aus (Wolf, Fischer *et al.*, 2000; Vandahl, Birkelund *et al.*, 2004).

Bereits ein paar Stunden nach Start der Infektion beginnt die Inklusionsmembran zu expandieren, einerseits durch den Einbau von Wirtszellmembran-Komponenten wie Lipiden und Cholesterin, andererseits durch die Insertion chlamydialer Proteine in die Inklusionsmembran (Inc-Proteine, siehe auch Kap. 1.4.3.2). Diese Expansion ist notwendig, um die steigende Anzahl an Bakterien aufnehmen zu können. Die Chlamydien haben dabei mehrere Wege zur Akquisition von Wirtszelllipiden entwickelt. So fangen die Bakterien Sphingomyelin sowie Cholesterin enthaltende Vesikel ab, die vom Golgi-Apparat zum Transport an die Wirtszellmembran abgegeben werden (Hackstadt, Rockey *et al.*, 1996; Wolf & Hackstadt, 2001; Carabeo, Mead *et al.*, 2003). Im Verlauf einer Infektion wird der Golgi-Apparat in sog. Golgi-Ministapel fragmentiert, die mit der Inklusion assoziieren (Heuer, Rejman Lipinski *et al.*, 2009). Es wird vermutet, dass auf diese Weise das Abfangen der Vesikel erleichtert wird. Eine Vorstufe von Sphingomyelin, Ceramid, wird durch Interaktion eines Proteins in der Inklusionsmembran mit dem Ceramid-Transferprotein CERT erhalten (Derré, Swiss *et al.*, 2011). Eine weitere Quelle für Shingomyelin stellen Multivesikularkörper (*multivesiculate bodies*, MVBs) dar. MVBs sind späte Endosomen mit intralumenalen Vesikeln, welche zum Abbau bestimmte Lipidkomponenten enthalten (Piper & Luzio, 2001). MVB-Markerproteine sind assoziiert mit der Inklusionsmembran sowie im Inklusionslumen detektiert worden (Beatty, 2006; 2008). Lipidtröpfchen sind Speicher für neutrale Lipide der Wirtszelle und werden als komplettes Organell in das Inklusionslumen aufgenommen (Kumar, Cocchiario *et al.*, 2006; Cocchiario, Kumar *et al.*, 2008). Glycerophospholipide werden nicht über Vesikel, sondern vermutlich über Membran-Membran-Kontaktstellen mit dem ER zur Inklusion und nachfolgend zu den Bakterien transportiert. Dort werden sie von den Chlamydien modifiziert und verwertet (Wylie, Hatch *et al.*, 1997).

Zusätzlich zu der Notwendigkeit, Nährstoffe von der Wirtszelle zu erhalten, müssen die Bakterien mit zellulären Signalwegen interferieren, die auf ihre Beseitigung ausgerichtet sind. So regulieren Chlamydien die Expression von MHC-Molekülen (*major histocompatibility complex*) der Klassen I und II herunter über die Degradation der entsprechenden Transkriptionsfaktoren RFX-5 (*regulatory factor X 5*) bzw. USF-1 (*upstream stimulation factor 1*) (Zhong, Fan *et al.*, 1999; Zhong, Liu *et al.*, 2000; Zhong, Fan *et al.*, 2001). MHC-

Moleküle sind zuständig für die Antigenpräsentation an T-Zellen im Verlauf der Immunantwort (Germain, 1995). Ein Verhindern der Wirtszellapoptose ist ebenfalls essentiell für Chlamydien, um ihren intrazellulären Replikationszyklus vollenden zu können. In infizierten Zellen ist die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und die nachfolgende sequentielle Aktivierung der Caspasen 9 und 3 – essentielle Schritte des intrinsischen Apoptosewegs – blockiert (Fan, Lu *et al.*, 1998). Nachfolgende Studien zeigten, dass proapoptotische BH3-only Proteine, welche die Mitochondrien permeabilisierenden Kanalproteine Bax und Bak aktivieren, direkt oder indirekt von einer chlamydialen Protease gespalten und somit inaktiviert werden (Fischer, Vier *et al.*, 2004; Dong, Pirbhai *et al.*, 2005; Ying, Seiffert *et al.*, 2005). Das BH3-only Protein Bad wird in seinem phosphorylierten, aktivierten Zustand an die Inklusionsmembran rekrutiert und damit von seinem Wirkort, dem Mitochondrium, ferngehalten (Verbeke, Welter-Stahl *et al.*, 2006). Auch die Induktion der Expression antiapoptotischer Proteine wie IAP-1 und -2 (*inhibitor of apoptosis*) könnten zur Apoptoseresistenz beitragen, wozu es jedoch widersprüchliche Erkenntnisse gibt (Rajalingam, Sharma *et al.*, 2006; Ying, Christian *et al.*, 2007).

### 1.3.3 Redifferenzierung und Freisetzung infektiöser Elementarkörperchen

Nach der Vermehrungsphase setzt in einem Zeitraum zwischen 36 hpi und 48 hpi die Redifferenzierung der Retikularkörperchen zu Elementarkörperchen ein, wobei es sich um einen asynchron ablaufenden Prozess handelt (Wolf, Fischer *et al.*, 2000). Das Signal, welches die Redifferenzierung auslöst, ist noch unbekannt. Im Verlauf dieses Prozesses werden verstärkt die cOMC-Proteine MOMP und OmcB exprimiert und das Genom wird wieder kondensiert (Mukhopadhyay, Good *et al.*, 2006). 72-84 hpi werden die infektiösen Bakterien aus der Wirtszelle freigesetzt. Dies geschieht entweder durch Lyse der Zelle oder aber durch Extrusion, d. h. die Abschnürung eines Teils der Inklusion, welcher durch Ausstülpung der Zellmembran ins extrazelluläre Milieu abgegeben wird. Der lytische Weg beinhaltet die sequentielle Auflösung der Inklusionsmembran, der Kernmembran und schließlich der Wirtszellmembran, was durch Proteasen vermittelt wird (Hybiske & Stephens, 2007). Der Prozess der Extrusion benötigt die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts sowie die Aktivität von Rho-GTPasen in der Phase der Abschnürung, die der Zytokinese ähnelt. Im Gegensatz zum lytischen Weg bleibt beim Extrusionsmechanismus eine intakte Wirtszelle zurück, die eine mit EBs angefüllte Inklusion beinhaltet (Hybiske & Stephens, 2007). Wie der eine oder andere Weg der Freisetzung gewählt und initiiert wird, ist ebenfalls noch ungeklärt.

## 1.4 Interaktion von Pathogenen mit der Wirtszelle

Für Chlamydien wie auch für andere pathogene Bakterien ist es essentiell, Interaktionen mit der Wirtszelle oder mit Proteinen des extrazellulären Milieus einzugehen, um eine Etablierung der Infektion und letztendlich eine erfolgreiche Vermehrung zu gewährleisten. Zu diesem Zweck wird von den Bakterien eine Reihe von Proteinen unter Nutzung verschiedener Sekretionssysteme sekretiert. Wie im vorherigen Kapitel bereits angeklungen ist, nehmen Chlamydien beispielsweise Nährstoffe aus der Wirtszelle auf oder bauen bestimmte Wirtszellmoleküle ab. Proteine, die zelluläre Abläufe zum Vorteil der Pathogene manipulieren, werden als Effektorproteine bezeichnet (Tseng, Tyler *et al.*, 2009).

### 1.4.1 Bakterielle Sekretionssysteme

Bis dato sind einige bakterielle Sekretionssysteme identifiziert und charakterisiert worden. Zwei allgemeine Sekretionswege, die in Bakterien sowie in Eukaryoten vorkommen, sind der sec-Sekretionsweg (*general secretion*) und der tat-Sekretionsweg (*twin-arginine translocation*). In diesen Systemen werden Proteine über eine einzelne Membran transportiert, entweder die Plasmamembran Gram-positiver Bakterien bzw. membranumschlossener Zellorganellen oder die innere Membran Gram-negativer Bakterien. Im Fall der sec-abhängigen Sekretion wird ein noch ungefaltetes Protein unter ATP-Verbrauch, im Fall der tat-abhängigen Sekretion ein bereits fertig gefaltetes Protein unter Verwendung eines Protonengradienten als Energiequelle transportiert (Tseng, Tyler *et al.*, 2009). Einige Sekretionssysteme Gram-negativer Bakterien sind von diesen beiden generellen Transportmechanismen abhängig, nämlich das Typ II-, Typ IV- und Typ V-Sekretionssystem sowie das Chaperon/Usher-System. In diesen Fällen wird zunächst das zu exportierende Protein mittels des sec- oder des tat-Wegs über die innere Membran ins Periplasma transloziert, wo es von Komponenten des entsprechenden Sekretionssystems in der äußeren Membran übernommen und ins extrazelluläre Milieu transportiert wird. Das Typ I-, Typ III- sowie Typ VI-Sekretionssystem Gram-negativer Bakterien sind sec- und tat-unabhängig, hier läuft die Sekretion in einem einzelnen Schritt ab (Beekman & Vanrompey, 2010).

Das Typ I-Sekretionssystem besteht aus drei Hauptkomponenten: einem ABC (*ATP-binding cassette*)-Transporter, Faktoren in der äußeren Membran (*outer membrane factors*, OMFs) sowie Membranfusionsproteinen (*membrane fusion proteins*, MFPs). Der ABC-Transporter stellt die Energie für den Transport bereit, während die OMFs eine Pore in der äußeren Membran bilden und die MFPs das Periplasma durchspannen und eine Verbindung von der inneren Membran zu den OMFs schaffen. Typische Substrate für das Typ I-Sekretionssystem sind Metalloproteasen oder Adhäsine von Pflanzen-Pathogenen (Tseng, Tyler *et al.*, 2009; Beekman & Vanrompey, 2010). Das Typ II-Sekretionssystem übernimmt wie bereits

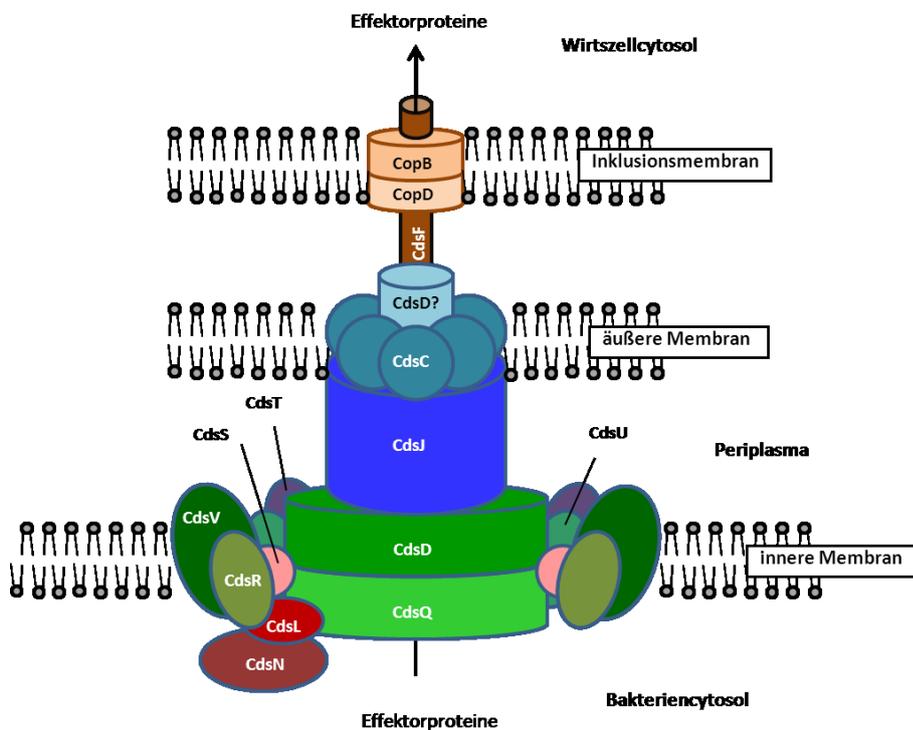
erwähnt seine Substrate vom sec- oder tat-Weg, nachdem diese die Proteine in das Periplasma transportiert haben. Komponenten des Typ II-Sekretionssystems, die sog. Sekretine, bilden eine Pore in der äußeren Membran, durch welche die Proteine in den extrazellulären Raum transloziert werden. Die Energie für den Transport wird von einer ATPase in der inneren Membran bereitgestellt. Beispiele für Typ II-sekretierte Proteine sind das Cholera-Toxin oder das Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa* (Filloux, 2004; Tseng, Tyler *et al.*, 2009; Beeckman & Vanrompey, 2010). Zudem besitzen die chlamydialen Proteine CPAF sowie Tsp/CT441, beides Proteasen, ein Typ II-Sekretionssignal (Valdivia, 2008). Bei dem Typ V-Sekretionssystem werden die Substrate zunächst sec-abhängig ins Periplasma transloziert, von wo aus sie autonom ihren Transport ins extrazelluläre Milieu bewerkstelligen (Jacob-Dubuisson, Fernandez *et al.*, 2004). Viele Proteine besitzen N-terminal eine sog. Passagierdomäne und C-terminal eine Domäne, die eine membran-durchspannende beta-Fass-Struktur ausbildet. Durch diese Struktur wird die Passagier-Domäne transloziert und bleibt anschließend entweder mit dem Carboxy-Terminus verbunden und somit membranverankert oder wird abgespalten (Jacob-Dubuisson, Fernandez *et al.*, 2004). Zusätzlich zu dieser Variante, die als Autotransport bezeichnet wird, sind zwei weitere entdeckt worden. In einem Fall assoziieren drei Proteine, um gemeinsam die beta-Fass-Struktur auszubilden; im zweiten Fall sind die Passagierdomäne und die beta-Fass-Domäne nicht auf einem einzigen Polypeptid vorhanden, sondern werden als zwei separate Proteine translatiert. Diese Variante wird auch als Zwei-Partner-Sekretion (*two partner secretion*, TPS) bezeichnet (Jacob-Dubuisson, Fernandez *et al.*, 2004; Tseng, Tyler *et al.*, 2009; Beeckman & Vanrompey, 2010). Mittels des Typ V-Sekretionssystems werden Adhäsine, Toxine oder Proteasen sekretiert. Zu den Substraten zählen auch Mitglieder der chlamydialen pmp-Familie, die über den Autotransporter-Mechanismus sekretiert werden (Jacob-Dubuisson, Fernandez *et al.*, 2004; Wehrl, Brinkmann *et al.*, 2004). Das *C. pneumoniae* pmp21 enthält in seiner Passagierdomäne, welche membranverankert bleibt, Tetrapeptid-Motive, die die Adhäsion an die Wirtszelle vermitteln (Moelleken, Schmidt & Hegemann, 2010). Der Chaperon/Usher (C/U)- Sekretionsweg ist ebenfalls abhängig von einer vorherigen Translozierung des zu sekretierenden Proteins ins Periplasma über den sec-Weg. Hier wird das Protein von einem Chaperon gebunden und an das sog. Usher-Protein in der äußeren Membran weitergeleitet, über das die Freisetzung ins extrazelluläre Milieu erfolgt (Beeckman & Vanrompey, 2010).

Die bakteriellen Sekretionssysteme vom Typ III, Typ IV und Typ VI transportieren ihre Substrate zusätzlich zur inneren und äußeren Bakterienmembran auch noch über die Plasmamembran der Wirtszelle. Das Typ IV-Sekretionssystem ist hierbei einzigartig in der Hinsicht, dass neben Proteinen auch Nukleinsäuren transportiert werden können. Für einige Substrate besteht eine Abhängigkeit vom sec-Weg, andere werden sec-unabhängig sekretiert. Die Energie für den Transport stammt aus der ATP-Hydrolyse (Beeckman &

Vanrompey, 2010; Tseng, Tyler *et al.*, 2009). Die fünf Untereinheiten des Pertussis-Toxins werden separat über das Typ IV-Sekretionssystem ins extrazelluläre Milieu transloziert. Nach Assemblierung der Untereinheiten bewirkt das funktionelle Toxin autonom die Sekretion seiner katalytischen Untereinheit in die Wirtszelle (Burns, 2003). Die Typ VI-Sekretionsmaschinerie besteht aus mehreren Einheiten des Hcp-Proteins (*hemolysin coregulated protein*), die einen hohlen Translokationskanal bilden, zudem aus VgrG-Proteinen (*valine-glycine repeat protein G*), welche in Trimer-Form an der Spitze des Kanals lokalisieren, und Proteinen in der inneren Membran, die als Plattform zur Assemblierung des Kanals dienen. Die Transportenergie stammt von einer assoziierten ATPase. Einige der VgrG-Proteine tragen C-terminale Verlängerungen, die bestimmte funktionelle Domänen enthalten, und können damit selbst als Effektoren innerhalb der Wirtszelle fungieren (Silverman, Brunet *et al.*, 2012). VgrG-1 aus *Vibrio cholerae* besitzt beispielsweise eine Aktin vernetzende Aktivität (Pukatzki, Ma *et al.*, 2007). Die Typ III-Sekretionsmaschinerie wird auch als Injektisom bezeichnet (Mota & Cornelis, 2005). Sie besteht aus einer Basis-Ringstruktur, die die innere sowie die äußere Bakterienmembran durchspannt, einer hohlen Nadelstruktur sowie einer Translokationspore an der Spitze der Nadel (Cornelis, 2006; Tseng, Tyler *et al.*, 2009). Das Sekretionssystem wird erst bei Kontakt mit der Wirtszelle aktiv, nachdem die Translokationspore in die Wirtszellmembran inseriert wurde, und transloziert daraufhin seine Substrate, die Effektorproteine, ins Wirtszellzytosol („kontaktabhängige Sekretion“) (Cornelis, 2006). Assoziiert mit dem Injektisom ist eine ATPase, die die Transportenergie bereitstellt (Tseng, Tyler *et al.*, 2009). Eine elegante Art der Anwendung des Typ III-Sekretionssystems haben enteropathogene *E. coli* (*enteropathogenic Escherichia coli*, EPEC) sowie enterohämorrhagische *E. coli* (*enterohemorrhagic Escherichia coli*, EHEC) entwickelt. Diese Bakterien injizieren ihren eigenen Rezeptor, Tir (*translocated intimin receptor*), in die Wirtszelle, wo er in die Plasmamembran inseriert wird und mit dem Protein Intimin auf der Bakterienoberfläche interagiert. Durch diese Interaktion werden in der Wirtszelle die Modulierung des Zytoskeletts und die Aufnahme der Bakterien ausgelöst (Kenny, DeVinney *et al.*, 1997; DeVinney, Stein *et al.*, 1999). Einige Pathogene besitzen mehr als ein Typ III-Sekretionssystem. *Salmonella* beispielsweise codiert zwei verschiedene Typ III-Sekretionssysteme (TTSS1 und TTSS2) auf zwei unterschiedlichen sog. Pathogenitätsinseln (*Salmonella Pathogenicity Island-1* bzw. -2, SPI-1/-2). Die Effektoren des TTSS1 spielen eine wichtige Rolle im Prozess der bakteriellen Invasion in die Wirtszelle, während diejenigen des TTSS2 essentiell für das intrazelluläre Überleben und die erfolgreiche Etablierung der Infektion sind (Agbor & McCormick, 2011). Im folgenden Kapitel findet sich eine detaillierte Beschreibung des chlamydialen Typ III-Sekretionsapparats.

### 1.4.2 Das chlamydiale Typ III-Sekretionssystem

Den ersten Hinweis auf das Vorhandensein eines Typ III-Sekretionssystems in Chlamydien lieferte die Identifizierung von chlamydialen Genen, welche Homologien zu Typ III-Sekretionselementen anderer Bakterien zeigten (Hsia, Pannekoek *et al.*, 1997). Weitere Analysen ergaben, dass in allen sequenzierten Genomen der *Chlamydiaceae* ein vollständiger Typ III-Sekretionsapparat codiert ist (Beeckman & Vanrompey, 2010). Basierend auf Homologien zu den Strukturproteinen des Typ III-Sekretionssystems aus *Yersinia* konnte ein Modell des chlamydialen Typ III-Injektisoms abgeleitet werden (Abb. 1-3).



**Abb. 1-3: Das chlamydiale Typ III-Injektisom.**

Das Modell basiert auf der Homologie chlamydialer Proteine zu Komponenten des Typ III-Sekretionsapparats aus *Yersinia*. Abb. modifiziert nach (Peters, Wilson *et al.*, 2007).

Die Ringstruktur in der inneren Membran bilden die Proteine CdsR – CdsV (contact development secretion), in die der sog. Basalkörper eingebettet ist. Dieser ist aufgebaut aus den in der inneren Membran verankerten Proteinen CdsQ und CdsD sowie aus dem das Periplasma durchspannenden Lipoprotein CdsJ (Peters, Wilson *et al.*, 2007; Beeckman & Vanrompey, 2010). Interessanterweise ist CdsD auch an der *C. trachomatis* EB-Oberfläche nachgewiesen worden (Tanzer & Hatch, 2001). CdsC bildet die Ringstruktur in der äußeren Membran (Peters, Wilson *et al.*, 2007; Beeckman & Vanrompey, 2010; Betts-Hampikian & Fields, 2010). Bei der Komponente, aus der die hohle Nadelstruktur aufgebaut ist, handelt es sich um CdsF (Betts, Twiggs *et al.*, 2008). Die Translokationspore, die in die Wirtszellmembran inseriert wird, setzt sich zusammen aus den Proteinen CopB und CopD

(Peters, Wilson *et al.*, 2007). CdsN ist die chlamydiale ATPase, welche die Energie für den Proteintransport bereitstellt. Sie ist im Zytosol lokalisiert, jedoch über Interaktionen mit Untereinheiten des Injektisoms mit der inneren Membran verbunden (Beeckman & Vanrompey, 2010). CdsL ist ein ATPase-Inhibitor und reguliert vermutlich die Aktivität des Typ III-Sekretionssystems (Peters, Wilson *et al.*, 2007).

Zusätzlich zu den Komponenten des Sekretionsapparats selbst gehören spezifische Chaperone zum Typ III-Sekretionssystem. Chaperone der Klasse I interagieren hierbei mit den Effektorproteinen und Chaperone der Klasse II mit den Proteinen der Translokationspore (Beeckman & Vanrompey, 2010). Anfänglich wurde vermutet, dass Chlamydien erst nach der Differenzierung in ein Retikularkörperchen Proteine über das Typ III-Sekretionssystem translozieren, da erst in diesem Stadium die metabolische Aktivität einsetzt (Hsia, Pannekoek *et al.*, 1997). Später wurde jedoch die Hypothese aufgestellt, dass das chlamydiale Injektisom gegen Ende des Entwicklungszyklus an der EB-Oberfläche assembliert und mit Effektorproteinen „geladen“ wird, die eine Rolle in der frühen Phase des neuen Infektionszyklus spielen, wie beispielsweise bei der Internalisierung von Elementarkörperchen (Fields, Mead *et al.*, 2003).

Während die strukturellen Komponenten des Typ III-Sekretionssystems zwischen verschiedenen Bakterien recht gut konserviert sind, ist die Identifizierung der zugehörigen Substrate um einiges schwieriger, da hier so gut wie keine konservierten charakteristischen Merkmale und auch keine spezifische Signalsequenz vorhanden sind (Beeckman & Vanrompey, 2010). Einen Überblick über einige bekannte chlamydiale Effektorproteine und ihre Funktionen gibt das folgende Unterkapitel.

### **1.4.3 Chlamydiale Effektorproteine**

#### **1.4.3.1 Wirtszellzytosol-lokalisierte Effektorproteine**

Während der Internalisierung von Elementarkörperchen kommt es zur Modulierung des Aktin-Zytoskeletts an der Chlamydien-Eintrittsstelle (Carabeo, Grieshaber *et al.*, 2002). Es hat sich gezeigt, dass das bakterielle Protein Tarp (*translocated actin-recruiting phosphoprotein*) an dieser Modulierung beteiligt ist. Tarp von *C. trachomatis* wird bereits kurze Zeit nach der Adhäsion Typ III-abhängig in die Wirtszelle sekretiert und dort von Wirtszellkinasen phosphoryliert (Clifton, Fields *et al.*, 2004; Jewett, Dooley *et al.*, 2008; Elwell, Ceesay *et al.*, 2008). Phosphoryliertes Tarp rekrutiert GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*), welche die Rho-GTPase Rac aktivieren; diese wiederum rekrutiert Aktin-bindende Adaptermoleküle wie WAVE2 und führt zur Aktivierung des Arp2/3-Komplexes, der neue Aktinfilamente synthetisiert (Carabeo, Dooley *et al.*, 2007; Lane, Mutchler *et al.*, 2008). Die Tarp-Homologe

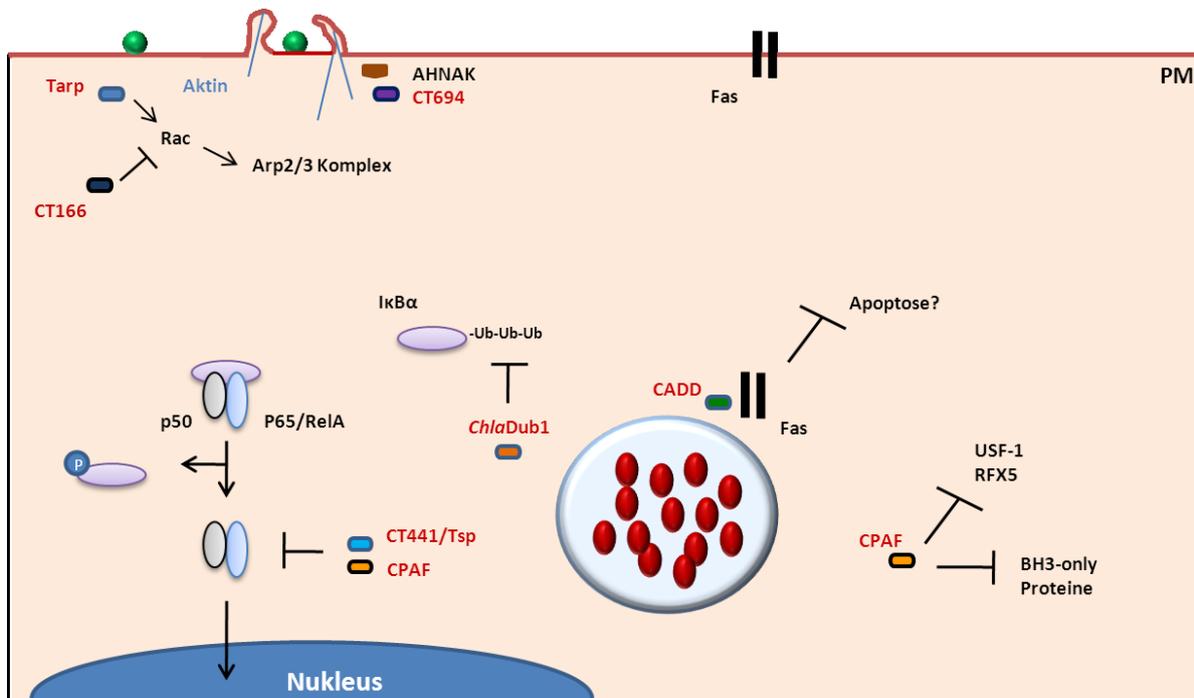
anderer *Chlamydia*-Spezies, z. B. aus *C. pneumoniae*, werden nach ihrer Translokation in die Wirtszelle nicht phosphoryliert, hier wird die Aktivierung von Rac über einen bisher unidentifizierten Weg ausgelöst (Clifton, Dooley *et al.*, 2005). Das Tarp-Protein aller Spezies kann zusätzlich monomere Aktinmoleküle binden und durch Selbst-Oligomerisierung in räumliche Nähe bringen. Auf diese Weise wirkt es direkt als ein sog. Nukleator, ein Polymerisationsstartpunkt für die Entstehung neuer Aktinfilamente (Jewett, Fischer *et al.*, 2006; Zrieq, 2009). Auch die *C. trachomatis*-Proteine CT694 und CT166 sind an der Modulierung des Aktin-Zytoskeletts beteiligt. CT694 interagiert mit dem Wirtszellprotein AHNAK, einem an der Zellmembran lokalisierten, Aktin bindenden Protein (Hower, Wolf *et al.*, 2009). CT166 glykosyliert Rac1 und inaktiviert es damit, könnte also eine wichtige Rolle in der Regulation der Zytoskelett-Veränderungen spielen (Thalmann, Janik *et al.*, 2010).

Das *C. trachomatis*-Protein CADD (*chl*amydia *pr*otein *as*sociating with *de*ath *do*main) wird spät im Infektionszyklus sekretiert und interagiert mit den sog. Todesdomänen von Rezeptoren der TNF-Familie (*t*umor *n*ecrosis *f*actor). Immunfluoreszenz-Analysen zeigten, dass sich der Rezeptor Fas in infizierten Zellen in der Nähe der Inklusionsmembran, assoziiert mit CADD, befindet (Stenner-Liewen, Liewen *et al.*, 2002). Möglicherweise wird durch ein Abfangen des Rezeptors die Apoptose inhibiert.

Die Proteine *Chla*Dub1 und *Chla*Dub2 von *C. trachomatis* werden während der Infektion sekretiert und besitzen deubiquitylierende sowie deneddylierende Aktivität, d. h. sie spalten die modifizierenden Moleküle Ubiquitin bzw. Nedd8 von Proteinen ab (Misaghi, Balsara *et al.*, 2006). Für *Chla*Dub1 konnte nachgewiesen werden, dass es die Ubiquitylierung und den nachfolgenden Abbau des NFκB-Inhibitors IκBα negativ beeinflusst und auf diese Weise die Aktivierung von NFκB hemmt (LeNegrata, Krieg *et al.*, 2008).

Drei Proteasen werden von *C. trachomatis* in das Wirtszellzytosol sekretiert: CPAF (*chl*amydial *pr*otease/*pr*oteasome-like *ac*tivity *f*actor), CT441/Tsp (*t*ail-specific *pr*otease) und cHtrA (*chl*amydial *h*igh *t*emperature *r*equirement *pr*otein *A*) (Zhong, 2011). Alle drei Proteasen weisen ein Signal für den sec-abhängigen Sekretionsweg auf. Möglicherweise werden sie zunächst ins bakterielle Periplasma transloziert und innerhalb von sich aus der äußeren Membran ausstülpender Vesikel ins Inklusionslumen abgegeben. Durch Fusion mit der Inklusionsmembran könnte schließlich die Freisetzung in das Wirtszellzytosol erfolgen (Zhong, 2011). CPAF wurde 2001 als der Urheber proteolytischer Aktivität in Lysaten *C. trachomatis*-infizierter Zellen identifiziert (Zhong, Fan *et al.*, 2001). Im Folgenden zeigte sich, dass die Spezies *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. muridarum* sowie *C. caviae* ebenfalls funktionelles CPAF exprimieren (Fan, Dong *et al.*, 2002; Dong, Zhong *et al.*, 2005). Zu den identifizierten Substraten gehören die bereits erwähnten Transkriptionsfaktoren USF-1 (*u*pstream *s*timulation *f*actor 1) und RFX5 (*r*egulatory *f*actor *X* 5), die für die Expression von

MHC (*major histocompatibility complex*)-Molekülen der Klassen I und II und somit für die Regulierung der Immunantwort zuständig sind (Germain, 1995; Zhong, Fan *et al.*, 2001). Zudem werden direkt oder indirekt proapoptotische BH3-only Proteine gespalten und auf diese Weise die Apoptose inhibiert (Fischer, Vier *et al.*, 2004). Auch die NFκB-Untereinheit p65/RelA ist ein Substrat von CPAF, wodurch NFκB inaktiviert und die Entzündungsreaktion der Zelle unterdrückt wird (Christian, Vier *et al.*, 2010). Es sind weitere mögliche Substrate bekannt, die eine Rolle in der Regulation von Stressantworten, des Zellzyklus oder auch der Inklusionsexpansion spielen (Zhong, 2011). Eine kürzlich erschienene Studie lässt allerdings Zweifel an der Authentizität einiger CPAF-Substrate aufkommen. Hier konnte gezeigt werden, dass die beobachtete Spaltung bestimmter Proteine von den zur Lysat-Herstellung verwendeten Puffern abhängig ist und möglicherweise in intakten Zellen gar nicht stattfindet (Chen, Johnson *et al.*, 2012). CT441/Tsp spaltet ebenfalls die p65/RelA-Untereinheit von NFκB (Lad, Li *et al.*, 2007). Die Substrate von cHtrA und dessen Rolle im chlamydialen Infektionszyklus sind bislang noch unbekannt (Zhong, 2011). Abb. 1-4 gibt einen Überblick über die beschriebenen Effektorproteine und ihre Funktionen.



**Abb. 1-4: Chlamydiale, Wirtszellzytosol-lokalisierte Effektorproteine.**

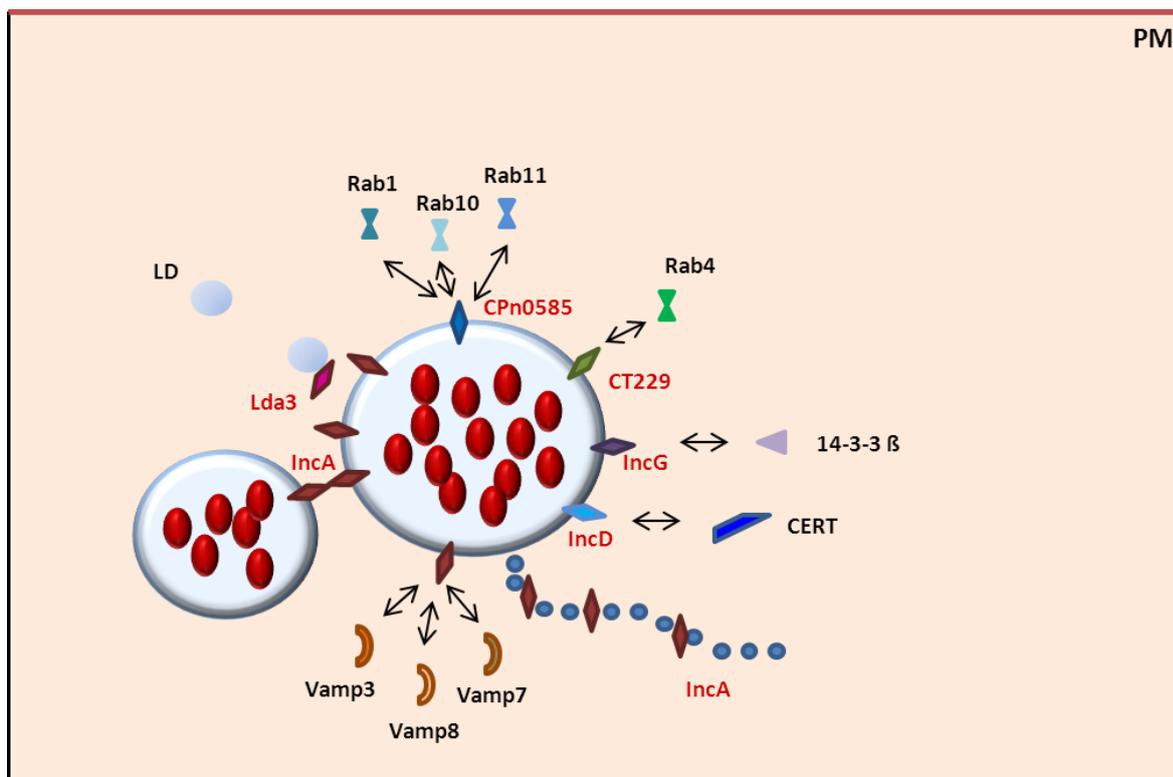
Chlamydiale Effektorproteine sind mit roter Schrift bezeichnet. Erläuterungen zur Funktion der einzelnen Proteine finden sich im Fließtext. Tarp: *translocated actin-recruiting phosphoprotein* Tsp: *tail-specific protease* CADD: *chlamydia protein associating with death domains* CPAF: *chlamydial protease/proteasome-like activity factor* USF-1: *upstream stimulation factor 1* RFX5: *regulatory factor X 5* PM: Plasmamembran.

### 1.4.3.2 Die Inklusionsmembran- (Inc-) Proteine

Eine besondere Form chlamydialer Effektorproteine stellen die sog. Inc-Proteine dar. Diese werden von den Bakterien sekretiert und im Folgenden in die Inklusionsmembran eingebaut. Als erstes Protein dieser Familie wurde IncA aus *Chlamydia psittaci* identifiziert, dem folgte die Identifizierung von Homologen in anderen *Chlamydia*-Spezies sowie weiterer Proteine dieser Familie (Rockey, Heinzen *et al.*, 1995; Bannantine, Rockey *et al.*, 1998; Scidmore-Carlson, Shaw *et al.*, 1999). Für IncA aus *Chlamydia trachomatis* konnte gezeigt werden, dass es zum Wirtszellzytosol hin exponiert ist und eine Selbst-Interaktion eingeht, wodurch es die homotypische Fusion von Inklusionen in mehrfach *C. trachomatis*-infizierten Zellen vermittelt (Hackstadt, Scidmore-Carlson *et al.*, 1999). *Chlamydia trachomatis*-Isolate, denen das IncA-Protein fehlt, fusionieren nicht (Suchland, Rockey *et al.*, 2000). Zudem wurde in den IncA-Proteinen mehrerer Spezies, ausgenommen das *C. pneumoniae* IncA (CPn0186), das sogenannte SNARE-Motiv (Soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment protein receptors) entdeckt, welches charakteristisch für eukaryotische Proteine ist, die selektiv Vesikeltransport und Vesikelverschmelzung vermitteln (Delevoye, Nilges *et al.*, 2004; Delevoye, Nilges *et al.*, 2008). Tatsächlich wurde nachgewiesen, dass das *C. trachomatis* IncA-Protein mit den eukaryotischen SNARE-Proteinen Vamp3, Vamp7 und Vamp8 interagiert, die sich auf der Oberfläche von Endosomen und Lysosomen befinden (Delevoye, Nilges *et al.*, 2008). Es hat sich gezeigt, dass diese Interaktion fusionsinhibierend wirkt (Paumet, Wesolowski *et al.*, 2009). Neben der Lokalisation in der Inklusionsmembran befindet sich IncA zudem auf fadenartigen Strukturen, die ausgehend von der Inklusionsmembran in das Wirtszellzytosol hineinragen (Brown, Skeiky *et al.*, 2002). Abhängig von der *Chlamydia*-Spezies und den Kultivierungsbedingungen können noch weitere chlamydiale Proteine wie LPS, MOMP oder Mitglieder der pmp-Familie auf diesen Fäden detektiert werden (Brown, Skeiky *et al.*, 2002; Elisabeth Becker, unpubl.). Die Bedeutung der Fäden ist noch ungeklärt. Die ektopische Expression von *C. caviae*- oder *C. trachomatis*-IncA blockiert die Entwicklung von Chlamydien, was darauf hindeutet, dass IncA essentielle Interaktionen mit der Wirtszelle vermittelt (Alzhanov, Barnes *et al.*, 2004; Delevoye, Nilges *et al.*, 2004).

Für das Protein IncG aus *C. trachomatis* konnte eine Interaktion mit dem eukaryotischen 14-3-3 $\beta$  Adapterprotein nachgewiesen werden, welches an Phosphoserin-Reste seiner Zielproteine bindet und darüber deren Lokalisation oder Aktivität verändert (Scidmore & Hackstadt, 2001). Das *C. trachomatis*-Protein IncD interagiert mit dem Ceramid-Transferprotein CERT, wodurch die Shingomyelin-Vorstufe Ceramid vom Endoplasmatischen Retikulum zur Inklusionsmembran gelangt und dort entweder metabolisch verwertet oder als Signalmolekül genutzt werden könnte (Derré, Swiss *et al.*, 2011). Das Inc-Protein CT229 interagiert mit der Rab-GTPase Rab4, wodurch diese zur Inklusionsmembran rekrutiert wird und dort die Verschmelzung mit Vesikeln beeinflussen könnte (Rzomp, Moorhead *et al.*,

2006). Ein Inklusionsmembranprotein aus *C. pneumoniae*, CPn0585, interagiert mit mehreren Rab-GTPasen, wodurch es möglicherweise die Verschmelzung mit Lipiden enthaltenden Vesikeln vermittelt, die für die Erweiterung der Inklusionsmembran und die Entwicklung der Chlamydien benötigt werden (Cortes, Rzomp *et al.*, 2007). Das Protein Lda3 (*lipid droplet associated 3*) aus *C. trachomatis* ist kein Inc-Protein, verbleibt aber nach Sekretion in die Wirtszelle in unmittelbarer Nähe der Inklusionsmembran. Dort interagiert es mit Lipidtröpfchen und vermittelt vermutlich deren Translokation in das Inklusionslumen an IncA-reichen Stellen (Kumar, Cocchiario *et al.*, 2006; Cocchiario, Kumar *et al.*, 2008). Eine Übersicht über bekannte Inc-Proteine und ihre Interaktionen mit Wirtszellproteinen gibt Abb. 1-5.



**Abb. 1-5: Chlamydiale Inklusionsmembranproteine.**

In der Abbildung sind chlamydiale Effektorproteine mit roter Schrift bezeichnet. Erläuterungen zu den Funktionen der einzelnen Proteine finden sich im Fließtext. LD: Lipidtröpfchen (*lipid droplet*) Lda3: *lipid droplet associated 3* PM: Plasmamembran.

Inc-Proteine zeigen wenig Ähnlichkeit auf Aminosäuresequenz-Ebene, besitzen jedoch eine charakteristische, doppelt gelappte hydrophobe Domäne von 50-80 Aminosäuren Länge (Bannantine, Griffiths *et al.*, 2000). Hierbei handelt es sich um vorhergesagte Transmembrandomänen, mittels derer die Proteine vermutlich in der Inklusionsmembran

verankert werden (Dehoux, Flores *et al.*, 2011). Auf Grundlage dieses charakteristischen Motivs konnten für *C. pneumoniae* 70 putative Inc-Proteine und für *C. trachomatis* 45 putative Inc-Proteine vorhergesagt werden, was 5,5 % bzw. 2,7 % des codierenden Genoms entspricht (Bannantine, Griffiths *et al.*, 2000). Ein Vergleich zwischen den Spezies *C. pneumoniae*, *C. felis*, *C. caviae*, *C. trachomatis* und *C. muridarum* offenbart eine Expansion der Familie der Inc-Proteine in den drei erstgenannten Spezies (Lutter, Martens *et al.*, 2011). Des Weiteren ergab der Vergleich, dass alle fünf Spezies ein sog. Kern-Set an 23 Inc-Proteinen aufweisen, für die Homologe in allen Genomen vorhanden sind und die vermutlich generelle essentielle Interaktionen mit der Wirtszelle vermitteln. Auf der anderen Seite gibt es einige speziesspezifische Inc-Proteine, die wirtszell- und infektionsspezifische Funktionen ausüben könnten (Toh, Miura *et al.*, 2003; Lutter, Martens *et al.*, 2011).

#### 1.4.4 Methoden zur Identifizierung chlamydialer Effektorproteine

Chlamydien sind genetisch nicht manipulierbar, was die Erforschung der chlamydialen Infektionsmechanismen erschwert. Daher wurden andere Strategien entwickelt, um infektionsrelevante Proteine zu identifizieren und zu charakterisieren. Die bioinformatische Suche nach potentiellen Inc-Proteinen basierend auf der charakteristischen hydrophoben, doppelt gelappten Domäne ist eine dieser Methoden. Durch Generierung von Antikörpern gegen die so erhaltenen Kandidaten und fluoreszenzmikroskopische Analysen können die Vorhersagen verifiziert und die Proteine weitergehend charakterisiert werden (Bannantine, Griffiths *et al.*, 2000). Durch die Analyse der Aminosäure-Zusammensetzung und Sekundärstruktur bekannter Effektorproteine aus verschiedenen Bakterien konnte ein putatives Typ III-Sekretionssignal im N-Terminus modelliert werden. Mittels eines entsprechend implementierten Algorithmus lässt sich bioinformatisch eine Vorhersage über die Typ III-Sekretion von Proteinen treffen (Arnold, Brandmeier *et al.*, 2009; Anwendung EffectiveT3 verfügbar unter <http://www.effectors.org/>).

Eine Voraussetzung dafür, dass ein Protein als Effektor wirksam sein kann, ist seine Sekretion in die Wirtszelle bzw. seine Insertion in die Inklusionsmembran. Proteine, die von einem Pathogen sekretiert werden, werden aufgrund der Universalität des Sekretionssignals üblicherweise auch von dem entsprechenden System eines anderen Pathogens erkannt und verarbeitet. Subtil *et al* testeten die Sekretion chlamydialer Proteine durch das heterologe *Shigella flexneri* Typ III-Sekretionssystem und konnten unter anderem die Inc-Proteine IncA, IncB und IncC als Substrate identifizieren (Subtil, Parsot *et al.*, 2001; Subtil, Delevoye *et al.*, 2005). Die Typ III-abhängige Sekretion von Tarp wurde durch die Nutzung von *Yersinia pseudotuberculosis* nachgewiesen (Clifton, Fields *et al.*, 2004).

Auch die Nutzung des eukaryotischen Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* hat sich als erfolgreich für die Erforschung potentieller Effektorproteine erwiesen, da Effektorproteine häufig zwischen Hefe und Säugetieren konservierte zelluläre Strukturen oder Signal-/Transportwege zum Ziel haben. Eine Inhibierung des Hefewachstums bei Expression eines bakteriellen Proteins legt nahe, dass dieses Protein in zelluläre Abläufe eingreift und somit potentiell ein Effektor sein könnte (Siggers & Lesser, 2008). Bakterielle Proteine können zudem als Fusion mit einem fluoreszierenden Protein wie GFP (*green fluorescent protein*) in Hefe exprimiert werden, wodurch Informationen über die Lokalisation und einen möglichen Organelltropismus erhalten werden können. Dies könnte wiederum Rückschlüsse auf die Funktion erlauben (Siggers & Lesser, 2008). Huh *et al* generierten *S. cerevisiae*-Stämme, in denen verschiedene Organellmarker genomisch mit RFP (*red fluorescent protein*) markiert wurden (Huh, Falvo *et al.*, 2003). Diese können auf eine Ko-Lokalisation mit beispielsweise GFP-fusionierten bakteriellen Proteinen getestet werden. Allerdings zeigte sich für viele Proteine, die einen Wachstumsdefekt in Hefe auslösten, auch einfach eine zytoplasmatische Lokalisation oder die Bildung von zytosolischen Aggregaten anstelle eines Organelltropismus (Sisko, Spaeth *et al.*, 2006).

## **1.5 CPn0043, CPn0072 und CPn1054 sind potentielle chlamydiale Effektorproteine**

Im Vorfeld zu dieser Arbeit wurde von Frau Dr. Anne Kerres und Frau Dr. Frauke Herbst erstmalig ein genomweiter Screen zur Identifizierung potentieller neuer chlamydialer Effektorproteine in dem eukaryotischen Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Dieser brachte insgesamt 47 Kandidaten hervor, die teils mehrfach in dem Screen identifiziert wurden und unterschiedlich starke Wachstumsphänotypen in Hefe auslösten (Herbst, 2011). Die weiterführende Charakterisierung des Kandidaten CPn0147 durch Frau Dr. Herbst ergab, dass es sich bei diesem Protein um ein Inc-Protein handelt, welches zusätzlich zur Lokalisation in der Inklusionsmembran auch auf den fadenartigen, IncA-positiven Strukturen in der Wirtszelle zu finden ist. Weiterhin assoziiert das Protein mit Lipidtröpfchen und vermittelt vermutlich deren Rekrutierung zur Inklusion (Herbst, 2011). Zu den im Effektor-Screen gefundenen Kandidaten zählen auch die im Rahmen dieser Arbeit näher zu charakterisierenden Proteine CPn0043, CPn0072 und CPn1054.

### **1.5.1 CPn0072 ist ein hypothetisches, *Chlamydia*-spezifisches Protein**

Bei CPn0072 handelt es sich um ein hypothetisches, *Chlamydia*-spezifisches Protein von 335 AS Länge. Bioinformatische Analysen sagen drei putative Transmembranregionen im

zentralen Teil des Proteins vorher (Quelle: TMHMM), jedoch keine weiteren konservierten Domänen. Die ersten beiden der vorhergesagten Transmembrandomänen entsprechen dem für Inc-Proteine charakteristischen doppelt gelappten, hydrophoben Motiv, weshalb es sich bei CPn0072 potentiell um ein Inc-Protein handelt (Dehoux, Flores *et al.*, 2011).

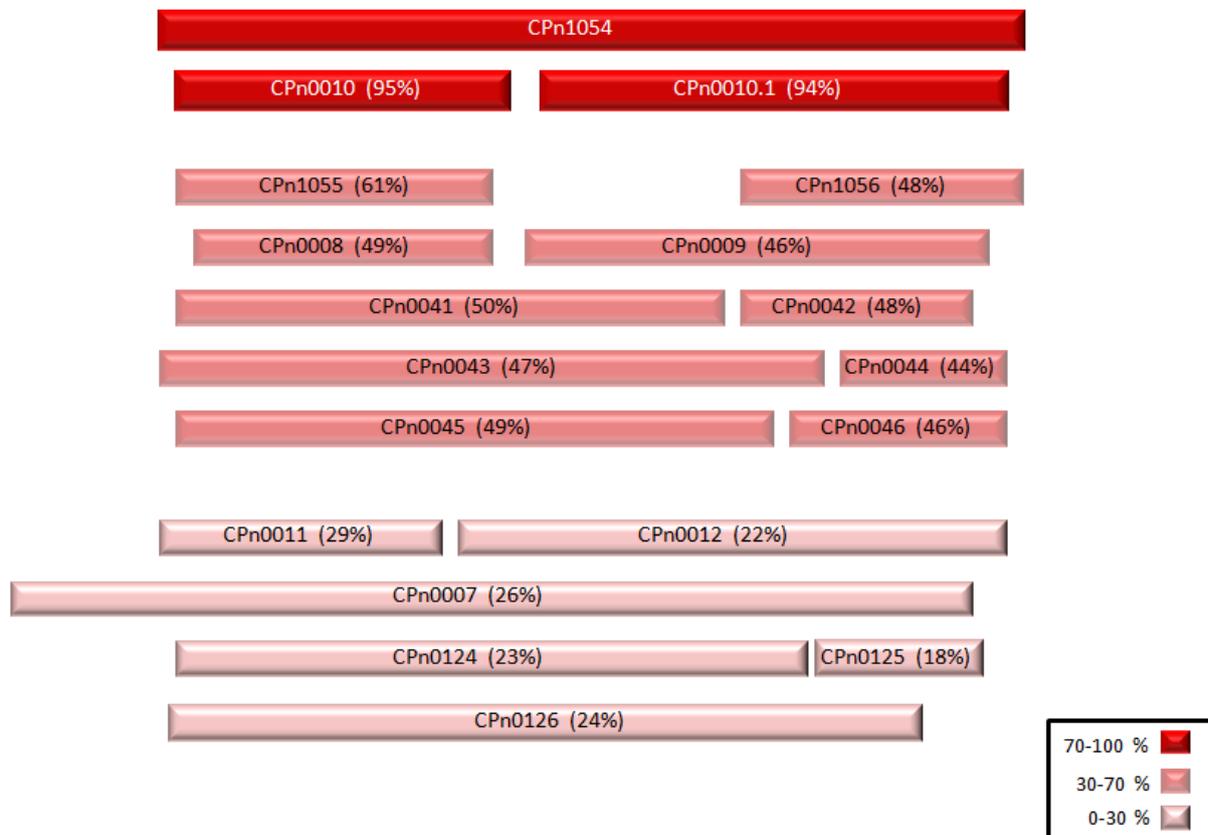
Lokalisationsanalysen mittels eines GFP-Fusionskonstrukts ergaben, dass CPn0072 in Hefe mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) assoziiert. In Humanzellen zeigte GFP-fusioniertes CPn0072 die Ausbildung einer Netzwerk-artigen Struktur, möglicherweise durch Assoziation mit dem ER. Mittels eines Antikörpers, der gegen ein Fusionsprotein aus dem CPn0072 N-Terminus (AS 1-90) und C-Terminus (AS 191-335) - unter Auslassung der Transmembranregion – generiert und nachfolgend für Immunfluoreszenz-Analysen eingesetzt wurde, konnte ein Inklusionsmembran-assoziiertes Signal für CPn0072 in infizierten Humanzellen beobachtet werden (Dr. Anne Kerres, unpubl.). Herr Dr. Guido Murra hat im Rahmen seiner Diplomarbeit unterschiedliche Gene aus *C. pneumoniae* bezüglich ihres Expressionsmusters im Infektionsverlauf untersucht. Er konnte für *cpn0072* eine überwiegend niedrige Expression feststellen, jedoch mit einem deutlichen Anstieg zum Zeitpunkt 36 hpi, nachfolgender Abnahme und erneutem Anstieg 96 hpi (Guido Murra, 2005). Transkriptanalysen für das entsprechende *C. trachomatis*-Gen, *ct324*, zeigten ein moderates Expressionsniveau mit kontinuierlichem Anstieg zu späteren Zeitpunkten der Infektion (Belland, Zhong *et al.*, 2003; supplementary material).

### **1.5.2 CPn0043 und CPn1054 sind Mitglieder einer *Chlamydia pneumoniae*-spezifischen, hypothetischen Proteinfamilie**

In einer Studie von 2001 identifizierten Daugaard *et al.* in den ansonsten sehr konservierten Genomen verschiedener *C. pneumoniae*-Stämme eine Region von hoher genetischer Variabilität (Daugaard, Christiansen *et al.*, 2001). Innerhalb dieser Region befanden sich sieben offene Leseraster (*open reading frames*, orfs), die allesamt für hypothetische Proteine mit hydrophoben Domänen codieren: CPn0007 – CPn0012 sowie CPn0010.1. Die Variabilität in dieser Region, die über Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP) detektiert wurde, bestand aus Einzelnukleotid-Polymorphismen sowie Insertionen und Deletionen innerhalb der einzelnen orfs. Eine Datenbanksuche nach ähnlichen Proteinen lieferte weitere zwölf Treffer: CPn0041 – CPn0046, CPn0124 – CPn0126 und CPn1054 – CPn1056. Alle diese 19 Proteine sind spezifisch für *Chlamydia pneumoniae* und bislang uncharakterisiert. Durch Sequenzvergleiche wurde ersichtlich, dass viele der orfs mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Genduplikation entstanden sind, wobei *cpn1054* als das Ursprungsgen angesehen wird (Daugaard, Christiansen *et al.*, 2001; Viratyosin, Campbell *et al.*, 2002). Durch Veränderungen wie Insertionen und Deletionen, die zu Leseraster-Verschiebungen und

vorzeitigen Stop-Codons führten, sind hieraus die paralogen Gene bzw. Genpaare hervorgegangen. Beispielsweise zeigte eine Sequenzanalyse, dass im Stamm CWL029 durch die Insertion eines Nukleotids in eine zu *cpn1054* beinahe identische Sequenz ein vorzeitiges Stop-Codon generiert und die betreffende Sequenz in die orfs *cpn0010* und *cpn0010.1* geteilt wird (Daugaard, Christiansen *et al.*, 2001). Auf Proteinebene besitzt CPn0010 eine 95%-ige Identität zu dem N-Terminus von CPn1054, während das *cpn0010.1*-Genprodukt zu 94 % mit dem CPn1054 C-Terminus identisch ist. CPn1055 und CPn1056 sind zu 61 % bzw. 48 % identisch zu dem N- bzw. C-Terminus des CPn1054-Proteins; allerdings zeigt sich eine zentral lokalisierte Deletion von ca. 250 Aminosäuren im Vergleich zum Ursprungprotein. Abb. 1-6 gibt einen Überblick über die Ähnlichkeiten aller Proteine aus der sog. CPn1054-Proteinfamilie untereinander.

### Die CPn1054-Proteinfamilie



**Abb. 1-6: Überblick über die Mitglieder der CPn1054-Proteinfamilie und die Identität auf Aminosäuresequenz-Ebene zum Ursprungprotein CPn1054.**

Die Prozentzahlen geben die Identität des jeweiligen Proteins zu CPn1054 auf Aminosäuresequenz-Ebene an, der Farbcode spiegelt diesen Grad an Identität wider. Die Analysen basieren auf den annotierten Proteinsequenzen des *C. pneumoniae*-Stammes CWL029.

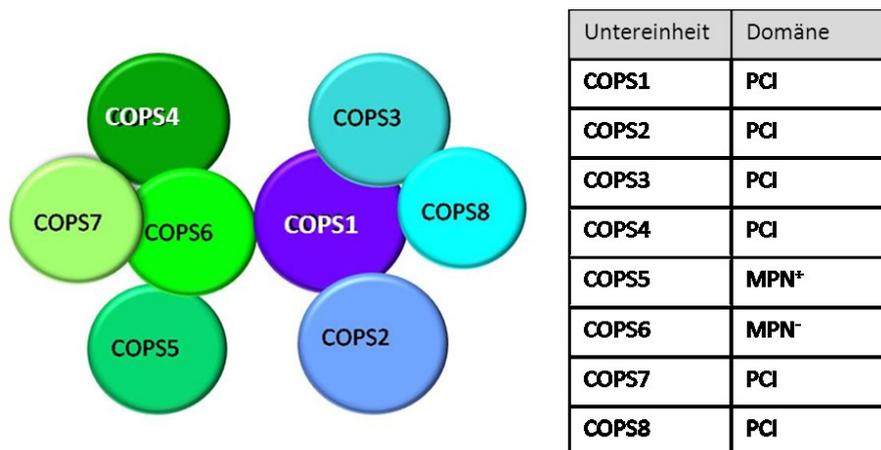
Alle Mitglieder der Proteinfamilie, die dem CPn1054 N-Terminus entsprechen, besitzen eine doppelt gelappte hydrophobe Domäne und sind somit putative Inc-Proteine (Dehoux, Flores *et al.*, 2011). Auf DNA-Ebene befinden sich am 5'-Ende der codierenden Region von *cpn0008*, *cpn0010*, *cpn0041*, *cpn0043*, *cpn0045*, *cpn1054* sowie *cpn1055* Poly-Cytosin-Sequenzen unterschiedlicher Länge (Rocha, Pradillon *et al.*, 2002; Viratyosin, Campbell *et al.*, 2002).

Rocha *et al.* identifizierten 2002 bei einer Suche nach langen repetitiven Sequenzen im *C. pneumoniae*-Genom einen Großteil der Mitglieder der CPn1054-Proteinfamilie (ausgenommen die Proteine CPn0007, CPn0011, CPn0012 sowie CPn0124 – CPn0126). Sie benannten diese Proteine ppp-Elemente (*C. pneumoniae polymorphic proteins*) und zogen den Schluss, dass die entsprechenden Gene aufgrund ihrer hohen Ähnlichkeiten zueinander homologe Rekombination eingehen und auf diese Weise zu Variabilität im Genom beitragen könnten (Rocha, Pradillon *et al.*, 2002).

In dem von Frau Dr. Herbst und Frau Dr. Kerres durchgeführten Effektor-Screen in Hefe wurden zwei Mitglieder der CPn1054-Proteinfamilie als putative Effektorproteine identifiziert: CPn1054 sowie CPn0043. CPn0043 ist mit einer Länge von 642 AS verkürzt im Vergleich zu CPn1054 mit 811 AS und beide Proteine weisen eine Identität von 47 % zueinander auf (Abb. 1-6). Im Fall von CPn1054 lösten zwei N-terminale Fragmente sowie ein C-terminales Fragment den beobachteten Wachstumsdefekt in *S. cerevisiae* aus, wohingegen bei CPn0043 nur ein einziges Fragment als wachstumshemmend identifiziert wurde, welches den N-terminalen Teil des Proteins umfasst. Eine Lokalisationsanalyse in *S. cerevisiae* mittels eines GFP-Fusionskonstrukts ergab eine punktförmige Akkumulation von CPn1054 an der Zellperipherie; in Humanzellen zeigte eine GFP-fusionierte Variante des Proteins eine Akkumulation innerhalb des Zytoplasmas sowie eine Assoziation mit membranösen Strukturen (Herbst, 2011). In beiden Fällen wurde die im 5'-Ende von *cpn1054* vorhandene Poly-Cytosin-Sequenz bei der Klonierung ausgelassen, da diese zu Unsicherheit bei der Sequenzierung geführt hatte. Mittels eines gegen den C-Terminus (AS 521-811) generierten Antikörpers konnten in einem Western Blot Banden, welche der erwarteten Laufhöhe des CPn1054-Proteins entsprachen, in Lysaten infizierter Humanzellen detektiert werden. Eine Analyse von EB- und RB-Fractionen ergab, dass das Protein sehr stark in Retikularkörperchen exprimiert wird, wohingegen nur eine sehr schwache Expression in Elementarkörperchen nachgewiesen werden konnte. Erste Immunfluoreszenz-Analysen infizierter Humanzellen mit dem Antikörper suggerierten eine Bakterien-assoziierte Lokalisation von CPn1054 (Herbst, 2011). Das Protein CPn0043 wurde noch nicht weitergehend untersucht. Dr. Gido Murra konnte in seiner Transkriptanalyse über den Infektionsverlauf für *cpn1054* durchweg eine konstitutive, aber schwache Expression nachweisen. Im Fall von *cpn0043* zeigte sich ein vergleichsweise höheres Expressionsniveau besonders zu frühen Zeitpunkten, das schließlich mit fortschreitender Infektionsdauer abnahm (Murra, 2005).

## 1.6 Das COP9 Signalosom ist ein multifunktionseller Proteinkomplex

Das COP9 Signalosom (CSN) wurde zuerst in *Arabidopsis thaliana* als ein Negativ-Regulierer des lichtinduzierten Wachstums (Photomorphogenese) identifiziert. Pflanzen, die eine Mutation in einer Untereinheit des Komplexes trugen, zeigten in der Dunkelheit dasselbe Wachstumsverhalten wie unter Lichtbedingungen (Wei, Chamovitz & Deng, 1994). Ein paar Jahre später wurde der Komplex auch aus Humanzellen isoliert (Seeger, Kraft *et al.*, 1998; Wei & Deng, 1998); im Folgenden zeigte sich, dass er in vielen eukaryotischen Organismen bis hin zur Hefe konserviert ist (Kato & Yoneda-Kato, 2009). Das menschliche COP9 Signalosom besteht aus acht Untereinheiten, die nach abnehmendem Molekulargewicht mit COPS1 bis COPS8 bezeichnet werden (alternativ: CSN1 bis CSN8). Strukturanalysen ergaben, dass der Holokomplex aus zwei Subkomplexen – der eine bestehend aus den Untereinheiten COPS1, COPS2, COPS3 und COPS8, der andere aus den Untereinheiten COPS4, COPS5, COPS6 und COPS7 – gebildet wird, die über eine Interaktion zwischen COPS1 und COPS6 verbunden sind und Symmetrie aufweisen (Sharon, Mao *et al.*, 2009). Sechs Untereinheiten des COP9 Signalosoms enthalten eine PCI-Domäne (Proteasom, COP9 Signalosom, eukaryotischer Translations-Initiationsfaktor 3/eIF3) und zwei Untereinheiten eine MPN-Domäne (MPR1/Pad1 N-terminal) (Abb. 1-7).



**Abb. 1-7: Übersicht über die Struktur des COP9 Signalosom-Komplexes und die in den Untereinheiten enthaltenen Domänen.**

Der Holokomplex wird aus zwei Subkomplexen gebildet und weist Symmetrie auf. Die Untereinheiten COPS5 sowie COPS6 beinhalten eine MPN-Domäne, alle übrigen Untereinheiten eine PCI-Domäne. MPN: MPR1/Pad1 N-terminal PCI: Proteasom, COP9 Signalosom, eukaryotischer Translations-Initiationsfaktor 3.

Das COP9 Signalosom kann als Holokomplex, bestehend aus allen acht Untereinheiten, auftreten, es sind jedoch auch Mini-Komplexe beschrieben worden, in denen nur bestimmte Untereinheiten enthalten sind. Des Weiteren kann die Untereinheit COPS5 in Monomer-

Form und vermutlich auch in Assoziation mit anderen, Signalosom-fremden, Proteinen auftreten (Tomoda, Kubota *et al.*, 2002; Kato & Yoneda-Kato, 2009; Sharon, Mao *et al.*, 2009). COPS5 wurde ursprünglich aufgrund seiner Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor c-Jun auch als JAB1 (*c-Jun activation domain binding protein 1*) bezeichnet (Claret, Hibi *et al.*, 1996). Die eine PCI-Domäne enthaltenden Untereinheiten bilden mittels Interaktion untereinander das strukturelle Gerüst des Signalosoms (Wei & Deng, 2003). Die MPN-Domäne von COPS5 beinhaltet das Metall-Bindemotiv JAMM (JAB1-MPN-Mov34) und wird auch mit MPN<sup>+</sup> bezeichnet, die MPN<sup>-</sup>-Domäne von COPS6 trägt dieses Motiv hingegen nicht. COPS5 besitzt eine Metalloprotease-Aktivität, die in der MPN-Domäne lokalisiert ist. Für diese Aktivität ist die Bindung eines Zink-Ions notwendig, was über das JAMM-Motiv geschieht. Da COPS6 das JAMM-Motiv nicht besitzt, ist diese Untereinheit katalytisch nicht aktiv, trägt aber vermutlich zur strukturellen Integrität des Komplexes bei (Cope, Suh *et al.*, 2002).

Dem COP9 Signalosom wurde eine Reihe von Funktionen zugeordnet. Die zuerst entdeckte und am besten charakterisierte Aktivität ist die Entfernung des modifizierenden, Ubiquitin-ähnlichen Moleküls Nedd8 von einer bestimmten Gruppe von Ubiquitin-Ligasen, den Cullin-RING Ubiquitin-Ligasen (CRLs). Dieser Prozess wird auch als Deneddylierung bezeichnet und führt zu einer vorübergehenden Inaktivierung der Ubiquitin-Ligase, so lange bis ein neues Nedd8-Molekül durch entsprechende Enzyme konjugiert wird (Neddylierung). Anfangs nahm man an, dass die Signalosom-vermittelte Deneddylierung die Ligase-Aktivität hemmt, doch es hat sich gezeigt, dass ein stetiger Neddylierungs-/Deneddylierungszyklus essentiell für die Funktionalität ist (Schwechheimer, Serino *et al.*, 2001; Cope, Suh *et al.*, 2002). Vermutlich wird durch den Deneddylierungsprozess eine Selbst-Ubiquitylierung der Ligase verhindert (Wei & Deng, 2003). Das MPN<sup>+</sup>-Motiv der COPS5-Untereinheit besitzt die katalytische Aktivität für die Deneddylierung, die jedoch nur ausgeübt werden kann, wenn COPS5 in den Holokomplex integriert ist (Cope, Suh *et al.*, 2002; Groisman, Polanowska *et al.*, 2003). Das COP9 Signalosom reguliert also über die Cullin-RING Ubiquitin-Ligasen die Stabilität von Proteinen, die von eben diesen Ligasen für den Abbau durch das Ubiquitin/Proteasom-System markiert werden. Zudem besitzt das COP9 Signalosom selbst eine deubiquitylierende Aktivität, die entweder eine Mono-Ubiquitylierung von einem Protein entfernt oder zur Depolymerisation von Poly-Ubiquitinketten führt (Groisman, Polanowska *et al.*, 2003). Somit kann der COP9-Komplex auch direkt die Protein-Degradation beeinflussen. Außerdem assoziiert das deubiquitylierende Enzym USP15 mit dem Signalosom, was einen weiteren Weg der Proteinabbau-Kontrolle darstellt (Hetfeld, Helfrich *et al.*, 2005). Des Weiteren konnte eine Signalosom-assoziierte Proteinkinase-Aktivität nachgewiesen werden (Seeger, Kraft *et al.*, 1998). Inositol-1,3,4-trisphosphat-5/6-Kinase, Casein-Kinase 2 (CK2) sowie Proteinkinase D (PKD) interagieren mit verschiedenen Untereinheiten des Signalosoms und sind mit hoher Wahrscheinlichkeit die Urheber dieser

Aktivität (Sun, Wilson *et al.*, 2002; Uhle, Medalia *et al.*, 2003). Es werden beispielsweise I $\kappa$ B $\alpha$  und der Tumor-Suppressor p53 phosphoryliert, was im Fall von p53 den Abbau durch das Ubiquitin/Proteasom-System zur Folge hat (Seeger, Kraft *et al.*, 1998; Bech-Otschir, Kraft *et al.*, 2001). Insgesamt beeinflusst das COP9 Signalosom durch seine verschiedenen Aktivitäten viele zelluläre Prozesse wie die Signaltransduktion, die Transkription oder die Zellzykluskontrolle (Wei & Deng, 2003; Wei, Serino *et al.*, 2008; Kato & Yoneda-Kato, 2009). Auch eine Rolle in der Modulierung der Apoptose ist in Betracht gekommen, da Studien zeigten, dass während des Apoptoseprozesses die Untereinheit COPS6 von Caspasen gespalten wird (da Silva Correia, Miranda *et al.*, 2007; Hetfeld, Peth *et al.*, 2008). Dies hat keine Auswirkungen auf die Integrität des Komplexes, könnte aber dessen Aktivität beeinflussen.

### 1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

In einem genomweiten Screen nach neuen potentiellen Effektorproteinen von *Chlamydia pneumoniae* in dem eukaryotischen Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* sind im Vorfeld 47 Kandidaten identifiziert worden (Herbst, 2011). In der vorliegenden Arbeit sollten drei dieser Kandidaten – CPn0043, CPn0072 sowie CPn1054 - näher charakterisiert und auf ihre mögliche Funktion während der chlamydialen Infektion hin untersucht werden. Hierzu sollten die Proteine zunächst unter Nutzung polyklonaler Antikörper in der Infektion detektiert und lokalisiert werden. Zudem sollte nachgewiesen werden, ob die Kandidaten Kontakt zum Wirtszellzytosol besitzen und somit potentiell als Effektoren wirken könnten. Unter Anwendung der Hefe-Zwei-Hybrid Methode sollten putative humane Interaktionspartner identifiziert werden. Nach einer biochemischen Verifizierung der Interaktionen sollten weiterführende Experimente Aufschluss über mögliche Auswirkungen der Interaktionen im Verlauf einer chlamydialen Infektion geben.

## 2. Materialien

### 2.1 Gebrauchsmaterial

Tabelle 2-1: Gebrauchsmaterial

Material	Hersteller
1,5 ml und 2,0 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
15 ml und 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcons)	Sarstedt
Dialyseschlauch	Serva
Deckgläschen	Roth
Einmalküvetten Polystyrol	Sarstedt
Filterpapier	VWR
Gewebekulturplatten (24 Vertiefungen)	Nunc
Gewebekulturröhrchen	Greiner
Glasperlen	Braun
Glasplättchen für Gewebekulturplatten	Roth
Latexkügelchen	Polysciences
Objektträger	Roth
Petrischalen (92 x 16 mm; 150 x 15 mm)	Sarstedt
Proteinsäulen mit Stopfen und Verschlusskappe	Thermo Scientific
PVDF-Membran	Millipore
Zellschaber	Nunc
Zellkulturflaschen Polystyrol (25 cm <sup>2</sup> und 80 cm <sup>2</sup> )	Nunc

### 2.2 Chemikalien

Tabelle 2-2: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid (30 % : 0,8 % Bisacrylamid)	Roth

Adenin	Roth
Agar	Difco
Agarose	Biozym
Ammoniumpersulfat	Merck
Ammoniumsulfat	Grüssing
Ampicillin	Sigma
Bacto Trypton	Difco
BES (N,N-Bis(2-hydroxyethyl)taurin)	Sigma
Borsäure	Sigma
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva
Bradford-Reagenz	BioRad
5-bromo-4-chloro-3-Indolylphosphat (BCIP)	Sigma
Bromphenolblau	Fluka
Calciumchlorid	Roth
Ciprofloxacin	Santa Cruz
Coomassie Brillantblau R250	Merck
Cycloheximid	Sigma
Desoxynukleosid-5`-Triphosphate (dNTPs)	MBI Fermentas
Dimethylformamid (DMF)	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Essigsäure	Riedel-deHaën
Ethanol	VWR
Ethanolamin	Sigma
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
Fötale Kälberserum (FKS)	Invitrogen
Fungizone (Amphotericin B)	Invitrogen
Gentamycin	Invitrogen

Glucose Monohydrat	Roth
Glycin	AppliChem
Glycerin	Roth
Guanidin-HCl	Serva
Hank's Salzlösung (HBSS)	Invitrogen
Harnstoff	VWR
Hefeextrakt	Difco
Hefe-Stickstoffquelle (YNB)	Difco
HEPES	Sigma
Imidazol	Sigma
Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Grüssing
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Grüssing
Kanamycin	Sigma
Lachssperma-DNA (Carrier-DNA)	Sigma
Lithiumacetat	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
Methanol	Riedel-deHaën
Milchpulver	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	VWR
Natriumdeoxycholat	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat	Appllichem
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumhydrogencarbonat	Fluka

di-Natriumhydrogenphosphat	Applichem
Natriumhydroxid	Roth
NHS-Sepharose	GE Healthcare
Nicht-essentielle Aminosäuren (MEM)	Invitrogen
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma
Nickel-NTA-Agarose	Qiagen
Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma
Para-Formaldehyd	Fluka
Pepton	Difco
Phenylmethan-Sulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Polyethylenglycol 3350 (PEG)	Sigma
Poly-L-Lysin	Sigma
Proteaseinhibitor-Cocktail (komplett)	Roche
Salzsäure	Roth
SuperSignal West Dura Stable Peroxide Puffer	Thermo Scientific
SuperSignal West Dura Luminol/Enhancer Lösung	Thermo Scientific
TEMED	Serva
Triethanolamin	Roth
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Merck
Trypton	Difco
Tryptophan	AppliChem
Tween 20	Merck
Vectashield	Linaris
Vitaminlösung (MEM)	Biochrom
X-alpha-Gal	Clontech
Xylen Cyanol	Serva

## 2.3 Geräte

Tabelle 2-3: Geräte

Gerät	Hersteller
Binokular Axiovert 25C	Zeiss
BioPhotometer Plus	Eppendorf
Blotapparatur	Biometra
Brutschrank Thermo Forma Stericycle 100	Thermo Scientific
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 50	Zeiss
Geldokumentationssystem	Bio-Rad
Gen Pulser & Pulse Controller	Bio-Rad
Heizblock	Labnet
Heizrührer	IKA
Herasafe Sicherheitswerkbank	Heraeus
Inkubator BE600	Memmert
Inkubator Kelvitron	Heraeus
Konfokalmikroskop LSM 510 Meta	Zeiss
LAS mini 4000	Fujifilm
Mikrowelle	Bosch
NanoDrop ND-2000C	PeqLab
PCR-Thermocycler Gene Amp 9700	MJ Research
PCR-Thermocycler PTC-200	Bio-Rad
pH-Meter	inoLab
Photometer DU-800	Beckmann
Proteingelsystem SE260	Hoefer
Speed-Vac Vakuum-Konzentrator	Savant
Schüttelinkubator Unitron	Infors
Ultraschallstab Sonoplus HD2200	Bandelin

Ultraschallwasserbad Sonorex	Bandelin
Vibrax VXR	IKA
Vortex Genie	Scientific industries
Wasserbad	Grant
Zählkammer	Thoma
Zellhomogenisator precellys	PeqLab
Zentrifuge Avanti J-25	Beckmann
Zentrifuge Biofuge Primo R	Heraeus
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus
Zentrifuge Multifuge 3 SR+	Heraeus
Zentrifuge Rotanta 460 R	Hettich

## 2.4 Enzyme

### 2.4.1 Restriktionsenzyme

Es wurden folgende Restriktionsenzyme der Firma MBI Fermentas in Kombination mit den entsprechenden Restriktionspuffern verwendet:

*BamHI, ClaI, EcoRI, EcoRV, HindIII, HincII, Sall, SmaI, SpeI, NcoI, NdeI, NotI, PvuI, PvuII*

### 2.4.2 weitere Enzyme

Phusion Polymerase	New England Biolabs
Platinum Pfx DNA-Polymerase	Invitrogen
RNase A	Qiagen
Taq DNA-Polymerase	eigene Herstellung durch Fr. Volfson
Trypsin/EDTA	Invitrogen

## 2.5 Fluoreszenzfarbstoffe

DAPI	Sigma
Rhodamin-Phalloidin	Invitrogen

## 2.6 Antikörper

### 2.6.1 Primärantikörper

Tabelle 2-4: Primärantikörper

Bezeichnung	gerichtet gegen	produziert in	Verdünnung	Referenz
Anti-c-myc	c-myc	Maus	1:1000 (WB)	Roche
Anti-penta-His	5x-/6x-His Tag	Maus	1:1000 (WB)	Qiagen
Anti-GFP	GFP	Kaninchen	1:1000 (WB)	Invitrogen
Anti-CPn1054 # 1368	CPn1054	Kaninchen	1:50 / pur (IF) 1:50 (WB)	Herbst, 2011
Anti-CPn0072 # 1310	CPn0072	Kaninchen	pur (IF) ●	Kerres & Herbst, unpubl.
Anti-MOMP mAb	<i>C. pn.</i> MOMP	Maus	1:50 (IF)	Luo, Jia et al., 2007
Anti-IncA mAb	<i>C. pn.</i> IncA	Maus	1:30 (IF)	Luo, Jia et al., 2007
Anti-COPS1	Humanes COPS1	Kaninchen	1:2500 (WB)	ENZO
Anti-JAB1	Humanes COPS5	Maus	1:1000 (WB) 1:200 (IF)	GeneTex
Anti-COPS6	Humanes COPS6	Kaninchen	1:1000 (WB)	ENZO
Anti-COPS7	Humanes COPS7	Kaninchen	1:2500 (WB)	ENZO
Anti-DnaK	DnaK	Maus	1:1000 (WB) 1:20 (IF)	Birkelund <i>et al.</i> , 1990
Anti-GAPDH	GAPDH	Maus	1:1000 (WB)	Sigma
Anti-CPn0043 # 52	CPn0043	Kaninchen	1:50 (IF)	diese Arbeit
Anti-CPn0043 # 53	CPn0043	Kaninchen	1:50 (IF)	diese Arbeit

IF: Immunfluoreszenz; WB: Western Blot; ● : antigengereinigtes Serum wird verwendet.

## 2.6.2 Sekundärantikörper

Tabelle 2-5: Sekundärantikörper

Bezeichnung	produziert in	Verdünnung	Referenz
Anti-Maus AP	Kaninchen	1:7500 (WB)	Promega
Anti-Kaninchen AP	Maus	1:7500 (WB)	Promega
Anti-Maus Alexa Fluor 488	Ziege	1:200 (IF)	Invitrogen
Anti-Kaninchen Alexa Fluor 594	Ziege	1:200 (IF)	Invitrogen
Anti-Kaninchen HRP	Ziege	1:7500 (WB)	Jackson Immunology Research Lab
Anti-Maus HRP	Ziege	1:10000 (WB)	Jackson Immunology Research Lab

IF: Immunfluoreszenz; WB: Western Blot

## 2.7 Kits

QIAEX II Gelextraktions-Kit (Qiagen)

Plasmidisolations-Kit Midi (Qiagen)

$\mu$ MACS™ Epitope Tag Proteinisolations-Kit (His) + Magnetsäulchen und magnetischem Säulhalter (Miltenyi Biotech)

Matchmaker™ 3 Yeast-Two-Hybrid Kit (Clontech)

Mate&Plate™ cDNA-Bank human testis (Clontech)

## 2.8 Größenstandards

### 2.8.1 DNA-Größenstandard

1 kb DNA ladder (Fermentas)

O'GeneRuler™ DNA ladder Mix (Fermentas)

## 2.8.2 Protein-Größenstandard

PageRuler™ prestained protein ladder (Fermentas): 130, 110, 90, 72, 55, 42, 35, 25, 15, 10 [kDa]

## 2.9 Oligonukleotide

### 2.9.1 Oligonukleotide zur Klonierung

Tabelle 2-6: Oligonukleotide zur Klonierung

Interne Bezeichnung	Name	Sequenz (5' → 3')
C-811	CPn0043 rev	GGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGC AGCTATATGTACATGCTTCCGT
C-957	Cpn0072 pUG34 fwd	GGATGAATTGTACAAATCTAGAACTAGTGGATCCCCCG GGATGTCTACTCCACTATCTTC
C-958	CPn0072 pUG34 rev	GGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGC AG TCAATGATTTGATTCAATGA
C-1076	CPn0043 fwd ohne c-stretch	GGATGAATTGTACAAATCTAGAACTAGTGGATCCCCCG GGATGCCAGACCACTCTGTAGG
C-1078	CPn0043 fwd ohne TM	GGATGAATTGTACAAATCTAGAACTAGTGGATCCCCCG GGATGGAAAGACGAGAGGTTTCGGG
C-1146	Cpn1054 Aa 201-811 BD fwd	AGAGGAGGACCTGCATATGGCCATGGAGGCCGAATTC CCGGCAGAATCTGAATCGCTTGATT
C-1147	Cpn1054 Aa 79-811 BD fwd	AGAGGAGGACCTGCATATGGCCATGGAGGCCGAATTC CCGCTACTATGTCTTTTAGTAAAACG
C-1149	Cpn1054 BD rev	GTTATGCTAGTTATGCGCCGCTGCAGGTCGACGGATC CCCTAGGTATGGTCCTCGCGAG
C-1150	Cpn1054 Aa 79-811 AD fwd	TTACGCTCATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATTCCACC CGCTACTATGTCTTTTAGTAAAACG
C-1151	Cpn1054 Aa 79-811 AD rev	CTGCAGCTCGAGCTCGATGGATCCCGTATCGATGCCCA CCCTAGGTATGGTCCTCGCGAG
C-1455	Cpn0043_oTM_pGBKT7_FOR	AGAGGAGGACCTGCATATGGCCATGGAGGCCGAATTC CCGGAAAGACGAGAGGTTTCGGG

C-1456	Cpn0043_pGBKT7_REV	GTTATGCTAGTTATGCGGCCGCTGCAGGTCGACGGATC CC <u>CTATATGTACATGCTTCCGTT</u>
C-1496	Cpn0072oTMs_pGBKT7_fwd	AGAGGAGGACCTGCATATGGCCATGGAGGCCGAATTC CCG <u>ATGTCTACTCCACTATCTTC</u>
C-1497	Cpn0072oTMs_pGBKT7_rev	GTTATGCTAGTTATGCGGCCGCTGCAGGTCGACGGATC CC <u>TCAATGATTTGATTCAATGAT</u>
C-1563	1054_Aa580- 811_pGBKT7_FOR	AGAGGAGGACCTGCATATGGCCATGGAGGCCGAATTC CCG <u>AAGAAGGCGTTTGAGAAGGCC</u>
C-1605	SLC30-286_pSR1_FOR	GGAATTCATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACG AT <u>GGCATCAGTAAGTCTGTTC</u>
C-1606	SLC30-554_pSR1_REV	TCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTTTAGTTAGTTAG AT <u>TTTCAGTTCCTTCTCAAGTC</u>
C-1725	COPS4_pFT8_FOR	TCGTCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGGGATCCC CCATGGCGGCAGCCGTGCGACA
C-1727	COPS6_pFT8_FOR	TCGTCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGGGATCCC CCATGGCGGCAGCCGTGCGCGGC
C-1728	COPS6_pFT8_REV	GCAGATCGTCAGTCAGTCAATGGTGATGGTGATGGTG CCG <u>AAAAAGAGCCCGCGCATTCTCC</u>
C-1827	Cpn0072Nter_pGBKT7_rev	GTTATGCTAGTTATGCGGCCGCTGCAGGTCGACGGATC C <u>TTTCCAATTCCTTTGGAGGA</u>
C-1828	Cpn0072CTer_pGBKT7_fwd	AGAGGAGGACCTGCATATGGCCATGGAGGCCGAATTC CCGATAGGTTTTTCCATTGGAAA
C-1869	COPS4_mCherry_fwd	GAGCTCAAGCTTCTGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCG GGATGGCGGCAGCCGTGCGACA
C-1870	COPS4_mCherry_rev	CCTCCTCGCCCTTGCTCACCATGGTGCGACCGGTGGA TC <u>TGAGCCATCTGGGCTTCCA</u>
C-1871	COPS6_mCherry_fwd	GAGCTCAAGCTTCTGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCG GGATGGCGGCAGCCGTGCGCGGC
C-1872	COPS6_mCherry_rev	CCTCCTCGCCCTTGCTCACCATGGTGCGACCGGTGGA TC <u>AAAAAGAGCCCGCGCATTCC</u>
C-1893	Cpn1054_Aa600_pGBKT7_rev	GTTATGCTAGTTATGCGGCCGCTGCAGGTCGACGGATC CC <u>CACCTTCTCCAACATCTCTG</u>
C-1910	COPS4_intern_FOR	GGTGCCAGCAACTTGCTGCC
C-1911	COPS4_intern_REV	GGCAGCAAGTTGCTGGCACC

C-1982	COPS4_pFT8_NTer_REV	GCAGATCGTCAGTCAGTCAATGGTGATGGTGATGGTG <u>CCCAAAAAGAGTAGCTAGCATCC</u>
C-2015	Cpn1054_Aa450_pGBKT7_rev	GTTATGCTAGTTATGCGGCCGCTGCAGGTCGACGGATC <u>CCCTCTTGATTTTGTCTCTC</u>
C-2016	Cpn1054_Aa450_pGBKT7_for	AGAGGAGGACCTGCATATGGCCATGGAGGCCGAATTC <u>CCGAGACGCGCTCTAATTTAGA</u>

Unterstrichen ist die Sequenzhomologie zum Zielgen; die restliche Sequenz ist homolog zum Vector, in den kloniert wurde.

## 2.9.2 Oligonukleotide zur Sequenzierung

Tabelle 2-7: Oligonukleotide zur Sequenzierung

Interne Bezeichnung	Name	Sequenz (5' → 3')
C-369	Cpn38	GTTACTGCTGCTGGTATTAC
C-373	Cpn22	ACTTCAGGTTGTCTAACTCC
C-803	GST Protease GenX His seq her	CAAGCTGTGACCGTCTCCG
C-896	Cpn1054 intern seq	AGATATGCCCTTCCAATTC
C-899	Cpn0043 intern seq	GAGATTCGCTAAAGAGGTCG
C-1116	Seq pEB2 s	CTCACTATAGGGCGAGCCGC
C-1224	Cpn1054 intern fwd seq	GGTGTGCTGAAAAGAAGC
C-1230	pGADT7-Rec colony rev	GCTCGATGGATCCCGTATCG
C-1303	pUG34_seq	CCACTCAATCTGCCTTATCC
C-1490	Seq hin mCherry	TTTAGTGAACCGTCAGATCC
C-1491	Seq her mCherry	GCCATGTTATCCTCCTCGCC
C-1492	pSR1_insert_Seq_For	GGTTTGTATTACTTCTTATTC
C-2203	GAL4_3'BD	TTTTCGTTTTAAACCTAAGAGTC
	pACT2-RP (GATC-Standardprimer)	CAGTTGAAGTGAAGTTC
	T7minus1 (GATC-Standardprimer)	AATACGACTCACTATAGGG

## 2.10 Plasmide

### 2.10.1 Ursprungsplasmide

Tabelle 2-8: Ursprungsplasmide

Interne Nr.	Name	Marker (Hefe, <i>E. coli</i> )	Beschreibung
# 848	pUG34	<i>HIS3, amp</i>	Hefe-Expressionsvector mit N-terminalem GFP-Tag
# 1353	pBYE	<i>URA3, amp</i>	Expressionsvector für Humanzellen mit N-terminalem GFP-Tag
# 1612	pFT8	<i>TRP1, amp</i>	<i>E. coli</i> -Expressionsvector mit N-terminalem GST-Tag und C-terminalem 6xHis-Tag
# 1720	mCherry CEN TRP ARS	<i>TRP1, kan</i>	Expressionsvector für Humanzellen mit C-terminalem mCherry-Tag
# 1941	pKM32	<i>URA3, amp</i>	<i>E. coli</i> -Expressionsvector mit N-terminalem 6xHis-Tag
# 1675	pGADT7	<i>LEU2, amp</i>	Hefe-Zwei-Hybrid Vector; Expression von GAL4 AD und HA-Tag (Clontech)
# 1676	pGADT7-T	<i>LEU2, amp</i>	Kontrollvector für Hefe-Zwei-Hybrid; Expression von GAL4 AD, HA-Tag und SV40 großem T-Antigen (Clontech)
# 1301	pGBKT7	<i>TRP1, kan</i>	Hefe-Zwei-Hybrid Vector; Expression von GAL4 BD und c-myc-Tag (Clontech)
# 1302	pGBKT7-p53	<i>TRP1, kan</i>	Kontrollvector für Hefe-Zwei-Hybrid; Expression von GAL4 BD, c-myc-Tag und p53 (Clontech)
# 1677	pGBKT7-Lam	<i>TRP1, kan</i>	Kontrollvector für Hefe-Zwei-Hybrid; Expression von GAL4 BD, c-myc-Tag und Lamin C (Clontech)
# 1788	pSR1	<i>HIS3, amp</i>	Hefe-Expressionsvector mit N-terminalem 6xHis-Tag

## 2.10.2 klonierte Plasmide

Tabelle 2-9: klonierte Plasmide

Interne Nr.	Name	Ursprungsplasmid (geschnitten mit)	Insert
# 1498	pAF71	pUG34	CPn1054 AS 14-811 (Quelle: Anne Kerres, Frauke Herbst)
# 1565	pAF90	pKM32	CPn1054 AS 521-811 (Quelle: Anne Kerres, Frauke Herbst)
# 1627	pAF96	pBYE	CPn1054 AS 14-811 (Quelle: Anne Kerres, Frauke Herbst)
# 1685	pAF127	pUG34	CPn1054 AS 80-811 (Quelle: Anne Kerres, Frauke Herbst)
# 1691	pAF133	pKM32	CPn0072 Fusion AS 1-90/191-335 (Quelle: Anne Kerres, Frauke Herbst)
# 2214	pSV2	pUG34 ( <i>Sma</i> I)	CPn0043 AS 14-642; Genabschnitt amplifiziert mit C-1076 + C-811 von genomischer DNA
# 2215	pSV3	pUG34 ( <i>Sma</i> I)	CPn0043 AS 80-642; Genabschnitt amplifiziert mit C-1078 + C-811 von genomischer DNA
# 2216	pSV4	pGBKT7 ( <i>Sma</i> I)	CPn1054 AS 201-811; Genabschnitt amplifiziert mit C-1146 + C-1149 von genomischer DNA
# 2217	pSV5	pGBKT7 ( <i>Sma</i> I)	CPn1054 AS 79-811; Genabschnitt amplifiziert mit C-1147 + C-1149 von genomischer DNA
# 2218	pSV6	pGADT7 ( <i>Sma</i> I)	CPn1054 AS 79-811; Genabschnitt amplifiziert mit C-1150 + C-1151 von genomischer DNA
# 2219	pSV7	pGBKT7 ( <i>Sma</i> I)	CPn0043 AS 80-642; Genabschnitt amplifiziert mit C-1455 + C-1456 von genomischer DNA
# 2220	pSV8	pGBKT7 ( <i>Sma</i> I)	CPn0072 Fusion AS 1-90/191-335; Genabschnitt amplif. mit C-1496 + C- 1497 von pAF133
# 2221	pSV9	pSR1 ( <i>Eco</i> RV)	SLC30A9 AS 286-554; Genabschnitt amplifiziert mit C-1605 + C-1606 von

			Bank-Plasmid Y2H 0072-37
# 2222	pSV10	pFT8 ( <i>Sma</i> I)	COPS4 AS 1-250; Genabschnitt amplifiziert mit C-1725 + C-1982 von Bank-Plasmid Y2H-8
# 2223	pSV11	pFT8 ( <i>Sma</i> I)	COPS6 Volllänge; Gen amplifiziert mit C-1727 + C-1728 von Bank-Plasmid Y2H-40
# 2224	pSV12	pGBKT7 ( <i>Sma</i> I)	CPn0072 AS 1-90; Genabschnitt amplifiziert mit C-1827 + C-1496 von pAF133
# 2225	pSV13	pGBKT7 ( <i>Sma</i> I)	CPn0072 AS 191-335; Genabschnitt amplifiziert mit C-1828 + C-1497 von pAF133
# 2226	pSV14	mCherry CEN TRP ARS ( <i>Sma</i> I)	COPS4 Volllänge; Gen amplifiziert in zwei Fragmenten mit C-1869 + C-1911 bzw. C-1910 + C-1870 von Y2H-8
# 2227	pSV15	mCherry CEN TRP ARS ( <i>Sma</i> I)	COPS6 Volllänge; Gen amplifiziert mit C-1871 + C-1872 von Y2H-40
# 2228	pSV16	pGBKT7 ( <i>Sma</i> I)	CPn1054 AS 201-600; Genabschnitt amplifiziert mit C-1146 + C-1893 von pAF96
# 2229	pSV17	pGBKT7 ( <i>Sma</i> I)	CPn1054 AS 580-811; Genabschnitt amplifiziert mit C-1563 + C-1149 von pAF96
# 2230	pSV18	pUG34 ( <i>Sma</i> I)	CPn0072 Fusion AS 1-90/191-335; Genabschnitt amplifiziert mit C-957 + C-958 von pAF133
# 2246	pSV19	pGBKT7 ( <i>Sma</i> I)	CPn 1054 AS 79-450; Genabschnitt amplifiziert mit C-1147 + C-2015 von pAF96
# 2247	pSV20	pGBKT7 ( <i>Sma</i> I)	CPn 1054 AS 450-811; Genabschnitt amplifiziert mit C-2016 + C-1149 von pAF96

Alle Inserts wurden komplett durchsequenziert.

## 2.11 Zellen und Zelllinien

### 2.11.1 Prokaryoten

#### *Chlamydia pneumoniae*

GiD: Gießener Isolat aus einem Patienten mit akuter Bronchitis (Jantos, Heck *et al.*, 1997)

#### *Escherichia coli*

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

XL<sub>1</sub>-blue: *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac- [F' proAB lacI<sup>q</sup> ZΔM15  
Tn10(Tc<sup>R</sup>)]* (Stratagene)

### 2.11.2 Eukaryoten

#### *Saccharomyces cerevisiae*

CEN.PK2: *MAT<sub>a</sub> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>C</sup> SUC2*  


---

*MAT<sub>α</sub> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>C</sup> SUC2*  
 (Entian, Schuster *et al.*, 1999)

AH109: *MAT<sub>a</sub> trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ*  
*LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3 GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2*  
*URA3::MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-LacZ MEL1* (Clontech)

Y187: *MAT<sub>α</sub> trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 ade2-101*  
*gal4Δ gal80Δ URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-LacZ MEL1* (Clontech)

## Humane Zelllinien

HEp-2: epitheliale Larynxkarzinom-Zelllinie (ECACC-Nr.: 86030501; ATCC-Nr.: CCL-23)

HeLa229: epitheliale Zervixkarzinom-Zelllinie (ECACC-Nr.: 86090201; ATCC-Nr.: CCL2.1)

HEK293: humane embryonale Nierenzellen (ATCC-Nr.: CRL-1573)

## **2.12 Medien und Medienzusätze**

### **2.12.1 Medien für *Escherichia coli***

Grundrezept LB-Medium:

10 g	Bacto Trypton
5 g	Hefeextrakt
5 g	Natriumchlorid
13,5 g	Agar (für Platten)
ad 1 L	deion. H <sub>2</sub> O

Das Medium wird autoklaviert und es werden Platten gegossen oder das Flüssigmedium wird portioniert, autoklaviert und gelagert. Zur Selektion wird Ampicillin mit einer Endkonzentration von 50 mg/L bzw. Kanamycin mit einer Endkonzentration von 25 mg/L zugesetzt.

### **2.12.2 Medien für *Saccharomyces cerevisiae***

SD-Minimalmedium:

20 g	Glucose
1,7 g	Hefe-Stickstoffquelle
5 g	Ammoniumsulfat
2 g	Dropout-Mix
20 g	Agar (für Platten)
ad 1 L	deion. H <sub>2</sub> O

SG-Minimalmedium: anstelle der Glucose werden 20 g Galactose eingesetzt.

Zusammensetzung des Dropout-Mixes:

Tabelle 2-10: Zusammensetzung des Dropout-Mixes

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

Zur Selektion wird die entsprechende Aminosäure, Nucleobase oder chemische Verbindung aus dem Mix ausgelassen. Das Medium wird autoklaviert und es werden Platten gegossen oder das Flüssigmedium wird portioniert, autoklaviert und gelagert.

Den Reporterplatten für Hefe-Zwei-Hybrid Analysen wird zusätzlich X-alpha-Gal zugesetzt. Hierzu wird das Medium nach dem Autoklavieren auf ca. 50°C abkühlen gelassen und es werden 2 ml X-alpha-Gal Lösung (2 mg/ml in Dimethylformamid) pro Liter Medium zugegeben, gut vermischt und hiernach die Platten gegossen.

<u>YPD<sup>+</sup>-Medium:</u>	20 g	Glucose	
	10 g	Hefeextrakt	
	20 g	Pepton	
	2 ml	Adeninlösung	(2 mg/ml)
	4 ml	Tryptophanlösung	(5 mg/ml)
	13,5 g	Agar (für Platten)	
	ad 1 L	deion. H <sub>2</sub> O	

Das Medium wird autoklaviert und es werden Platten gegossen oder das Flüssigmedium wird portioniert, autoklaviert und gelagert.

2x YPDA-Medium: zweifach konzentriertes YPD<sup>+</sup> Medium mit Zugabe von zusätzlich 15 ml Adeninlösung.

0,5x YPDA-Medium: halb konzentriertes YPD<sup>+</sup> Medium mit Zugabe von zusätzlich 15 ml Adeninlösung.

### **2.12.3 Zellkulturmedien**

#### Medium für HEp-2 Zellen und HeLa-Zellen:

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) GlutaMAX<sup>TM</sup> + Glucose + Pyruvat

#### Medium für HEK293T-Zellen:

Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)

## 3. Methoden

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

Die Kultivierung von *E. coli* auf Selektionsplatten erfolgt im Inkubator bei 37°C. Flüssigkulturen werden im Schüttelinkubator bei 37°C und 140 Umdrehungen pro Minute (Upm) inkubiert.

#### 3.1.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

- Von *E. coli*-Zellen des Stamms XL<sub>1</sub>-blue, die auf einer LB-Selektionsplatte mit Tetracyclin (30µl/Platte) gewachsen sind, wird eine einzelne Kolonie gepickt und in 5 ml Medium über Nacht (üN) bei 37°C wachsen gelassen.
- Am Morgen wird die üN-Kultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 in 1 L LB-Medium überimpft und bei 37°C und 140 Upm wachsen gelassen, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,7 bis 0,8 erreicht ist.
- Nachdem die Kulturen 30 min auf Eis abgekühlt wurden, erfolgt eine Zentrifugation bei 4°C und 4000 Upm (Beckmann J2-21) für 15 min.
- Das Pellet wird zweimal mit je 1 L kaltem, sterilem ddH<sub>2</sub>O gewaschen und hiernach in 20 ml kaltem, sterilem 10%-igen Glycerin resuspendiert.
- Nach erneutem Zentrifugieren für 15 min bei 4°C und 4000 Upm (Beckmann J2-21) werden die Zellen in 2-3 ml sterilem 10%-igen Glycerin gelöst, aliquotiert und 1 min in Flüssigstickstoff schockgefroren.
- Die Lagerung der Zellen bis zum Gebrauch erfolgt bei – 80°C.

#### 3.1.2 Ein-Minuten-Transformation

Zum Einbringen reiner und hoch konzentrierter Plasmid-DNA, welche eine Ampicillin-Resistenz trägt, in *E. coli* wird die Methode der Ein-Minuten-Transformation verwendet.

- Zu 7 µl DMSO-kompetenten *E. coli*-Zellen vom Stamm BL21 auf Eis (hergestellt von der Arbeitsgruppe Hegemann nach Sambrook, Fritsch & Maniatis 1989) werden 500 – 1000 ng Plasmid-DNA hinzugegeben und die Mischung wird 1 min bei 42°C inkubiert.
- Es werden 100 µl LB-Medium hinzupipettiert und der komplette Ansatz wird auf einer entsprechenden Selektionsplatte ausplattiert.

### 3.1.3 Transformation durch Elektroporation

Niedrig konzentrierte Plasmid-DNA sowie Plasmide, die eine Kanamycin-Resistenz tragen, können mittels Ein-Minuten-Transformation nicht in *E. coli* eingebracht werden. In diesem Fall wird die effizientere Methode der Elektroporation angewendet.

- Zu 10 µl elektrokompetenten *E. coli*-Zellen auf Eis (hergestellt nach 3.1.1) werden 500 – 1000 ng Plasmid-DNA sowie 40 µl ddH<sub>2</sub>O hinzugegeben.
- Der komplette Transformationsansatz wird in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Bio-Rad) pipettiert und die Elektroporation unter folgenden Bedingungen durchgeführt:  
  
Spannung: 2,2 kV; Widerstand: 200 Ohm; Kapazität: 25 µF; Pulszeit: 8,7 msec
- Es wird 1 ml LB-Medium in die Küvette zugegeben, der Ansatz in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 30 bis 60 min im Schüttelinkubator inkubiert.
- Der Ansatz wird 5 sec bei maximaler Umdrehungszahl in der Tischzentrifuge (Heraeus Biofuge pico) abzentrifugiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und komplett auf einer entsprechenden Selektionsplatte ausplattiert.

### 3.1.4 Plasmid-Minipräparation

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA mittlerer Reinheit und Konzentration wird eine Präparation im kleinen Maßstab durchgeführt.

- Eine 2 ml üN-Kultur einer transformierten *E. coli*-Kolonie in entsprechendem Selektionsmedium wird in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 6000 Upm für 5 min in der Tischzentrifuge (Heraeus Biofuge pico) abzentrifugiert.
- Das Pellet wird mit 1 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen und wiederum abzentrifugiert.
- Es werden 300 µl Puffer P1 (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) und dasselbe Volumen Puffer P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) zugegeben und die Zellen hierin resuspendiert.
- Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) werden 300 µl Puffer P3 (3 M Kaliumacetat pH 5,5) zugegeben und der Ansatz wird 15 min auf Eis inkubiert; hierauf folgt eine Zentrifugation bei 13000 Upm für 15 min in der Tischzentrifuge.
- Der Überstand wird in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt und es werden 0,5 ml Isopropanol hinzupipettiert.

- Nach einer Zentrifugation für 20 min bei 13000 Upm wird der Überstand verworfen, das Pellet mit 1 ml 70%-igem Ethanol gewaschen und anschließend im Vakuum-Konzentrator getrocknet. Zuletzt wird das Pellet in 50 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### 3.1.5 Plasmid-Midipräparation

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA hoher Konzentration und Reinheit wird eine Plasmid-Midipräparation unter Verwendung des DNA-Midipräparations-Kits (Qiagen) durchgeführt. Eine 50 ml üN-Kultur einer transformierten *E.coli* Kolonie in entsprechendem Selektionsmedium wird hierbei nach der dem Kit beiliegenden Vorschrift aufgearbeitet.

## 3.2 Kultivierung und Manipulation von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* auf Selektionsplatten erfolgt im Inkubator bei 30°C. Flüssigkulturen werden entweder im Rad bei 30°C oder im Schüttelinkubator bei 30°C und 140 Upm inkubiert.

### 3.2.1 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

- Eine 5 ml üN-Kultur wird am Morgen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 in 50 ml YPD-Medium überimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 1,0 (= 2 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml) bei 30°C im Schüttelinkubator inkubiert.
- Die Flüssigkultur wird 5 min bei 3500 Upm (Heraeus Megafuge) abzentrifugiert, mit 25 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen und wiederum 5 min bei 3500 Upm abzentrifugiert.
- Das Pellet wird in 1 ml 100 mM Lithiumacetat aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.
- Nach Zentrifugation bei 13000 Upm für 5 sec in der Tischzentrifuge (Heraeus Biofuge pico) wird das Pellet in 100 mM Lithiumacetat resuspendiert, so dass eine Zellzahl von 1 x 10<sup>9</sup> Zellen/ml vorliegt.
- Für die Transformation werden 50 µl Aliquots der aufbereiteten Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben, 5 sec bei 13000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge pico) und nach Entfernen des Überstands folgende Reagenzien zu den Pellets gegeben:

240 µl PEG (50 % w/v)

36 µl Lithiumacetat (1 M)

50 µl Carrier-DNA (2 mg/ml)

- x  $\mu$ l Plasmid-DNA (100 – 500 ng)
- y  $\mu$ l Plasmid-DNA 2 (100 – 500 ng) im Fall einer Ko-Transformation von 2 Vektoren
- 34 – x (– y)  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O

Die Carrier-DNA muss zuvor 10 min bei 100°C gekocht und auf Eis abgekühlt werden.

- Die Ansätze werden gründlich gevortext und 30 min bei 30°C inkubiert. Hiernach erfolgt ein Hitzeschock für 30 min bei 42°C.
- Die Ansätze werden daraufhin kurz in der Tischzentrifuge bei maximaler Umdrehungszahl abzentrifugiert, die Pellets jeweils in 200  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O gelöst und auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

### 3.2.2 Homologe Rekombination in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* kann lineare DNA-Moleküle, die Homologie zueinander aufweisen, verknüpfen. Dieser Vorgang wird als homologe Rekombination bezeichnet und kann sich für eine Klonierung in Hefe zunutze gemacht werden. Hierbei wird der als Rückgrat dienende Vector (Ursprungsvector) mittels eines Restriktionsverdau linearisiert. Das einzubringende Gen wird über eine PCR amplifiziert, wobei beide eingesetzten Primer jeweils eine 20 – 23 Nukleotide umfassende Homologie zum Beginn bzw. Ende des Gens aufweisen und eine 40 Nukleotide umfassende Homologie zu der Sequenz um die Schnittstelle im Vector. Das PCR-Produkt wird zusammen mit dem linearisierten Vector in die Hefe transformiert und aufgrund der künstlich eingefügten Homologie zu den linearen Enden des Vectors wird das PCR-Fragment in den Vector ligiert. Für eine Klonierung mittels homologer Rekombination sollten ca. 100 ng geschnittener Ursprungsvector sowie ca. 300 ng PCR-Produkt eingesetzt werden. Die Transformation in die Hefe erfolgt wie unter 3.2.1 beschrieben.

### 3.2.3 Isolierung von Gesamt-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Zusammensetzung der Puffer entspricht der unter 3.1.4 beschriebenen.

- Eine  $\bar{u}$ N-Kultur transformierter Hefezellen in entsprechendem Selektionsmedium wird in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 6000 Upm (Heraeus Biofuge pico) abzentrifugiert.
- Nach Waschen des Pellets mit 1 ml ddH<sub>2</sub>O wird wiederum bei 6000 Upm für 5 min zentrifugiert.
- Die Zellen werden in 500  $\mu$ l Puffer P1 resuspendiert und hiernach werden 500  $\mu$ l Puffer P2 sowie ca.  $\frac{2}{3}$  des Volumens an Glasperlen hinzugegeben und der Ansatz wird für 20 min bei maximaler Geschwindigkeit geschüttelt (Vibrax VXR, IKA).

- Der Überstand wird in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und es werden 300 µl Puffer P3 zugegeben. Nach Inkubation für 10 min auf Eis erfolgt eine Zentrifugation für 15 min bei 13000 Upm in der Tischzentrifuge.
- Der Überstand wird erneut in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt und für 30 min bei 13000 Upm zentrifugiert.
- Das Pellet wird mit 500 µl 70%-igem Ethanol gewaschen, anschließend im Vakuum-Konzentrator getrocknet und in 20 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 3.2.4 Hefe-Zwei-Hybrid Screen

#### Grundlagen des verwendeten Hefe-Zwei-Hybrid Systems

Das verwendete Hefe-Zwei-Hybrid System basiert auf dem modularen Aufbau des Gal4p Transkriptionsfaktors, der aus einer DNA-bindenden Domäne (DNA-BD) und einer Aktivierungsdomäne (AD) zusammengesetzt ist. Befinden sich beide Domänen in räumlicher Nähe zueinander, kann der Transkriptionsfaktor aktiv werden. In dem Hefe-Zwei-Hybrid Stamm AH109 ist das endogene *GAL4*-Gen deletiert, zudem befinden sich in diesem Stamm die unter Gal4p-Regulation stehenden Reportergene *HIS3*, *ADE2* sowie *MEL1*. *HIS3* und *ADE2* sind Nährstoffmarker, die für Proteine des Histidin- bzw. Adeninbiosynthesewegs codieren. Werden diese Gene exprimiert, kann die Hefe auf Selektionsmedium, das kein Histidin und Adenin enthält, wachsen; andernfalls nicht. *MEL1* codiert für die alpha-Galactosidase, ein von der Hefe in die Umgebung sekretiertes Enzym, das das farblose Substrat X-alpha-Gal in ein blaues Produkt umsetzt. Um zwei Proteine auf Interaktion zu testen, wird das eine in Fusion mit der Gal4p DNA-BD mit dem zweiten Protein in Fusion zu der Gal4p AD in Hefe ko-exprimiert. Die Basisvectoren des hier verwendeten Hefe-Zwei-Hybrid Systems der Firma Clontech sind pGBKT7 (enthält die codierende Sequenz für die Gal4p DNA-BD) sowie pGADT7 (enthält die codierende Sequenz für die Gal4p AD). Das Plasmid pGBKT7 beinhaltet zudem das Gen *TRP1*, welches ein Protein des Tryptophanbiosynthesewegs codiert; pGADT7 beinhaltet *LEU2*, welches für ein Protein des Leucinbiosynthesewegs codiert. Zur Identifizierung von Hefen, die beide Plasmide besitzen, werden diese auf Medium ausplattiert, dem die beiden Aminosäuren Tryptophan und Leucin fehlen (SD/-Leu/-Trp; Selektionsmedium). Für den Protein-Protein-Interaktionstest werden die Hefen auf Medium ausplattiert, dem neben Leucin und Tryptophan auch die Aminosäuren Adenin und Histidin fehlen und dem die Substanz X-alpha-Gal zugegeben wurde (Reportermedium). Findet Wachstum und eine Blaufärbung der Kolonien statt, so kann man davon ausgehen, dass durch eine Interaktion der getesteten Proteine die daran fusionierten Gal4p-Domänen in räumliche Nähe gelangt sind und die Reportergene aktiviert werden konnten. Die Stringenz des Reportermediums kann variiert werden: Hochstringentes

Medium testet die Aktivierung aller drei Reportergene, mittelstringentes prüft die Aktivierung zweier Reportergene und niedrigstringentes zeigt nur die Aktivierung eines einzigen Reportergens an (Beispiel: SD/-Leu/-Trp/-His testet auf die Expression von *HIS3* = niedrigstringent; SD/-Leu/-Trp/-His/ + X-alpha-Gal testet auf die Expression von *HIS3* sowie *MEL1* = mittelstringent).

#### Screenen einer humanen cDNA-Bank nach Interaktionspartnern mittels Hefepaarung

Für einen Interaktionspartnerscreen mittels Hefe-Zwei-Hybrid wird zunächst die codierende Sequenz für das zur Suche einzusetzende Protein (Köder-Protein) in den Vector pGBKT7 kloniert und in den Hefestamm AH109 transformiert. Hierauf folgt ein Test auf Autoaktivierung der Reportergene durch den Köder auf entsprechendem Reportermedium. Findet keine Autoaktivierung statt, so kann das Konstrukt für den Screen eingesetzt werden.

Es wird eine in den Hefestamm Y187 vortransformierte cDNA-Bank (*human testis*) von der Firma Clontech verwendet. Die cDNA-Inserts sind hierbei über homologe Rekombination in den Vector pGADT7-Rec in Fusion zu der für die Gal4p Aktivierungsdomäne codierenden Sequenz eingebracht worden. Das Plasmid pGADT7-Rec entspricht im Prinzip pGADT7, es ist lediglich eine kurze Sequenz eingefügt worden, die das Einbringen der cDNA-Bank über homologe Rekombination ermöglicht. Der Hefestamm Y187 besitzt den Paarungstyp *MAT $\alpha$* , der Stamm AH109, in den das Köder-Plasmid transformiert wurde, den Paarungstyp *MAT $\underline{a}$* . Da Hefen mit einem entgegengesetzten Paarungstyp fusionieren und diploide Zellen bilden, kann das Zusammenbringen des Köder-Plasmids mit den Bank-Plasmiden über Hefepaarung erfolgen.

- Es wird eine  $\bar{u}$ N-Kultur einer mit dem Köder-Plasmid transformierten Hefekolonie vom Stamm AH109 in 50 ml entsprechendem Selektionsmedium (SD/-Trp) angeimpft.
- Die Kultur wird bei 30°C und 250 Upm inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,8 erreicht ist.
- Die Zellen werden für 5 min bei 3500 Upm abzentrifugiert und hiernach auf eine Zellzahl von  $2 \times 10^8$  Zellen/ml in Selektionsmedium eingestellt.
- Ein 1 ml Aliquot der in den Hefestamm Y187 prätransformierten cDNA Bank wird im Wasserbad bei RT aufgetaut.
- Es werden 10  $\mu$ l aus dem Bank-Aliquot entnommen und schrittweise auf 1:100, 1:1000 und 1:10000 in entsprechendem Selektionsmedium (SD/-Leu) verdünnt. Von den Verdünnungen werden je 100  $\mu$ l auf Selektionsplatten ausgestrichen und diese bei 30°C inkubiert (dieser Schritt dient zur Bestimmung des Bank-Titers, s.u.).
- Nun wird das Bank-Aliquot mit der zuvor auf eine definierte Zellzahl eingestellten Kultur an Köder-Plasmid enthaltendem AH109 in einem sterilen 2 L Kolben zusammengegeben und mit 45 ml 2x YPDA-Medium (+ 50  $\mu$ g/ml Kanamycin) aufgefüllt.

- Die Kultur wird 20-24 h bei 30°C und 50 Upm inkubiert, damit die Hefepaarung erfolgen kann (mit Hilfe eines Mikroskops kann das Vorhandensein von Zygoten in der Kultur überprüft werden).
- Sind Zygoten in der Kultur vorhanden, so werden die Zellen 10 min bei 3500 Upm abzentrifugiert (Heraeus Megafuge) und hierauf in 10 ml 0,5x YPDA-Medium (+ 50 µg/ml Kanamycin) resuspendiert.
- Es werden schrittweise Verdünnungen der Kultur von 1:100, 1:1000 und 1:10000 hergestellt und jeweils 100 µl hiervon auf Doppel-Selektionsplatten (SD/-Leu/-Trp) sowie auf SD/-Leu und SD/-Trp Selektionsplatten ausplattiert und bei 30°C inkubiert (mittels dieser Platten werden die Paarungseffizienz und die Anzahl durchmusterter Klone bestimmt, s.u.).
- Die restliche Kultur gepaarter Hefezellen wird in 200 µl Aliquots auf 55-60 großen Platten mit mittelstringentem Reportermedium (SD/-Leu/-Trp/-His + X-alpha-Gal) ausgestrichen und bei 30°C inkubiert

Die großen Platten werden nun täglich nach blau gefärbten Kolonien durchmustert und diese auf kleinen Platten mit hochstringentem Reportermedium (SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His + X-alpha-Gal) vereinzelt. Zur Absicherung des Ergebnisses wird der Vereinzlungsschritt auf frischen Reporterplatten zweimal wiederholt. Aus hiernach noch positiven Kolonien wird die Hefe-Gesamt-DNA isoliert, in *E. coli* elektroporiert und hieraus die Plasmid-DNA gewonnen. Als weitere Verifizierung der Interaktion wird eine gerichtete Ko-Transformation jeweils eines isolierten Bank-Plasmids mit dem Köder-Plasmid durchgeführt und die transformierten Hefen auf hochstringentem Reportermedium ausgestrichen. Die Inserts derjenigen Bank-Plasmide, die reproduzierbar Interaktion zeigen und zudem nicht zu einer Autoaktivierung der Reportergene führen, werden sequenziert.

#### Bestimmung der Kennzahlen eines Screens

Bestimmung des Titers der cDNA-Bank:

Der Titer der humanen cDNA-Bank wird durch Auszählung der Hefen auf den SD/-Leu Selektionsplatten, auf denen die unterschiedlichen Verdünnungsstufen der Bank ausplattiert wurden, unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ermittelt. Die Angabe wird in Zellen/ml gemacht.

Bestimmung der Paarungseffizienz:

Zur Bestimmung der Paarungseffizienz werden die Hefen auf den SD/-Leu-, SD/-Trp- sowie den Doppel-Selektionsplatten (SD/-Leu/-Trp), auf denen die unterschiedlichen

Verdünnungsstufen der gepaarten Kultur ausgestrichen wurden, ausgezählt. Aus dem Verhältnis von diploiden Zellen zum limitierenden Partner ergibt sich die Paarungseffizienz:

$$\text{Paarungseffizienz} = \frac{\text{Anzahl diploider Zellen pro ml}}{\text{Anzahl Zellen limitierender Partner pro ml}} \times 100 \quad [\%]$$

Bestimmung der Anzahl durchmusterter Klone:

Zur Bestimmung der Anzahl durchmusterter Klone werden die Hefen auf den Doppel-Selektionsplatten (SD/-Leu/-Trp), auf denen die unterschiedlichen Verdünnungsstufen der gepaarten Kultur ausgestrichen wurden, ausgezählt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und des plattierten Volumens wird die Anzahl Diploider pro ml errechnet. Diese Zahl wird mit dem Resuspensions-Volumen multipliziert, also dem Volumen, in dem die Hefezellen zum Ausplattieren auf den großen Screen-Platten aufgenommen worden waren.

### 3.2.5 Serieller Verdünnungstropftest

Von einer 5 ml üN-Kultur transformierter Hefezellen in induzierendem Selektionsmedium wird am Morgen mittels einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl pro ml bestimmt und es werden Ansätze auf die Zellzahlen  $2 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $2 \times 10^5/\text{ml}$ ,  $2 \times 10^4/\text{ml}$  und  $2 \times 10^3/\text{ml}$  eingestellt. Jeweils 5  $\mu\text{l}$  jeder Verdünnung werden nebeneinander auf eine Selektionsplatte getropft, was einer Zellzahl von 10000, 1000, 100 sowie 10 entspricht. Die Platte wird bei 30°C inkubiert und das Wachstum der Hefezellen täglich dokumentiert.

### 3.2.6 Gewinnung von Proteinlysate aus Hefekulturen

- Eine 5 ml üN-Kultur transformierter Hefezellen in nicht induzierendem Selektionsmedium wird am Morgen auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,1 in 50 ml induzierendem Selektionsmedium verdünnt und bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von ca. 0,8 im Schüttelinkubator wachsen gelassen.
- Die Zellen werden 10 min bei 3500 Upm (Heraeus Megafuge) abzentrifugiert, mit 40 ml TBS-Puffer gewaschen und wiederum 10 min bei 3500 Upm zentrifugiert.
- Auf das Pellet werden 700  $\mu\text{l}$  Lysepuffer (50 mM HEPES-KOH pH 7,5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0,1 % Natriumdeoxycholat, 1mM PMSF, 1x Proteaseinhibitor-Cocktail) sowie  $\frac{2}{3}$  des Volumens an Glasperlen gegeben und der Ansatz wird für 1 h bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit gevortext (Vibrax VXR, IKA).

- Der Überstand wird auf Eis in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 30 min bei 15000 Upm und 4°C zentrifugiert (Heraeus Biofuge primo).
- Wiederum wird der Überstand, das Proteinlysate, in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei – 20°C gelagert.

### 3.2.7 Vorbereitung von *S. cerevisiae*-Zellen für die Mikroskopie

- Eine 5 ml üN-Kultur transformierter Hefezellen in nicht induzierendem Selektionsmedium wird am Morgen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 in 5 ml induzierendem Medium angeimpft und 4–5 h bei 30°C unter rotierendem Schütteln wachsen gelassen.
- Hiernach werden 2 ml der Kultur in ein Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert. Auf das Pellet wird 1 ml 3,7%-ige PFA-Lösung (in PBS: 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> in deion. H<sub>2</sub>O; pH 7,4) gegeben und es wird 10 min bei 30°C inkubiert.
- Nachdem der Ansatz abzentrifugiert und dreimal mit je 1,5 ml PBS gewaschen wurde, wird 1 ml DAPI-Lösung (1µg/ml) hinzugegeben und 3 min bei RT inkubiert.
- Die Zellen werden wiederum abzentrifugiert, einmal mit 1,5 ml PBS gewaschen und hiernach in 0,5 ml PBS aufgenommen.
- Ein Deckglas wird mit Poly-L-Lysin-Lösung (0,5 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O) beschichtet, 15 min inkubiert und nach Abnehmen der Lösung trocknen gelassen.
- Die Hefezellen in PBS werden mit einer Pipette aufgenommen und ein paar Mal über das schräg gehaltene Deckglas perlen gelassen, so dass Zellen an der Poly-Lysin-Beschichtung haften bleiben.
- Auf einen Objektträger wird ein Tropfen Vectashield aufgegeben und hierauf, mit der angetrockneten Zellschicht nach unten gerichtet, das Deckglas gelegt. Das Deckglas wird mit Klarlack versiegelt und bei 4°C gelagert.

### 3.3 Zellbiologische Methoden

#### 3.3.1 Kultivierung von Humanzellen in der Zellkultur

##### 3.3.1.1 Herstellung aller Lösungen für die Zellkultur

Hitzeinaktivierung von fötalem Kälberserum (FKS):

- 500 ml FKS werden bei RT aufgetaut und hiernach 1 h bei 56°C im Wasserbad hitzeinaktiviert.
- Das Serum wird in 50 ml Aliquots portioniert und bei –20°C gelagert.

Vitamine und Amphotericin B:

- Die Vitamine und das Amphotericin B werden aufgetaut, in 5 ml Portionen aliquotiert und bei –20°C gelagert.

Herstellung der Trypsinlösung:

- Die Trypsin/EDTA-Lösung wird aufgetaut und in 5 ml Aliquots portioniert bei –20°C gelagert.
- Zur Herstellung der Gebrauchslösung werden 5 ml Trypsinlösung mit 95 ml Hank's Salzlösung (HBSS) zusammengegeben und bei 4°C gelagert.

Herstellung der para-Formaldehydlösung (für die Fixierung):

- Zur Herstellung der Stammlösung werden 3,7 g para-Formaldehyd (PFA) in 10 ml PBS bei 56°C und unter Zugabe weniger Tropfen NaOH (5 M) gelöst.
- Zur Herstellung der Gebrauchslösung wird ein Aliquot der 37%-igen Stammlösung 1:10 in PBS verdünnt und bei 4°C gelagert.

##### 3.3.1.2 Herstellung des Zellkulturmediums

Zu 500 ml DMEM GlutaMAX<sup>TM</sup>- bzw. IMDM-Medium werden folgende Zusätze gegeben:

- |   |                             |
|---|-----------------------------|
| ▪ 50 ml FKS (hitzeinaktiviert)                  | Endkonzentration: 10 %      |
| ▪ 5 ml MEM Vitamine (100x)                      | Endkonzentration: 1x        |
| ▪ 5 ml MEM nicht-essentielle Aminosäuren (100x) | Endkonzentration: 1x        |
| ▪ 5 ml Fungizone (Amphotericin B) (250 µg/ml)   | Endkonzentration: 2,5 µg/ml |
| ▪ 0,5 ml Gentamycin (50 mg/ml)                  | Endkonzentration: 50µg/ml   |

### **3.3.1.3 Passagieren von adhärennten Humanzellen**

#### **3.3.1.3.1 Ablösen von adhärennten Humanzellen durch Trypsinbehandlung**

- Der Zellrasen einer konfluent bewachsenen 80 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche wird mit 10 ml HBSS gewaschen, nachdem das Medium abgenommen wurde.
- Es werden 5 ml Trypsinlösung auf die Zellen gegeben und es wird 10 min bei RT inkubiert. Das Ablösen der Zellen kann durch gelegentliches Schwenken gefördert werden.
- Die abgelösten Zellen werden nach Hinzugabe von 5 ml Medium abgezogen, in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 500 Upm (Rotanta 460R) abzentrifugiert.
- Der Überstand wird abgenommen und die Zellen in 5 ml frischem Medium resuspendiert.

#### **3.3.1.3.2 Passage von adhärennten Humanzellen in Zellkulturflaschen**

- Die nach 3.3.1.3.1 aufgearbeiteten Zellen werden je nach Bedarf mit Medium verdünnt und in kleinen 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (5 ml Suspension je Flasche) oder großen 80 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (15 ml Suspension je Flasche) neu ausgesät.
- Die Inkubation erfolgt bei 37°C und 6 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank so lange, bis die gewünschte Zelldichte erreicht ist.

#### **3.3.1.3.3 Passage von adhärennten Humanzellen in Gewebekulturplatten**

- Die nach 3.3.1.3.1 aufgearbeiteten Zellen werden je nach Bedarf mit Medium verdünnt.
- Je 1 ml Suspension wird in eine Vertiefung einer Gewebekulturplatte pipettiert, in die zuvor mittels einer Pinzette ein steriles Glasplättchen eingelegt wurde.
- Luftbläschen unterhalb der Glasplatte werden mittels einer sterilen Pipettenspitze entfernt.
- Die Inkubation erfolgt bei 37°C und 6 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank so lange, bis die gewünschte Zelldichte erreicht ist.

### 3.3.1.4 Transfektion von adhärennten Humanzellen

Für die Transfektion werden zu 80 % konfluent gewachsene Humanzellen auf Glasplättchen in 24-Well Platten verwendet.

- Es wird folgender Transfektionsansatz pipettiert:
  - 2 µg Plasmid-DNA (aus Midi-Präparation)
  - 10 µl Calciumchlorid (1 M)
  - 30 µl ddH<sub>2</sub>O (steril)
- Der Mix wird unter Vortexen zu 40 µl 2x BBS (50 mM BES pH 6,9, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) hinzupipettiert und der komplette Ansatz 20 min bei RT inkubiert.
- Das Medium wird von den Humanzellen abgezogen und durch 200 µl serumfreies Medium ersetzt. Die 80 µl Transfektionsansatz werden tropfenweise unter leichtem Schwenken hinzugegeben und die Platte wird für 3-5 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.
- Hiernach wird das Medium abgenommen und es wird 1 ml serumhaltiges Medium auf die Zellen gegeben. Nach weiteren 24 h Inkubation bei 37°C können die Zellen fixiert und analysiert werden.

### 3.3.1.5 Aktin-Färbung transfizierter Humanzellen

Für die Aktin-Färbung werden transfizierte Humanzellen in Gewebekulturplatten verwendet.

- Die Zellen werden zweimal mit 1 ml vorgewärmtem PBS gewaschen und mit 1 ml 3,7%-iger PFA-Lösung für 10 min bei RT fixiert.
- Nach zweimaligem weiteren Waschen mit PBS werden die Zellen mit 1 ml 0,1%-igem Triton X-100 (in PBS) 3 bis 5 min bei RT permeabilisiert, worauf wiederum zwei Waschschrte folgen.
- Zum Blockieren unspezifischer Färbungen werden die Zellen mit 1%-iger BSA-Lösung (in PBS) für 20 – 30 min bei RT inkubiert.
- Eine Stammlösung Rhodamin-Phalloidin (6,6 µM in Methanol) wird 200-fach in PBS verdünnt und 200 µl je Vertiefung werden auf die Zellen gegeben, nachdem die Blockierungslösung entfernt wurde.
- Nach 20 min Inkubation bei RT mit der Färbelösung wird diese abgenommen und die Zellen werden einige Male mit 1 ml PBS gewaschen.

- Das Deckglas wird entnommen, getrocknet und mit dem Zellrasen nach unten auf einen Objektträger gelegt, auf den zuvor ein Tropfen Vectashield aufgebracht worden war. Nach Versiegeln mit Klarlack kann das Präparat mikroskopiert werden.

### 3.3.2 Chlamydienkultur

#### 3.3.2.1 Herstellung des Chlamydienkultur-Mediums

Für die Chlamydienkultur wird dem Zellkulturmedium Cycloheximid in einer Endkonzentration von 1,2 µg/ml zugesetzt. Durch Cycloheximid wird die eukaryotische Proteinsynthese gehemmt, was das Fortschreiten der Chlamydieninfektion begünstigt. Für einzelne Experimente ist auf den Zusatz von Cycloheximid verzichtet worden. Dies wird an entsprechender Stelle angemerkt.

#### 3.3.2.2 Passage von Chlamydien in Gewebekulturplatten

Es werden zu 80-90 % konfluent gewachsene Humanzellen auf Glasplättchen in 24-Well Platten verwendet.

- Ein Chlamydien-Pool wird bei 37°C im Brutschrank aufgetaut und entsprechend der gewünschten Infektiosität mit Zellkulturmedium verdünnt.
- 1 ml der Suspension pro Vertiefung wird auf die Zellen gegeben, nachdem das alte Medium abgenommen wurde.
- Die Platte wird für 1 h bei 2920 Upm (Rotanta 460R) und 30°C zentrifugiert und hiernach 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wird das Medium abgenommen und durch 1 ml frisches Medium (mit oder ohne Zusatz von 1,2 µg/ml Cycloheximid) ersetzt.
- Nach der gewünschten Infektionsdauer werden die Zellen fixiert und weitergehend analysiert.

#### 3.3.2.3 Passage von Chlamydien in kleinen Zellkulturflaschen

Es werden zu 80-90 % konfluent gewachsene Humanzellen in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen verwendet.

- Ein Chlamydien-Pool wird bei 37°C im Brutschrank aufgetaut und entsprechend der gewünschten Infektiosität mit Zellkulturmedium verdünnt.
- Je 5 ml der Suspension werden pro Flasche auf die Zellen gegeben, nachdem das alte Medium entfernt wurde.

- Die Flaschen werden 1 h bei 2920 Upm (Rotanta 460R) und 30°C zentrifugiert und hiernach 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wird das Medium abgenommen und durch 5 ml frisches Medium mit oder ohne Zusatz von Cycloheximid ersetzt.
- Nach 48-72 h werden die infizierten Zellen mittels eines Zellschabers im Medium in Lösung gebracht, die Suspensionen aus bis zu sechs Flaschen in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und 45 sec mit dem Ultraschallstab sonifiziert.
- Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 2670 Upm wird der Überstand in ein frisches 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und die Zentrifugation wiederholt.
- Der Überstand wird nach Bedarf verdünnt und zur Infektion weiterer Zellen in Zellkulturflaschen verwendet.

#### **3.3.2.4 Detektion chlamydialer Proteine mittels indirekter Immunfluoreszenz**

*C. pneumoniae*-infizierte Humanzellen in Gewebekulturplatten werden nach der gewünschten Infektionsdauer mittels Methanol oder 3,7%-iger PFA-Lösung fixiert.

##### Methanol-Fixierung:

500 µl Methanol werden pro Vertiefung auf die Zellen gegeben, nachdem das Medium abgenommen wurde. Nach drei Minuten Inkubation bei RT wird das Methanol entfernt und die Zellen werden dreimal für 5 min mit 1 ml HBSS gewaschen.

##### PFA-Fixierung:

500 µl 3,7%-ige PFA-Lösung werden pro Vertiefung auf die Zellen gegeben, nachdem das Medium entfernt wurde. Nach 10 min Inkubation bei RT wird die PFA-Lösung abgenommen und die Zellen werden dreimal für 5 min mit 1 ml HBSS gewaschen.

##### Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse:

- 20 µl entsprechend verdünnter Primärantikörper (in HBSS) werden auf die fixierten Zellen gegeben und es wird für 30 min bei RT inkubiert.
- Nach dreimaligem Waschen mit 1 ml HBSS für jeweils 3 min werden 20 µl des entsprechend verdünnten Sekundärantikörpers (in HBSS) auf die Zellen gegeben und es wird 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert.
- Dem dreimaligen Waschen mit 1 ml HBSS folgt nun die Zugabe von 20 µl DAPI-Lösung (1µg/ml in PBS). Die Platte wird für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert.

- Es wird abschließend dreimal gewaschen, das Glasplättchen entnommen, getrocknet und mit dem Zellrasen nach unten auf einen Tropfen Vectashield auf einem Objektträger gelegt. Nach Versiegeln mit Klarlack kann das Präparat mikroskopiert werden.

### 3.3.2.5 Gewinnung von Gesamt-Proteinlysate aus infizierten Humanzellen

Für die Analyse von Proteinexpression während einer Infektion werden Humanzellen in kleinen Zellkulturflaschen mit *C. pneumoniae* infiziert und ohne Anwesenheit von Cycloheximid im Medium bei 37°C inkubiert. Nach der gewünschten Infektionsdauer werden die Zellen geerntet und es wird Lysat hergestellt.

- Nach Entfernung des Mediums werden die Zellen einmal mit 5 ml kaltem HBSS gewaschen.
- Es wird auf Eis 1 ml kalter Lysepuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1 % SDS, 1 % NP-40, 0,5 % Natriumdeoxycholat, 1 mM PMSF, 1x Proteaseinhibitor-Cocktail) auf die Zellen gegeben und diese werden hierin mittels eines sterilen Zellschabers gelöst.
- Die Zellen werden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren aufgebrochen.
- Das Lysat wird 30 min bei 4°C und 15000 Upm (Heraeus Biofuge primo) zentrifugiert, der Überstand wird in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

### 3.3.3 Test auf Kontamination durch *Mycoplasma* sp.

In regelmäßigen Abständen sollte die Zellkultur auf Kontamination durch Mycoplasmen getestet werden. Hierzu wird eine *Mycoplasma*-spezifische PCR durchgeführt, die das 16 S rRNA-Gen als Zielsequenz hat (Ossewaarde, de Vries *et al.*, 1996). Es werden 100 µl Überstand von einer Zellkulturflasche abgenommen und 15 min bei 100°C erhitzt.

<u>PCR-Ansatz:</u>	10 µl	Matrizen-DNA (erhitzter Überstand)
	5 µl	10x PCR-Puffer
	2,5 µl	dNTP-Mix (je 4 mM)
	3 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)

1 µl	Oligonukleotid GPO3 (End: 50 pmol)
1 µl	Oligonukleotid MGSO (End: 50 pmol)
0,25 µl	TrueStart <i>Taq</i> DNA-Polymerase
ad 50 µl	ddH <sub>2</sub> O

### PCR-Programm:

Tabelle 3-1: PCR-Programm zum Nachweis von *Mycoplasma*-DNA

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	1 min	} 35 Zyklen
Primer-Anlagerung	60°C	1 min	
Elongation	72°C	1 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	

Die erwartete Fragmentgröße beträgt 270 bp.

## 3.4 Molekularbiologische Methoden

### 3.4.1 Restriktionsspaltung von DNA

Zur Linearisierung von Vektoren für die homologe Rekombination und zur Kontrollspaltung hergestellter Konstrukte wird die DNA restriktionsverdaut.

<u>Ansatz:</u>	0,5 – 1 µg	Plasmid DNA
	0,5 µl	Restriktionsenzym (10 U/µl)
	2 µl	Restriktionspuffer (10x konzentriert)
	ad 20 µl	ddH <sub>2</sub> O

Die Inkubation des Ansatzes erfolgt bei der für das Enzym optimalen Temperatur (nach Herstellerangaben) für mindestens 4 h, optional über Nacht.

### 3.4.2 PCR zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten für homologe Rekombination

Für die Generierung der in der homologen Rekombination in Hefe einzusetzenden DNA-Fragmente werden Primer benutzt, welche 20-23 Nukleotide Homologie zum Zielgen und 40 Nukleotide Homologie zum Vector besitzen. Die PCRs werden unter Verwendung der Phusion-Polymerase, der Pfx-Polymerase oder der *Taq*-Polymerase durchgeführt. Die Phusion-Polymerase sowie die *Taq*-Polymerase besitzen eine optimale Arbeitstemperatur von 72°C, die Pfx-Polymerase eine von 68°C.

<u>PCR-Ansatz:</u>	1 µl	Matrizen-DNA (50-100 ng)
	5 µl	PCR-Puffer (10x konzentriert)
	2,5 µl	dNTP-Mix (je 4 mM)
	0,5 µl	Oligonukleotid 1 und Oligonukleotid 2 (je 10 µM)
	0,5 µl	DNA-Polymerase (2U/µl)
	ad 50 µl	ddH <sub>2</sub> O

#### PCR-Programm:

Tabelle 3-2: PCR-Programm zur Amplifizierung von Genen für die Klonierung

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	1 min	} 35 Zyklen
Primer-Anlagerung	x °C	30 sec bis 1 min	
Elongation	68°C/72°C	y min	
Finale Elongation	68°C/72°C	7 min	

Die Temperatur, bei der sich die Primer anlagern, wird nach folgender Formel bestimmt:

$$T_A \text{ in } ^\circ\text{C} = 3 \times (\text{G} + \text{C}) + 2 \times (\text{A} + \text{T})$$

wobei G + C die Summe aller Guanin- und Cytosin-Basen, A + T die Summe aller Adenin- und Thymin-Basen innerhalb der Primer-Sequenz ist. Für die Elongationszeit gilt: 1 min pro 1 kb Länge.

### 3.4.3 PCR auf Hefezellen

Mittels einer PCR auf Hefezellen kann nach Durchführung einer homologen Rekombination eine erste Kontrolle durchgeführt werden, ob das Insert in den geschnittenen Vector integriert wurde. Hierzu werden unter Verwendung einer Mikropipettenspitze einige Hefezellen von der Platte genommen und in folgendem Ansatz resuspendiert:

3 µl	PCR-Puffer (10x konzentriert)
0,3 µl	Oligonukleotid 1 und Oligonukleotid 2 (je 50 µM)
0,24 µl	dNTP-Mix (je 25 mM)
1,8 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
0,3 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (1 U/µl)
ad 30 µl	ddH <sub>2</sub> O

Das PCR-Programm entspricht dem unter 3.4.2 angegebenen.

### 3.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgt je nach Größe durch Elektrophorese in einem 0,7%-igen oder 1,5%-igen Agarosegel. Die Proben werden hierzu mit 6x Ladegelpuffer (0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylen Cyanol, 30 % Glycerin) versetzt. Als Laufpuffer wird 1x TBE (89 mM Tris/HCl, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) verwendet.

### 3.4.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel erfolgt unter Nutzung des QIAEX II Geleextraktions-Kits der Firma Qiagen nach dem beiliegenden Protokoll.

### 3.4.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgt mittels des NanoDrop, der 1 µl der DNA-Probe im Abgleich gegen 1 µl ddH<sub>2</sub>O misst.

### 3.4.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wird von der Firma GATC durchgeführt.

## 3.5 Biochemische Methoden

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

Es wird eine üN-Kultur einer transformierten *E. coli*-Kolonie in 50 ml LB-Medium plus entsprechendem Antibiotikum zur Selektion angeimpft. Am Morgen wird die Kultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 in 1 L Selektionsmedium überimpft, und nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wird durch Zugabe von 1 mM IPTG die Proteinexpression induziert. Die Kultur wird 4 h bei 37°C und 140 Upm weiter wachsen gelassen und hiernach geerntet. Dazu werden die Zellen zunächst 10 min bei 5000 Upm und 4°C abzentrifugiert, mit 40 ml kaltem PBS gewaschen und 5 min bei 6000 Upm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird entweder bei -20°C weggefroren oder direkt weiterverarbeitet.

### 3.5.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen

#### 3.5.2.1 Aufarbeitung des Pellets aus einer 1 L Induktionskultur

Das Pellet einer 1 L Induktionskultur wird in 20 ml Puffer B (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris/HCl pH 8,0) resuspendiert und die Suspension 1 h bei RT unter rotierendem Schütteln inkubiert. Danach wird der Ansatz 30 min bei 15000 Upm (Avanti J-25) und 4°C abzentrifugiert, der Überstand wird für die Affinitätsaufreinigung verwendet.

### 3.5.2.2 Aufreinigung von Proteinen über den 6x Histidin-Rest

Die Proteinaufreinigung wird unter denaturierenden Bedingungen über den 6x Histidin-Rest durchgeführt. Die Oligohistidine binden hierbei an Nickel-NTA-Agarose, welche in einer Säule immobilisiert wird. Nach diversen Waschschritten erfolgt die Elution der gebundenen Proteine mittels des Kompetitors Imidazol, der stärker an Nickel bindet und die Proteine von der Bindestelle verdrängt.

- Zu dem geklärten Überstand aus 3.5.2.1 wird 1 ml Nickel-NTA-Agarose zugegeben und das Gemisch wird 1 h bei RT unter rotierendem Schütteln inkubiert.
- In die zu benutzende Säule wird ein Gaze-Stopfen eingelegt, um ein Hindurchfließen der Agarose zu verhindern. Das Lysat wird über die Säule laufen gelassen, der Durchfluss aufgefangen und erneut auf die Säule gegeben.
- Es folgen Waschschriffe mit 10 ml Puffer B + 20 mM Imidazol sowie 10 ml Puffer C + 50 mM Imidazol (Zusammensetzung Puffer C: 8 M Harnstoff, 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris/HCl pH 6,3).
- Die Elution des Proteins erfolgt in fünf Fraktionen zu je 1 ml Puffer C + 500 mM Imidazol. Vor der ersten Elutionfraktion wird die Agarose bei mittels Verschlusskappe verschlossener Säule 5 min mit dem Elutionspuffer inkubiert.

### 3.5.3 Dialyse von Proteinen

Ca. 5 cm eines Dialyseschlauchs werden 10 min in 100°C heißem Wasser gekocht und hiernach mit einer sterilen Klemme an einem Ende verschlossen. Die Proteinlösung wird mittels einer sterilen Pipette in den erkalteten Dialyseschlauch eingefüllt und dieser auch am anderen Ende mit einer Klemme verschlossen. Die Dialyse erfolgt gegen 2 x 2 L PBS für jeweils 10-12 h bei 4°C unter leichtem Rühren.

### 3.5.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels Bradford-Reagenz

Es wird folgender Ansatz pipettiert:

10 µl Proteinlösung

790 µl ddH<sub>2</sub>O

200 µl Bradford-Reagenz

Der Ansatz wird 10 min bei RT inkubiert und hiernach die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Der Abgleich erfolgt gegen 800 µl ddH<sub>2</sub>O versetzt mit 200 µl Bradford-Reagenz. Zudem wird eine Eichkurve unter Verwendung unterschiedlich konzentrierter BSA-Lösungen erstellt. Die Konzentration an Protein im Ansatz errechnet sich mit Hilfe der Absorption  $A_{595\text{nm}}$  sowie der Steigung  $a$  der Eichgeraden nach folgender Formel:

$$c [\mu\text{g/ml}] = A_{595\text{nm}} / a$$

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in der Ursprungslösung muss noch der Verdünnungsfaktor von 100 mit einbezogen werden.

### 3.5.5 Vorbereitung von Proben für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Um Proteine in einem SDS-Gel entsprechend ihrer Größe aufzutrennen, müssen diese denaturiert vorliegen. Es wird folgender Ansatz pipettiert:

32,5 µl Proteinlysate

12,5 µl SDS-Blaumarker (4x konzentriert)

5 µl DTT (1 M)

Der Ansatz wird 15 min bei 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und entweder direkt auf ein Gel aufgetragen oder bei -20°C weggefroren.

### 3.5.6 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt je nach deren Größe über verschieden prozentige Polyacrylamidgele. Zur Fokussierung der Proteine wird dem Trenngel ein Sammelgel vorgeschaltet.

### 3.5.6.1 Herstellung des Polyacrylamidgels

Tabelle 3-3: Zusammensetzung von Trenngelen unterschiedlicher Prozentualität

	Acrylamidlösung	Trenngelpuffer (4x)	Ammoniumpersulfat (APS)	TEMED	ddH <sub>2</sub> O
10%	6,7 ml	5 ml	0,2 ml	0,07 ml	8,4 ml
15%	10 ml	5 ml	0,2 ml	0,07 ml	5 ml

- Der Ansatz für das Trenngel wird nach obigem Schema zusammenpipettiert, wobei APS und TEMED als Polymerisations-Initiatoren zuletzt zugegeben werden.
- Der Ansatz wird in den Zwischenraum einer durch Abstandhalter getrennten Glasplatte und Aluminiumplatte gegossen, mit Isopropanol überschichtet und auspolymerisieren gelassen.
- Zum Gießen des Sammelgels werden 1,5 ml Acrylamidlösung, 2,5 ml Sammelgelpuffer (4x) und 6 ml ddH<sub>2</sub>O zusammengegeben. Das Isopropanol wird von dem Trenngel entfernt, es werden APS und TEMED in den oben angegebenen Volumina zu dem Sammelgelansatz pipettiert und mit diesem das Trenngel überschichtet.
- Es wird ein Kamm eingesteckt, so dass sich im Sammelgel Taschen für die Auftragung der Proteinproben bilden können. Nachdem auch das Sammelgel auspolymerisiert ist, kann der Kamm entfernt und das Gel für die Elektrophorese verwendet werden.

Zusammensetzung des Trenngelpuffers (4x): 0,5 M Tris/HCl pH 6,8, 0,4 % SDS

Zusammensetzung des Sammelgelpuffers (4x): 1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 0,4 % SDS

### 3.5.6.2 SDS-Gelelektrophorese

Das Gel wird in die Elektrophoreseapparatur eingespannt, welche daraufhin mit Laufpuffer (0,05 M Tris/HCl pH 8,3, 0,2 M Glycin, 0,1 % SDS) aufgefüllt wird. Es werden maximal 25 µl Proteinprobe pro Tasche aufgetragen und die Auftrennung erfolgt bei 200 V für 1,5 h bis 2 h.

### 3.5.7 Färben eines Proteingels mit Coomassie Brilliantblau

Zum Färben mittels Coomassie Brilliantblau wird das Gel nach Beendigung der Elektrophorese durch Spülen mit deion. Wasser vorsichtig von der Glasplatte abgelöst und in eine mit deion. Wasser gefüllte Schale gegeben. Das Gel wird 30 sec bei 600 Watt in der Mikrowelle erhitzt und hiernach 5 min unter Schütteln inkubiert. Dies wird dreimal wiederholt. Anschließend wird Coomassie-Färbelösung (0,008 % Coomassie Brilliantblau G250, 35 mM HCl) in die Schale gegeben und diese 15 sec bei 600 Watt in der Mikrowelle erhitzt. Das Gel wird so lange gefärbt, bis die erwarteten Banden gut sichtbar sind. Danach wird die Färbelösung abgeschüttet und deion. Wasser auf das Gel gegeben.

### 3.5.8 Western Blot

Zum Nachweis bestimmter Proteine beispielsweise in einem Gesamtzelllysat wird ein Western Blot durchgeführt. Hierfür werden die Proteine zunächst wie unter 3.5.6 beschrieben über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt.

#### 3.5.8.1 Transfer der Proteine auf eine Membran

Eine PVDF-Membran sowie 2 Filterpapiere werden auf eine Größe von 7 cm x 9 cm zurechtgeschnitten. Die Filterpapiere werden in Transferpuffer (25 mM Tris/HCl, 150 mM Glycin, 0,05 % SDS, 10 % Methanol) getränkt, die Membran wird kurz in Methanol aktiviert und hiernach ebenfalls in Transferpuffer inkubiert. Eines der Filterpapiere wird auf die Graphitplatte der Blotapparatur gelegt, darauf wird die Membran platziert. Das Gel wird vorsichtig durch Spülen mit deion. Wasser von der Glasplatte gelöst und luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Das Gel wird mit dem zweiten Filterpapier bedeckt, die zweite Graphitplatte aufgelegt und der Transfer findet für 25-30 min bei 200 mA statt. Hiernach wird die Membran mittels einer Pinzette in Blockierungslösung (3 % Milchpulver, 0,05 % Tween, in PBS) überführt und 1 h bei RT bzw. bei 4°C üN inkubiert.

#### 3.5.8.2 Antikörperreaktion auf der Membran

Nach der Inkubation in Blockierungslösung wird die Membran mit dem Primärantikörper in geeigneter Verdünnung für 2 h bei RT (alternativ bei 4°C üN) inkubiert. Hiernach wird die Membran dreimal für je 10 min in PBS gewaschen. Es folgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in geeigneter Verdünnung für 1 h bei RT (alternativ bei 4°C üN). Die Membran wird wiederum dreimal für je 10 min in PBS gewaschen und anschließend für 5 min in Detektionspuffer (0,1 M Tris/HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>) inkubiert.

### 3.5.8.3 Detektion mittels Alkalischer Phosphatase

Bei Nutzung eines AP-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgt die Detektion durch Zugabe von 20 ml Detektionspuffer, dem je 66 µl BCIP-Lösung (0,5 g in 5 ml DMF) sowie NBT-Lösung (0,5 g in 5 ml 70%-igem DMF) zugesetzt wurden, zu der Membran. Die Farbreaktion kann einige Minuten bis zu mehreren Stunden dauern. Zum Abstoppen der Reaktion wird die Membran mehrmals mit deion. Wasser gespült.

### 3.5.8.4 Detektion mittels Peroxidase

Bei Nutzung eines Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgt die Detektion durch Zugabe von 1 ml Detektionslösung (Luminol/Stable Peroxide Buffer im Verhältnis 1:1 gemischt) auf die Membran. Die Chemilumineszenz-Reaktion wird mittels des LAS mini 4000 (Fujifilm) dokumentiert.

### 3.5.9 Far Western Blot

Der Far Western Blot ist eine an den klassischen Western Blot angelehnte Methode, die dazu dient, Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Hierbei wird zunächst ein Proteinlysat, welches das mit einem Tag markierte Köder-Protein enthält, wie unter 3.5.6 beschrieben über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt und wie unter 3.5.8.1 beschrieben auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Proteine auf der Membran werden nun durch Inkubation in Puffern mit abnehmender Guanidin-HCl Konzentration schrittweise renaturiert. Die Inkubation erfolgt unter leichtem Schütteln; die Dauer der einzelnen Inkubationsschritte und die erforderliche Temperatur sind Tabelle 3-4 zu entnehmen. Nach dem letzten Renaturierungsschritt wird die Membran mit 5 % Milchpulver / 0,05 % Tween in PBS für 1 h bei RT blockiert und hiernach über Nacht bei 4°C mit einem Lysat, welches das mit einem anderen Tag versehene Beute-Protein enthält, inkubiert. Am nächsten Morgen wird das Lysat abgenommen und die Membran kurz in PBS gewaschen. Hiernach wird die Membran mittels eines Antikörpers gegen das Beute-Protein wie unter 3.5.8.2 und 3.5.8.3 beschrieben detektiert (Schritt „Inkubation in Blockierungslösung“ aus 3.5.8.2 entfällt). Erscheint auf der Laufhöhe des Köder-Proteins eine Bande, so hat eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen stattgefunden.

Tabelle 3-4: Puffer für die schrittweise Renaturierung

Komponente	Konzentration von Guanidin-HCl (M)				
	6	3	1	0,1	0
Glycerin (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
NaCl (5 M) (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tris (1 M pH 7,5) (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
EDTA (0,5 M) (ml)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Tween-20 (10 %) (ml)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Guanidin-HCl (8 M) (ml)	18,75	9,30	3,13	0,31	0
Milchpulver (g)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
DTT (1 M) ( $\mu$ l)	25	25	25	25	25
ddH <sub>2</sub> O (ml)	2,45	12,82	18,07	20,89	21,20
Zeit/Temperatur	30 min/RT	30 min/RT	30 min/RT	30 min/4°C	1 h/4°C

Totalvolumen: jeweils 25 ml

### 3.5.10 Ko-Immunpräzipitation

Mittels Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) kann eine Interaktion zwischen zwei Proteinen nachgewiesen werden. Die Proteine werden mit einem Tag versehen, in Hefe ko-exprimiert und es wird Hefe-Gesamtzelllysat hergestellt. Unter Verwendung Antikörper-gebundener, paramagnetischer Kügelchen aus dem  $\mu$ MACS Proteinisolations-Kit (Miltenyi Biotech) wird eines der Proteine über seinen Tag präzipitiert. Per Western Blot wird überprüft, ob das zweite Protein ko-präzipitiert wurde.

- Zu 100  $\mu$ l Gesamtzelllysat werden 50  $\mu$ l der paramagnetischen, Antikörper-gebundenen Kügelchen gegeben und der Ansatz wird 1 h auf Eis inkubiert.
- Die zum Isolationskit zugehörige Säule, die mit ebenfalls paramagnetischen Kügelchen ausgekleidet ist, wird in den Magnethalter eingehängt und mit 200  $\mu$ l Lysepuffer äquilibriert.

- Der Ansatz wird auf die Säule gegeben und der Durchfluss wird verworfen.
- Es folgt ein viermaliges Waschen mit je 200 µl Waschpuffer W1 und ein einmaliges Waschen mit 200 µl Waschpuffer W2 (Puffer aus dem Isolationskit, Zusammensetzung nicht bekannt).
- Es werden 20 µl 96°C warmen Elutionspuffers (Zusammensetzung nicht bekannt) auf die Säule gegeben und es wird 5 min inkubiert.
- Die Elution erfolgt mit 50 µl des warmen Elutionspuffers, hiernach wird die Probe 30 min bei 96°C erhitzt.

### 3.5.11 Aufreinigung polyklonaler Antikörperseren gegen säulengebundenen Antigen

Es liegen gegen Fragmente des CPn0072- bzw. des CPn1054-Proteins generierte polyklonale Antikörperseren vor, die von der Firma Eurogentec hergestellt wurden. Die CPn0072- bzw. CPn1054-spezifischen Antikörper sollen aus den Seren gegen das als Immunogen eingesetzte Fusionsprotein (Antigen) affinitätsgereinigt werden. Dies geschieht unter Verwendung von NHS-Sepharose, an welche das Antigen gebunden und darauf folgend mit dem Antikörperserum inkubiert wird. Nach diversen Waschschrritten können die vom Antigen gebundenen spezifischen Antikörper eluiert werden.

- 1,5 ml Sepharose werden in eine Säule mit Fritte gegeben und das Isopropanol wird durch Zugabe von 20 ml kalter HCl (1 mM) herausgespült. Anschließend wird die Sepharose mit 10 ml Kopplungspuffer (0,2 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8,3) gewaschen.
- Ca. 2 mg Fusionsprotein (exprimiert von Plasmid pAF90 bzw. pAF133, siehe Kap. 2.10.2) in PBS (hergestellt nach 3.5.1 und 3.5.2; dialysiert) werden mit demselben Volumen an Kopplungspuffer gemischt, auf die Säule gegeben und die Säule wird verschlossen.
- Nach Inkubation üN bei 4°C unter rotierendem Schütteln wird die Säule leer laufen gelassen.
- Zur Blockierung nicht reagierter NHS-Gruppen werden 4 ml Blockierungslösung (0,5 M Ethanolamin, 0,1 M Tris pH 8,5) zugegeben und der Ansatz wird 4 h bei 4°C inkubiert.
- Es wird dreimal mit 1,5 ml Puffer 1 (0,1 M Tris, pH 8,0) gewaschen, danach dreimal mit 1,5 ml Puffer 2 (0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl, pH 4,0), was drei- bis sechsmal in der gleichen Reihenfolge wiederholt wird.

- Anschließend werden 2,5 ml Antiserum und 8 ml Tris (0,1 M, pH 8,0) auf die Säule gegeben, diese wird verschlossen und 2 h bei 4°C unter rotierendem Schütteln inkubiert.
- Nachdem die Säule durchlaufen gelassen wurde, erfolgt ein Waschen mit 10 ml Tris (10 mM, pH7,5) sowie 10 ml 500 mM NaCl, 10 mM Tris pH7,5.
- Für die saure Elution des Antikörpers werden 5 ml Glycin (100 mM pH 2,5) zugegeben und es wird 5 min bei verschlossener Säule inkubiert. Die 1 ml-Elutionsfraktionen werden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen, in denen 0,5 ml Tris (1 M, pH 8,0) zur Neutralisierung des pH-Wertes vorgelegt wurden.
- Für die basische Elution werden 5 ml Triethanolamin (0,1 M, pH 11,5) zugegeben und es wird 5 min inkubiert. Die 1 ml-Elutionsfraktionen werden wiederum in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit 0,5 ml vorgelegtem Tris aufgefangen. Die gereinigten Antikörperlösungen werden aliquotiert und bei -20°C weggefroren.

### **3.5.12 Aufreinigung polyklonaler Antikörperseren gegen geblottetes Antigen**

Die gemäß Kap. 3.5.11 aufgereinigte polyklonale Antikörperpräparation zeigte im Fall von CPn1054 keine guten Signale in Immunfluoreszenz-Analysen. Daher soll das gegen ein CPn1054-Proteinfragment (AS 521-811) generierte Antikörperserum nun gereinigt werden, indem es mit geblottetem rekombinantem Antigen (exprimiert von Plasmid pAF90) inkubiert und der gebundene Antikörper nachfolgend von der Membran eluiert wird.

- Es werden 25 µg aufgereinigtes und dialysiertes Antigen (exprimiert von Plasmid pAF90, siehe Kap. 2.10.2) pro Tasche auf ein 15%-iges Polyacrylamidgel aufgetragen, nach der Beschreibung in Kapitel 3.5.6 aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet (Kap. 3.5.8.1).
- Ein ca. 0,5 cm breiter Streifen der Membran wird abgetrennt und das aufgetragene Protein gemäß der Vorschrift in Kapitel 3.5.8.2 detektiert.
- Die restliche Membran wird mit 1 ml polyklonalem CPn1054-Antiserum (Hase #1368) in Folie eingeschweißt und für 3 h bei 4°C unter rotierendem Schütteln inkubiert.
- Auf Laufhöhe des antigenen Fusionsproteins (ermittelt durch den zuvor abgetrennten und entwickelten Blotstreifen) wird ein Streifen der Membran herausgeschnitten und zur Elution des Antikörpers für 10 min bei RT mit 200 µl Glycin / HCl (100 mM, pH 2,8) in einem 2 ml Reaktionsgefäß inkubiert.  
Die Antikörper-Lösung wird in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in das 40 µl Tris / HCl (1 M, pH 9,0) zur Neutralisierung vorgelegt wurden.

### 3.5.13 Abreicherung polyklonaler Antikörperseren gegen fixierte HEp2-Zellen

Weder die Aufreinigung gemäß Kap 3.5.11 noch diejenige gemäß 3.5.12 brachte Antikörperpräparationen hervor, mit denen gute Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt werden konnten. Daher sollte nun versucht werden das gegen ein CPn1054-Proteinfragment generierte Antikörperserum gegen fixierte HEp2-Zellen abzureichern, um unspezifische Signale zu eliminieren, und das abgereicherte Serum für Mikroskopie-Experimente zu nutzen.

- Konfluent gewachsene HEp2-Zellen in der Vertiefung einer Gewebekulturplatte werden gemäß der Beschreibung in Kap. 3.3.2.4 mit 100 % Methanol fixiert.
- 200 µl polyklonales Antikörperserum (Hase #1368) werden auf die fixierten Zellen in der Vertiefung gegeben und die Gewebekulturplatte wird 4 h bei 4°C inkubiert.

Nach der angegebenen Zeit wird das abgereicherte Serum in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

### 3.5.14 Test der Spezifität polyklonaler Antikörperseren

Zum Test der Spezifität polyklonaler Antikörperseren werden diese mit dem an Latexkügelchen gebundenen Antigen inkubiert. Die Latexkügelchen werden hiernach durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand wird für die Analyse (z. B. Immunfluoreszenz) verwendet. Wurde das Serum durch spezifische Interaktion des Antikörpers mit dem Antigen abgereichert, so lässt sich für das immunogene Protein nur noch ein sehr abgeschwächtes oder idealerweise gar kein Signal mehr detektieren.

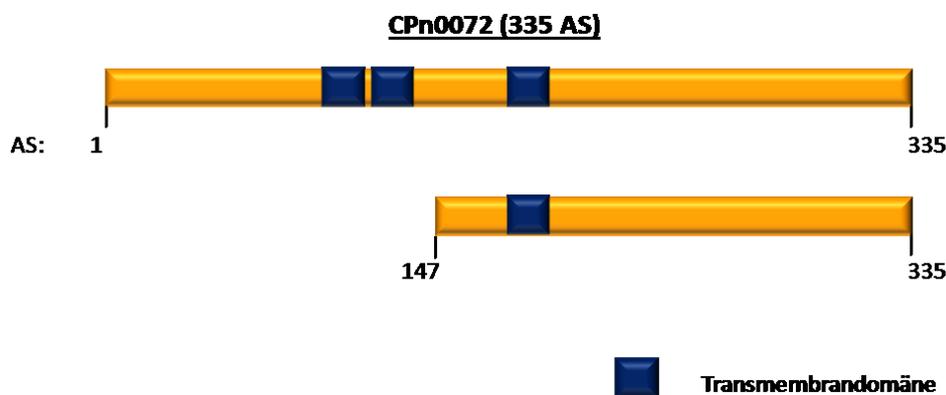
- Es werden  $1 \times 10^9$  Latexkügelchen in 1 ml PBS resuspendiert und 5 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert.
- Das Pellet wird in 1 ml frischem PBS gelöst und wiederum 5 min bei 13000 Upm abzentrifugiert.
- Hiernach wird das Pellet in 1 ml Kopplungspuffer (0,2 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8,6) resuspendiert und es werden ca. 200 mg Fusionsprotein (Antigen) sowie 100 µl Kopplungspuffer hinzugegeben.
- Nach Inkubation für 1 h bei 37°C werden weitere 500 µl Kopplungspuffer zugegeben und der Ansatz wird für 3 min im Ultraschallbad sonifiziert.
- Nach Zugabe von 500 µl BSA-Lösung (40 mg/ml in Kopplungspuffer) wird der Ansatz erneut 1 h bei 37°C inkubiert.

- Das Gemisch wird 5 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) abzentrifugiert und mit 1 ml BSA-Lösung (1 mg/ml in PBS) gewaschen.
- Es werden 100 µl polyklonales Antikörperserum auf die mit Antigen beschichteten Kügelchen gegeben und der Ansatz wird üN bei 4°C unter rotierendem Schütteln inkubiert.
- Am Morgen wird der Ansatz 5 min bei 13000 Upm abzentrifugiert, der Überstand wird in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für weitere Analysen verwendet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 CPn0072

Bei CPn0072 handelt es sich um ein hypothetisches, *Chlamydia*-spezifisches Protein. Im Mittelteil des Proteins befinden sich drei vorhergesagte Transmembranregionen (Quelle: TMHMM), weitere bekannte konservierte Domänen konnten jedoch nicht identifiziert werden. In dem genomweiten Screen nach neuen chlamydialen Effektorproteinen in Hefe wurde der C-Terminus von CPn0072 (AS 147-335), der noch eine der drei Transmembrandomänen enthält, als Auslöser von Wachstumshemmung identifiziert (Abb. 4-1) (Dr. Anne Kerres, Dr. Frauke Herbst, unpubl.).



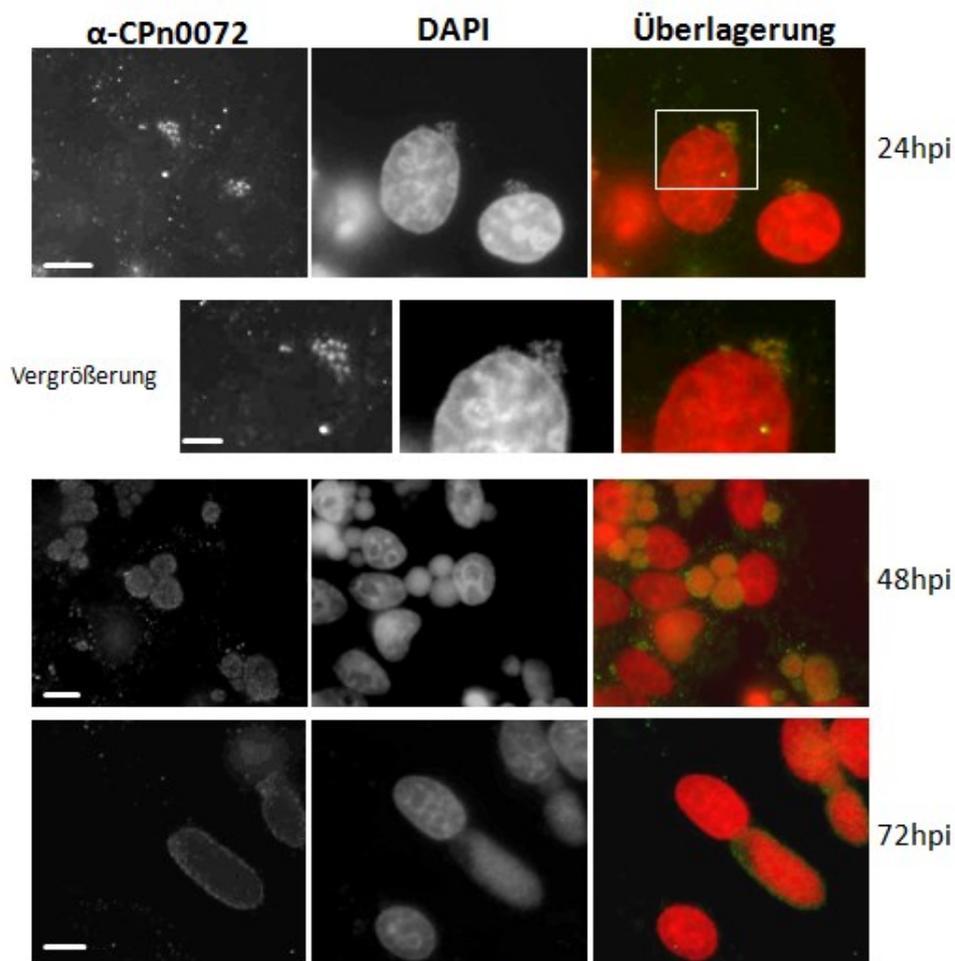
**Abb. 4-1: Übersicht über die Struktur des CPn0072-Proteins.**

CPn0072 besitzt eine Länge von 335 AS und drei vorhergesagte Transmembrandomänen. Ein C-terminaler Abschnitt des Proteins führte zu Wachstumshemmung in Hefe.

CPn0072 wird bioinformatisch als ein putatives Inklusionsmembranprotein eingestuft und im heterologen *Shigella flexneri*-System konnte eine Typ III-abhängige Sekretion beobachtet werden (Dehoux, Flores *et al.*, 2011). Erste Lokalisationsanalysen mittels eines polyklonalen Antikörperserums legten eine Assoziation mit der Inklusionsmembran nahe (Dr. Anne Kerres, unpubl.). Dies spricht dafür, dass es sich bei CPn0072 tatsächlich um ein Effektorprotein handeln könnte, weswegen das Protein für eine weitergehende Charakterisierung ausgewählt wurde.

#### 4.1.1 CPn0072 zeigt in der Infektion eine Inklusionsmembran-assoziierte Lokalisation und ist Wirtszellzytosol-exponiert

Das bereits im Vorfeld zu dieser Arbeit von Frau Dr. Anne Kerres und Frau Dr. Frauke Herbst in Auftrag gegebene polyklonale Antikörperserum gegen ein Fusionsprotein aus CPn0072 AS 1-90 und AS 190-335 (also ohne die Transmembrandomänen) wurde affinitätschromatografisch gegen das in einer Säule immobilisierte Antigen aufgereinigt. *C. pneumoniae*-infizierte Humanzellen wurden unter Nutzung des gereinigten Serums gefärbt, um die Lokalisation von CPn0072 zu verschiedenen Zeitpunkten im Infektionsverlauf zu bestimmen (Abb. 4-2).

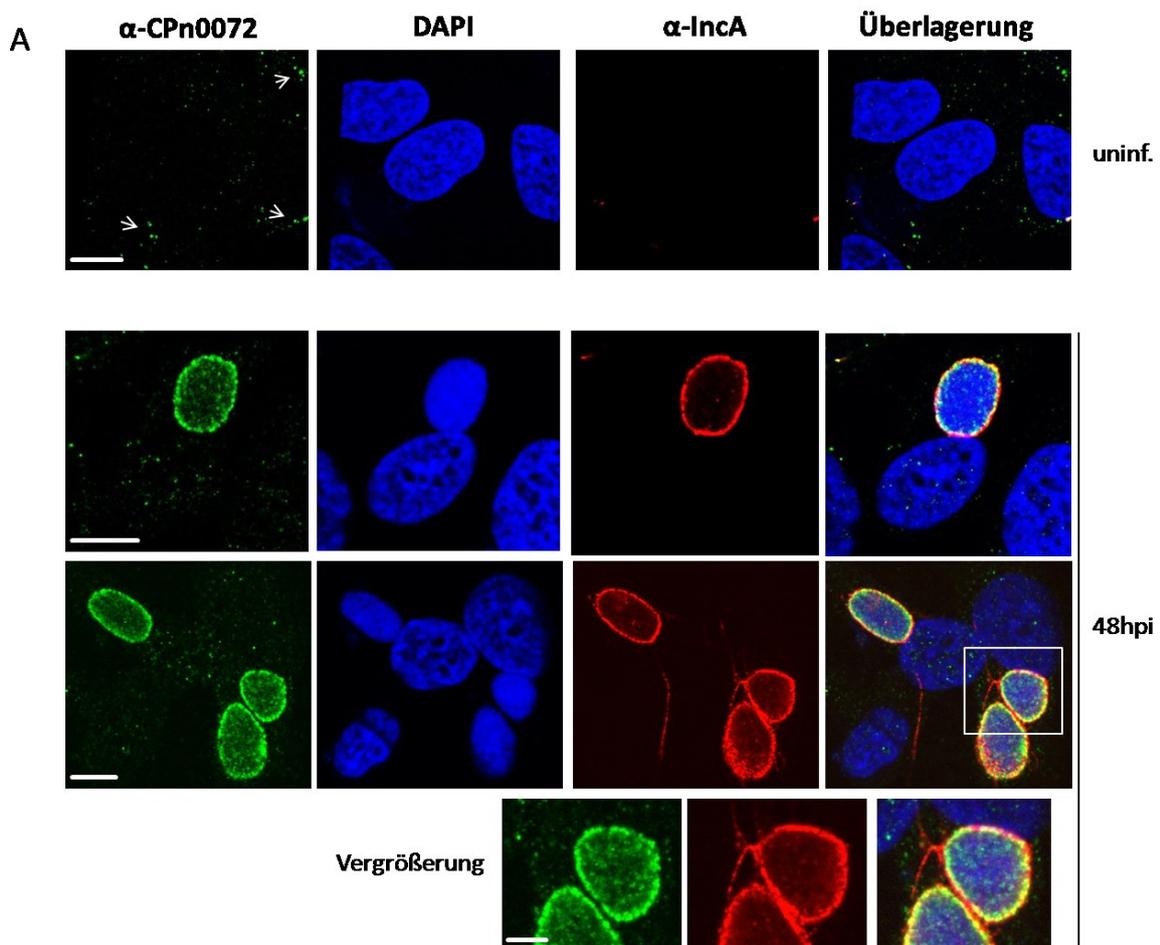


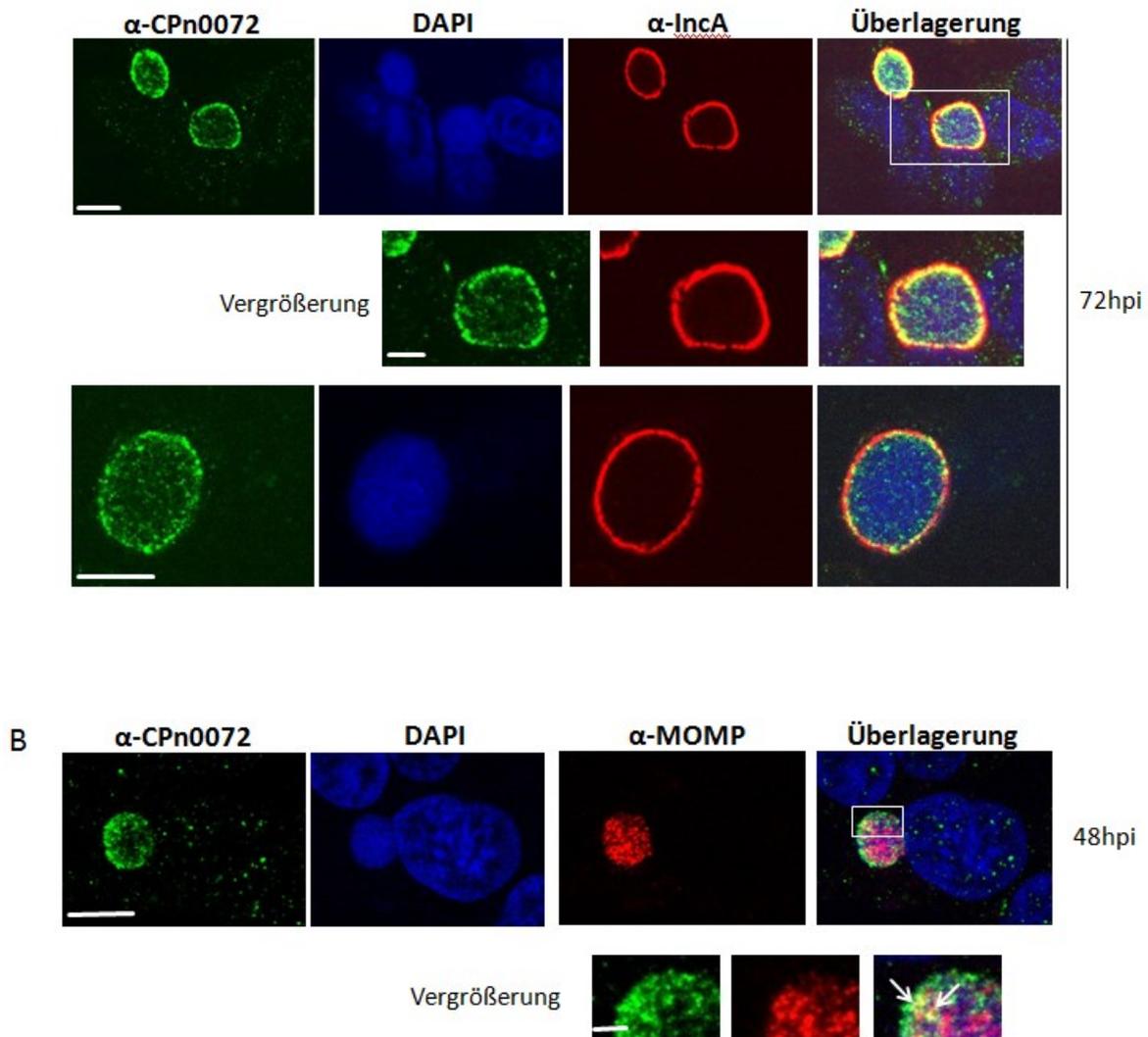
**Abb. 4-2: Lokalisationsanalyse von CPn0072 in der Infektion.**

HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* (MOI = 3) infiziert und 24 hpi, 48 hpi sowie 72 hpi Methanol-fixiert. Infizierte Zellen wurden mit aufgereinigtem, unverdünntem Anti-CPn0072 Primärantikörper in Kombination mit Alexa488-gekoppeltem Anti-Kaninchen Sekundärantikörper (1:200) gefärbt, zudem wurde die DNA durch die Nutzung von DAPI sichtbar gemacht. In der Überlagerung ist CPn0072 in grün und die DNA in rot dargestellt. Die Vergrößerung zeigt den weiß umrandeten Bereich der darüberliegenden Reihe. Der Längenmarker entspricht 5 µm bzw. in der Vergrößerung 2 µm.

Wie Abbildung 4-2 zu entnehmen ist, zeigte sich zum Zeitpunkt 24 hpi eine Bakterien-Assoziation des CPn0072-Signals, da sich mit der durch DAPI angefärbten bakteriellen DNA eine Überlagerung ergab. Die chlamydialen Einschlüsse befanden sich in perinukleärer Position, wie es typischerweise während einer Infektion zu beobachten ist. Zum Zeitpunkt 48 hpi war das CPn0072-Signal verstärkt am Inklusionsrand zu detektieren, zusätzlich traten punktierte Signale im Inklusionslumen auf. 72 hpi fanden sich im Lumen so gut wie gar keine Signale mehr, während eine deutliche ringförmige Färbung des Inklusionsrands zu beobachten war. Dies entspricht prinzipiell den zuvor von Frau Dr. Kerres gemachten Beobachtungen.

Um eine genauere Aussage bezüglich der Lokalisation machen zu können, wurde eine Ko-Färbung von CPn0072 und dem bekannten Inklusionsmembranprotein IncA bzw. dem chlamydialen oberflächenlokalisierten MOMP (*major outer membrane protein*) durchgeführt (Abb. 4-3).





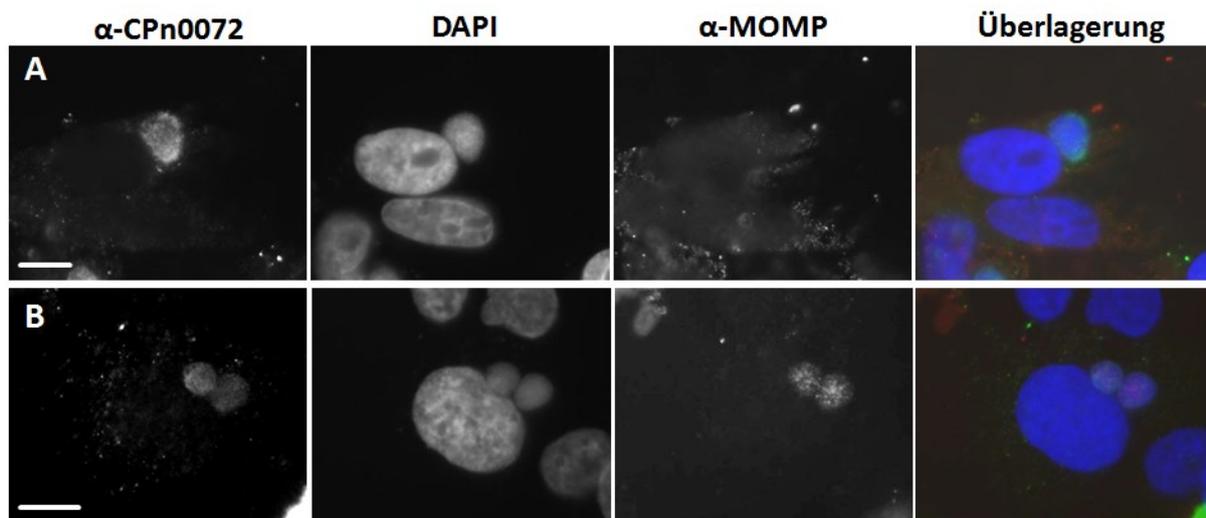
**Abb. 4-3: Ko-Lokalisationsanalyse von CPn0072 und chlamydialen Markerproteinen in der Infektion.**

**A)** HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* (MOI = 2) infiziert und 48 hpi bzw. 72 hpi Methanol-fixiert. Die fixierten Zellen wurden mittels des antigengereinigten CPn0072-Antikörpers (pur) in Kombination mit einem Alexa488-gekoppelten Anti-Kaninchen Sekundärantikörper (1:200) sowie zusätzlich mit einem Anti-IncA Primärantikörper (1:30) in Kombination mit Alexa594-gekoppeltem Anti-Maus Sekundärantikörper ko-gefärbt. Die DNA wurde mittels DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Die Vergrößerung zeigt jeweils den weiß umrandeten Bereich der darüberliegenden Reihe. Hintergrundsignale des CPn0072-Antikörpers sind mit Pfeilen indiziert. Der Längenmarker entspricht 5  $\mu$ m bzw. in der Vergrößerung 2,5  $\mu$ m. Grün: CPn0072, Rot: IncA, Blau: DNA.

**B)** Hep-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* (MOI = 2) infiziert und 48 hpi Methanol-fixiert. Die Zellen wurden mit dem aufgereinigten CPn0072-Antikörper (wie in **A**) sowie zusätzlich mit einem Anti-MOMP Primärantikörper (1:50) und einem Alexa594-gekoppelten Anti-Maus Sekundärantikörper (1:200) ko-gefärbt. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt. Die Vergrößerung zeigt den weiß umrandeten Bereich der darüberliegenden Reihe, die Pfeile markieren Punkte der Überlagerung von grünem und rotem Signal. Der Längenmarker entspricht 5  $\mu$ m bzw. in der Vergrößerung 1  $\mu$ m. Grün: CPn0072, Rot: MOMP, Blau: DNA. Die Bilder wurden am Konfokalmikroskop aufgenommen.

Das CPn0072-Antikörperserum generierte punktförmige Hintergrundsignale im Zytosol und in den Zellkernen nicht-infizierter Humanzellen (Abb. 4-3 A; Pfeile). In infizierten Zellen zeigte das CPn0072-Signal zu den untersuchten Zeitpunkten 48 hpi und 72 hpi die bereits zuvor beobachtete Konzentration am Inklusionsrand (Abb. 4-3 A und B). Auch innerhalb der Inklusion wurden distinkte Partikel, möglicherweise die Bakterien, angefärbt. Für IncA ergab sich in infizierten Zellen sowohl 48 hpi wie auch 72 hpi eine deutliche Ring-artige Färbung mit wenigen bis keinen Signalen im Inklusionslumen (Abb. 4-3 A). Zudem traten die bereits beschriebenen IncA-positiven fadenartigen Strukturen auf, die ausgehend von der Inklusion ins Wirtszellzytosol hineinragen (Brown, Skeiky *et al.*, 2002). Zum Zeitpunkt 48 hpi war ein hoher Grad an Überlagerung von dem IncA-Signal und dem CPn0072-Signal am Inklusionsrand zu beobachten, was durch die Gelbfärbung angezeigt wird. Diese Überlagerung war jedoch nicht vollständig, es traten vereinzelte rote und grüne Signale hervor. CPn0072 schien jedoch nicht mit den fadenartigen, IncA-positiven Strukturen zu assoziieren (siehe Vergrößerung in Abb. 4-3 A, 48 hpi). Zum Zeitpunkt 72 hpi konnte ebenfalls eine teilweise erhebliche Überlagerung von CPn0072 mit IncA detektiert werden, wobei jedoch noch deutliche rote IncA-Signale auftraten, die das gelbe Signal zu umgeben scheinen. Die Färbung des chlamydialen Oberflächenproteins MOMP ergab zum beobachteten Zeitpunkt 48 hpi distinkte Signale im Inklusionsinneren, bei denen es sich mutmaßlich um die Bakterien handelt. Eine Ko-Färbung von CPn0072 und MOMP zeigte lediglich in einzelnen Punkten eine Signalüberlagerung (siehe Vergrößerung in Abb. 4-3 B). Die CPn0072-Signale im Inklusionsinneren könnten daher sowohl auf Chlamydien-assoziiertes CPn0072-Protein als auch auf lösliches Protein im Lumen zurückzuführen sein.

Die starke Ko-Lokalisation mit IncA und die einzelnen grünen Signale für CPn0072 am Inklusionsrand suggerieren, dass CPn0072 Kontakt zum Wirtszellzytosol besitzen und mit Wirtszellproteinen interagieren könnte. Um zu testen, ob CPn0072 von der zytosolischen Seite der Wirtszelle aus zugänglich ist, wurde eine Ko-Färbung von CPn0072 und MOMP in infizierten, para-Formaldehyd (PFA)-fixierten Humanzellen ohne Anwendung weiterer Permeabilisierungsschritte durchgeführt. Dies sollte lediglich die Wirtszellmembran durchlässig für Antikörper machen, während die Inklusionsmembran impermeabel sein sollte. Als Kontrolle wurde eine Färbung infizierter, Methanol-fixierter Zellen, in denen alle Membranen einschließlich der bakteriellen permeabilisiert sein sollten, mittels desselben Antikörper-Ansatzes durchgeführt.



**Abb. 4-4: CPn0072 ist von der zytosolischen Seite der Wirtszelle aus zugänglich.**

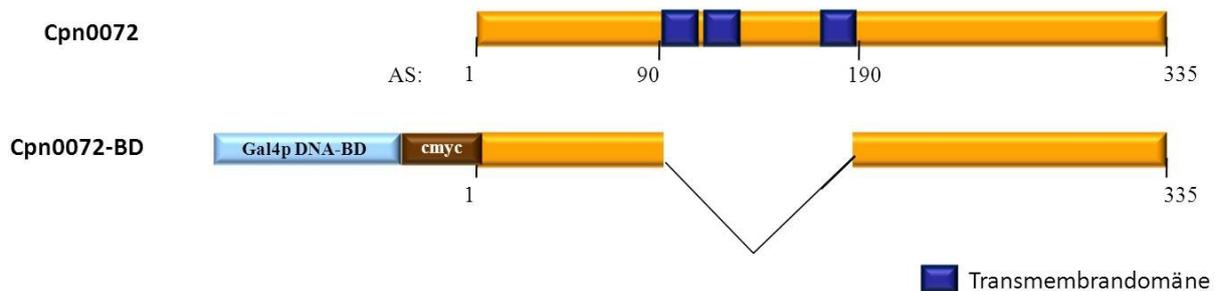
HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* (MOI = 2) infiziert und 48 hpi PFA-fixiert (A) oder Methanol-fixiert (B). Die fixierten Zellen wurden mittels CPn0072-Antikörper (antigengereinigt, pur) und Anti-MOMP Antikörper (1:50) in Verbindung mit Alexa488-gekoppeltem Anti-Kaninchen bzw. Alexa594-gekoppeltem Anti-Maus Sekundärantikörper (je 1:200) ko-gefärbt. Die DNA wurde mittels DAPI sichtbar gemacht. In der Überlagerung ist CPn0072 in grün, MOMP in rot und die DNA in blau dargestellt. Der Längenmarker entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

Es zeigte sich in PFA-fixierten Zellen ein Inklusion-assoziiertes CPn0072-Signal, wobei die zuvor beobachtete Ringstruktur entlang der Inklusionsmembran in diesem Fall nicht deutlich hervortrat (Abb. 4-4 A). Der MOMP-Antikörper lieferte eine diffuse Hintergrundfärbung, jedoch kein spezifisches Signal. Bei der Kontrollfärbung Methanol-fixierter Zellen mit demselben Ansatz an Antikörper-Mix zeigte sich ein Signal sowohl für CPn0072 als auch für MOMP (Abb. 4-4 B). Dies deutet darauf hin, dass der Antikörper gegen das chlamydiale Oberflächenprotein prinzipiell funktionell ist und es sich bei dem Ausbleiben des Signals in PFA-fixierten Zellen um einen spezifischen Effekt handelt. Die deutliche Ringstruktur, die zuvor für CPn0072 zum Zeitpunkt 48 hpi beobachtet worden war (Abb. 4-3), fehlte auch hier. Eventuell tritt die Ring-ähnliche Färbung erst ab einer bestimmten Inklusionsgröße auf, da die Inklusionen in Abb. 4-3 einen größeren Durchmesser aufweisen als diejenigen in Abb. 4-4.

Es lässt sich zusammenfassend festhalten, dass CPn0072 zum Zeitpunkt 24 hpi eine Bakterien-Assoziation aufweist. Zu späteren Zeitpunkten der Infektion, nämlich 48 hpi und 72 hpi, tritt eine Relokalisierung zur Inklusionsperipherie hin sowie eine partielle Ko-Lokalisation mit dem Inklusionsmembranprotein Inca auf. Zudem kann CPn0072 von der zytosolischen Seite der Wirtszelle her durch einen Antikörper detektiert werden und besitzt daher wahrscheinlich Kontakt zum Wirtszellzytosol.

#### 4.1.2 Identifizierung putativer CPn0072-Interaktionspartner mittels eines Hefe-Zwei-Hybrid Screens

Um Aufschluss über die mögliche Funktion von CPn0072 während des Infektionszyklus zu erhalten, wurde eine humane cDNA-Bank mittels der Hefe-Zwei-Hybrid Methode nach potentiellen Interaktionspartnern durchmustert. Hierzu wurde *cpn0072* unter Auslassung des die Transmembrandomänen codierenden Bereichs in den Hefe-Zwei-Hybrid Vector pGBKT7 kloniert (Abb. 4-5).



**Abb. 4-5: CPn0072-Konstrukt für den Hefe-Zwei-Hybrid Screen.**

Zum Einsatz als Köder in einem Hefe-Zwei-Hybrid Screen wurde *cpn0072* unter Auslassung des Transmembrandomänen-Bereichs in den Vector pGBKT7, in Fusion zur codierenden Sequenz für die Gal4p DNA-Bindedomäne (DNA-BD) und das c-myc-Protein, kloniert (CPn0072-BD, # 2220).

Die cDNA-Bank befand sich in dem Vector pGADT7-Rec, wobei jede cDNA in Fusion zu der codierenden Sequenz für die Gal4p-Aktivierungsdomäne (AD) und das HA-Protein kloniert und in den Hefestamm Y187 vortransformiert worden war. Das CPn0072-Köderkonstrukt wurde in den Hefestamm AH109 transformiert. Die beiden Hefestämme besitzen entgegengesetzte Paarungstypen, so dass das Zusammenbringen des Köder-Konstrukts mit den Bank-Plasmiden in eine Hefezelle über Hefepaarung erfolgen konnte (siehe Kap. 3.2.4). Nach ca. 24 h waren in der zur Paarung angesetzten Hefekultur diploide Zellen vorhanden und die Kultur wurde auf großen Platten mit mittelstringentem Reportermedium ausplattiert. Täglich wurden die Platten nach blau gefärbten Hefekolonien durchmustert und diese auf hochstringentem Medium vereinzelt, um das positive Ergebnis zu bestätigen. Zur Sicherheit wurde der Vereinzlungsschritt für alle Kandidaten ein- bis zweimal wiederholt. Aus Hefen, die reproduzierbar Wachstum auf den Reporterplatten zeigten, wurde die Gesamt-DNA isoliert, in *E. coli* elektroporiert und hieraus die Plasmid-DNA gewonnen. Nach einer gerichteten Ko-Transformation von Köder-Plasmid und isoliertem Beute-Plasmid in den Hefestamm AH109 wurde das Wachstum auf hochstringenten Reporterplatten abermals getestet. War auch hier das Ergebnis positiv und zeigte das Beute-Protein in einem weiteren

Test keine Autoaktivierung der Reportergene, wurde das Beute-Plasmid zur Sequenzierung geschickt. Im Screen nach CPn0072-Interaktionspartnern wuchsen auf den mittelstringenten Reporterplatten, auf denen die gepaarte Hefekultur ausgestrichen worden war, insgesamt 204 Hefekolonien; 96 hiervon wiesen eine Blaufärbung auf. Nach zweimaliger Vereinzlung dieser 96 Hefekolonien auf hochstringentem Reportermedium zeigten noch 24 Kolonien Wachstum und Blaufärbung, und in der gerichteten Ko-Transformation ergab sich für fünf Kandidaten ein positives Ergebnis.

Die Berechnung der Kennzahlen des Screens gemäß Kapitel 3.2.4 ergab einen Bank-Titer von  $7 \times 10^7$  Zellen/ml, eine Paarungseffizienz von 4,36 % und eine Anzahl durchmusterter Klone von  $3,3 \times 10^6$  (die Rohdaten zur Bestimmung der Kennzahlen befinden sich im Anhang). Tabelle 4-1 stellt diese ermittelten Kennzahlen den Richtwerten, wie sie im Handbuch der Firma Clontech zu finden sind, gegenüber.

Tabelle 4-1: Gegenüberstellung der Kennzahlen des CPn0072-Interaktionspartnerscreens und der entsprechenden Richtwerte

	CPn0072-Screen	Richtwert
Titer der cDNA-Bank	$7 \times 10^7$ Zellen/ml	$\geq 2 \times 10^7$ Zellen/ml
Paarungseffizienz	4,36 %	2 – 5 %
Anzahl durchmusterter Klone	$3,3 \times 10^6$	$\geq 1 \times 10^6$

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, liegen alle Werte im geforderten Bereich; es kann also von einer erfolgsversprechenden Durchführung des Screens ausgegangen werden. Der Mensch besitzt 20.000 bis 30.000 Gene, so dass bei  $3,3 \times 10^6$  durchmusterter cDNA-Klonen eine 110- bis 165-fache Abdeckung des Genoms erreicht und somit auch niedrig exprimierte Gene erfasst sein sollten.

Die sequenzierten Inserts der fünf Bank-Plasmide, die in Kombination mit dem Köder-Plasmid zu einer Aktivierung der Reportergene geführt hatten, wurden über Blast-Analyse den entsprechenden Proteinen zugeordnet. Es wurde weiterhin überprüft, ob die für das jeweilige Protein codierende Sequenz sich in demselben Leseraster wie die *GAL4*-Aktivierungsdomäne befindet und ob das Protein in Vollängen-Version oder lediglich als Fragment in dem Bank-Plasmid codiert ist. Tabelle 4-2 fasst diese Analysen zusammen.

Tabelle 4-2: Insert-Analyse der sequenzierten Bank-Plasmide aus dem CPn0072-Screen

Interaktions-kandidat	codiert auf Bank-Plasmid	codierter Abschnitt (Gesamtlänge in AS)	gleiches Leseraster wie GAL4?
<i>cAMP responsive element binding protein 3</i> (CREB3)	Y2H 0072-13	AS 1-278 (371)	ja, aber Stop-Codon vor Beginn von <i>CREB3</i>
	Y2H 0072-14	AS 1-294 (371)	ja, aber Stop-Codon vor Beginn von <i>CREB3</i>
<i>solute carrier family 30 member 9</i> (SLC30A9)	Y2H 0072-37	AS 286-554 (568)	ja
<i>glyoxalase domain containing 4</i> (GLOD4)	Y2H 0072-42	AS 248-298 (298)	nein
<i>Intraflagellar transport 172 homolog</i> (IFT 172 Homolog)	Y2H 0072-47	AS 1588 – 1635 (1749)	ja

Die Bank-Plasmide Y2H 0072-13 und Y2H 0072-14 codierten jeweils für ein Fragment des Proteins CREB3 (*cAMP responsive element binding protein 3*), wobei der von Y2H 0072-14 codierte Abschnitt etwas länger war. Der Grund, weshalb die Proteine nicht vollständig codiert wurden, lag jeweils in einer Mutation, die zu einer Leserasterverschiebung führte (Dies gilt auch für die Inserts der Plasmide Y2H 0072-37 und Y2H 0072-47, deren zugeordneten Proteinen ein Teil des C-Terminus fehlt.). CREB3, das auch als LZIP oder Luman bekannt ist, gehört zu einer Unterfamilie ER-membrangebundener bZIP-Transkriptionsfaktoren. Diese werden unter ER-Stressbedingungen proteolytisch gespalten, wodurch das N-terminale Fragment freigegeben wird, in den Zellkern gelangen und dort die Transkription bestimmter Gene aktivieren kann (Chan, Kok *et al.*, 2011). Die Sequenzanalysen ergaben, dass sich die für CREB3 codierenden Sequenzen zwar in demselben Leseraster wie die *GAL4*-Aktivierungsdomäne befanden, jedoch dazwischen ein Stop-Codon anwesend war, wodurch nicht klar ist, ob das Protein tatsächlich exprimiert wurde. Dieser Kandidat wurde daher nicht weitergehend analysiert.

Das auf dem Plasmid Y2H 0072-42 codierte GLOD4 (*glyoxalase domain containing 4*) ist ein Protein mit Homologie zu dem Enzym Glyoxalase aus *Caenorhabditis elegans*, aber mit wenig Ähnlichkeit zu dem korrespondierenden humanen Enzym. Die humane Glyoxalase wirkt an der Detoxifizierung von Methylglyoxal mit, einem Nebenprodukt der Glykolyse. Zudem ist das während der Lipid-Peroxidation entstehende Glyxal ein Substrat dieses Enzyms (Qin, Wan *et al.*, 2001). Ob GLOD4 eine Glyoxalase-Aktivität besitzt, ist nicht geklärt. In dem Bank-

Plasmid war ein nur 50 AS umfassender Abschnitt des GLOD4-Proteins codiert, wobei sich die codierende Sequenz nicht in einem Leseraster mit der *GAL4*-Aktivierungsdomäne befand. Auch dieser Kandidat wurde nicht weitergehend analysiert.

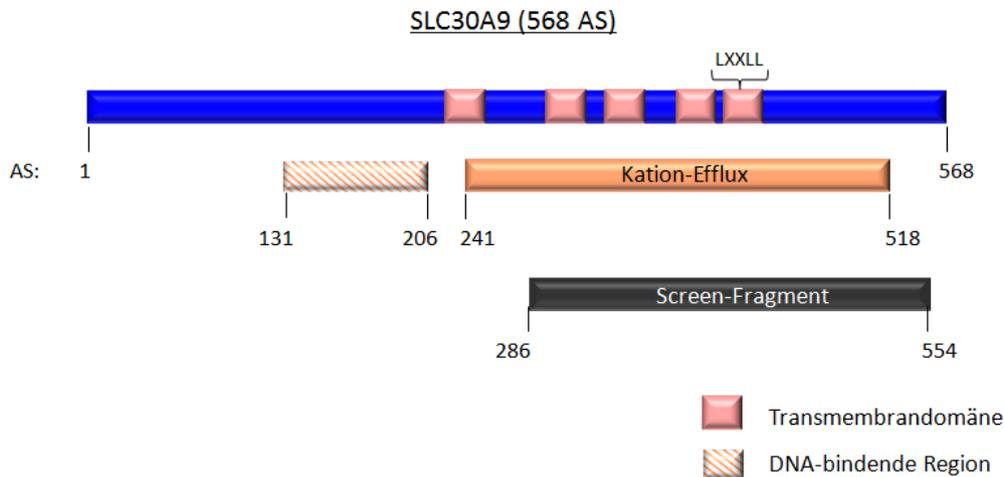
Das Bank-Plasmid Y2H 0072-47 beinhaltet ein Insert, dessen Genprodukt in der Blast-Suche einem zu IFT 172 homologen Protein (*intraflagellar transport 172 homolog*) zugeordnet wurde. Allerdings reichte die Übereinstimmung nur über einen relativ kurzen Abschnitt von ca. 50 AS und es fanden sich innerhalb dieser Sequenz einige Austausche (in Tab. 4-2 nicht detailliert aufgeführt). Das Protein IFT 172 aus *Chlamydomonas* interagiert mit Mikrotubuli-Proteinen und spielt vermutlich eine Rolle in der Regulation von Transportvorgängen an der Spitze des Flagellums (Pedersen, Miller *et al.*, 2005). Aufgrund der geringen Sequenz-überlappung mit vielen Aminosäure-Austauschen wurde der Kandidat für eine weitergehende Analyse ebenfalls nicht in Betracht gezogen.

Im Bank-Plasmid Y2H 0072-37 befand sich ein Genabschnitt, der für ein Fragment aus den AS 286-554 des Proteins SLC30A9 (*solute carrier family 30 member 9*) codierte und in demselben Leseraster wie die *GAL4*-Aktivierungsdomäne lag. Bei SLC30A9 handelt es sich um einen bioinformatisch annotierten Zink-Transporter, andererseits weist das Protein aber auch Eigenschaften eines Transkriptionsfaktors auf (siehe Kap. 4.1.3). Die Tatsache, dass ein erheblicher Abschnitt des insgesamt 568 AS langen Proteins im korrekten Leseraster auf dem Bank-Plasmid codiert wurde, machte SLC30A9 zum vielversprechendsten Kandidaten, der daher für weitere Analysen ausgewählt wurde.

#### **4.1.3 SLC30A9 ist ein potentieller CPn0072-Interaktionspartner**

Das Gen für das 568 AS umfassende SLC30A9-Protein wurde 1999 aus humanen Lungenzellen isoliert und zunächst als HUEL (*human embryonic lung*) oder C4orf1 bezeichnet (Sim & Chow, 1999). Immunfluoreszenz-Analysen mittels eines gegen das Protein generierten Antikörpers zeigten eine Zytosol-Lokalisation und mögliche Assoziation mit Zytoskelett-Strukturen in normalen Zelllinien, während in Tumorzellen zudem eine Translokation in den Zellkern zu beobachten war (Sim & Chow, 1999). Diese Translokation fand überwiegend in der S-Phase des Zellzyklus statt (Sim, Yeo *et al.*, 2002). Im N-terminalen Bereich des Proteins (AS 139-219) befindet sich eine DNA-bindende Region und im C-Terminus ein LXXLL-Motiv (AS 462-466), das Interaktion mit Zellkern-lokalisierten Rezeptoren vermittelt (Sim, Yeo *et al.*, 2002) (Abb. 4-6). Späterhin wurde das Protein aufgrund bioinformatischer Analysen als Mitglied der SLC30-Familie der Zink-Transporter eingestuft und bekam den Namen SLC30A9 oder ZnT9 (Seve, Chimienti *et al.*, 2004). Es wurde eine für diese Transporter charakteristische Kation-Efflux-Domäne annotiert, zudem weist das Protein im C-terminalen Bereich insgesamt fünf bioinformatisch vorhergesagte

Transmembrandomänen auf (Abb. 4-6). Der Nachweis einer tatsächlichen Zinktransport-Aktivität von SLC30A9 ist bislang nicht erbracht worden, zudem ist die Homologie zu anderen Zink-Transportern der SLC30-Familie eher gering (Seve, Chimienti *et al.*, 2004).



**Abb. 4-6: Übersicht über die Struktur des Proteins SLC30A9 und die Lage des im Screen isolierten Fragments.**

Das Protein SLC30A9 besitzt eine Gesamtlänge von 568 AS und weist insgesamt fünf vorhergesagte Transmembrandomänen auf (Quelle: TMHMM). Im C-Terminus ist eine Kation-Efflux-Domäne vorhanden, ebenso wie das Zellkernrezeptor-Interaktionsmotiv LXXLL. Im N-terminalen Teil befindet sich eine DNA-bindende Region. Das im Hefe-Zwei-Hybrid Screen identifizierte Fragment deckt einen C-terminalen Bereich von SLC30A9 ab.

Im Hefe-Zwei-Hybrid Screen wurde ein C-terminaler Abschnitt des SLC30A9-Proteins (AS 286-554) als potentiell mit CPn0072 interagierend identifiziert. Die relative Stärke der Interaktion sollte in Form eines seriellen Verdünnungstropftests analysiert werden. Als Kontrolle dienten zwei in dem Hefe-Zwei-Hybrid Kit mitgelieferte Plasmide, die jeweils eines von zwei Proteinen codieren, deren Interaktion bekannt und recht stark ist. Wie Abbildung 4-7 zu entnehmen ist, zeigte sich im Fall der Positivkontrolle erwartungsgemäß ein deutliches Wachstum auf der Reporterplatte. Für die Kombination aus CPn0072 und dem SLC30A9 Screenfragment konnte ein moderates Wachstum auf Reportermedium beobachtet werden, das wesentlich schwächer im Vergleich zur Positivkontrolle ausfiel. Relativ gesehen scheint diese Interaktion also nicht sehr stark zu sein.

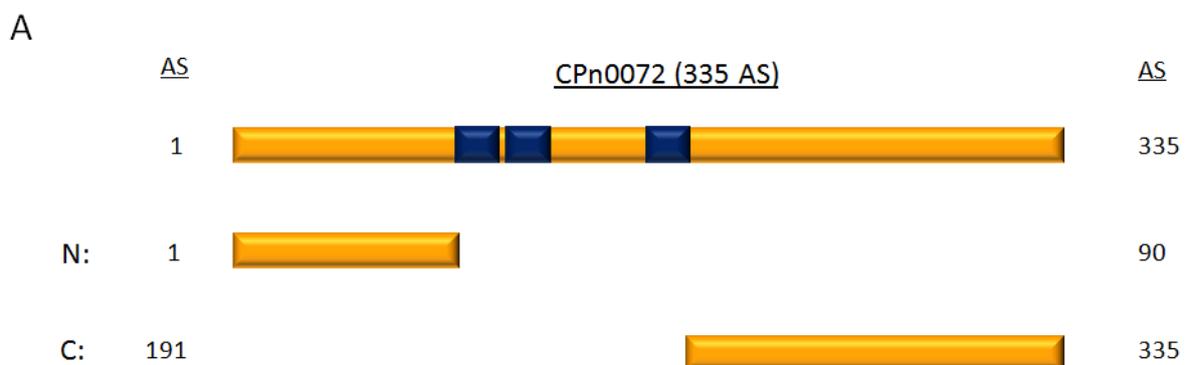


**Abb. 4-7: CPn0072 zeigt im Hefe-Zwei-Hybrid System eine Interaktion mit SLC30A9.**

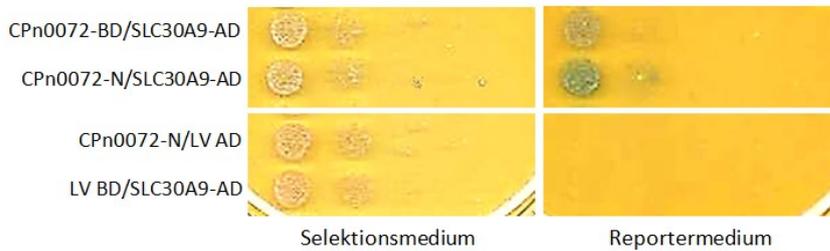
Das Köder-Konstrukt CPn0072-BD (# 2220) wurde mit dem SLC30A9 enthaltenden Bank-Plasmid (Y2H 0072-37) in den Hefestamm AH109 ko-transformiert. Mit entsprechenden Kontroll-Kombinationen wurde ebenso verfahren. Transformierte Hefen wurden über Nacht in SD/-Leu/-Trp Selektionsmedium unter konstitutiv Proteinexpression-induzierenden Bedingungen angezogen und hiernach in definierter Zellzahl auf Selektions- bzw. hochstringente Reporterplatten getropft. Mittels der Selektionsplatte wurde das gleichmäßige Wachstum aller Hefen überprüft, die Reporterplatte zeigte Interaktion an. Es wurden mehrere Klone analysiert, die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis. LV AD: Leervector pGADT7 (# 1675) LV BD: Leervector pGBKT7 (# 1301) Plasmide der Positivkontrolle: pGBKT7-p53 (# 1302) und pGADT7-T (# 1676).

#### 4.1.4 Der CPn0072 N-Terminus vermittelt die Interaktion mit SLC30A9

Es sollte als nächstes geklärt werden, welcher Abschnitt des CPn0072-Proteins verantwortlich für die Interaktion mit SLC30A9 ist. Da der die Transmembranregionen enthaltende Mittelteil zur Durchführung des Screens ausgelassen wurde, kamen hierfür der N-Terminus bestehend aus den AS 1-90 oder der C-Terminus bestehend aus den AS 191-335 infrage. Diese beiden Regionen wurden daher separat jeweils in den Vector pGBKT7 kloniert und auf Interaktion mit dem SLC30A9 Screenfragment getestet (Abb. 4-8). Der CPn0072 N-Terminus interagiert stärker mit SLC30A9 verglichen mit der durch das Köder-Konstrukt CPn0072-BD vermittelten Interaktion. Im Gegensatz dazu war keine Interaktion des CPn0072 C-Terminus mit SLC30A9 zu beobachten (Abb. 4-8 B und C).



B



C



**Abb. 4-8: Der CPn0072 N-Terminus vermittelt die Interaktion mit SLC30A9 im Hefe-Zwei-Hybrid System.**

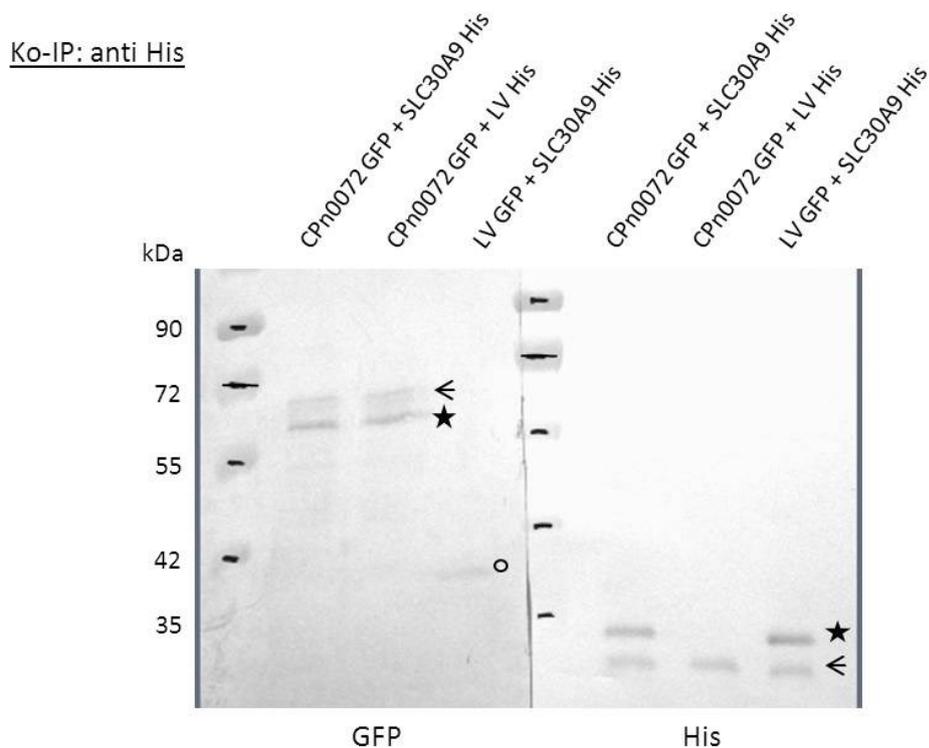
**A)** Zur Identifizierung der mit SLC30A9 interagierenden Region wurden die codierenden Sequenzen für den CPn0072 N-Terminus sowie den CPn0072 C-Terminus separat in den Vector pGBKT7 kloniert (# 2224 bzw. # 2225).

**B)** und **C)** Die CPn0072 Termini wurden mit dem SLC30A9 enthaltenden Bank-Plasmid (Y2H 0072-37) in den Hefestamm AH109 ko-transformiert. Die Durchführung des Tropftests erfolgte wie bereits für Abb. 4-7 beschrieben. Es wurden mehrere Klone analysiert, die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis. LV AD: Leervector pGADT7 (# 1675) LV BD: Leervector pGBKT7 (# 1301).

#### 4.1.5 Die Interaktion zwischen CPn0072 und SLC30A9 muss bestätigt werden

Die im Hefe-Zwei-Hybrid System zu beobachtende Interaktion zwischen CPn0072 und dem Fragment aus AS 286-554 des Proteins SLC30A9 sollte auf biochemischem Weg bestätigt werden. Hierzu wurden *cpn0072* unter Auslassung des Transmembrandomänen-Bereichs sowie der im Interaktionspartnerscreen identifizierte Abschnitt von *SLC30A9* in unterschiedliche Hefe-Expressionsvektoren in Fusion zu *GFP* bzw. der codierenden Sequenz für einen 6x Histidin-Rest kloniert. Die Markerproteine waren jeweils N-terminal gelegen. Beide Konstrukte wurden in Hefe ko-exprimiert und nach der Gewinnung von Hefe-Gesamtzelllysat wurde eine Ko-Immünpräzipitation (Ko-IP) unter Nutzung Anti-His-Antikörper beschichteter Kügelchen durchgeführt. Die Detektion der Fusionskonstrukte

erfolgte mittels Western Blot unter Nutzung spezifischer Antikörper gegen die Markerproteine (Abb. 4-9).



**Abb. 4-9: Mittels Ko-Immünpräzipitation konnte keine spezifische Interaktion zwischen CPn0072 und SLC30A9 nachgewiesen werden.**

Zur Durchführung der Ko-IP wurde SLC30A9 AS 286-554 in dem Hefe-Expressionsvector pSR1 an einen N-terminalen 6x Histidin-Rest fusioniert (# 2221). *cpn0072* wurde unter Auslassung des Transmembrandomänen-Bereichs in den Hefe-Expressionsvector pUG34 in Fusion zu N-terminalem GFP kloniert (# 2230). Beide Konstrukte wurden in den Hefestamm CEN.PK2 ko-transformiert, die Hefen zur Induktion der Proteinexpression vom GAL1- bzw. MET25-Promotor in SG/-His/-Met Selektionsmedium angezogen und es wurde Lysat hergestellt. Mit entsprechenden Kontroll-Kombinationen wurde ebenso verfahren. Nach der Immunpräzipitation mit einem Anti-His Antikörper erfolgte die Auftrennung der Proben in einem 10%-igen SDS-Gel und die Detektion der Fusionsproteine über einen Western Blot unter Nutzung eines Anti-GFP bzw. Anti-His Antikörpers (jeweils 1:1000) in Kombination mit AP-gekoppeltem Anti-Maus (für His) bzw. Anti-Kaninchen (für GFP) Sekundärantikörper (jeweils 1:7500). Das erwartete Molekulargewicht beträgt für das CPn0072-GFP Fusionsprotein 64 kDa, für GFP allein 40 kDa und für das SLC30A9-His Fusionsprotein 31 kDa. Markiert sind die vermutlichen Banden der Fusionsproteine (★), GFP alleine (o) sowie zusätzlich aufgetretene Banden (←). LV His: Leervector pSR1 (# 1788) LV GFP: Leervector pUG34 (# 848).

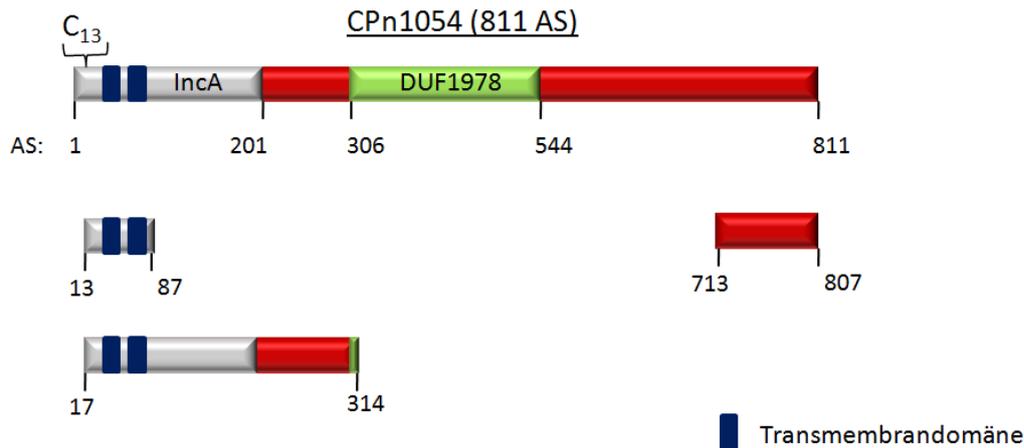
Der Anti-His Blot zeigt, dass mittels Anti-His Antikörper-beschichteter Magnetkügelchen das SLC30A9-His Fusionsprotein aus den entsprechenden Ansätzen 1 und 3 präzipitiert werden konnte (Stern). Die erwartete Größe beträgt 31 kDa, was mit der tatsächlichen Laufhöhe

übereinstimmt. Es ließ sich zudem eine Bande von etwas geringerem Molekulargewicht bei allen drei Ansätzen ausmachen (Pfeil). Hierbei handelt es sich vermutlich um ein unspezifisches Signal. Wie in der ersten Spur des GFP-Blots zu sehen ist, ließ sich das CPn0072-GFP Fusionsprotein aus dem SLC30A9 enthaltenden Lysat ko-präzipitieren. Das erwartete Molekulargewicht beträgt 64 kDa und entspricht der beobachteten Laufhöhe (Stern). Allerdings zeigte sich, dass das Fusionsprotein auch bei Abwesenheit des His-markierten SLC30A9 in ähnlicher Menge präzipitiert worden war (GFP-Blot, mittlere Spur). Es trat bei diesen beiden Ansätzen zusätzlich jeweils eine schwächere Bande von höherem Molekulargewicht mit auf, bei der es sich um eine unspezifische Bande oder eine Modifikation des Fusionsproteins handeln könnte (Pfeil). In der dritten Spur des GFP-Blots erschien eine Bande auf einer Höhe unterhalb von 42 kDa (Kreis). Hierbei handelt es sich vermutlich um das auf dem Hefe-Expressionsvector codierte GFP alleine, das ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 40 kDa besitzt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier benutzte Kombination aus unterschiedlich markiertem CPn0072- und SLC30A9-Protein sich als ungeeignet zum Nachweis einer spezifischen Interaktion herausgestellt hat, da entweder die angebrachten Marker eine unspezifische Wechselwirkung miteinander eingehen oder aber der Anti-His Antikörper direkt mit GFP wechselwirkt. Ob die im Hefe-Zwei-Hybrid System gefundene Interaktion zwischen CPn0072 und dem Zink-Transporter SLC30A9 real ist und eine Rolle während der Infektion spielt, muss weiter verfolgt werden.

## 4.2 CPn1054

CPn1054 ist ein *C. pneumoniae*-spezifisches hypothetisches Protein und besitzt N-terminal eine für Inc-Proteine charakteristische IncA-Domäne sowie zentral eine Domäne unbekannter Funktion, DUF1978 (Quelle: Pfam). Zudem befinden sich im N-Terminus zwei vorhergesagte Transmembrandomänen (Quelle: TMHMM) sowie auf DNA-Ebene eine Poly-C-Sequenz aus 13 Nukleotiden. In dem genomweiten Screen nach potentiellen neuen Effektorproteinen wurden drei Fragmente des CPn1054-Proteins als Auslöser von Wachstumshemmung in Hefe identifiziert. Zwei dieser Fragmente umfassen einen Abschnitt des N-Terminus und beinhalten jeweils beide vorhergesagten Transmembrandomänen des Proteins; das dritte Fragment deckt einen Abschnitt des C-Terminus ab (Abb. 4-10).



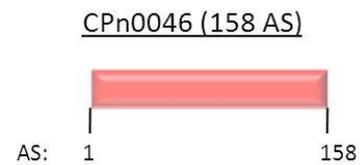
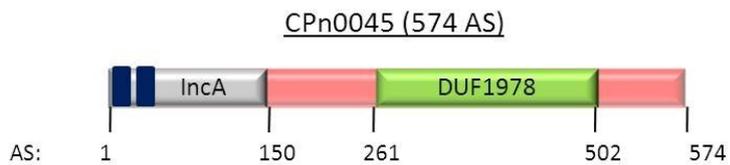
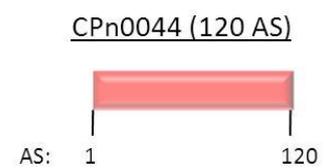
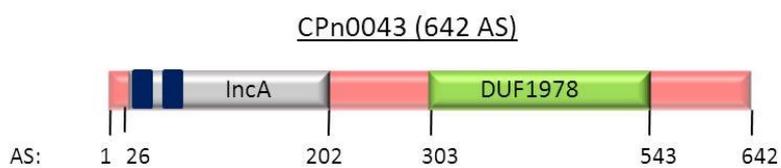
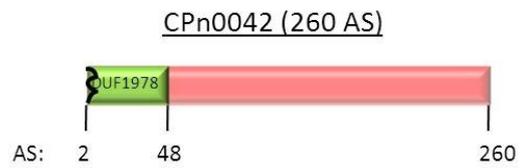
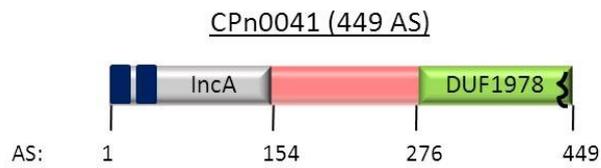
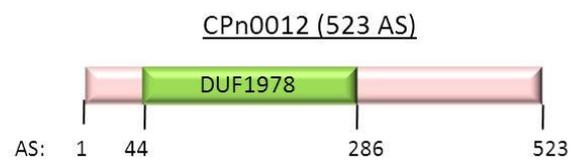
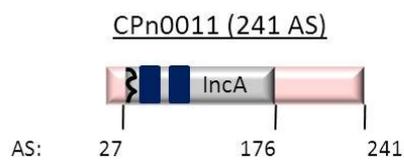
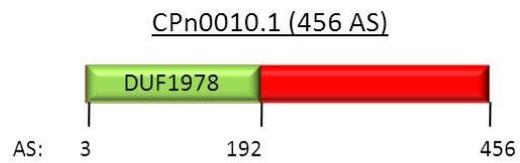
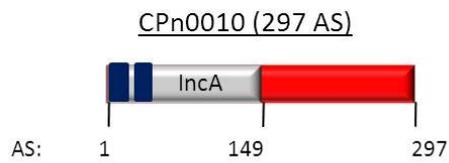
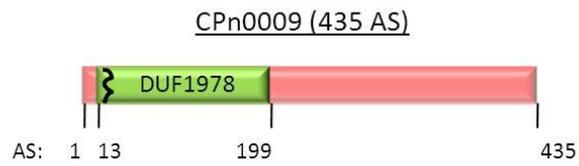
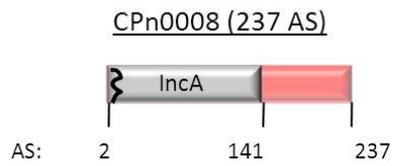
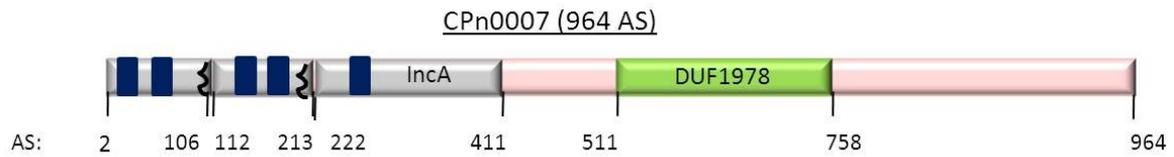
**Abb. 4-10: Domänenstruktur des Proteins CPn1054 und Übersicht über die im Effektor-Screen identifizierten Fragmente.**

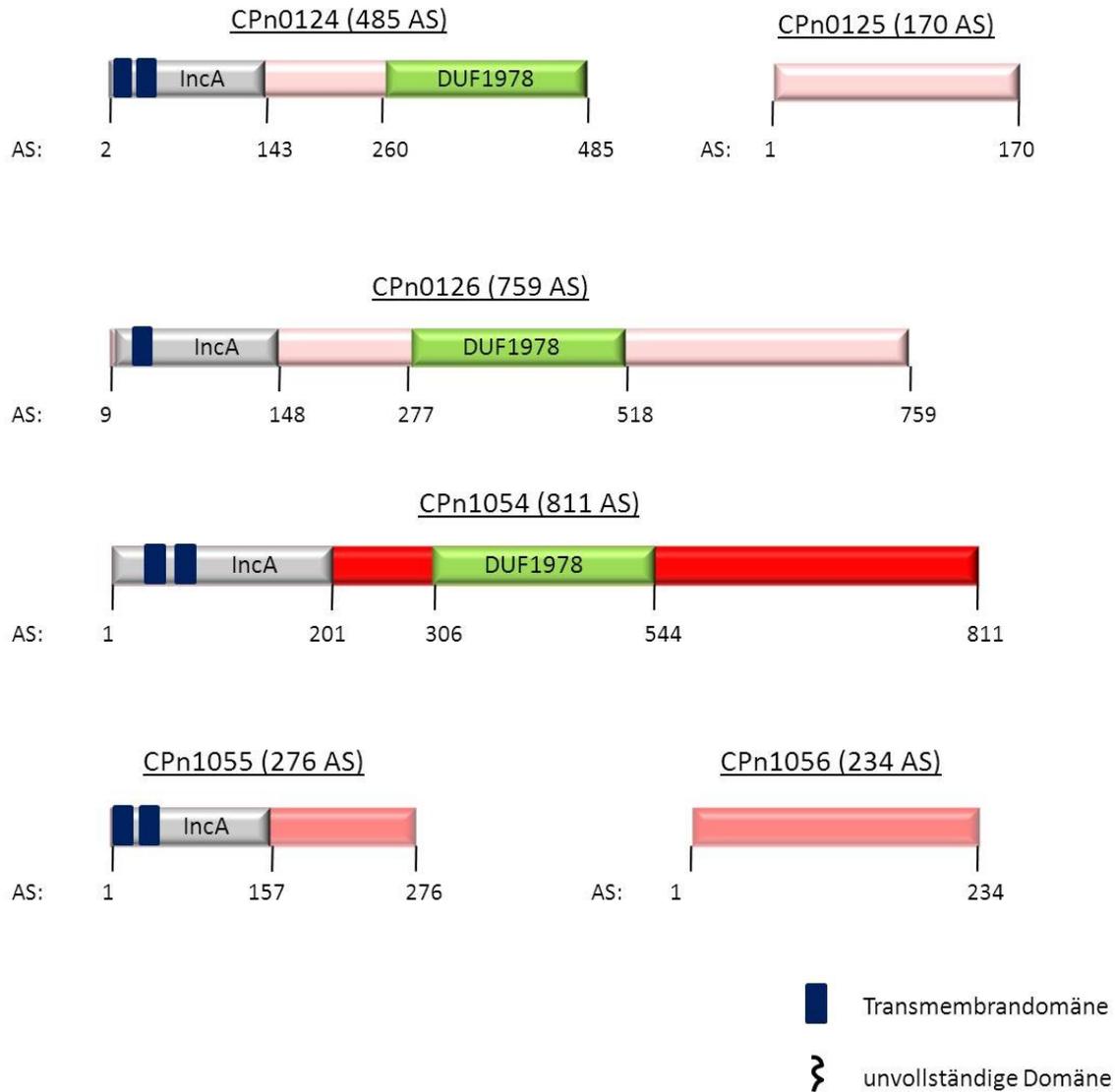
CPn1054 besitzt eine Länge von 811 AS und beinhaltet zwei vorhergesagte konservierte Domänen, IncA sowie DUF1978. N-terminal sind zwei putative Transmembrandomänen zu finden. Insgesamt wurden drei Fragmente von CPn1054 im Effektor-Screen isoliert, zwei davon weisen eine teilweise Überlappung auf.

Bei CPn1054 handelt es sich um ein potentielles Inc-Protein und bioinformatisch wird eine Typ III-Sekretion vorhergesagt (Dehoux, Flores *et al.*, 2011; Effective T3). CPn1054 wurde aber hauptsächlich als ein weiter zu charakterisierender Kandidat ausgewählt, da es als das Ursprungprotein der paralogen CPn1054-Familie gilt, die es nur in *C. pneumoniae* gibt, und ein weiteres Mitglied dieser Familie - CPn0043 - ebenfalls im Effektor-Screen identifiziert worden ist.

#### 4.2.1 Bioinformatische Analyse der CPn1054-Proteinfamilie

Die Ähnlichkeit der übrigen, ebenfalls allesamt hypothetischen Mitglieder der CPn1054-Proteinfamilie zum Ursprungprotein CPn1054 auf Aminosäuresequenz-Ebene ist bereits in Kap. 1.5.2 dargestellt worden. Im Folgenden wurde nach konservierten Domänen in allen Familienmitgliedern gesucht, um sie den für CPn1054 annotierten Domänen gegenüberzustellen (Abb. 4-11).





**Abb. 4-11: Konservierte Domänen in Mitgliedern der CPn1054-Proteinfamilie.**

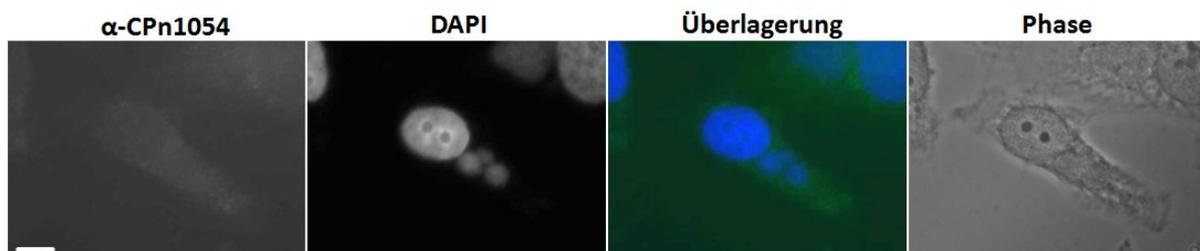
Die Suche nach konservierten Domänen erfolgte über Pfam. Die Farbcodierung entspricht der in Abb. 1-6 benutzten.

Die meisten der Proteine weisen eine IncA-Domäne und/oder eine DUF1978-Domäne auf, ausgenommen CPn0044, CPn0046, CPn0125 sowie CPn1056. Relativ kleine Proteine, die den CPn1054 N-Terminus abdecken, beinhalten eine IncA-Domäne. Hier sind CPn0008, CPn0010, CPn0011 und CPn1055 zu nennen. Die IncA-Domänen von CPn0008 sowie CPn0011 sind allerdings nicht vollständig. Kurze Proteine, welche dem CPn1054 C-Terminus entsprechen, tragen eine DUF1978-Domäne: CPn0009, CPn0010.1, CPn0012 und CPn0042, wobei die Domäne im Fall von CPn0009 und CPn0042 unvollständig ist. Bei den Proteinen, die beide

Domänen enthalten, handelt es sich um CPn0007, CPn0041, CPn0043, CPn0045, CPn0124, CPn0126 sowie CPn1054. Für CPn0007 findet sich die Besonderheit, dass neben einer vollständigen Inca-Domäne zusätzlich zwei unvollständige auftreten. Im Fall von CPn0041 ist die DUF1978-Domäne nicht vollständig vorhanden.

#### 4.2.2 Antigengereinigte CPn1054-Antikörperseren zeigen keine guten Signale in Immunfluoreszenz-Analysen

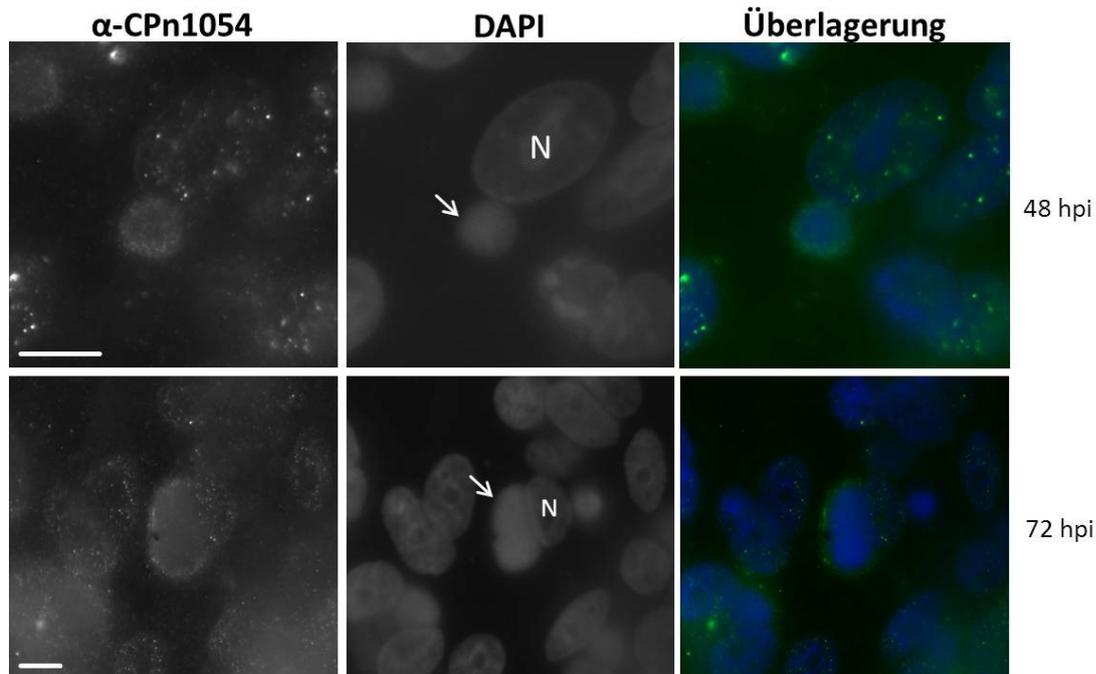
Es lag bereits ein gegen den CPn1054 C-Terminus (AS 521-811) generiertes polyklonales Antikörperserum vor (Herbst, 2011). Durch Präadsorption dieses Vollserums gegen das immobilisierte rekombinante Antigen wurden dem Serum alle spezifischen Antikörper gegen CPn1054 entzogen. Durch die nachfolgende Färbung infizierter Humanzellen mit diesem abgereicherten Serum wurde zunächst die Spezifität des Antikörpers überprüft. Es zeigte sich eine schwache und diffuse Färbung der gesamten Zelle inklusive Einschluss-Lumen bei sehr hoher Belichtungszeit, die als unspezifisches Signal angesehen wurde (Abb. 4-12).



**Abb. 4-12: Test der Spezifität des CPn1054-Antikörperserums.**

Das unaufgereinigte CPn1054-Antikörperserum wurde nach der Beschreibung in Kapitel 3.5.14 gegen das immobilisierte Antigen präadsorbiert. HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* (MOI = 2) infiziert, 48 hpi Methanol-fixiert und mit dem abgereicherten Antikörperserum (1:50) in Kombination mit Alexa488-gekoppeltem Anti-Kaninchen Sekundärantikörper (1:200) angefärbt. Die DNA wurde durch die Nutzung von DAPI sichtbar gemacht. In der Überlagerung ist das Serum-generierte Signal in grün und die DNA in blau dargestellt. Der Längensmarker entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

Für die weiteren mikroskopischen Untersuchungen wurde das polyklonale CPn1054-Antikörperserum zunächst gegen säulengebundenen Antigen affinitätsgereinigt (siehe Kap. 3.5.11) und zur Färbung Methanol-fixierter, infizierter HEp2-Zellen eingesetzt (Abb. 4-13).

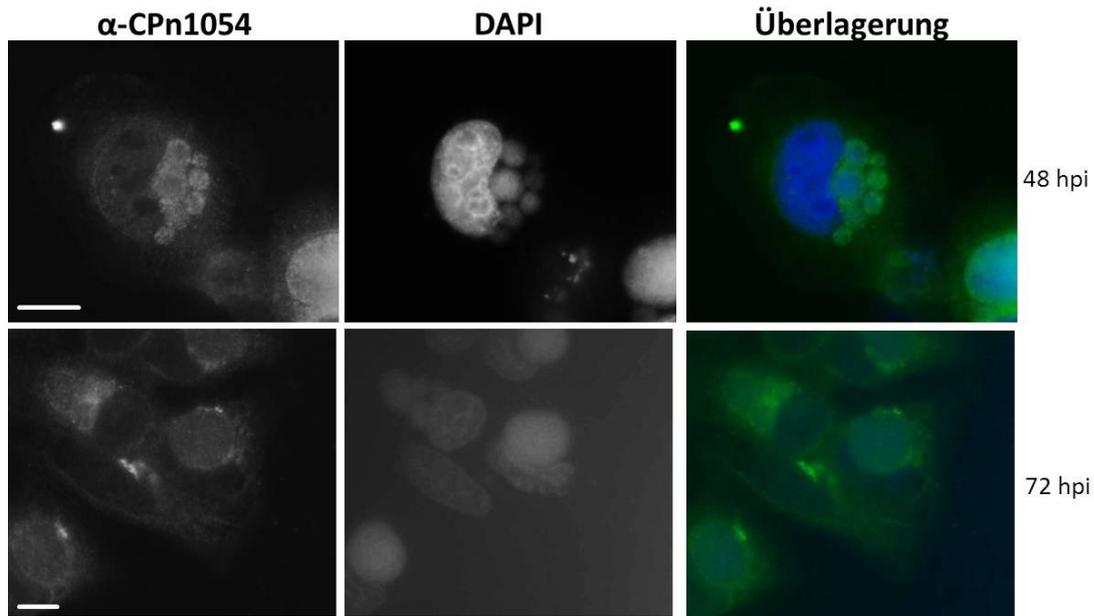


**Abb. 4-13: Färbung infizierter HEp2-Zellen mit einer CPn1054-Antikörperpräparation, die gegen säulengebundenen Antigen aufgereinigt worden war.**

Das CPn1054-Antikörperserum wurde gegen säulengebundenen Antigen (exprimiert von Plasmid pAF90, siehe Kap. 2.10.2) affinitätsgereinigt (Kap. 3.5.11). HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* (MOI = 2) infiziert, 48 hpi sowie 72 hpi Methanol-fixiert und mit dem unverdünnten gereinigten Antikörper in Kombination mit Alexa488-gekoppeltem Anti-Kaninchen Sekundärantikörper (1:200) angefärbt. Die DNA wurde durch die Nutzung von DAPI sichtbar gemacht. In der Überlagerung ist das CPn1054-Signal in grün und die DNA in blau dargestellt. Pfeile markieren Inklusionen, N Nuklei. Der Längenmarker entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

Es zeigten sich zu beiden Zeitpunkten punktierte Hintergrundsignale in den Zellkernen, die besonders zum Zeitpunkt 48 hpi teilweise sehr stark waren. Zudem waren 48 hpi besonders gegen den Rand des Einschlusses hin punktierte CPn1054-Signale zu sehen, während das Zentrum der Inklusion vergleichsweise signalarm war. 72 hpi war eine punktierte, Ring-ähnliche Färbung zu sehen, welche die bakteriellen DAPI-Signale umgab. Auch im Inklusionslumen konnten verschwommene Signale beobachtet werden.

Nachdem mittels der säulengereinigten Antikörperlösung keine guten Mikroskopanalysen durchgeführt werden konnten, wurde das CPn1054-Vollserum alternativ gegen membrangebundenen Antigen aufgereinigt (siehe Kap. 3.5.12). Auch mit der auf diese Weise gewonnenen Antikörperlösung wurden infizierte HEp-2 Zellen angefärbt, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten Methanol-fixiert worden waren (Abb. 4-14).



**Abb. 4-14:** Färbung infizierter HEp2-Zellen mit einer CPn1054-Antikörperpräparation, die gegen membrangebundenes Antigen aufgereinigt worden war.

Das CPn1054-Antikörperserum wurde nach der Beschreibung in Kapitel 3.5.12 gegen das auf einer Membran immobilisierte Antigen affinitätsgereinigt. HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* (MOI = 5) infiziert, 48 hpi sowie 72 hpi Methanol-fixiert und mit dem unverdünnten gereinigten Antikörper in Kombination mit Alexa488-gekoppeltem Anti-Kaninchen Sekundärantikörper (1:200) angefärbt. Die DNA wurde durch die Nutzung von DAPI sichtbar gemacht. In der Überlagerung ist das CPn1054-Signal in grün und die DNA in blau dargestellt. Der Längensmarker entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

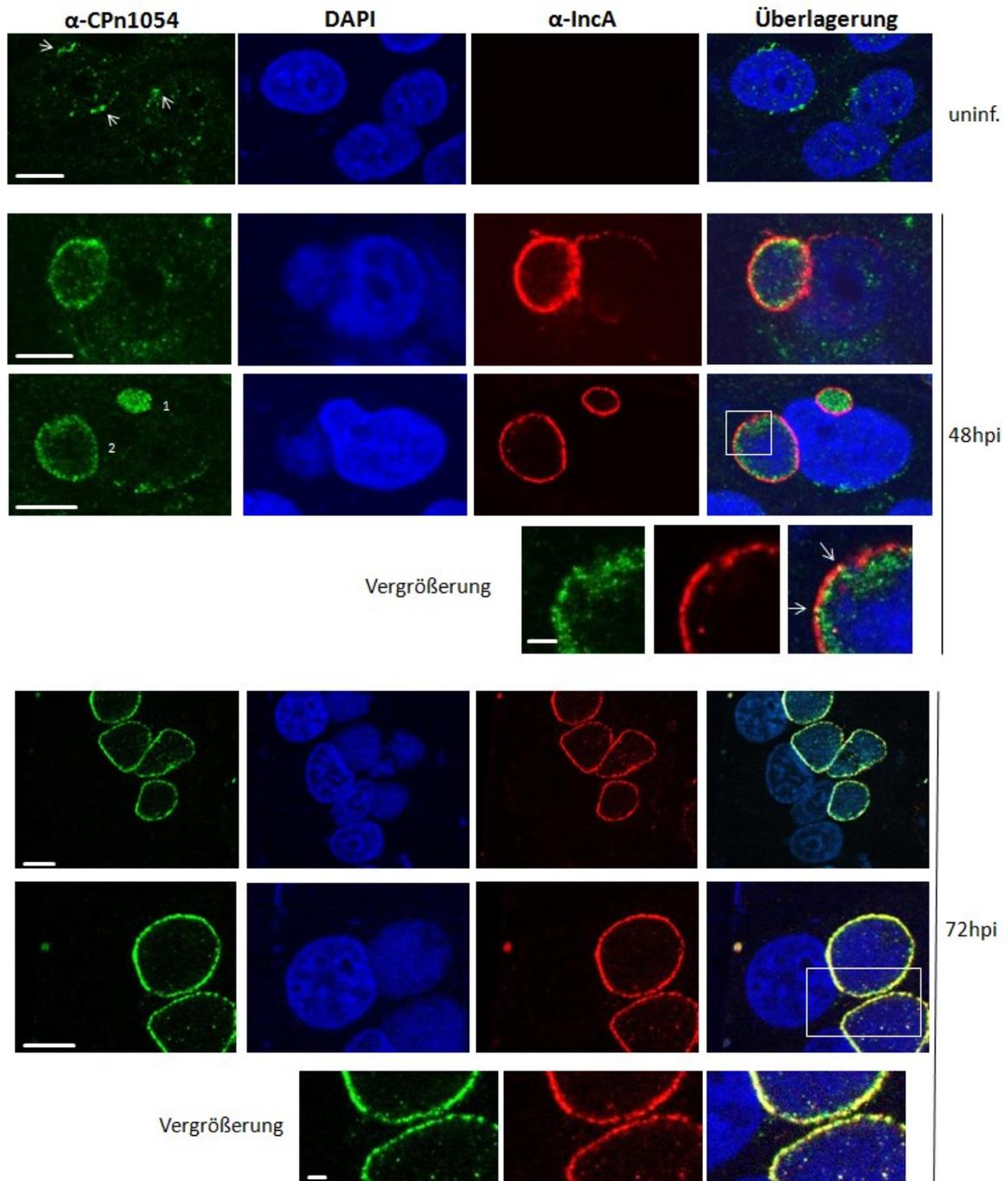
Auch hier zeigte sich zum Zeitpunkt 48 hpi ein Hintergrundsignal im Zellkern, das jedoch nicht punktiert ausfiel, sondern eher schwach und diffus im kompletten Kern verteilt war. Im Cytosol war ebenfalls eine Hintergrundfärbung auszumachen. Darüber hinaus konnte eine Anfärbung der Inklusionen beobachtet werden, wobei einige über ihre komplette Ausdehnung hinweg punktierte Signale aufwiesen, während bei anderen wiederum stärker die Randbereiche gefärbt und das Zentrum der Inklusion relativ signalarm war. Zum Zeitpunkt 72 hpi war eine schwache, diffuse Färbung innerhalb der Zellen zu sehen. Das Zellkern-Innere wurde vornehmlich ausgespart, während am Kernrand Signale auftraten. Die Inklusionen waren über ihre gesamte Ausdehnung hinweg punktiert angefärbt, vereinzelt traten stärkere Signale am Rand auf.

Letztendlich wurde keine der beiden ausgetesteten Antikörper-Aufreinigungsmethoden als hinreichend gut erachtet, um mittels der gereinigten Antikörperpräparation weitere mikroskopische Analysen durchzuführen. Gegen Ende der Dissertation wurde dann eine weitere Aufreinigungsmethode für den Anti-CPn1054-Antikörper getestet, bei der nicht wie

bisher der spezifische Antikörper gegen das Antigen aufgereinigt wurde, sondern die unspezifischen Antikörper gegen fixierte Humanzellepitope abgereichert wurden (siehe Kap. 3.5.13). Alle nachfolgenden Immunfluoreszenz-Analysen wurden mit dieser Antikörper-Präparation durchgeführt.

#### **4.2.3 CPn1054 zeigt in der Infektion möglicherweise eine Inklusionsmembran-assoziierte Lokalisation**

Um zu klären, wo CPn1054 in der Infektion lokalisiert ist, wurden infizierte Humanzellen zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert und mit CPn1054-Antikörperserum gefärbt. Da es sich bei CPn1054 um ein vorhergesagtes Inc-Protein handelt und in ersten Mikroskopiebildern bereits Hinweise auf eine Lokalisierung am Inklusionsrand auftraten (s. Kap. 4.2.2), wurde IncA zum Vergleich ko-gefärbt (Abb. 4-15).



**Abb. 4-15: Ko-Lokalisationsanalyse von CPn1054 und IncA in der Infektion.**

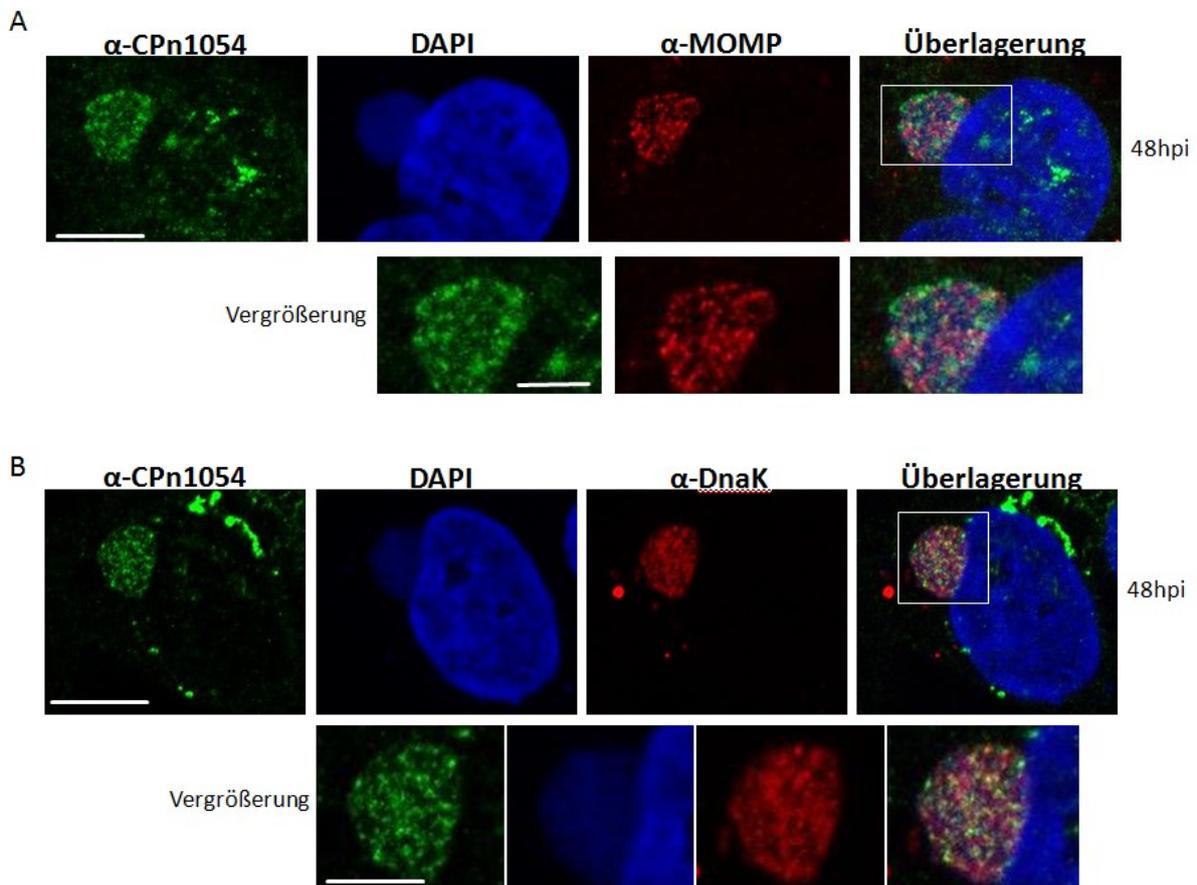
HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* (MOI = 2) infiziert und 48 hpi bzw. 72 hpi Methanol-fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit Antikörpern gegen CPn1054 (abgereichert gemäß Kapitel 3.5.13, 1:50) sowie IncA (1:30) in Kombination mit Alexa488-gekoppeltem Anti-Kaninchen bzw. Alexa594-gekoppeltem Anti-Maus Sekundärantikörper (jeweils 1:200) ko-gefärbt. Die DNA wurde mittels DAPI gefärbt. In der Überlagerung ist CPn1054 in grün, IncA in rot und die DNA in blau dargestellt. Die Vergrößerung zeigt jeweils den weiß umrandeten Bereich der darüberliegenden Reihe; die Pfeile bei 48 hpi markieren Punkte der Überlagerung von grünem und rotem Signal. In nicht-infizierten Zellen markieren die Pfeile unspezifische Hintergrundsignale. Der

Längenmarker entspricht 5  $\mu\text{m}$  bzw. in der Vergrößerung 1  $\mu\text{m}$ . Die Bilder wurden am Konfokalmikroskop aufgenommen. (Die Aufnahmen für den Zeitpunkt 72 hpi wurden nur einmal generiert)

Es zeigte sich zum Zeitpunkt 48 hpi ein offenbar von der Inklusionsgröße abhängiges Lokalisationsmuster für CPn1054. Eine kleine Inklusion (1) wies eine punktierte Färbung über ihre gesamte Ausdehnung hinweg auf, wohingegen bei einer größeren Inklusion (2) das CPn1054-Signal verstärkt am Rande der Inklusion zu detektieren war (Abb. 4-15, 48 hpi). Die CPn1054-Signale ko-lokalisieren größtenteils nicht mit dem ringförmigen Signal für das Inklusionsmembranprotein IncA, sondern schienen innerhalb dieses Signals im Einschluss zu liegen. Lediglich vereinzelt ergab sich eine Überlagerung der Signale, wie an den gelben Punkten in der Vergrößerungs-Ansicht zu erkennen ist (Pfeile). Ein anderes Bild bot sich zum Zeitpunkt 72 hpi: Hier zeigte CPn1054 eine ringförmige Lokalisation an der Inklusionsmembran, wobei die Signale für CPn1054 und IncA einen hohen Grad an Überlagerung aufwiesen und zusätzlich vereinzelt grüne CPn1054-Signale am Inklusionsrand zu detektieren waren (siehe Vergrößerung). Das Inklusionslumen war beinahe vollständig frei von CPn1054-Signalen. Da im Vorfeld voneinander abweichende Beobachtungen bezüglich der Lokalisation von CPn1054 zum Zeitpunkt 72 hpi gemacht wurden (siehe Abb. 4-13 und 4-14) und die Analyse am Konfokalmikroskop nur einmalig durchgeführt werden konnte, ist dieses Ergebnis vorläufig. Insgesamt lässt sich die Hypothese aufstellen, dass mit zunehmender Inklusionsexpansion die Lokalisation von CPn1054 von einer punktierten Verteilung über die komplette Inklusion hinweg zu einer IncA charakteristischen ringförmigen Lokalisation am Inklusionsrand verschoben wird. Eine Aussage über eine mögliche Sekretion des CPn1054-Proteins ins Wirtszellzytosol kann aufgrund des starken Hintergrundsignals, das in gefärbten nicht-infizierten Zellen zu detektieren war (Pfeile), nicht gemacht werden. CPn1054 schien nicht mit den IncA-positiven fadenartigen Strukturen zu assoziieren, welche von der Inklusion ausgehend ins Cytosol der Wirtszelle reichen (Abb. 4-15, 48 hpi).

Das punktierte CPn1054-Signal in frühen bzw. kleinen Inklusionen könnte auf eine Bakterien-Assoziation des Proteins hindeuten. Daher wurden Ko-Färbungen mit weiteren chlamydialen Markerproteinen durchgeführt, um hierüber Aufschluss zu gewinnen. Zum untersuchten Zeitpunkt 48 hpi ergab sich keine signifikante Überlagerung der Signale für CPn1054 und das chlamydiale Oberflächenprotein MOMP (Abb. 4-16 A). Somit scheint sich das CPn1054-Protein in kleinen Inklusionen nicht an der Bakterien-Oberfläche zu befinden. Eine Ko-Färbung von CPn1054 und dem intrachlamydialen Protein DnaK 48 hpi zeigte hingegen an vielen Stellen eine Überlagerung der Signale (Abb. 4-16 B). Dies suggeriert, dass sich ein gewisser Anteil an CPn1054-Protein zu diesem Zeitpunkt innerhalb der Bakterien befindet.

Später in der Infektion könnte CPn1054 schließlich sekretiert und in die Inklusionsmembran inseriert werden.



**Abb. 4-16: Ko-Lokalisationsanalyse von CPn1054 und MOMP bzw. DnaK in der Infektion.**

HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* (MOI = 2) infiziert und 48 hpi Methanol-fixiert.

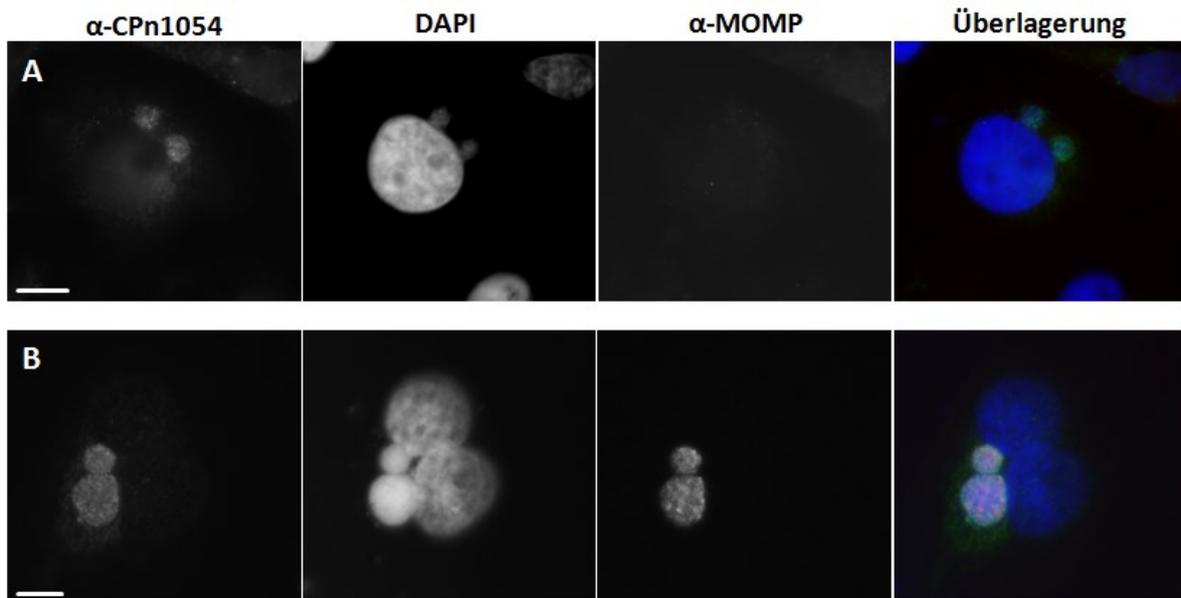
**A)** Die fixierten Zellen wurden mit Antikörpern gegen CPn1054 (abgereichert gemäß Kap. 3.5.13, 1:50) und MOMP (1:50) in Kombination mit Alexa488-gekoppeltem Anti-Kaninchen bzw. Alexa 594-gekoppeltem Anti-Maus Sekundärantikörper (jeweils 1:200) ko-gefärbt. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt.

**B)** Fixierte Zellen wurden mit Antikörpern gegen CPn1054 (wie in A) und DnaK (1:20) in Kombination mit den in A) aufgeführten Sekundärantikörpern ko-gefärbt. Die DNA wurde durch die Nutzung von DAPI sichtbar gemacht.

In den Überlagerungsbildern ist CPn1054 in grün, das jeweils ko-gefärbte chlamydiale Protein in rot und die DNA in blau dargestellt. Die Vergrößerung zeigt jeweils den weiß umrandeten Bereich der darüberliegenden Reihe. Der Längensmarker entspricht 5  $\mu\text{m}$  bzw. in der Vergrößerung 2,5  $\mu\text{m}$ . Die Bilder wurden am Konfokalmikroskop aufgenommen.

#### 4.2.4 CPn1054 ist Wirtszellzytosol-exponiert

Die mögliche Ko-Lokalisation mit IncA sowie die einzelnen CPn1054-Signale an der Inklusionsmembran deuten darauf hin, dass CPn1054 Kontakt zum Wirtszellzytosol besitzen könnte. Um dies zu überprüfen, wurden *C. pneumoniae*-infizierte HEp-2 Zellen mit 3,7%-igem para-Formaldehyd (PFA) fixiert und es wurde ohne nachfolgende Permeabilisierungsschritte eine Ko-Färbung mit Antikörpern gegen CPn1054 sowie MOMP durchgeführt. Zur Kontrolle wurden infizierte und Methanol-fixierte HEp-2 Zellen, die vollständig permeabilisiert sind, mit derselben Antikörper-Kombination gefärbt (Abb. 4-17).



**Abb. 4-17: CPn1054 ist von der zytosolischen Seite der Wirtszelle her zugänglich.**

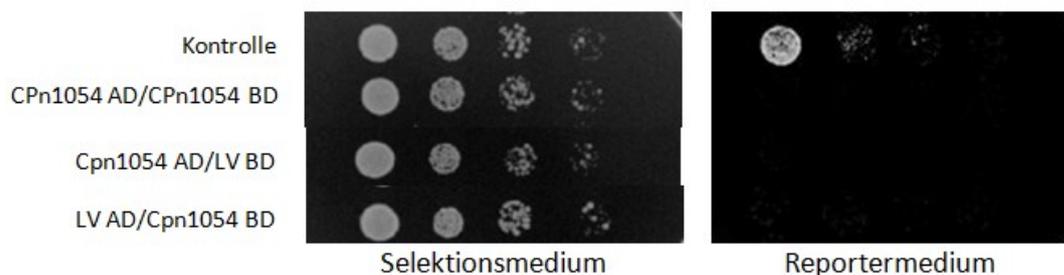
*C. pneumoniae*-infizierte HEp-2 Zellen (MOI = 2) wurden 48 hpi mit 3,7%-igem para-Formaldehyd (A) bzw. Methanol (B) fixiert und es wurde eine Ko-Färbung mit einer Antikörper-Mischung gegen CPn1054 (abgereichert gemäß Kap. 3.5.13, 1:50) und MOMP (1:50) durchgeführt. Als Sekundärantikörper wurden Alexa488-gekoppelter Anti-Kaninchen Antikörper sowie Alexa594-gekoppelter Anti-Maus Antikörper (jeweils 1:200) eingesetzt. Die DNA wurde mittels DAPI-Färbung sichtbar gemacht. In der Überlagerung ist CPn1054 in grün, MOMP in rot und die DNA in blau dargestellt. Der Längensmarker entspricht 5  $\mu$ m.

In para-Formaldehyd-fixierten Zellen konnte kein Signal für MOMP, wohl aber eines für CPn1054 detektiert werden (Abb. 4-17 A). Die Tatsache, dass MOMP nicht für eine Antikörperfärbung zugänglich war, zeigt, dass die Inklusionsmembran erwartungsgemäß nicht permeabilisiert worden war. Die prinzipielle Funktionalität des MOMP-Antikörpers konnte durch die Nutzung Methanol-fixierter Zellen nachgewiesen werden, die mit einem Aliquot desselben Ansatzes gefärbt wurden und in denen ein deutliches Signal sowohl für

CPn1054 als auch für MOMP zu sehen war (Abb. 4-17 B). Die erhaltenen Ergebnisse sprechen dafür, dass CPn1054 Kontakt zum Wirtszellzytosol besitzt.

#### 4.2.5 CPn1054 geht keine Selbst-Interaktion ein

Das bekannte und bereits recht gut charakterisierte Inklusionsmembranprotein IncA aus *C. trachomatis* zeigt eine Selbst-Interaktion, wodurch die Fusion von Inklusionen in mehrfach infizierten Zellen vermittelt wird (Hackstadt, Scidmore-Carlson *et al.*, 1999). Aufgrund des Vorhandenseins einer IncA-Domäne bei CPn1054 wurde untersucht, ob das Protein ebenfalls eine Selbst-Interaktion eingeht. Zu diesem Zweck wurde die codierende Sequenz für CPn1054 AS 79-811 (ohne Transmembrandomänen) jeweils in den Vector pGADT7 in Fusion zur GAL4-Aktivierungsdomäne und in den Vector pGBKT7 in Fusion zur GAL4 DNA-bindenden Domäne kloniert und die Konstrukte wurden im Hefe-Zwei-Hybrid System getestet (Abb. 4-18).



**Abb. 4-18: CPn1054 zeigt keine Selbst-Interaktion im Hefe-Zwei-Hybrid System.**

Der Hefestamm AH109 wurde mit Plasmiden, welche eine Fusion aus CPn1054 AS 79-811 und der Gal4p Aktivierungsdomäne (# 2218) bzw. aus CPn1054 AS 79-811 und der Gal4p DNA-Bindedomäne (# 2217) codieren, ko-transformiert. Entsprechende Kontroll-Kombinationen wurden ebenfalls ko-transformiert. Die Durchführung des Tropftests erfolgte wie in Abb. 4-7 beschrieben. Es wurden mehrere Klone analysiert, die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis. LV AD: Leervector pGADT7 (# 1675) LV BD: Leervector pGBKT7 (# 1301) Plasmide der Positivkontrolle: pGBKT7-p53 (# 1302) und pGADT7-T (# 1676).

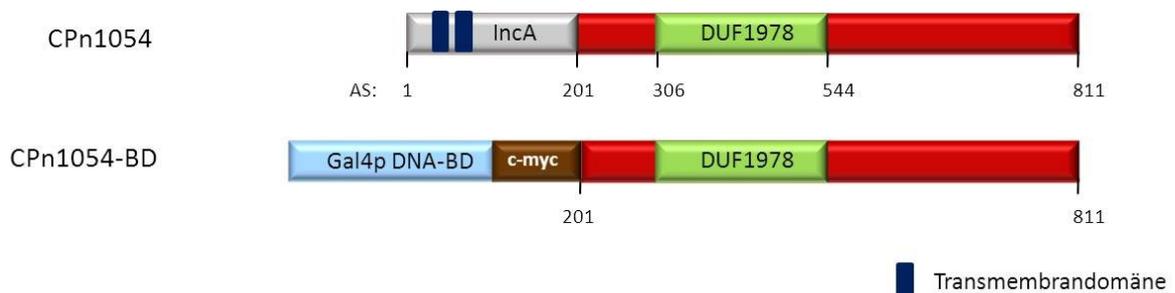
Wie in Abbildung 4-18 zu sehen, zeigten alle ko-transformierten Hefen ein gleichmäßiges Wachstum auf Selektionsmedium. Auf der Reporterplatte zeigte sich hingegen nur ein Wachstum von Hefen, die mit der Kontroll-Kombination aus p53 und dem SV40 großen T-Antigen ko-transformiert worden waren. Die beiden CPn1054-Fusionsproteine in

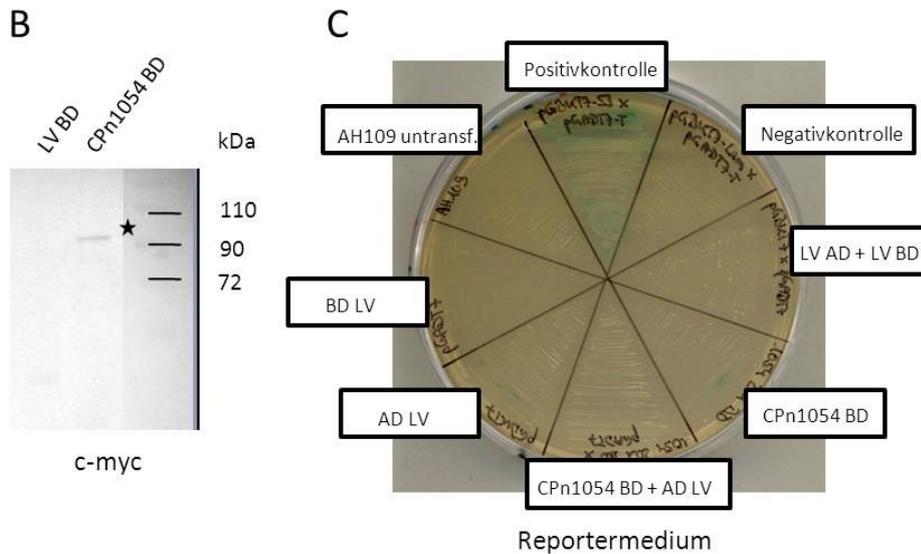
Kombination sowie die zugehörigen Kontroll-Paarungen mit dem entsprechenden Leervector wuchsen hingegen nicht. Dies deutet darauf hin, dass es zu keiner Interaktion zwischen zwei CPn1054-Proteinen kam.

#### 4.2.6 Identifizierung putativer CPn1054-Interaktionspartner mittels eines Hefe-Zwei-Hybrid Screens

Um Hinweise auf die mögliche Funktion von CPn1054 während einer Infektion zu erhalten, wurde ein Screen nach humanen Interaktionspartnern unter Verwendung der Hefe-Zwei-Hybrid Methode durchgeführt. Die codierende Sequenz für CPn1054 wurde unter Auslassung der kompletten Inca-Domäne, die möglicherweise Wechselwirkungen mit membranösen Strukturen oder Vesikeln eingehen und auf diese Weise den Hefe-Zwei-Hybrid Versuch behindern könnte, in den Vector pGBKT7 kloniert (Abb. 4-19 A). Das Konstrukt wurde in den Hefestamm AH109 transformiert und die Proteinexpression überprüft. Im Western Blot konnte das Fusionsprotein bei ca. 93 kDa detektiert werden (Abb. 4-19 B, Stern). Eine Überprüfung des Wachstums auf den im Screen einzusetzenden mittelstringenten Reporterplatten ergab, dass das Köder-Konstrukt weder alleine noch in Kombination mit dem entsprechenden Leerplasmid pGADT7 eine Aktivierung der Reportergene bewirkte (Abb. 4-19 C).

A





**Abb. 4-19: Im Hefe-Zwei-Hybrid Screen eingesetztes CPn1054-Konstrukt.**

**A)** Die codierende Sequenz für CPn1054 (ohne InCA-Domäne) wurde in den Vector pGBKT7 in Fusion zur GAL4 DNA-bindenden Domäne sowie zu *c-myc* kloniert (CPn1054-BD, # 2216).

**B)** Das klonierte Konstrukt CPn1054-BD sowie der Leervector wurden in den Hefestamm AH 109 transformiert. Hefen wurden unter konstitutiver Expressionsinduktion in SD/-Trp Selektionsmedium angezogen und es wurde Gesamtzelllysat hergestellt. Nach Auftrennung über ein 10%-iges SDS-Gel wurde das Fusionsprotein (erwartet: 93 kDa) im Western Blot mittels eines Anti-*c-myc* Antikörpers (1:1000) und eines AP-gekoppelten Anti-Maus Sekundärantikörpers (1:7500) detektiert (Stern).

**C)** Mit den angegebenen Konstrukten bzw. Plasmiden transformierte Hefen vom Stamm AH109 wurden auf mittelstringentem Reportermedium (SD/-Leu/-Trp/-His + X-alpha-Gal) ausgestrichen, um auf eine Aktivierung der Reportergene zu testen. LV AD: Leervector pGADT7 (# 1675) LV BD: Leervector pGBKT7 (# 1301) Plasmide der Positivkontrolle: pGBKT7-p53 (# 1302) und pGADT7-T (# 1676) Plasmide der Negativkontrolle: pGADT7-T (# 1676) und pGBKT7-Lam (# 1677).

Mit diesem Konstrukt wurde nun der Hefe-Zwei-Hybrid Screen durchgeführt. Auf den mittelstringenten Reporterplatten wuchsen insgesamt 2996 Hefekolonien, 93 hiervon wiesen eine Blaufärbung auf. Nach zweimaliger Vereinzlung dieser 93 Kolonien zeigten noch 27 davon Wachstum und Blaufärbung. In der gerichteten Ko-Transformation von Köder-Plasmid und isoliertem Bank-Plasmid konnte für 24 Kombinationen das positive Ergebnis verifiziert werden. Autoaktivierungstests zeigten, dass die 24 Bank-Plasmide alleine zu keiner Aktivierung der Reportergene führten, so dass sie alle zur Sequenzierung geschickt werden konnten. Die Berechnung der Kennzahlen des Screens ergab einen Bank-Titer von  $1,9 \times 10^8$  Zellen/ml, eine Paarungseffizienz von 6,62 % und eine Anzahl durchmusterter Klone

von  $1,43 \times 10^7$  (die Rohdaten zur Bestimmung der Kennzahlen finden sich im Anhang). Tabelle 4-3 stellt diese ermittelten Kennzahlen den Richtwerten, wie sie im Handbuch der Firma Clontech zu finden sind, gegenüber.

Tabelle 4-3: Gegenüberstellung der Kennzahlen des CPn1054-Interaktionspartnerscreens und der entsprechenden Richtwerte

	CPn1054-Screen	Richtwert
Titer der cDNA-Bank	$1,9 \times 10^8$ Zellen/ml	$\geq 2 \times 10^7$ Zellen/ml
Paarungseffizienz	6,62 %	2 – 5 %
Anzahl durchmusterter Klone	$1,43 \times 10^7$	$\geq 1 \times 10^6$

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, liegen alle Werte im geforderten Bereich. Bei der hohen Anzahl von  $1,43 \times 10^7$  durchmusterter Klonen wurde bei einer angenommenen Anzahl von 20.000 bis 30.000 menschlichen Genen eine ca. 500- bis 700-fache Abdeckung des Genoms erreicht. Dies sollte ausreichend sein, um auch niedrig exprimierte Gene zu erfassen.

Die Inserts der 24 Bank-Plasmide codierten für insgesamt 14 verschiedene humane Proteine (Tab. 4-4).

Tabelle 4-4: Insert-Analyse der isolierten Bank-Plasmide aus dem CPn1054-Screen

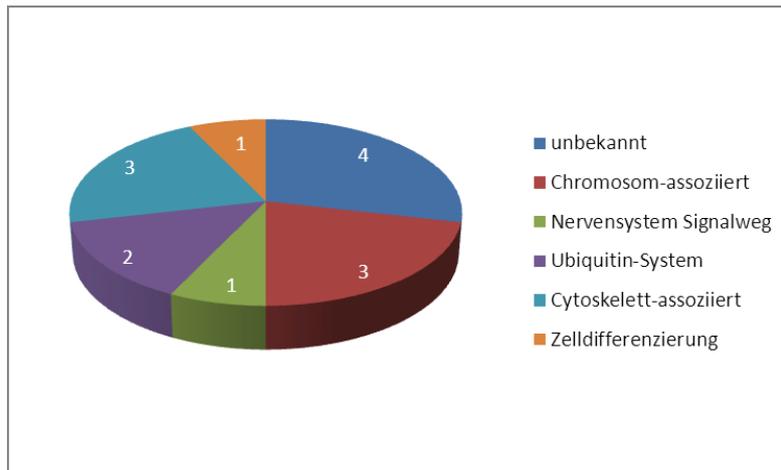
Interaktions-Kandidat	codiert auf Bank-Plasmid	codierter Proteinabschnitt (Gesamtlänge in AS)	Gleiches Leseraster wie GAL4?
<i>Coiled coil domain containing 42</i> (CCDC42)	Y2H-2	AS 79-242 (242)	ja
	Y2H-4	AS 79-242 (242)	ja
	Y2H-20	AS 78-242 (242)	ja
<i>bromodomain and PHD finger-containing protein 3</i> (BRPF3)	Y2H-3	AS 426-1145 (1205) *	ja
<i>nerve growth factor receptor</i> (TNFRSF16) <i>associated protein 1</i> (NGFRAP1)	Y2H-5	AS 1-111 (111)	ja

<i>chromosome 1 open reading frame 216</i> (c1orf216)	Y2H-7 Y2H-10 Y2H-17	AS 145-229 (229) AS 94-229 (229) AS 94-229 (229)	ja ja ja
<i>COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 4</i> ( <i>Arabidopsis</i> ) (COPSA4)	Y2H-8 Y2H-15	AS 1-406 (406) L258P-Mutation AS 1-406 (406) L211P-Mutation	ja ja
<i>troponin I type 3</i> (cardiac) (TNNI3)	Y2H-11 Y2H-12 Y2H-55	AS 51-210 (210) AS 49-210 (210) AS 51-210 (210)	ja ja ja
<i>kinesin family member 5A</i> (KIF5A)	Y2H-13	AS 530-928 (1032)	ja
<i>mortality factor 4 like 1</i> (MORF4A1)	Y2H-24	AS 1-235 (235) H174R-Mutation	ja
<i>actinin, alpha 1</i> (ACTN1)	Y2H-25	AS 411-892 (892) *	ja
<i>required for meiotic nuclear division 5 homolog B</i> (RMND5B)	Y2H-31	AS 1-115, Stop-Codon, AS 116-393 (393)	ja
<i>COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 6</i> ( <i>Arabidopsis</i> ) (COPS6)	Y2H-40 Y2H-57 Y2H-74 Y2H-78	AS 1-327 (327) AS 1-327 (327) AS 1-327 (327) AS 1-327 (327) Q224R-Mutation	ja ja ja ja
<i>ZW10 interactor</i> (ZWINT)	Y2H-47	AS 1-173, eine nicht zugehörige Sequenz, AS 174-230 (230)	ja
<i>chromosome 10 open reading frame 78</i> (C10orf78)	Y2H-50	AS 5-245 (245) V143A-Mutation	ja
<i>coiled-coil alpha-helical rod protein 1</i> (CCHCR1)	Y2H-62	AS 235-615 (782) R417W-Mutation	ja

\* Insert wurde im zentralen Bereich nicht sequenziert

Einige Proteine wurden in mehreren Bank-Plasmiden codiert. CCDC42, TNNI3 sowie C1orf216 kamen je dreimal vor, COPS4 zweimal und COPS6 viermal. Die restlichen neun Sequenzen traten jeweils nur einmal auf. Alle codierten Gene bzw. Genabschnitte befanden sich in demselben Leserahmen wie die *GAL4*-Aktivierungsdomäne. Die Proteine NGFRAP1, COPS4, COPS6 sowie MORF4A1 wurden vollständig in den Bank-Plasmiden codiert, während im Fall von C1orf78 lediglich die ersten 4 Aminosäuren fehlten. Von den Proteinen CCDC42, C1orf216 sowie TNNI3 wurde ein C-terminaler Abschnitt codiert, vermutlich ist die reverse Transkription zur Herstellung der cDNA an einem bestimmten Punkt abgebrochen. Die Inserts der Plasmide Y2H-3 sowie Y2H-25, die für Fragmente der Proteine BRPF3 bzw. ACTN1 codieren, sind nicht komplett durchsequenziert worden. Die Sequenzierungen wurden mit einem Forward- und einem Reverse-Standardprimer der Firma GATC durchgeführt, wodurch in den meisten Fällen das komplette Insert abgedeckt werden konnte. Der im Plasmid Y2H-3 codierte Bereich des Proteins BRPF3 sowie der im Plasmid Y2H-25 codierte Bereich des Proteins ACTN1 waren jedoch zu groß, um sie mit diesen beiden Standardprimern abdecken zu können. Es kann also nur angenommen werden, dass jeweils auch der nicht abgedeckte Bereich im Plasmid codiert ist. Die translatierten Genprodukte einiger Insert-Sequenzen wiesen Mutationen im Vergleich zu den annotierten Proteinen auf. So beinhalteten beispielsweise beide COPS4-enthaltenden Konstrukte einen Aminosäureaustausch im Protein, jedoch an unterschiedlichen Positionen. Eines der isolierten COPS6-enthaltenden Plasmide, Y2H-78, trug ebenfalls eine Mutation, während bei den übrigen drei kein Austausch vorlag. Auch die in den Bank-Plasmiden codierten Abschnitte von MORF4A1, C1orf78 sowie CCHCR1 enthielten je einen Aminosäureaustausch. Reichte der im Plasmid codierte Bereich nicht bis zum Ende des Proteins - wie im Falle von BRPF3, KIF5A, CCHCR1 und ACTN1 - so lag eine Mutation vor, die zu einer Verschiebung des Leserahmens führte. Weitere Besonderheiten traten bei der Analyse der Inserts von Y2H-31 sowie Y2H-47 auf. Im Plasmid Y2H-31 fand sich die codierende Sequenz für das 393 AS lange Protein RMND5B, jedoch unterbrochen durch ein Stop-Codon nach AS 115. Im Plasmid Y2H-47 war das 230 AS lange Protein ZWINT codiert, allerdings befand sich zwischen AS 173 und 174 eine nicht zugehörige Aminosäuresequenz. Da die Integration der cDNA in die Bank-Plasmide über homologe Rekombination in Hefe erfolgte, könnte man vermuten, dass die genfremde Sequenz zwischen den AS 173 und 174 von ZWINT über ein unspezifisches Rekombinationsereignis integriert worden ist.

Die als potentielle Interaktionspartner identifizierten Proteine wurden unter Nutzung der Datenbanken KEGG sowie UniProt in Funktionsklassen eingeteilt, wobei mehrmals aufgetretene Proteine nur einmal berücksichtigt wurden (Abb. 4-20).



**Abb. 4-20: Klassifizierung der potentiellen CPn1054-Interaktionspartner nach ihren vorhergesagten Funktionen.**

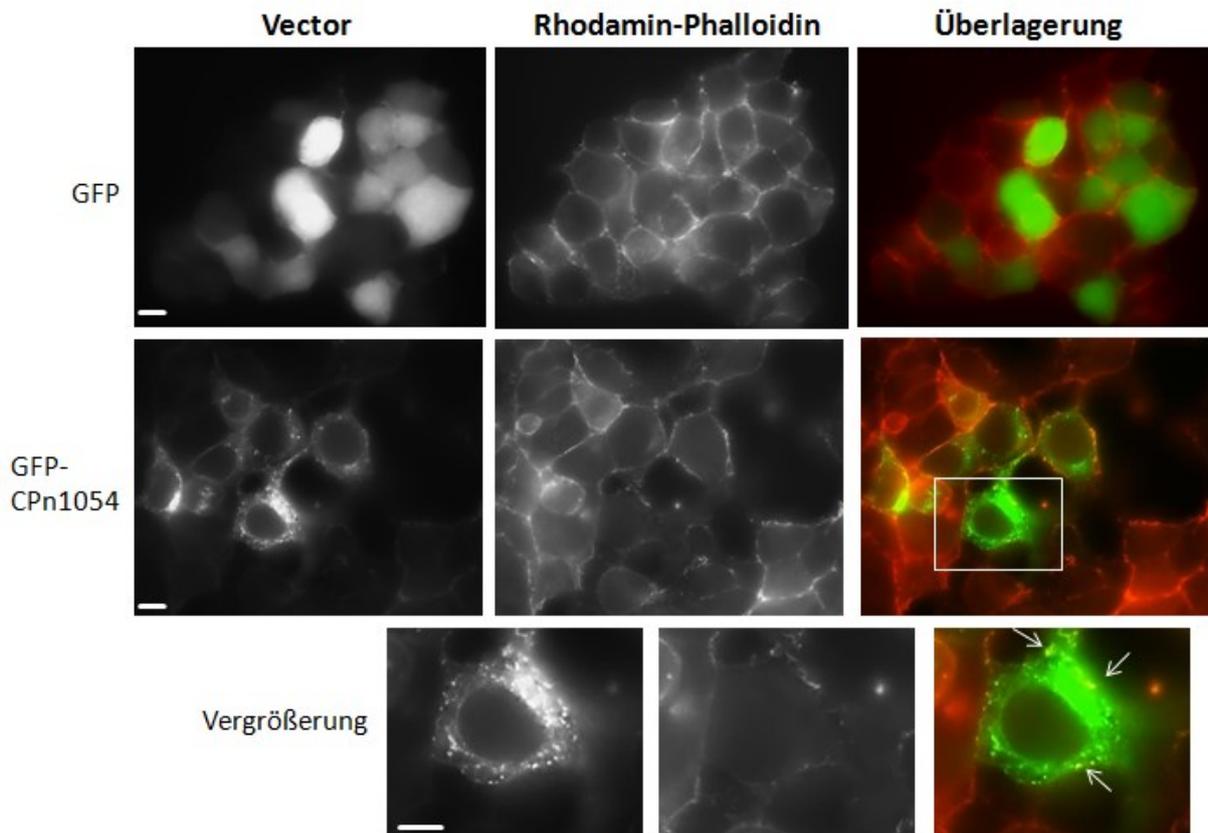
Die Einteilung wurde entsprechend den Informationen aus den Datenbanken KEGG und UniProt vorgenommen.

**Proteine unbekannter Funktion.** In diese Kategorie fallen vier der Kandidaten. *CCDC42* (*coiled-coil domain containing 42*) besitzt eine den Namen gebende *coiled-coil* Domäne und kommt in zwei Transkriptvarianten vor (UniProt). *C1orf216* und *C10orf78* sind offene Leseraster, die auf dem Chromosom 1 bzw. Chromosom 10 codieren und nicht weiter charakterisiert sind (KEGG). *RMND5B* (*required for meiotic nuclear division 5 homolog B*) besitzt trotz des anderen vermuten lassenden Namens keine zugeordnete Funktion. Das Protein liegt in zwei Isoformen vor (UniProt).

**Chromosom-assoziierte Proteine.** Drei der identifizierten Kandidaten werden als Chromosom-assoziierte Proteine geführt. Das humane *ZWINT* (*ZW10 interactor*) assoziiert mit dem Kinetochor, wohin es das Mitose-Checkpoint-Protein *ZW10* rekrutiert; zudem ist es verantwortlich für die Verbindung des inneren mit dem äußeren Kinetochor (Starr, Saffery *et al.*, 2000; Vos, Famulski *et al.*, 2011). *BRPF3* (*bromodomain and PHD finger-containing protein 3*) und *MORF4A1* (*mortality factor 4 like 1*) sind Komponenten unterschiedlicher Histon-Acetyltransferase-Komplexe und darüber beteiligt an der Transkriptionsregulation. *MORF4A1* wurde interessanterweise auch als Teil eines Histon-Deacetylase-Komplexes identifiziert (Ullah, Pelletier *et al.*, 2008; Pena, Tominaga *et al.*, 2011).

**Zytoskelett-assoziierte Proteine.** In diese Kategorie fallen die Proteine *ACTN1* (*actinin, alpha 1*), *TNNI3* (*troponin I type 3*) sowie *KIF5A* (*kinesin family member 5A*). Troponin I ist die regulatorische Untereinheit des Troponin-Komplexes, der Muskel-Kontraktionen reguliert. Bei dem im Screen isolierten Troponin handelt es sich um die Herzmuskel-spezifische Variante des Proteins (Bhavsar, Brand *et al.*, 1996; Rani, Nallari *et al.*, 2012). Kinesine sind Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine, die beispielsweise Vesikel entlang der Mikrotubuli transportieren. Bei *KIF5A* handelt es sich um die Neuron-spezifische Variante der schweren Kette von Kinesin (Reid, Kloos *et al.*, 2002). Alpha-Actinin verbindet filamentöses Aktin (F-Aktin) miteinander und verankert das Zytoskelett mit Transmembranproteinen an Stellen

mit Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakt. Es sorgt auch für die Stabilität von Aktin-basierten Stress-Fäden. Alpha-Actinin 1 stellt die nicht-Muskel Variante der alpha-Actinine dar (Oikonomou, Zachou *et al.*, 2011). Um zu überprüfen, ob CPn1054 möglicherweise mit Aktin-Strukturen in der Humanzelle assoziiert, wurden Zellen mit einem humanen Transfektionsvector, der die codierende Sequenz für CPn1054 AS 14-811 (unter Auslassung der Poly-C-Sequenz am 5'-Ende) in Fusion zu N-terminalem *GFP* enthält, transfiziert, nach 24 h fixiert und mittels Rhodamin-Phalloidin zur Detektion des Aktin-Zytoskeletts gefärbt.



**Abb. 4-21: Ektopisch exprimiertes CPn1054-GFP Fusionsprotein könnte mit Aktin-Strukturen assoziieren.**

HEK293T-Zellen wurden mit einem für ein Fusionsprotein aus GFP und CPn1054 AS 14-811 codierenden Plasmid (# 1627) sowie mit dem korrespondierenden Leervector pBYE (# 1353) transfiziert und 24 h nach der Transfektion PFA-fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mittels einer Rhodamin-Phalloidin-Färbung sichtbar gemacht (Kap. 3.3.1.5). In der Überlagerung ist das GFP-Signal in grün und das Aktin-Zytoskelett in rot dargestellt. Die Vergrößerung zeigt den weiß umrandeten Bereich der darüberliegenden Reihe, Pfeile markieren Punkte der Überlagerung von grünem und rotem Signal. Der Längenmarker entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

Das CPn1054-Fusionskonstrukt bildete eine retikuläre Struktur im Zytosol der Zelle aus (Abb. 4-21). An vereinzelt Punkten war eine Überlagerung mit dem Signal der Aktinstrukturen auszumachen (Pfeile in der Vergrößerungsansicht). In Leervector-

transfizierten Zellen, die nur GFP exprimierten, war eine diffuse Färbung im gesamten Zytosol und keine Überlagerung des GFP-Signals mit dem Aktin-Signal zu sehen. Somit könnte transfiziertes CPn1054 in der Wirtszelle tatsächlich mit Aktinstrukturen assoziieren.

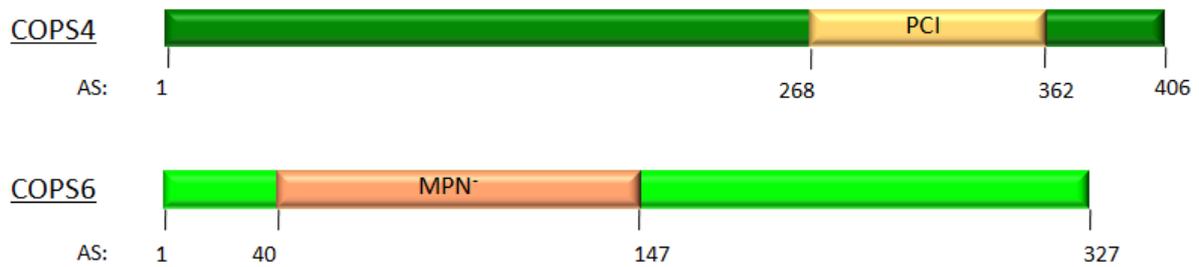
**Nervensystem-Signalweg.** Der Vertreter dieser Kategorie ist NGFRAP1 (*nerve growth factor receptor* (TNFRSF16) *associated protein* 1). Es handelt sich hierbei um ein Adapter-Protein, welches mit dem Neurotrophin-Rezeptor assoziiert. Die NGFRAP1-vermittelte Signalweiterleitung ist essentiell für das Ausführen einer NGF (*nerve growth factor*)-induzierten Apoptose (Mukai, Hachiya *et al.*, 2000).

**Zelldifferenzierung.** CCHCR1 (*coiled-coil alpha-helical rod protein* 1) spielt möglicherweise eine Rolle bei der Proliferation von Keratinozyten (Suomela, Elomaa *et al.*, 2003). Zudem scheint das Protein an der Regulation des Steroid-Metabolismus von Hautzellen beteiligt zu sein (Tiala, Suomela *et al.*, 2007).

**Ubiquitin-Signalweg.** In diese Kategorie fallen die Proteine COPS4 und COPS6, die beide Untereinheiten eines multifunktionellen Proteinkomplexes namens COP9 Signalosom sind. Die Klassifizierung beruht darauf, dass eine der Hauptfunktionen des COP9 Signalosoms die Regulation einer bestimmten Klasse an Ubiquitin-Ligasen und darüber die Kontrolle von Protein-Degradation ist. Daneben ist der Komplex an weiteren essentiellen zellulären Vorgängen wie der Transkriptionskontrolle oder der Regulation des Zellzyklus beteiligt (siehe Kapitel 1.6). Die Tatsache, dass zwei Untereinheiten desselben multifunktionellen Komplexes viermal respektive zweimal im Screen gefunden worden sind, machte sie zu den interessantesten Kandidaten, auf die die weiteren Analysen fokussiert wurden.

#### 4.2.7 CPn1054 zeigt im Hefe-Zwei-Hybrid System eine starke Interaktion mit COPS4 und COPS6

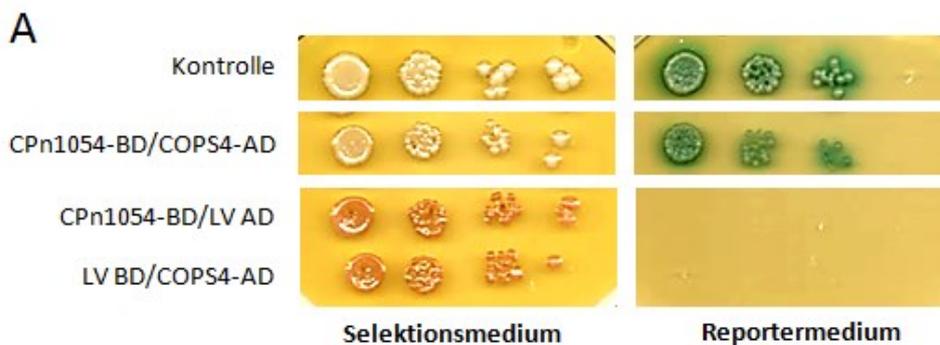
COPS4 ist die viertgrößte Untereinheit des COP9 Signalosom-Komplexes und besitzt eine PCI-Domäne am C-terminalen Ende (Abb. 4-22). Diese Domäne kommt in mehreren Untereinheiten des Signalosoms, des 26S Proteasoms sowie des eukaryotischen Translations-Initiationsfaktors eIF3 vor; durch die Interaktion je zweier PCI-Domänen wird vermutlich die strukturelle Integrität dieser drei Komplexe gewährleistet. COPS6 ist die drittkleinste Untereinheit des COP9 Signalosoms und trägt, wie auch COPS5, eine MPN-Domäne am N-terminalen Ende, die jedoch keine Fähigkeit zur Bindung von Metallionen aufweist und daher als MPN<sup>-</sup> bezeichnet wird (Abb. 4-22). MPN-Domänen finden sich ebenfalls in mindestens einer Untereinheit der drei oben genannten Proteinkomplexe und vermitteln Metalloprotease-Aktivität, insofern die die Fähigkeit zur Metallionen-Bindung besitzen. Sowohl COPS4 als auch COPS6 wurden in Vollängen-Version in den Bank-Plasmiden codiert.

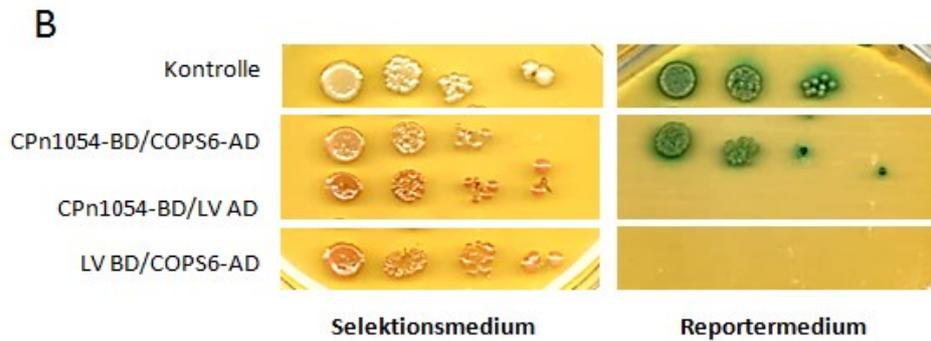


**Abb. 4-22: Übersicht über die Struktur der COP9 Signalosom-Untereinheiten COPS4 und COPS6.**

COPS4 besitzt eine Länge von 406 Aminosäuren und eine PCI-Domäne im C-terminalen Bereich. COPS6 besteht aus 327 Aminosäuren und weist am N-terminalen Ende eine MPN<sup>-</sup>-Domäne auf. PCI: Proteasom, COP9 Signalosom, eukaryotischer Translations-Initiationsfaktor 3 MPN: MPR1/Pad1 N-terminal.

Um die relative Stärke der Interaktion zwischen dem CPn1054-Köder-Konstrukt und COPS4 bzw. COPS6 zu bestimmen, wurde ein serieller Verdünnungstropftest durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Interaktion von CPn1054 mit COPS4 annähernd so stark wie die der Positivkontrolle war (Abb. 4-23 A). Die Interaktion mit COPS6 erschien im Vergleich dazu schwächer, konnte aber dennoch deutlich detektiert werden (Abb. 4-23 B). Das Ergebnis bestätigt eine stabile Interaktion zwischen CPn1054 und den beiden Untereinheiten des COP9 Signalosoms.





**Abb. 4-23: CPn1054 zeigt im Hefe-Zwei-Hybrid System eine starke Interaktion mit den COP9-Untereinheiten COPS4 und COPS6.**

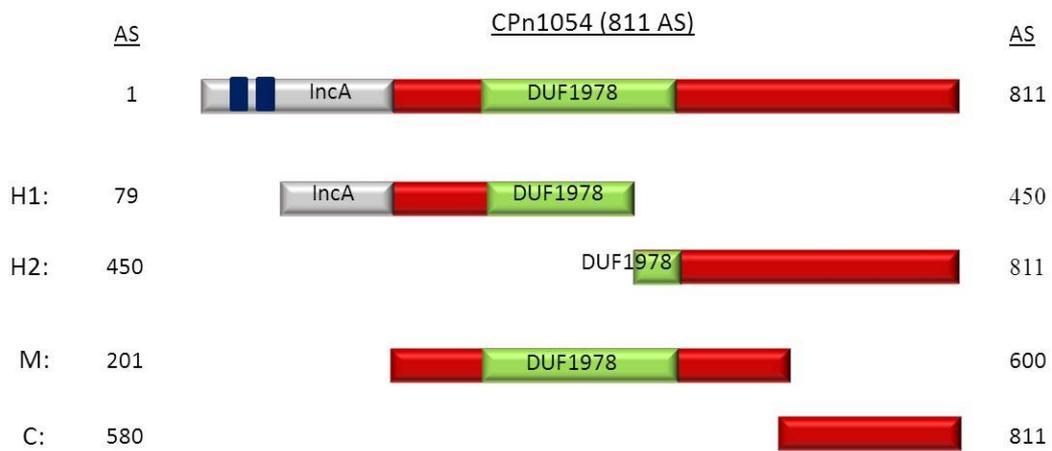
**A) und B)** Das Köder-Konstrukt CPn1054-BD (# 2216) wurde mit isolierten Bank-Plasmiden, welche COPS4 (Y2H-8) bzw. COPS6 (Y2H-40) beinhalten, in den Hefestamm AH109 ko-transformiert. Entsprechende Kontrollen wurden ebenfalls ko-transformiert. Die Durchführung der Tropftests erfolgte wie in Abb. 4-7 beschrieben. Es wurden mehrere Klone analysiert, die Abbildung zeigt repräsentative Ergebnisse. LV AD: Leervector pGADT7 (# 1675) LV BD: Leervector pGBKT7 (# 1301) Plasmide der Positivkontrolle: pGBKT7-p53 (# 1302) und pGADT7-T (# 1676).

#### 4.2.8 Der Mittelteil des CPn1054-Proteins vermittelt die Interaktion mit COPS4 und COPS6

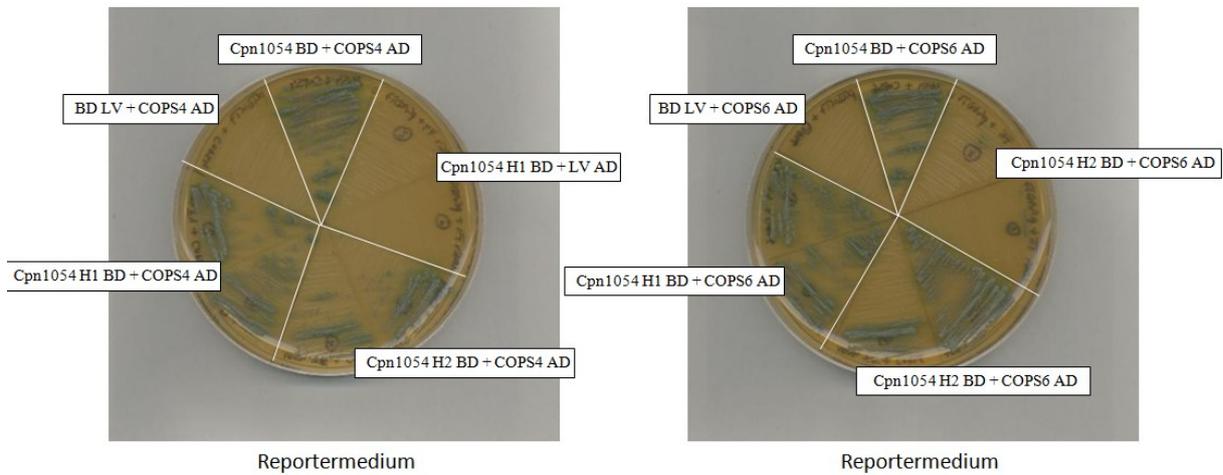
Um herauszufinden, welche Region von CPn1054 eine Interaktion mit COPS4 bzw. COPS6 eingeht, wurde das Protein in mehrere Fragmente unterteilt und diese mittels der Hefe-Zwei-Hybrid Methode auf Interaktion mit den Signalosom-Untereinheiten getestet. Eine erste Unterteilung des Proteins in zwei Hälften unter Auslassung der Transmembrandomänen (Fragment H1: AS 79-450; Fragment H2: AS 450-811; Abb. 4-24 A) ergab jeweils eine Interaktion sowohl mit COPS4 als auch mit COPS6 (Abb. 4-24 B). Aufgrund der Vermutung, dass die Interaktionen durch die DUF1978-Domäne vermittelt werden könnten, wurde eine weitere Unterteilung in einen Mittelteil von CPn1054 (CPn1054-M: AS 201-600), der die komplette Domäne enthält, sowie den C-Terminus (CPn1054-C: AS 580-811) vorgenommen (Abb. 4-24 A). Der N-Terminus (AS 1-200) wurde ausgelassen, da er auch im Köder-Konstrukt für den Screen nicht anwesend war und daher nicht essentiell für die Interaktion mit den COP9-Untereinheiten sein kann. Wie im Hefe-Zwei-Hybrid Test ermittelt werden konnte, ging der mittlere Abschnitt von CPn1054 sowohl mit COPS4 als auch mit COPS6 eine Interaktion ein, wohingegen der C-terminale Abschnitt mit keiner der beiden Untereinheiten interagiert (Abb. 4-24 C). Die Interaktion des M-Fragments mit den beiden COP9-Untereinheiten war dabei jeweils stärker als die des Köder-Konstruktes CPn1054-BD (AS 201-811), welches als Kontrolle mitgeführt wurde. Interessanterweise war die Interaktion sowohl des CPn1054 Köder-Konstrukts als auch des M-Fragments mit COPS4

stärker als mit COPS6. Insgesamt konnte also die interagierende Region von Cpn1054 auf einen Bereich zwischen den AS 201-600 eingegrenzt werden.

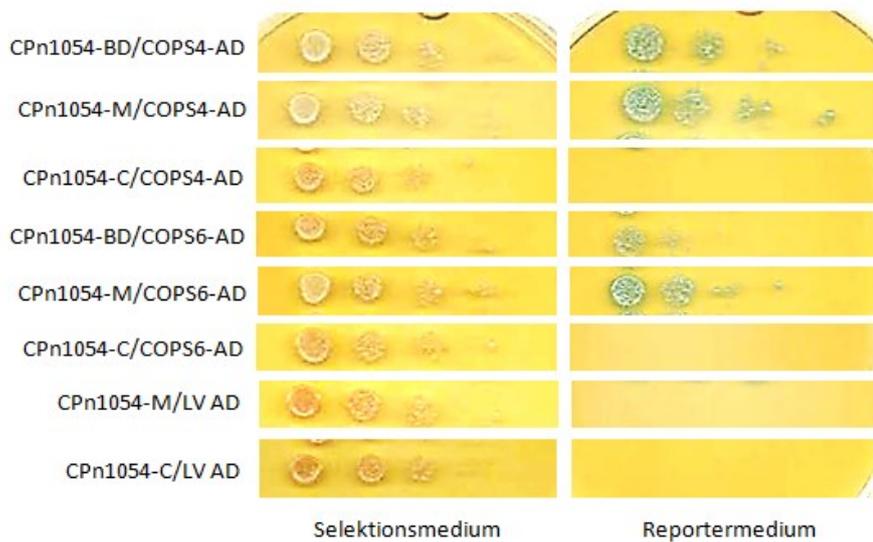
A



B



C



**Abb. 4-24: Test unterschiedlicher Fragmente des CPn1054-Proteins auf Interaktion mit COPS4 und COPS6.**

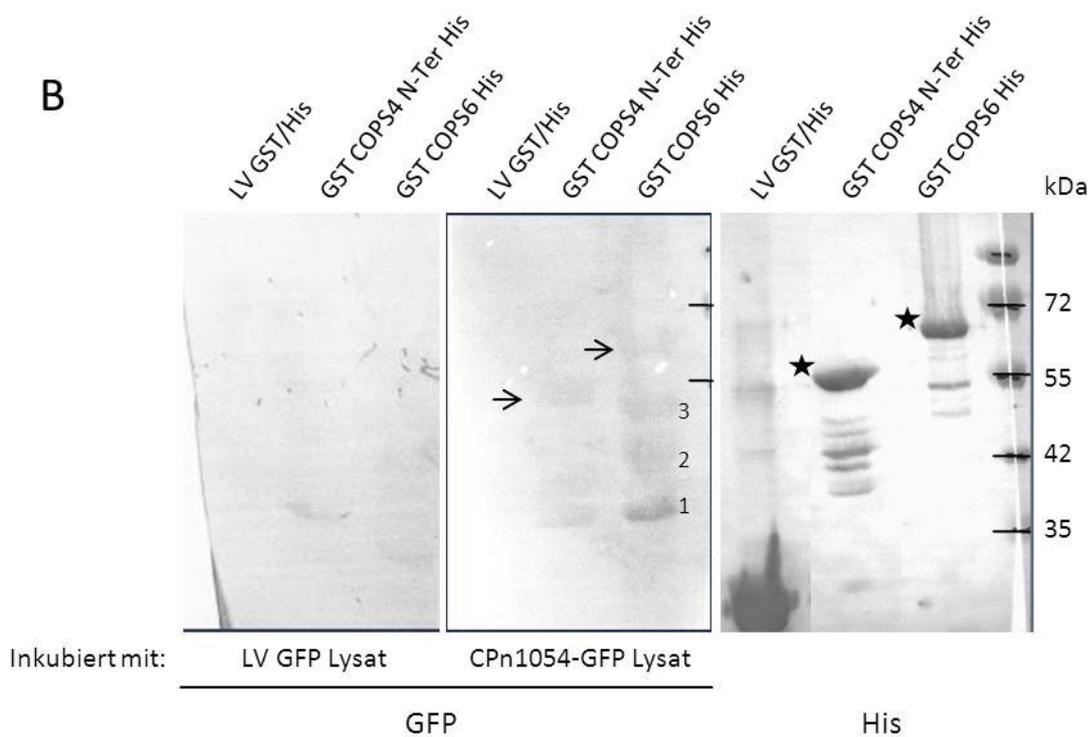
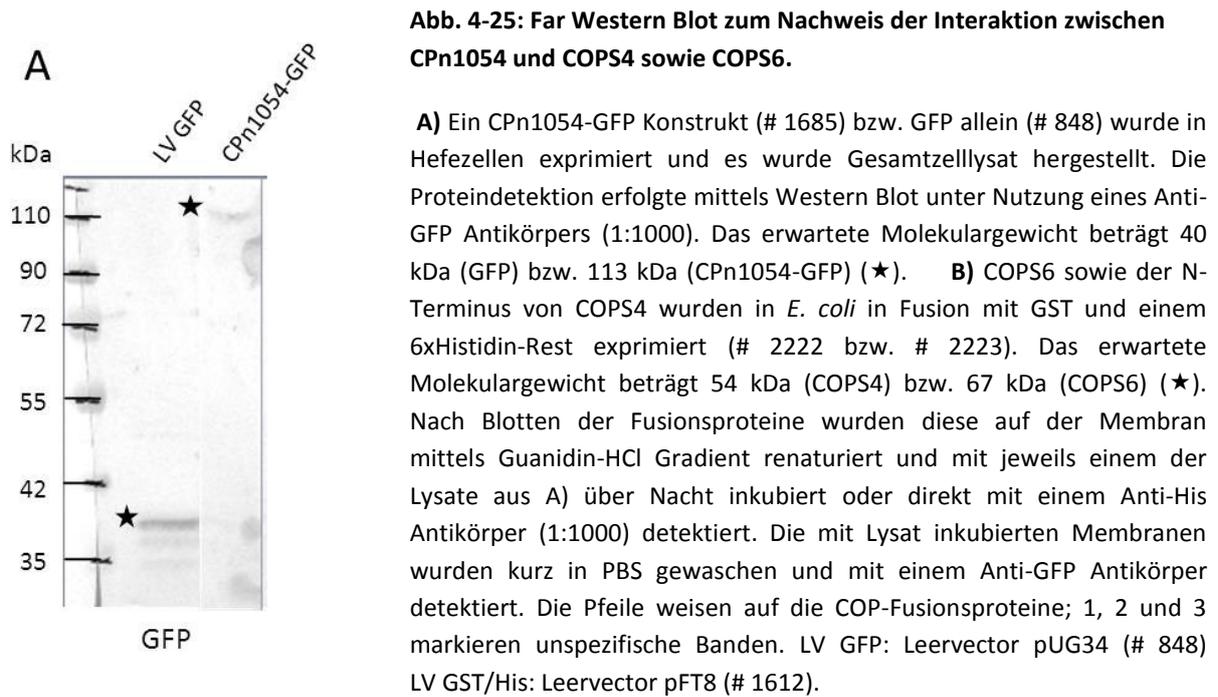
**A)** Die codierenden Sequenzen für die Fragmente CPn1054 H1, CPn1054 H2, CPn1054-M sowie CPn1054-C wurden jeweils in den Vector pGBKT7 (# 1301) kloniert. **B)** Das Konstrukt CPn1054 H1 (# 2246) bzw. CPn1054 H2 (# 2247) wurde in Kombination mit isolierten Bank-Plasmiden, welche COPS4 (Y2H-8) oder COPS6 (Y2H-40) beinhalten, in den Hefestamm AH109 ko-transformiert. Entsprechende Kontrollen wurden mitgeführt. Die ko-transformierten Hefen wurden auf Reporterplatten ausgestrichen. **C)** Das Konstrukt CPn1054-M (# 2228) bzw. CPn1054-C (# 2229) wurde jeweils mit Y2H-8 sowie Y2H-40 zusammen ko-transformiert. Mit entsprechenden Kontrollen wurde ebenso verfahren. Die Durchführung des Tropftests erfolgte wie in Abb. 4-7 beschrieben. LV AD: Leervector pGADT7 (# 1675) LV BD: Leervector pGBKT7 (# 1301).

#### 4.2.9 Die Interaktion von CPn1054 mit COPS4 und COPS6 konnte biochemisch bestätigt werden

Die mittels Hefe-Zwei-Hybrid Methode detektierte Interaktion zwischen CPn1054 und COPS4 bzw. COPS6 sollte biochemisch bestätigt werden. Eine Ko-Immunpräzipitation aus Hefen, welche CPn1054 AS 201-811 im Hefe-Zwei-Hybrid Vector pGBKT7 (mit c-myc markiert) sowie COPS4 bzw. COPS6 im Bank-Vector pGADT7-Rec (mit HA markiert) exprimierten, erwies sich als nicht geeignet, da CPn1054 auch bei Abwesenheit der Interaktionskandidaten von Anti-HA-Antikörpern präzipitiert wurde (nicht gezeigt).

Alternativ wurden daher Far Western Blot-Analysen durchgeführt. CPn1054 AS 201-811 wurde als Fusionskonstrukt mit N-terminalem GFP in Hefe transformiert und exprimiert (das entsprechende Plasmid wurde bereits von Dr. Anne Kerres und Dr. Frauke Herbst kloniert), und es wurde Hefe-Gesamtzelllysat hergestellt. Im Western Blot konnte das CPn1054-Fusionsprotein (erwartet: 113 kDa) nachgewiesen werden (Abb. 4-25 A; Stern an rechter

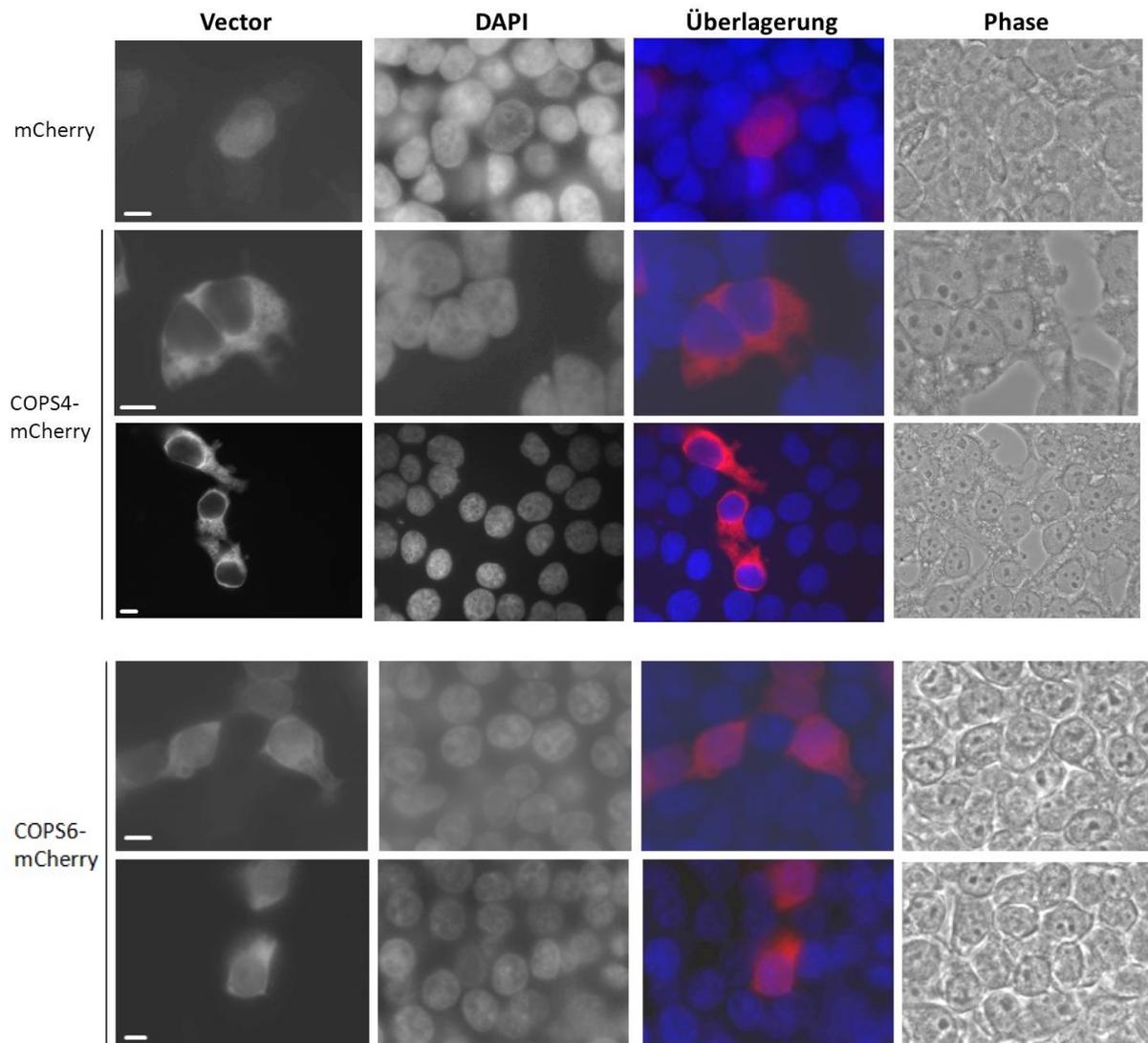
Blot-Spur). Das erwartete Molekulargewicht von GFP alleine liegt bei 40 kDa (linke Blot-Spur; Stern). Das Protein COPS6 sowie der N-Terminus (AS 1-250) von COPS4 wurden in *E. coli* als Fusion mit N-terminalem GST und C-terminalem 6x Histidin-Rest exprimiert. Das COPS4-Volllängenprotein hatte keine Expression gezeigt, vorherige Hefe-Zwei-Hybrid Versuche hatten aber ergeben, dass der N-terminale Bereich ausreicht, um eine Interaktion mit CPn1054 einzugehen (siehe Anhang). Die in *E. coli* exprimierten Fusionsproteine wurden nach dem Blotten auf eine Membran entweder 1) direkt mit einem Antikörper gegen den 6x Histidin-Rest detektiert (Kontrollblot) oder über Nacht 2) mit dem Lysat Leervector-transformierter Hefen oder 3) mit CPn1054-GFP enthaltendem Lysat inkubiert und nachfolgend mit einem Anti-GFP Antikörper detektiert. Es zeigte sich, dass in dem His-detektierten Kontrollblot die Expression des COPS4 N-Terminus (erwartet: 54 kDa) sowie die Expression von COPS6 (erwartet: 67 kDa) nachgewiesen werden konnte (Abb. 4-25 B, rechter Blot). Mit einem Stern gekennzeichnet sind die vermutlichen Volllängenproteine, deren Laufhöhe mit dem erwarteten Molekulargewicht übereinstimmt. Daneben traten einige Degradationsbanden auf. Der mit Leervector-Lysat inkubierte und GFP-detektierte Blot zeigte keine Banden (Abb. 4-25 B, linker Blot). Bei Betrachtung des mit CPn1054-GFP Lysat inkubierten und GFP-detektierten Blots (Abb. 4-25 B, mittlerer Blot) ließen sich schwache Banden auf der erwarteten Laufhöhe vom COPS4- sowie vom COPS6-Fusionsprotein erkennen (Pfeile). Es waren aber auch noch weitere, teilweise sogar stärkere Banden von niedrigerem Molekulargewicht vorhanden. So fand sich in der Spur mit dem COPS6-Konstrukt noch eine intensive Bande bei einer Größe von etwas mehr als 35 kDa, die auch in der Spur des COPS4-Proteins zu sehen war (mit „1“ bezeichnet). Zusätzlich traten bei der COPS6-Probe noch Banden auf der Höhe von 42 kDa (2) sowie etwas unterhalb von 55 kDa (3) auf. Bei Vergleich mit dem His-detektierten Kontrollblot wird deutlich, dass es sich hierbei vermutlich nicht um Degradationsbanden handelt, sondern um unspezifische Signale.



Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Far Western Blot-Analyse einen weiteren Hinweis auf eine Interaktion zwischen CPn1054 und COPS4 sowie COPS6 lieferte.

#### **4.2.10 Ektopisch exprimiertes COPS4 und COPS6 assoziieren möglicherweise mit der Inklusionsmembran**

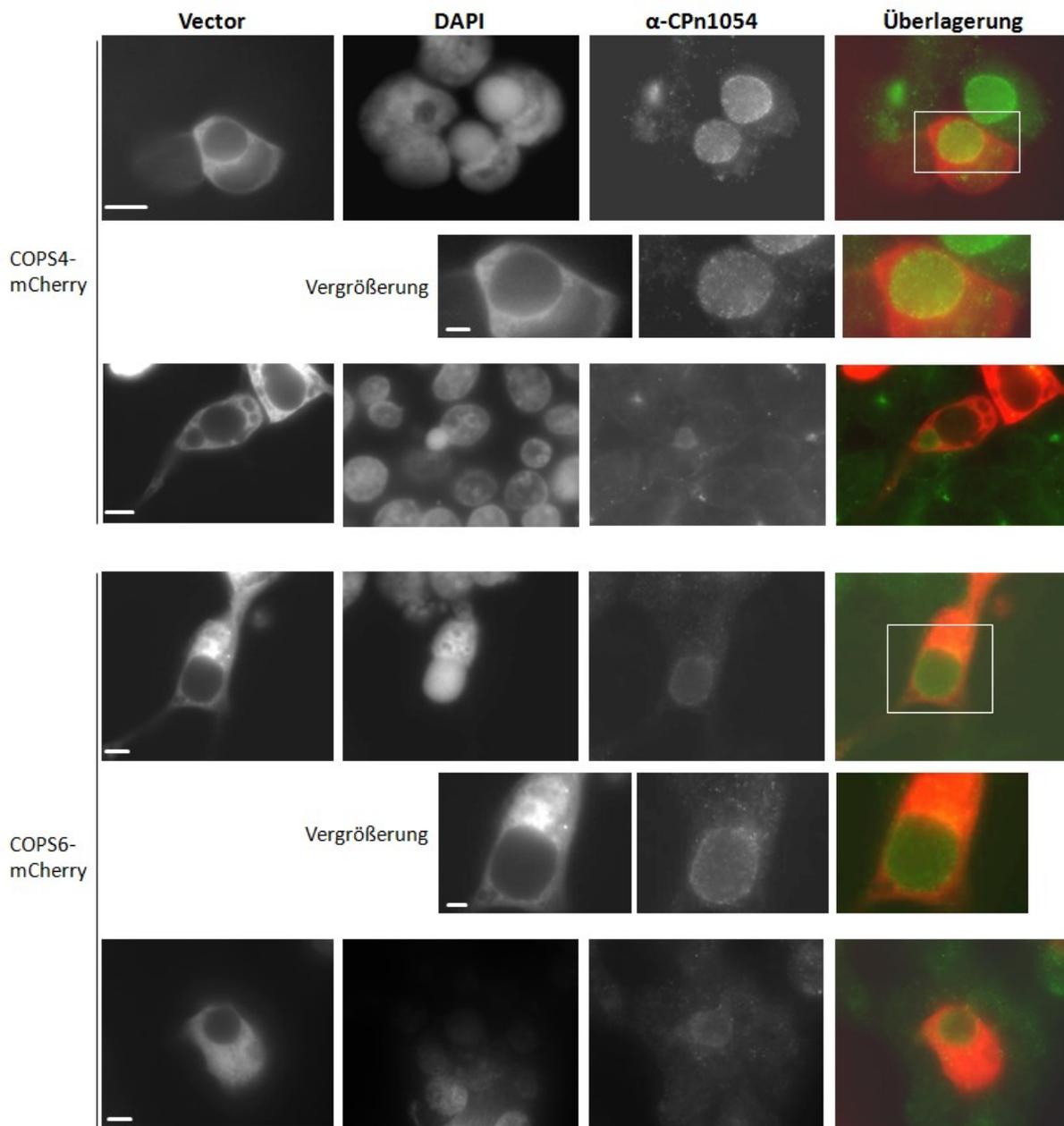
Es stellte sich als nächstes die Frage, welchen Effekt eine mögliche Interaktion von CPn1054 mit Untereinheiten des COP9-Signalosoms während einer Infektion haben könnte. Da es sich bei CPn1054 möglicherweise um ein Inklusionsmembranprotein handelt, wurde vermutet, dass durch die Interaktion die Proteine COPS4 und COPS6 an die Inklusionsmembran rekrutiert werden könnten. Über die subzelluläre Lokalisation dieser beiden Untereinheiten gibt es bislang keine verlässlichen Erkenntnisse. Die Lokalisation vom COP9 Holokomplex, von Subkomplexen oder von einzelnen Untereinheiten scheint in Abhängigkeit von den benutzten Zellen und den experimentellen Bedingungen zu variieren (Wei & Deng, 1998; Seeger, Kraft *et al.*, 1998). Um die Lokalisation in den im Rahmen dieser Arbeit benutzten Humanzellen zu bestimmen, wurden die codierenden Sequenzen für COPS4 sowie COPS6 in einen humanen Transfektionsvector in Fusion zu dem Reporterprotein mCherry kloniert. Für die Klonierung von COPS4 wurde das Bank-Plasmid Y2H-8 verwendet, die hierin enthaltene L258P-Mutation wurde durch den Einsatz interner Primer (C-1910 und C-1911) beseitigt, so dass eine fehlerfreie Version des Proteins vorlag. Nach Transfektion und Expression der Konstrukte in Humanzellen zeigte sich, dass das COPS6-Fusionsprotein im Zellkern sowie etwas stärker im Zytoplasma lokalisierte, während das COPS4-Fusionsprotein den Kern klar aussparte (Abb. 4-26). Beide Fusionskonstrukte assoziierten mit Netzwerk-artigen Strukturen innerhalb des Zytoplasmas, wobei es sich im Fall von COPS4 um das Endoplasmatische Retikulum handeln könnte.



**Abb. 4-26: Lokalisationsanalyse von COPS4- und COPS6-Fusionsproteinen in Humanzellen.**

Die codierenden Sequenzen für COPS4 (# 2226) sowie COPS6 (# 2227) wurden in einen humanen Transfektionsvector (# 1720) in Fusion zu dem C-terminal orientierten Reporterprotein *mCherry* kloniert und in HEK293T-Zellen transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen Methanol-fixiert, die DNA mittels DAPI angefärbt und die Präparate mikroskopiert. In der Überlagerung ist das mCherry-Signal in rot und die DNA in blau dargestellt. Der Längenmarker entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

Im Folgenden wurde die Lokalisation der COP9-Untereinheiten während einer Chlamydien-Infektion studiert und auf eine mögliche Ko-Lokalisation mit CPn1054 hin untersucht.



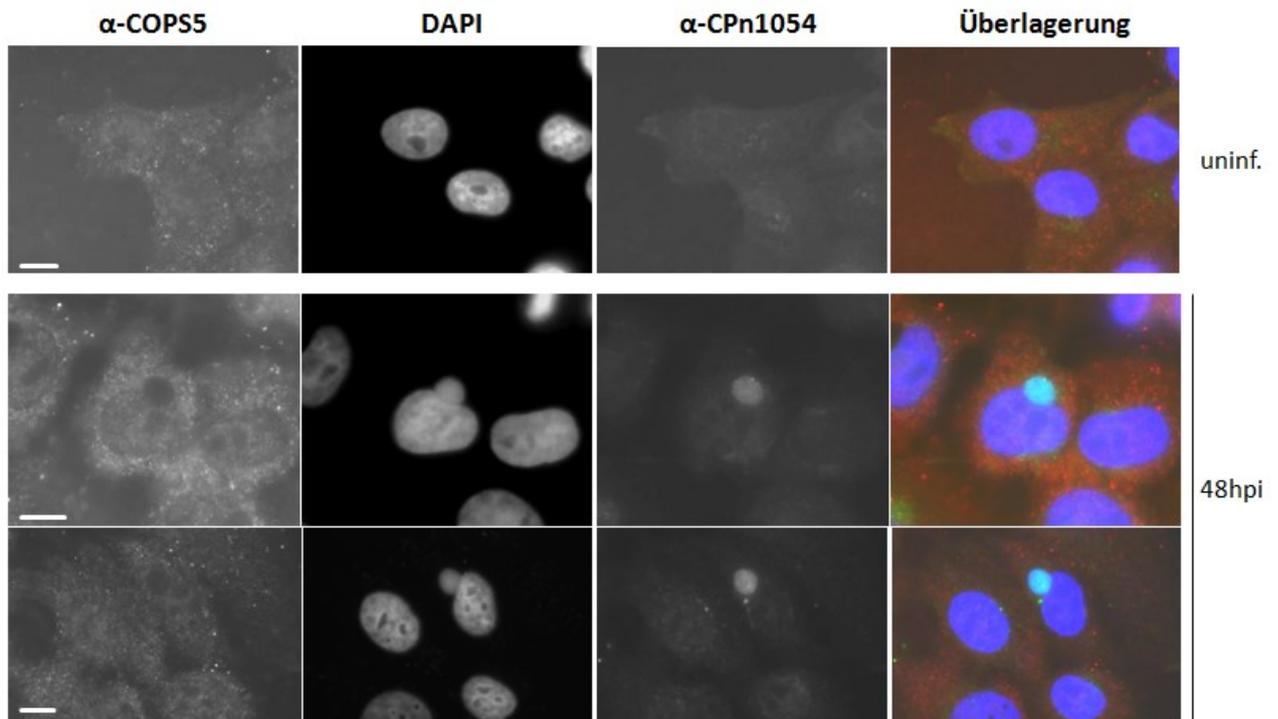
**Abb. 4-27: Lokalisationsanalyse der COPS4- und COPS6-Fusionsproteine während einer *C. pneumoniae*-Infektion.**

Mit dem COPS4- bzw. COPS6-mCherry-Fusionskonstrukt transfizierte HEK293T-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion zusätzlich mit *C. pneumoniae* (MOI = 2) infiziert. Die Infektion lief ohne die Anwesenheit von Cycloheximid im Medium ab. 48 hpi wurden die Zellen Methanol-fixiert und CPn1054 wurde mittels indirekter Antikörperfärbung detektiert (abgereichertes Serum gemäß Kapitel 3.5.13, 1:50; Alexa488-gekoppelter Anti-Kaninchen Sekundärantikörper, 1:200). Die DNA wurde durch Nutzung von DAPI sichtbar gemacht. In der Überlagerung ist CPn1054 in grün und das mCherry-Signal in rot dargestellt. Der Längenmarker entspricht 5  $\mu\text{m}$  bzw. in der Vergrößerung 2  $\mu\text{m}$ .

Die mikroskopische Analyse der infizierten Humanzellen ergab für das COPS4-Fusionsprotein wiederum eine zytosolische Lokalisation und eine Aussparung des Zellkerns; zudem scheint auch die Inklusion frei von COPS4-Signal zu sein (Abb. 4-27). Im Überlagerungsbild ist am Rand der Inklusion eine gelbliche, Ring-ähnliche Färbung zu sehen, was auf eine Ko-Lokalisation von COPS4 und dem CPn1054-Protein hindeuten könnte. Die Lokalisation des COPS6-Fusionsproteins schien sich während der Infektion in Richtung des Zellkerns verschoben zu haben, da dort ein deutlich stärkeres Signal zu sehen war als in nicht-infizierten Zellen. Dies konnte jedoch nicht immer beobachtet werden und bleibt daher fraglich. Die Inklusion ist wiederum frei von Signalen. Möglicherweise liegt auch im Fall von COPS6 eine leichte gelbliche Färbung am Rande der Inklusion vor, die jedoch nicht so deutlich ausfiel wie bei COPS4 (Abb. 4-27). Es ergaben sich somit Hinweise auf eine mögliche Interaktion von CPn1054 und COPS4 bzw. COPS6 während einer Infektion, eine endgültige Aussage ist letztlich aber nicht möglich.

#### **4.2.11 Endogenes COPS5 zeigt keine Assoziation mit der Inklusion**

COPS4 und COPS6 bilden zusammen mit COPS5 sowie COPS7 eine Hälfte des symmetrisch aufgebauten COP9-Holokomplexes, die andere Hälfte wird gebildet aus den Untereinheiten COPS1 bis COPS3 sowie COPS8 (Abb. 1-8). Die COPS5-Untereinheit ist diejenige, die im Holokomplex die Metalloprotease-Aktivität ausübt, durch die Ubiquitin-Ligasen deneddyliert werden (Kap. 1.6). Über eine Funktion von COPS5 in COP9-Subkomplexen ist nichts bekannt. Da COPS4, COPS6 und COPS5 in derselben Hälfte des Holokomplexes lokalisiert sind, könnte über eine Interaktion mit den beiden im Screen identifizierten Untereinheiten COPS5 zur Inklusion rekrutiert werden. Um dies zu überprüfen, wurde die Lokalisation von endogenem COPS5 in infizierten und nicht-infizierten Humanzellen untersucht. Sowohl in nicht-infizierten wie auch in infizierten Humanzellen zeigten sich gleichmäßig verteilte, punktförmige Signale für COPS5 im Zytosol sowie im Zellkern (Abb. 4-28). In vielen infizierten Zellen schien die Konzentration an zytosolischem COPS5 erhöht zu sein im Vergleich zu den Kontrollzellen. Interessanterweise konnte keine Rekrutierung von COPS5 zur Inklusion festgestellt werden, ebenso konnte kein COPS5-Signal im Inneren der Inklusion detektiert werden. Bei Abwesenheit von Cycloheximid während einer Infektion sind die Inklusionen generell kleiner als zu entsprechenden Zeitpunkten bei Cycloheximid-Anwesenheit, da Cycloheximid die eukaryotische Proteinbiosynthese hemmt, was die Entwicklung der Chlamydien begünstigt. Diese verlangsamte Chlamydien-Entwicklung könnte der Grund dafür sein, dass in den hier untersuchten Zellen kein verstärktes CPn1054-Signal am Inklusionsrand auftrat, wie es sonst zum Zeitpunkt 48 hpi teilweise zu beobachten war (Abb. 4-15).



**Abb. 4-28: Lokalisationsanalyse von endogenem COPS5 in nicht-infizierten und *C. pneumoniae*-infizierten Humanzellen.**

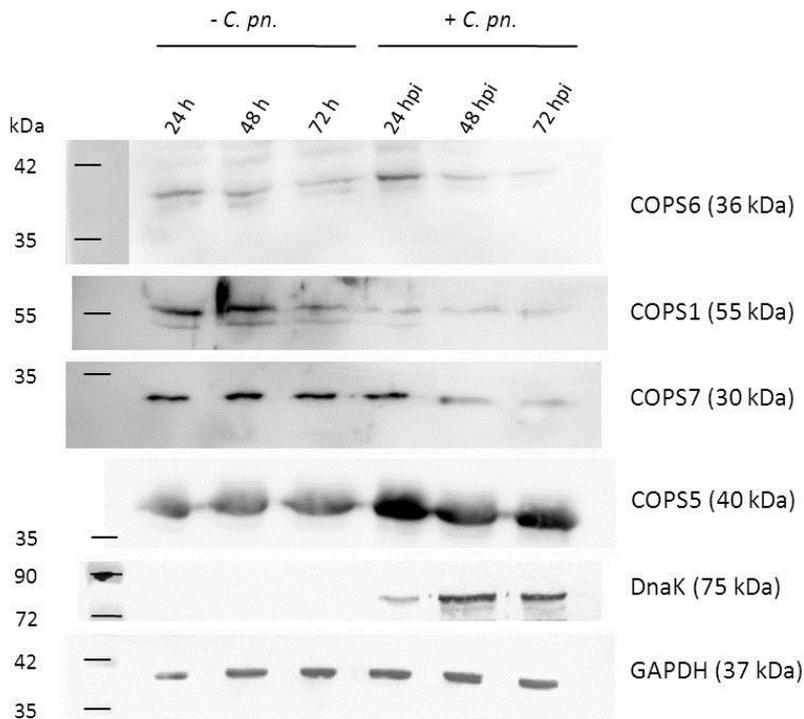
HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* (MOI = 2) infiziert. Auf die Zugabe von Cycloheximid zum Medium wurde verzichtet. 48 hpi wurden die Zellen Methanol-fixiert und mit Antikörpern gegen CPn1054 (abgereichert gemäß Kap. 3.5.13, 1:50) sowie COPS5 (1:200) in Kombination mit Alexa488-gekoppeltem Anti-Kaninchen und Alexa594-gekoppeltem Anti-Maus Sekundärantikörper ko-gefärbt. Die DNA wurde durch die Nutzung von DAPI sichtbar gemacht. In der Überlagerung ist CPn1054 in grün, COPS5 in rot und die DNA in blau dargestellt. Der Längenmarker entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

Insgesamt lässt sich festhalten, dass endogenes COPS5 oder COPS5-enhaltende Subkomplexe offenbar nicht zur Inklusion rekrutiert werden.

#### **4.2.12 Die Expression von COP9 Signalosom-Untereinheiten ist verändert in *C. pneumoniae*-infizierten Humanzellen**

Mittels Immunfluoreszenz-Analyse konnte eine Wechselwirkung von Chlamydien mit dem COP9-Signalosom bzw. mit Signalosom-Untereinheiten nicht eindeutig nachgewiesen werden. Allerdings deutete das teilweise stärkere COPS5-Signal in infizierten Zellen darauf hin, dass das Expressionsniveau von COP9-Untereinheiten durch eine Chlamydien-Infektion beeinflusst werden könnte. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Lysate nicht-infizierter und infizierter Humanzellen

hergestellt und diverse Untereinheiten des Signalosoms mittels spezifischer Antikörper im Western Blot detektiert (Abb. 4-29).



**Abb. 4-29: Das Expressionsniveau mehrerer COP9-Untereinheiten ist während einer Chlamydien-Infektion verändert.**

HeLa-Zellen wurden mit *C. pneumoniae* infiziert und nach der angegebenen Infektionsdauer (unter Abwesenheit von Cycloheximid) wurde Gesamtzelllysat hergestellt. Zur Kontrolle wurde mit nicht-infizierten Zellen ebenso verfahren. Die Proben wurden unter Nutzung von GAPDH als Referenz auf einen möglichst gleichen Proteingehalt eingestellt. Die Chlamydieninfektion wurde über die Detektion des bakteriellen DnaK-Proteins nachgewiesen. Verfolgt wurde die Entwicklung des Expressionsniveaus der COP9-Untereinheiten COPS1, COPS5, COPS6 sowie COPS7 über die Zeit unter Nutzung entsprechender Antikörper. Die Auftrennung der Proben erfolgte über ein 10%-iges SDS-Gel im Fall von DnaK und über ein 15%-iges SDS-Gel im Fall von GAPDH sowie der COP9-Untereinheiten. Die Detektion von GAPDH und DnaK erfolgte mittels eines Alkalische Phosphatase-gekoppelten Zweitantikörpers, die der COP9-Untereinheiten mittels eines Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers. Die eingesetzten Verdünnungen der Primär- und Sekundärantikörper sind den Tabellen 2-4 und 2-5 zu entnehmen. Das Experiment wurde für die Untereinheiten COPS1, COPS5 und COPS7 nur einmal durchgeführt.

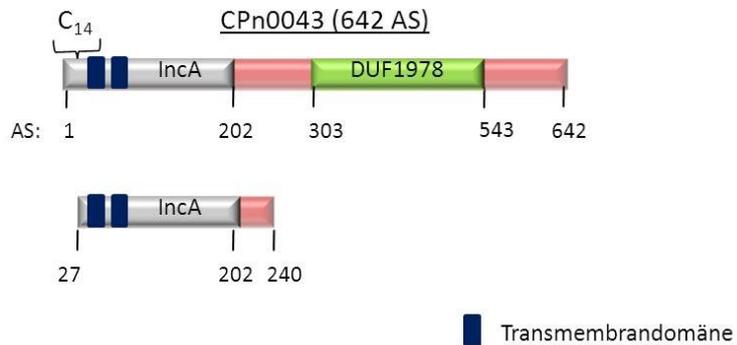
Die Expression von COPS6 in nicht-infizierten Zellen blieb auf einem relativ konstanten Niveau; möglicherweise fand eine leichte Abnahme von 48 h nach 72 h statt (Abb. 4-29). In *C. pneumoniae*-infizierten Zellen war nach 24 h eine im Vergleich zu dem Kontrolllysat erhöhte COPS6-Expression zu verzeichnen, die jedoch im weiteren Verlauf der Infektion

stetig abnahm und schließlich 72 hpi unterhalb des Niveaus in Kontrollzellen zu dem entsprechenden Zeitpunkt lag. Als weitere Untereinheiten wurden COPS1, COPS7 sowie COPS5, welches die enzymatische Metalloprotease-Aktivität besitzt, analysiert. Dieses Experiment wurde jedoch nur einmal durchgeführt und muss bestätigt werden. COPS1 zeigte in nicht-infizierten Zellen über die ersten 48 h eine gleichmäßige Expression, während sie nach 72 h abfiel. Demgegenüber lag in infizierten Zellen über alle Zeitpunkte eine gleichmäßig erniedrigte Expression vor (Abb. 4-29). Für COPS7 fand sich in den Kontrollzellen über den untersuchten Zeitraum hinweg ein konstantes Expressionsniveau. In infizierten Zellen zeigte sich nach 24 h zunächst keine Veränderung gegenüber den nicht-infizierten Kontrollzellen, mit fortschreitender Infektionsdauer nahm die COPS7-Expression jedoch signifikant ab. Ein ganz anderes Bild ergab sich hingegen für die Untereinheit COPS5, welche in den Holokomplex integriert für die katalytische Aktivität bei der Deneddylierung zuständig ist. Hier war in den Kontrollzellen über den untersuchten Zeitraum eine konstante Expression zu sehen, welche deutlich erhöht schien gegenüber den Niveaus der anderen untersuchten Untereinheiten. Interessanterweise stieg in *C. pneumoniae*-infizierten Zellen die Expression noch einmal deutlich an und verblieb auf einem hohen, konstanten Niveau. Bei Detektion mittels eines COPS4-spezifischen Antikörpers zeigten sich leider mehrere Banden auf der für das Protein erwarteten Laufhöhe, so dass die korrekte Bande nicht identifiziert werden konnte und hier keine Aussage möglich war (nicht gezeigt).

Es konnten demnach Hinweise darauf gewonnen werden, dass während einer Chlamydien-Infektion die Expression von COP9-Untereinheiten unterschiedlich verändert wird. COPS1, COPS6 sowie COPS7 sind drei der Untereinheiten, die das strukturelle Gerüst des Signalosom-Komplexes bilden (siehe Kap. 1.6). Für alle drei Proteine zeigte eine erste Analyse eine Abnahme des Expressionsniveaus im Verlauf der Infektion. Im Gegensatz dazu war die Expression von COPS5 in Chlamydien-infizierten Zellen deutlich erhöht im Vergleich zu Kontrollzellen. Diese Analysen müssen zukünftig verifiziert werden.

### 4.3 CPn0043

Auch CPn0043, ein weiteres Mitglied der CPn1054-Proteinfamilie, wurde in dem von Frau Dr. Kerres und Frau Dr. Herbst durchgeführten Screen in Hefe als ein mögliches Effektorprotein identifiziert. Das Protein besitzt eine 47%-ige Aminosäure-Identität zu CPn1054 über die gesamte Länge (Abb. 1-6). Wie auch CPn1054, weist CPn0043 eine InCA-Domäne im N-Terminus sowie zentral eine Domäne unbekannter Funktion, DUF1978, auf (Quelle: Pfam). Auf Nukleotid-Ebene befindet sich am 5'-Ende eine Poly-C-Sequenz aus 14 Wiederholungen. Der Bereich, der Wachstumshemmung in Hefe auslöste, besteht aus einem N-terminalen Fragment (AS 27-240), welches die Transmembrandomänen sowie die komplette InCA-Domäne enthält (Abb. 4-30).



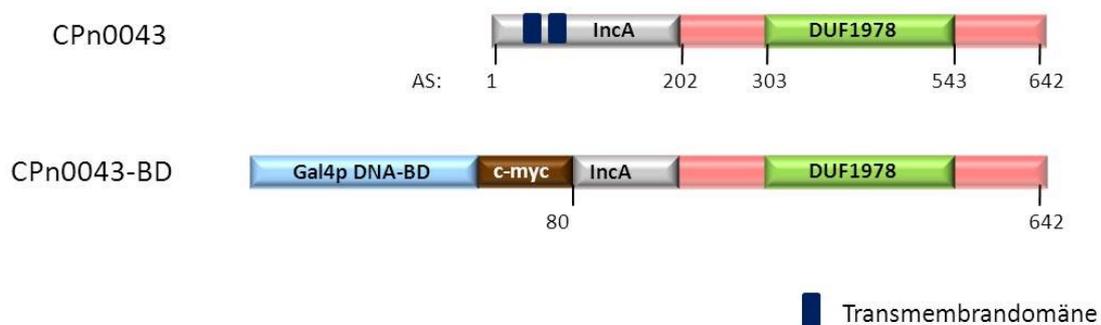
**Abb. 4-30: Übersicht über die Domänenstruktur von CPn0043 und das im Effektorscreen isolierte Fragment.**

CPn0043 besitzt eine Länge von 642 AS, eine IncA-Domäne am N-terminalen Ende sowie zentral eine Domäne unbekannter Funktion (DUF1978). Ein N-terminales Fragment löste Wachstumshemmung in Hefe aus.

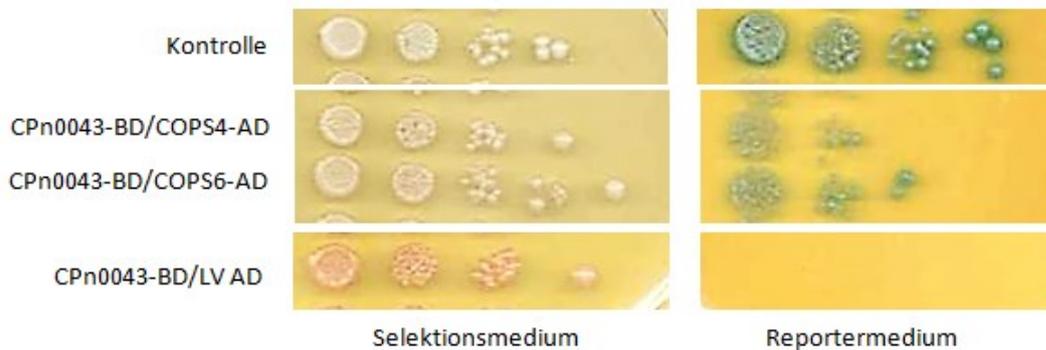
#### 4.3.1 CPn0043 zeigt ebenfalls eine Interaktion mit COPS4 und COPS6

Aufgrund der signifikanten Ähnlichkeit zueinander wurde vermutet, dass CPn0043 und CPn1054 gemeinsame Interaktionspartner besitzen könnten. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde die codierende Sequenz für CPn0043 AS 80-642, unter Auslassung der Transmembrandomänen, in den Hefe-Zwei-Hybrid Vector pGBKT7 kloniert (Abb. 4-31 A) und auf Interaktion mit den 14 im CPn1054-Screen isolierten Kandidaten im Bank-Plasmid pGADT7-Rec getestet. Es zeigte sich, dass CPn0043 ebenfalls eine Interaktion mit COPS4 sowie COPS6 einging (Abb. 4-31 B), interessanterweise jedoch mit keinem der übrigen Kandidaten (nicht gezeigt). Die Interaktion von CPn0043 mit COPS6 war dabei stärker als die mit COPS4, wie aus dem deutlicheren Wachstum der Hefezellen gefolgert werden kann. Beide Interaktionen waren jedoch schwächer im Vergleich zur Positivkontrolle.

A



## B

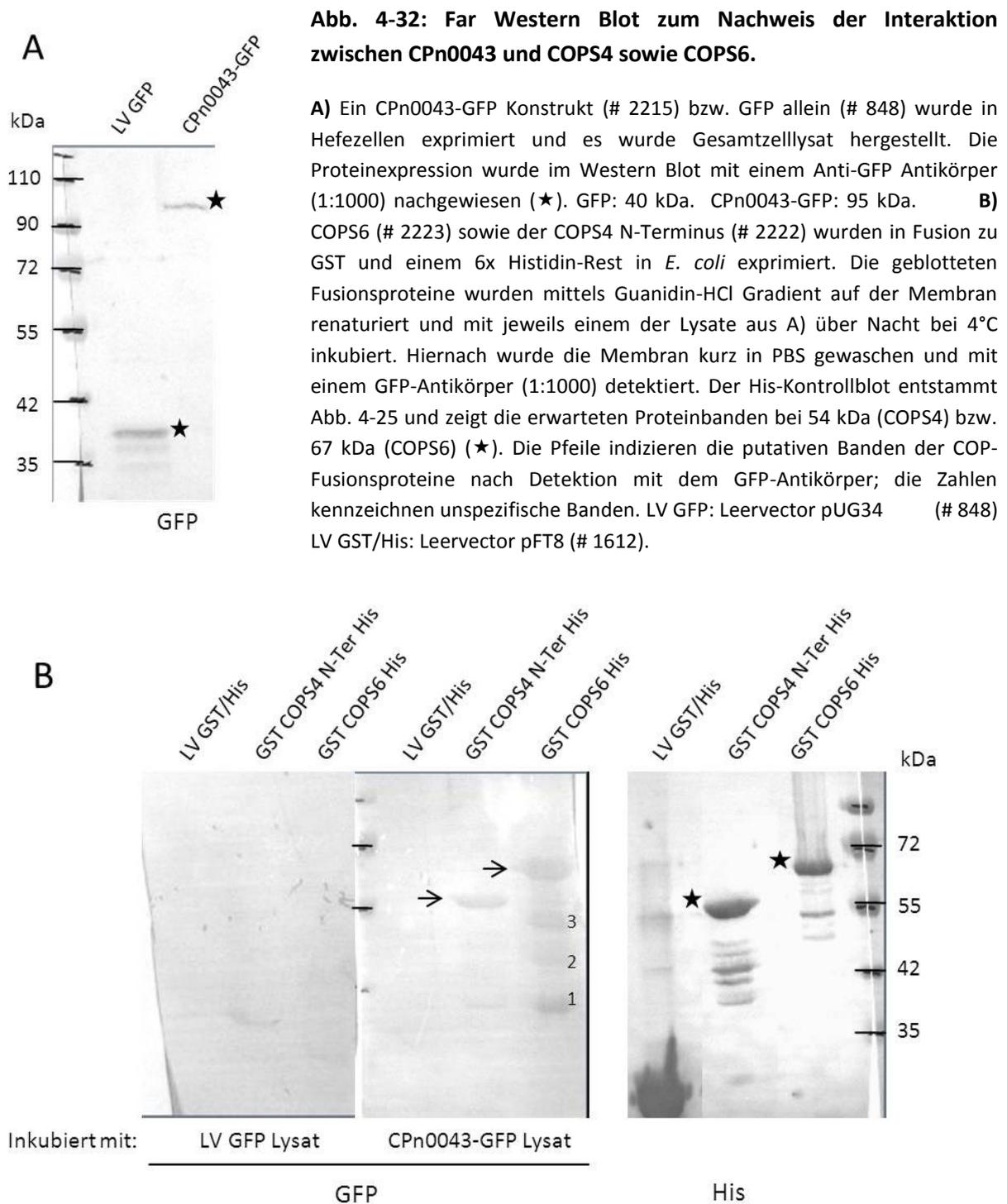


**Abb. 4-31: CPn0043 zeigt Interaktion mit COPS4 und COPS6 im Hefe-Zwei-Hybrid System.**

**A)** *cpn0043* wurde unter Auslassung des die Transmembrandomänen codierenden Bereichs in den Vector pGBKT7 kloniert (CPn0043-BD, # 2219). **B)** Das CPn0043-Konstrukt wurde zusammen mit den COPS4- bzw. COPS6-tragenden Bank-Plasmiden (Y2H-8 bzw. Y2H-40) in den Hefestamm AH109 ko-transformiert. Entsprechende Kontroll-Kombinationen wurden ebenfalls ko-transformiert. Die Durchführung des seriellen Verdünnungstropftests erfolgte wie in Abb. 4-7 beschrieben. LV AD: Leervector pGADT7 (# 1675) Plasmide der Positivkontrolle: pGBKT7-p53 (# 1302) und pGADT7-T (# 1676).

#### 4.3.2 Die Interaktion von CPn0043 mit COPS4 und COPS6 konnte biochemisch bestätigt werden

Um die im Hefe-Zwei-Hybrid System gefundene Interaktion zwischen CPn0043 und den beiden COP9-Untereinheiten auf biochemischem Wege zu bestätigen, wurde die Methode des Far Western Blots angewandt. Es wurden die bereits in Kapitel 4.2.9 beschriebenen Fusionskonstrukte von COPS6 bzw. dem COPS4 N-Terminus benutzt. Die codierende Sequenz für CPn0043 wurde unter Auslassung des Transmembrandomänen-Bereichs (AS 80-642) in den Hefe-Expressionsvector pUG34 in Fusion zu N-terminalem *GFP* kloniert, das Fusionsprotein in Hefe exprimiert und Gesamtzelllysat hergestellt. Die Expression des CPn0043-GFP Fusionsproteins sowie von GFP alleine in Leervector-transformierten Hefen konnte im Western Blot detektiert werden (Abb. 4-32 A; Sterne). Das erwartete Molekulargewicht liegt bei 95 kDa bzw. 40 kDa, was mit der realen Laufhöhe der Banden übereinstimmt. Membranen mit geblotteten und renaturierten COPS4- und COPS6-Fusionsproteinen wurden über Nacht entweder 1) mit dem Lysat Leervector-transformierter Hefen oder 2) mit dem Lysat CPn0043-GFP exprimierender Hefen inkubiert. Hiernach wurden die Blots mittels eines Antikörpers gegen GFP, d. h. gerichtet gegen die markierten Proteine in den Lysaten, detektiert. Der mittels His-Antikörper detektierte Kontrollblot zum Nachweis der COP-Fusionsproteine, der bereits für Abbildung 4-25 generiert worden war, ist zum Vergleich noch einmal beigefügt (Abb. 4-32 B, rechter Blot).

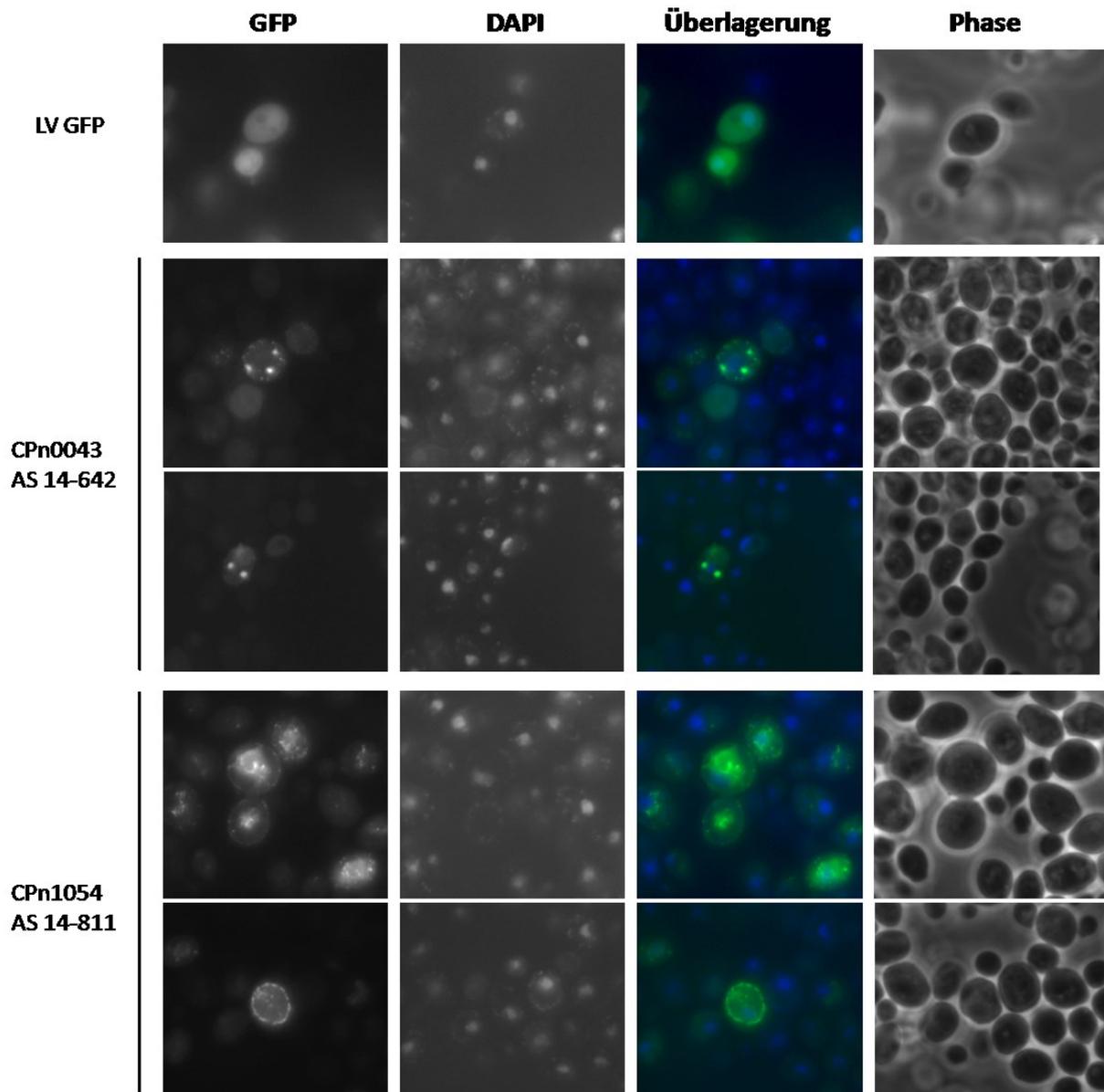


Bei Inkubation der Membran mit dem CPn0043-GFP Lysat und nachfolgender GFP-Detektion traten Banden auf, die den COP-Fusionsproteinen entsprechen (Abb. 4-32 B, mittlerer Blot; Pfeile). Dies legt eine Interaktion zwischen den COP9-Untereinheiten und CPn0043 nahe. Zusätzlich zu den erwarteten Banden traten im Blot noch weitere Banden auf. In der Spur

mit dem COPS4- Fusionsprotein erschien eine Bande etwas oberhalb von 35 kDa (mit „1“ bezeichnet). Diese Bande war ebenfalls in der COPS6-Spur auszumachen, zudem ließen sich hier Banden auf der Höhe von 42 kDa (2) sowie unterhalb von 55 kDa (3) erkennen. Dieselben Banden sind bereits bei der Durchführung des Far Western Blots mit CPn1054-GFP Lysat aufgetreten (Abb. 4-25). Bei Vergleich mit dem His-Kontrollblot scheint es sich hierbei nicht um Abbauprodukte zu handeln, sondern um unspezifische Banden. Bei Inkubation der Blot-Membran mit dem Lysat Leervector-transformierter Hefen traten keine Banden auf (Abb. 4-32 B, linker Blot). Somit ließ sich eine Interaktion zwischen CPn0043 und COPS4 sowie COPS6 auch biochemisch nachweisen und hiermit das Hefe-Zwei-Hybrid Ergebnis bestätigen.

#### **4.3.3 CPn0043 zeigt in Hefe ein anderes Lokalisationsmuster als CPn1054**

Durch Lokalisationsanalysen bakterieller Proteine in Hefe kann in manchen Fällen ein Hinweis auf deren Funktion erhalten werden, z. B. bei Auftreten eines Organell-Tropismus. Die codierende Sequenz für CPn0043 AS 14-642 (unter Auslassung der auf DNA-Ebene vorhandenen poly-C-Sequenz) wurde in den Hefe-Expressionsvector pUG34 in Fusion zu *GFP* kloniert und mit diesem Konstrukt transformierte Hefen wurden fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Zum Vergleich wurde die Lokalisation eines CPn1054-GFP Fusionskonstrukts, das bereits von Frau Dr. Kerres und Frau Dr. Herbst kloniert worden war, parallel analysiert (Abb. 4-33). *cpn1054* war hierbei unter Auslassung der poly-C-Sequenz am 5'-Ende, d. h. ohne die ersten 39 Nukleotide bzw. die ersten 13 Aminosäuren, kloniert worden, da sich bei einer Klonierung des Volllängen-Gens die Sequenzierung in der Region des Cytosin-Trakts als schwierig erwiesen hatte. Relativ zum diffusen GFP-Signal in den Kontrollzellen bildete das CPn0043-Fusionsprotein punktförmige zytosolische Aggregate, deren Anzahl bei zwei bis drei pro Zelle lag (Abb. 4-33). Es konnten zudem einige schwache punktierte Signale an der Zellperipherie, vermutlich Membran-assoziiert, beobachtet werden. Im Fall von CPn1054 trat die bereits beschriebene punktförmige Akkumulation an der Zellperipherie, vermutlich ebenfalls an der Zytoplasmamembran, auf, sowie zusätzlich eine Assoziation mit dem ER (Abb. 4-33; Herbst, 2011). Somit zeigten CPn1054 und CPn0043 trotz der hohen Ähnlichkeit zueinander auf Aminosäuresequenz-Ebene prinzipiell unterschiedliche Lokalisationsmuster in Hefe. Gemeinsam ist ihnen lediglich ein gewisser Grad an Assoziation mit der Zellperipherie.

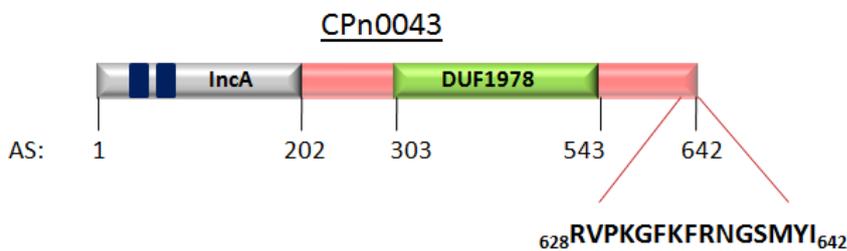


**Abb. 4-33: Lokalisationsanalyse von CPn0043- und CPn1054-Fusionsproteinen in Hefe.**

*cpn1054* (#1498) sowie *cpn0043* (#2214) wurden unter Auslassung der Poly-C-Sequenz in den Vector pUG34 in Fusion zu N-terminalem *GFP* kloniert und die Konstrukte wurden in den Hefestamm CEN.PK2 transformiert. Nach Anzucht in SD/-His/-Met-Medium für 5 h zur Induktion der Proteinexpression über den MET25-Promotor wurden die Hefen fixiert und die DNA wurde mittels DAPI angefärbt. In der Überlagerung ist das GFP-Signal in grün und die DNA in blau dargestellt. LV GFP: Leervector pUG34 (# 848).

#### 4.3.4 CPn0043 konnte in der Infektion mittels eines Peptidantikörpers nicht detektiert werden

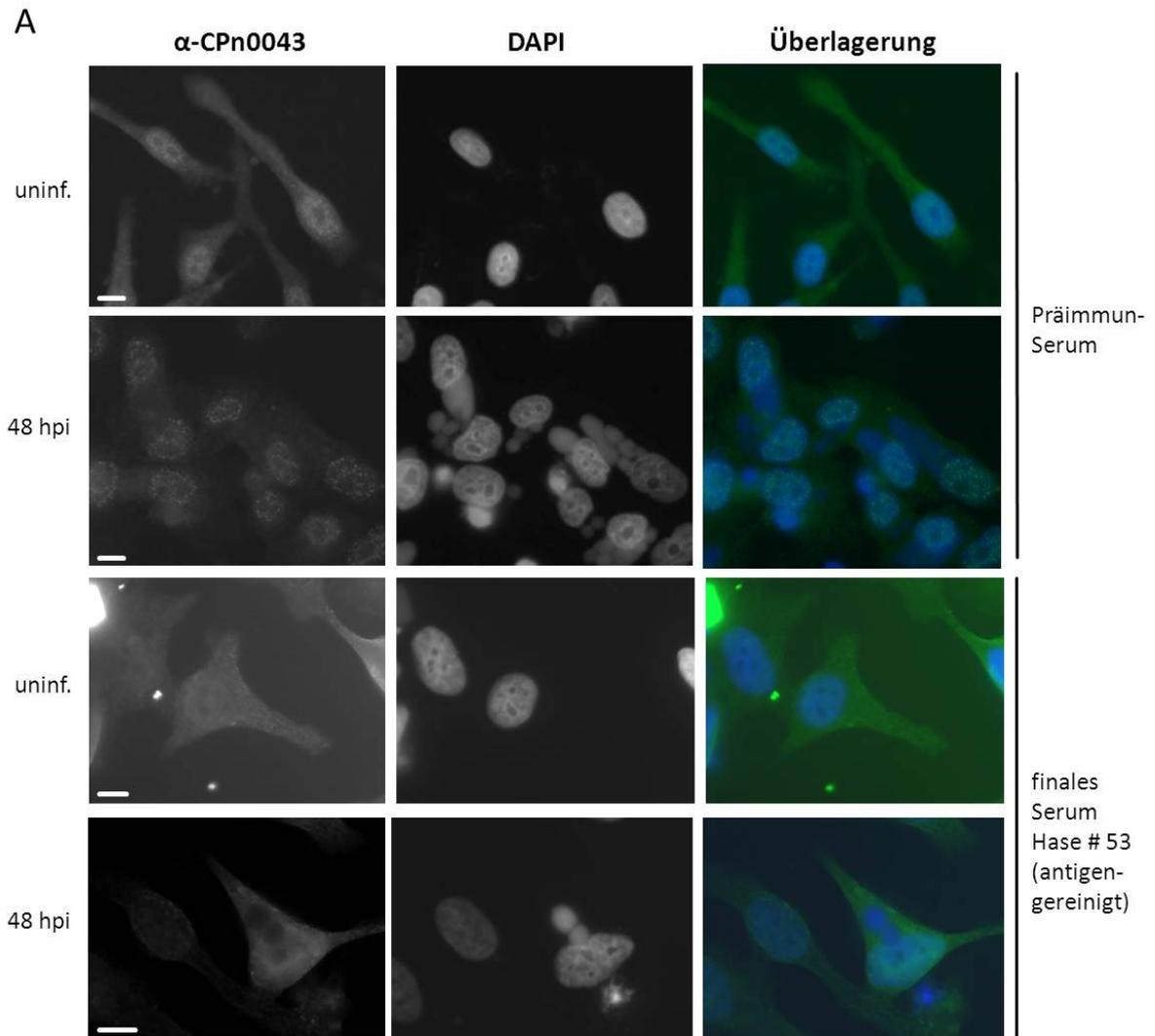
Um zu untersuchen, ob CPn0043 in infizierten Humanzellen exprimiert wird und welche Lokalisation es in der Infektion zeigt, wurde ein Peptid-Antikörper gegen die C-terminalen 15 Aminosäuren des Proteins in Auftrag gegeben (Abb. 4-34). Dieser Abschnitt war in Sequenzanalysen als derjenige mit der geringsten Ähnlichkeit zwischen einzelnen Mitgliedern der CPn1054-Familie identifiziert worden. Die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzreaktivität mit anderen Familienmitgliedern sollte so minimiert werden. Es wurden zwei Hasen immunisiert und die erhaltenen Antiseren gegen das immobilisierte Peptid antigengereinigt (von der Firma Eurogentec durchgeführt).

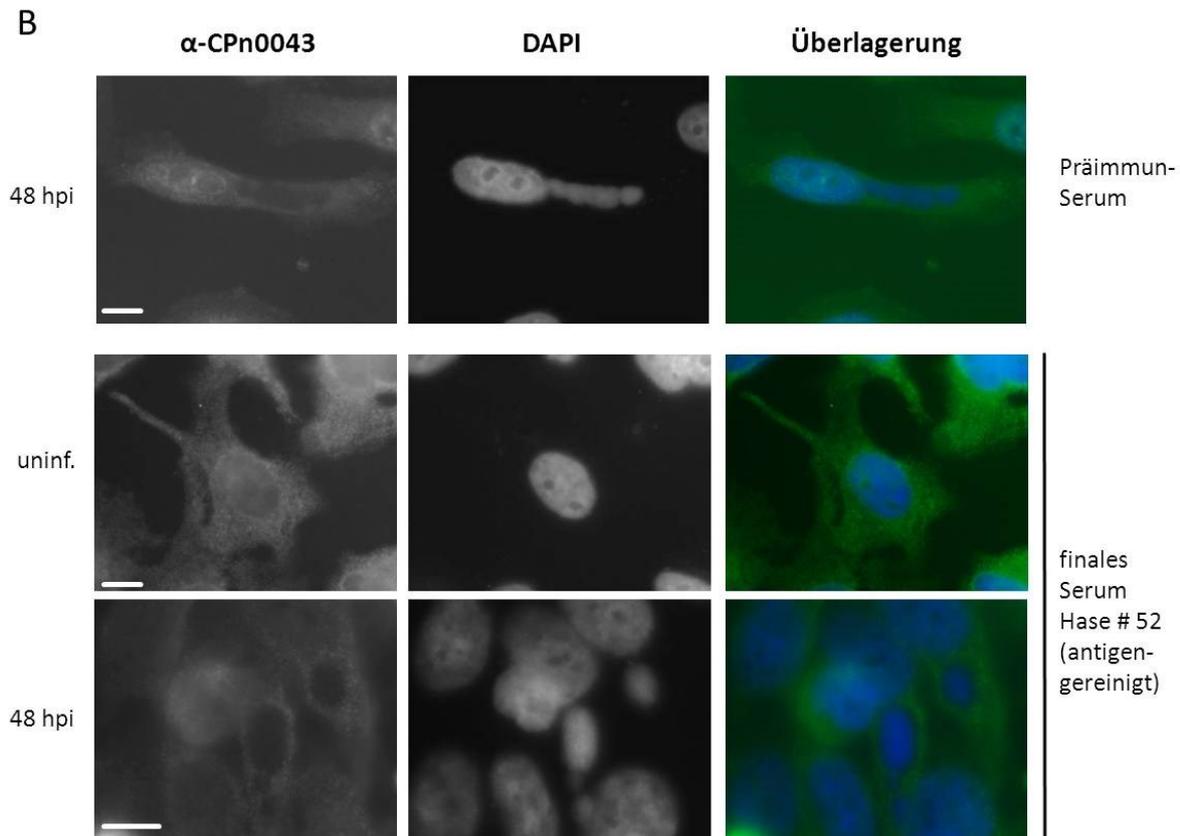


**Abb. 4-34:** Zur Antikörper-Generierung eingesetztes CPn0043-Peptid.

Die C-terminalen 15 Aminosäuren von CPn0043 zeigen die geringste Sequenz-Ähnlichkeit zu anderen Mitgliedern der CPn1054-Proteinfamilie und wurden zur Generierung von Antikörperseren eingesetzt.

Bei Färbung nicht-infizierter sowie infizierter Humanzellen mit dem jeweiligen Präimmunserum von Hase # 52 und # 53 war jeweils eine diffuse Färbung des Zytoplasmas zu beobachten; zusätzlich hierzu zeigten sich starke punktierte Signale im Zellkern (Abb. 4-35 A und B). Die Inklusionen bzw. Bakterien wurden nicht gefärbt. Leider ergaben die Immunfluoreszenz-Analysen mittels der gereinigten Antikörperseren kein spezifisches Signal in infizierten HEp-2 Zellen. In infizierten sowie auch in nicht-infizierten Zellen war stattdessen eine diffuse Färbung des Zytosols und des Zellkerns zu sehen, wobei die stark punktierte Färbung des Zellkerns verloren gegangen war (Abb. 4-35 A und B). Die Inklusionen waren wiederum frei von Signalen. Dieses Ergebnis zeigten beide generierten Antiseren. Es scheint also nach Immunisierung mit dem CPn0043-Peptid kein spezifischer Antikörper gebildet worden zu sein, oder aber das Signal eines solchen Antikörpers ist sehr schwach und wird von Hintergrundsignalen überlagert. Insgesamt bleibt festzuhalten, dass eine spezifische Detektion von CPn0043 mittels eines Peptidantikörpers fehlschlug.

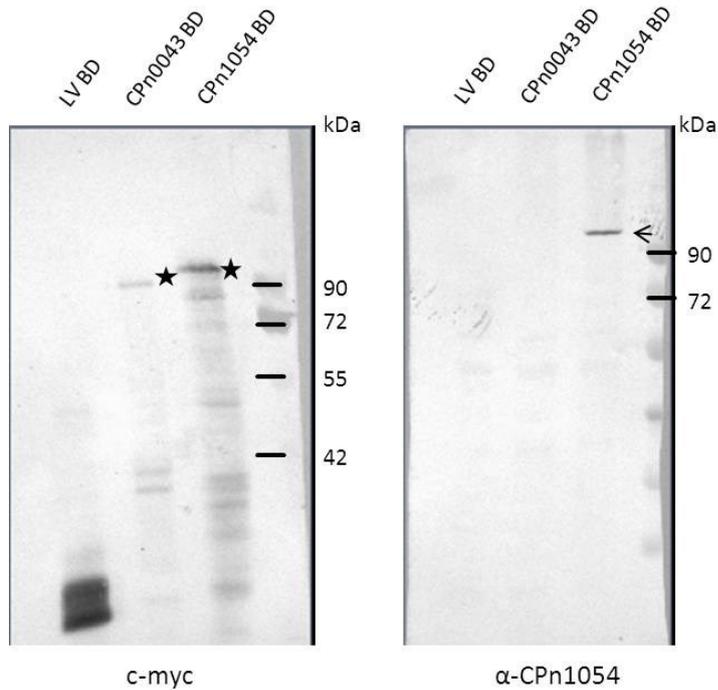




**Abb. 4-35: Immunfluoreszenz-Analyse infizierter Humanzellen mit dem CPn0043-Peptidantikörper.**

Hep-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* (MOI = 2) infiziert und 48 hpi Methanol-fixiert. Es folgte eine indirekte Immunfluoreszenz-Analyse mit dem antigengereinigten CPn0043-Peptidantikörper (1:50) bzw. dem zugehörigen Präimmenserum der Hasen # 53 (A) sowie # 52 (B) (jeweils 1:50). Die DNA wurde durch Färbung mit DAPI sichtbar gemacht. In der Überlagerung ist das Serum-generierte Signal in grün und die DNA in blau dargestellt. Der Längensmarker entspricht 5  $\mu$ m.

Um zu testen, ob CPn0043 möglicherweise von dem gegen CPn1054 generierten Antikörperserum erkannt wird, wurden die Hefe-Zwei-Hybrid Köderkonstrukte CPn0043 BD sowie CPn1054 BD separat in Hefe exprimiert und zunächst die Expression durch die Nutzung eines Anti-c-myc Antikörpers nachgewiesen (Abb. 4-36; Sterne). Ein weiterer Blot wurde mittels des CPn1054-Antiserums detektiert. Es zeigte sich hierbei eine klare Bande in der Spur des CPn1054-Fusionsproteins (Abb. 4-36; Pfeil), jedoch trat kein Signal in der Spur des CPn0043-Fusionsproteins auf. Somit liegt vermutlich keine Kreuzreaktivität des CPn1054-Antikörpers mit CPn0043 vor. Weitere zu CPn1054 sehr ähnliche Mitglieder der Proteinfamilie wären noch zu testen.



des CPn1054-Fusionsproteins eine Bande von der erwarteten Laufhöhe auszumachen (Pfeil).

**Abb. 4-36: CPn0043 wird von dem CPn1054-Antikörper nicht erkannt.**

Hefen vom Stamm AH109 wurden mit den Konstrukten CPn0043 BD (# 2219) bzw. CPn1054 BD (#2216) oder dem Leervector pGBKT7 (# 1301) transformiert und es wurde Hefe-Gesamtzelllysat hergestellt. Aufgetragene Proteinproben wurden geblottet und mittels eines c-myc Antikörpers (1:1000) oder mittels des antigengereinigten CPn1054-Antiserums (1:50) detektiert. Erwartet wurden Proteinbanden bei 87 kDa (CPn0043) bzw. 93 kDa (CPn1054) im c-myc Kontrollblot, was mit den tatsächlichen Laufhöhen übereinstimmt (★). Daneben treten einige Degradationsbanden auf. Im anti-CPn1054 Blot ist nur in der Spur

## 5. Diskussion

*Chlamydia pneumoniae* und *Chlamydia trachomatis* sind bedeutende Humanpathogene, die eine Vielzahl von Säugetieren infizieren und Krankheiten des Respirations- sowie des Urogenitaltrakts auslösen können. Einen wichtigen Pathogenitätsfaktor stellen die von den Bakterien sekretierten sog. Effektorproteine dar, die mit Wirtszellproteinen interagieren und verschiedenste Signal- und Transportwege der Zelle beeinflussen. Auf diese Weise stellen die Bakterien sicher, dass sie ihren obligat intrazellulären Entwicklungszyklus erfolgreich durchlaufen können. Chlamydien sind genetisch nicht manipulierbar, weswegen auf andere Methoden zurückgegriffen werden muss, um die Infektionsmechanismen zu erforschen. In einem genomweiten Screen nach potentiellen neuen Effektorproteinen von *C. pneumoniae* im eukaryotischen Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* konnten im Vorfeld zu dieser Arbeit insgesamt 47 Kandidaten identifiziert werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, drei dieser Kandidaten – CPn0043, CPn0072 und CPn1054 – näher zu charakterisieren und durch die Identifizierung putativer humaner Interaktionspartner Aufschluss über die möglichen Funktionen der Proteine im Verlauf einer Infektion zu erhalten.

### 5.1 CPn0072 als potentielles Effektorprotein

Bei CPn0072 handelt es sich um ein hypothetisches chlamydiales Protein, das im Mittelteil drei Transmembrandomänen beinhaltet. Hierbei handelt es sich einmal um das für Inc-Proteine charakteristische, doppelt gelappte Transmembran-Motiv sowie eine weitere, C-terminal hierzu lokalisierte Transmembrandomäne (Abb. 4-1). In dem von Frau Dr. Kerres und Frau Dr. Herbst durchgeführten genomweiten Effektorscreen in Hefe wurde ein C-terminaler Abschnitt des Proteins als Auslöser von Wachstumshemmung identifiziert. Dieser Abschnitt beinhaltet die dritte, einzelne Transmembrandomäne (Abb. 4-1). Sisko *et al.* beobachteten bei der Analyse der Expression chlamydialer Proteine in Hefe, dass die Anwesenheit von Transmembrandomänen toxisch auf Hefen wirkt (Sisko, Spaeth *et al.*, 2006). Möglicherweise ist die im Effektorscreen beobachtete Wachstumsinhibierung auf einen Effekt der Transmembrandomäne zurückzuführen. Dies könnte durch die Expression des CPn0072 C-Terminus bestehend aus den Aminosäuren 191 bis 335, worin keine Transmembrandomäne enthalten ist, in Hefe überprüft werden. Sollte sich in diesem Fall ebenfalls eine Beeinträchtigung des Wachstums zeigen, so handelt es sich wahrscheinlich um einen Effekt, der durch eine spezielle Region im CPn0072 C-Terminus ausgelöst wird.

Zur weiterführenden Charakterisierung von CPn0072 wurde mit einem polyklonalen Antikörperserum gegen ein Fusionsprotein aus den Aminosäuren 1 bis 90 sowie 191 bis 335 des Proteins, unter Auslassung der Transmembrandomänen, versucht, die CPn0072-Expression auf biochemischem Weg in infizierten Humanzellen nachzuweisen. Leider konnte

das Protein in Western Blots jedoch nicht detektiert werden. Laut Transkriptdaten wird *cpn0072*-mRNA kontinuierlich auf überwiegend niedrigem Niveau über den Infektionsverlauf exprimiert, mit Anstiegen zu den Zeitpunkten 36 hpi sowie 96 hpi (Murra, 2005). Möglicherweise war es nicht gelungen, das Protein trotz des Austestens mehrerer Lysepuffer in Lösung zu bekommen, oder aber die Proteinexpression ist generell zu gering, um mittels eines Western Blots detektiert werden zu können. Eventuell könnte das Protein durch eine Immunpräzipitation aus infizierten Zellen so weit angereichert werden, dass es per Western Blot nachweisbar ist. Indirekte Immunfluoreszenz-Analysen hingegen ergaben Signale für CPn0072 in infizierten Humanzellen. Hierbei zeigte sich in der frühen Infektion (24 hpi) eine gleichmäßige Anfärbung der Bakterien, während zu den Zeitpunkten 48 hpi sowie 72 hpi eine Konzentration des CPn0072-Signals am Rand der Inklusion vorlag, zusätzlich aber auch noch vereinzelt Signale im Lumen auszumachen waren (Abb. 4-2 und Abb. 4-3). Diese Ergebnisse stimmen mit zuvor gemachten Beobachtungen überein (Dr. Anne Kerres, unpubl.). Durch Ko-Färbungen mit Antikörpern gegen das bekannte Inklusionsmembranprotein IncA sowie das chlamydiale Oberflächenprotein MOMP konnte die Lokalisation von CPn0072 spezifiziert werden, denn es zeigte sich eine partielle Überlagerung der Signale von CPn0072 und IncA zu den beiden beobachteten Zeitpunkten 48 hpi sowie 72 hpi, was auf eine teilweise Ko-Lokalisation hindeutet (Abb. 4-3 A). Die Überlagerung fand gleichmäßig über die gesamte Inklusionsmembran verteilt statt. Hingegen zeigten die Signale für CPn0072 und MOMP zum beobachteten Zeitpunkt 48 hpi nur einen sehr geringen Grad an Überschneidung und somit größtenteils keine Ko-Lokalisation (Abb. 4-3 B). Die teilweise Ko-Lokalisation von CPn0072 mit dem bekanntesten Inklusionsmembranprotein bekräftigt die bioinformatische Vorhersage, dass es sich bei CPn0072 ebenfalls um ein Inklusionsmembranprotein handeln könnte (Dehoux, Flores *et al.*, 2011). Bei einigen anderen bereits bekannten Inc-Proteinen treten durchaus unterschiedliche Lokalisierungsmuster auf. So sind die *C. trachomatis*-Proteine IncA, IncE und IncG beispielsweise gleichmäßig über die gesamte Inklusionsmembran verteilt, was in der mikroskopischen Betrachtung ein Ringmuster ergibt (vgl. IncA-Färbung in Abb. 4-3 A); die Proteine IncB sowie IncF hingegen sind nur innerhalb bestimmter Domänen an der Inklusionsoberfläche zu finden (Scidmore-Carlson, Shaw *et al.*, 1999; Mital, Miller *et al.*, 2010). IncA interagiert mit IncA-Proteinen auf der Oberfläche anderer Inklusionen sowie mit SNARE-Proteinen der Wirtszelle, IncG bindet das eukaryotische Adapterprotein 14-3-3 $\beta$  an die Inklusionsmembran (Hackstadt, Scidmore-Carlson *et al.*, 1999; Scidmore & Hackstadt, 2001; Delevoye, Nilges *et al.*, 2008). IncB rekrutiert Wirtszellkinasen zu sog. Mikrodomänen an der Inklusionsoberfläche, die Bedeutung dieser Aktivität muss noch geklärt werden (Mital, Miller *et al.*, 2010) Die Tatsache, dass CPn0072 gleichmäßig über die Inklusionsmembran verteilt ist, lässt vermuten, dass seine Funktion nicht auf einen bestimmten Bereich beschränkt ist.

Neben der Inklusionsmembran-assoziierten Lokalisation ist ein weiteres Charakteristikum eines Inc-Proteins seine Exposition zum Wirtszellzytosol. Um dies für CPn0072 zu untersuchen, wurden *C. pneumoniae*-infizierte Humanzellen mit para-Formaldehyd fixiert und ohne nachfolgende Permeabilisierungsschritte mit einer Kombination aus CPn0072- sowie MOMP-Antikörper ko-gefärbt. Es zeigte sich in diesen Zellen kein MOMP-Signal, was den Erwartungen entsprach, da sich MOMP als chlamydiales Oberflächenprotein im Inneren der Inklusion befindet, die nicht permeabilisiert worden war. In Methanol-fixierten Kontrollzellen konnte MOMP hingegen detektiert werden (Abb. 4-4). CPn0072 konnte sowohl in Methanol-fixierten Zellen als auch in PFA-fixierten Zellen detektiert werden (Abb. 4-4). Da das Protein von der zytosolischen Seite der Wirtszelle aus für eine Antikörperfärbung zugänglich ist, muss es Domänen mit Wirtszellkontakt besitzen. Das benutzte polyklonale Antikörperserum war gegen ein Fusionsprotein aus dem N-Terminus und dem C-Terminus von CPn0072 generiert worden. Die beiden Termini sollten sich aufgrund des Vorhandenseins von drei Transmembrandomänen im Mittelteil des Proteins auf unterschiedlichen Seiten der Inklusionsmembran befinden, so dass noch geklärt werden muss, welcher Teil des Proteins Zytosol-exponiert ist. Hierzu müssten Antikörperseren gegen den N-Terminus und den C-Terminus separat generiert und hiermit das Experiment wiederholt werden. Aufgrund der Exposition zum Wirtszellzytosol könnte CPn0072 potentiell mit Wirtszellproteinen interagieren und eine Funktion als Effektor ausüben.

### 5.1.1 Potentielle humane CPn0072-Interaktionspartner bleiben fraglich

Um mögliche humane CPn0072-Interaktionspartner zu identifizieren, wurde ein Hefe-Zwei-Hybrid Screen durchgeführt. Da die Gefahr bestand, dass die im Protein enthaltenen Transmembrandomänen mit membranösen Strukturen innerhalb der Hefezelle assoziieren und nicht effizient in den Zellkern transportiert werden, wurde als Köder für den Screen ein Fusionskonstrukt aus dem CPn0072 N-Terminus (AS 1-90) und dem C-Terminus (AS 191-335) eingesetzt, das keine Transmembrandomänen enthält (Abb. 4-5). Es konnten insgesamt vier Kandidaten identifiziert werden, die bei einer Ko-Transformation mit dem CPn0072-Köderkonstrukt reproduzierbar eine Aktivierung der Reportergene zeigten, wobei ein Kandidat in zwei Bank-Plasmiden codiert wurde (Tab. 4-2).

GLOD4 (*glyoxalase domain containing 4*) ist ein Protein mit Homologie zum Enzym Glyoxalase aus *Caenorhabditis elegans*, allerdings mit wenig Ähnlichkeit zu dem korrespondierenden humanen Enzym (Qin, Wan *et al.*, 2001). IFT 172-Homolog (*intraflagellar transport 172 homolog*) ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein aus *Chlamydomonas* und vermittelt Transportvorgänge an der Spitze des Flagellums (Pedersen, Miller *et al.*, 2005). In den isolierten Bank-Plasmiden war jeweils ein lediglich 50 Aminosäuren umfassender Abschnitt des betreffenden Proteins codiert, der sich im Fall von

GL0D4 nicht in demselben Leseraster wie die Gal4p-Aktivierungsdomäne befand und im Fall von IFT 172 mehrere AS-Austausche beinhaltete (Tab. 4-2). Beide Kandidaten wurden daher nicht weiter beachtet.

In zwei der isolierten Bank-Plasmide wurde ein erheblicher Abschnitt des Proteins CREB3 (*cAMP responsive element binding protein 3*) codiert, dem jeweils lediglich ein Teil des C-Terminus fehlte (Tabelle 4-2). Beide Sequenzen befanden sich in demselben Leseraster wie die GAL4 Aktivierungsdomäne, allerdings wurden in beiden Fällen die GAL4-Sequenz und die CREB3-Sequenz durch ein Stop-Codon unterbrochen. Nun besitzen Hefen jedoch spezifische tRNAs, sog. Suppressor-tRNAs, durch deren Aktivität an der Position des Stop-Codons eine bestimmte Aminosäure eingefügt und das Stop-Codon somit „überschrieben“ wird (Beier & Grimm, 2001). Es ist daher nicht sicher, dass das Fusionsprotein tatsächlich nicht exprimiert wird. Um diesen Kandidaten abzusichern, müsste CREB3 ohne ein zwischengeschaltetes Stop-Codon in Fusion zur GAL4 Aktivierungsdomäne kloniert und die Interaktion des Proteins mit CPn0072 im Hefe-Zwei-Hybrid System noch einmal getestet werden. Ließe sich das positive Ergebnis bestätigen, könnte CREB3 als möglicher Interaktionspartner weitergehend charakterisiert werden. Bei diesem Kandidaten handelt es sich um einen ER-Membran-gebundenen Transkriptionsfaktor, der unter Stressbedingungen proteolytisch freigesetzt wird. Nach Translokation in den Zellkern bewirkt CREB3 dort die Transkription seiner Zielgene, die eine Rolle in der Antwort auf fehlgefaltete Proteine, aber auch in der Immunantwort oder dem Lipidmetabolismus spielen (Chan, Kok *et al.*, 2011). Es ist bekannt, dass es Membran-Membran-Kontaktstellen zwischen der chlamydialen Inklusionsmembran und dem Endoplasmatischen Retikulum gibt, an denen z. B. eine Interaktion zwischen dem Inc-Protein IncD und dem Ceramid-Transferprotein CERT stattfindet (Derré, Swiss *et al.*, 2011). Es wäre denkbar, dass der Kontakt zur chlamydialen Inklusion zu Stressbedingungen im ER und zur proteolytischen Aktivierung von CREB3 führt. Über eine Interaktion mit CPn0072 könnte CREB3 abgefangen und an die Inklusionsmembran gebunden werden, so dass es nicht als Transkriptionsfaktor aktiv werden kann. Dies könnte durch Immunfluoreszenz-Analysen mittels eines gegen CREB3 gerichteten Antikörpers in infizierten Humanzellen untersucht werden.

Bei dem vierten potentiellen CPn0072-Interaktionspartner handelt es sich um SLC30A9 (*solute carrier family 30 member 9*). Die Tatsache, dass in dem isolierten Bank-Plasmid der relativ große Abschnitt von AS 286 bis 554 des insgesamt 568 AS langen Proteins codiert wurde und sich die Sequenz zudem in demselben Leseraster wie die GAL4 Aktivierungsdomäne befand, machte SLC30A9 zum interessantesten Kandidaten, der weitergehend untersucht wurde. Bei seiner Identifizierung wurde das Protein zunächst als HUEL (*human embryonic lung*) oder C4orf1 bezeichnet und konnte mittels eines spezifischen Antikörpers in humanen Nicht-Tumorzellen im Zytosol, assoziiert mit Zytoskelett-Strukturen, detektiert werden. In Tumorzellen befand sich das Protein im Zellkern kleiner oder sich

teilender Zellen, wohingegen es in größeren und reiferen Zellen einen peri-nukleären Ring bildete (Sim & Chow, 1999). Nachfolgende Experimente mit Tumorzellen zeigten eine Translokation von HUEL in den Kern während der S-Phase des Zellzyklus (Sim, Yeo *et al.*, 2002). Im N-terminalen Bereich von HUEL wurde eine Domäne mit Homologie zu der DNA-bindenden Domäne eines DNA-Reparaturproteins identifiziert, zudem befindet sich ein Motiv für Interaktion mit Zellkern-lokalisierten Rezeptoren am C-terminalen Ende (Sim, Yeo *et al.*, 2002; Abb. 4-6). Aufgrund der genannten Beobachtungen wurde vermutet, dass es sich bei HUEL um ein Protein handelt, das eine Rolle bei der Transkriptionskontrolle oder der Regulation der DNA-Replikation und des Zellzyklus spielen könnte. Späterhin wurde das Protein jedoch bioinformatisch der SLC30-Familie membrangebundener Zink-Transporter zugeordnet und bekam den Namen SLC30A9 oder ZnT9 (Seve, Chimienti *et al.*, 2004). Es wurde eine Kation Efflux-Domäne im C-terminalen Bereich des Proteins annotiert (Abb. 4-6). Es existieren zwei große Familien von Zink-Transportern in eukaryotischen Zellen. Mitglieder der SLC30 (oder ZnT)-Familie transportieren Zink-Ionen aus dem Zytosol heraus entweder in intrazelluläre Kompartimente oder ins extrazelluläre Milieu. Ihre Antagonisten sind Mitglieder der SLC39 (oder ZIP)-Familie, die Zink aus dem extrazellulären Milieu oder aus intrazellulären Kompartimenten heraus ins Zytosol transportieren (Lichten & Cousins, 2009). Die SLC30-Familie besitzt 10 Mitglieder, wobei es zu SLC30A9 sowie zu SLC30A10 keine funktionellen Studien gibt und somit unklar ist, ob diese beiden Proteine tatsächlich Zink-transport-Aktivität besitzen (Palmiter & Huang, 2004; Lichten & Cousins, 2009). Während für die Zink-Transporter SLC30A1 bis SLC30A7 eine Lokalisation in den Membranen des Golgi-Apparates, von Endosomen oder sekretorischen und synaptischen Vesikeln nachgewiesen werden konnte, ist über die Lokalisation von SLC30A8 sowie SLC30A10 nichts bekannt. Die in der Studie von Sim & Chow beschriebene Lokalisation von SLC30A9 an Zytoskelett-Strukturen im Zytosol bzw. im Zellkern von Tumorzellen lässt sich nur schwer mit einer Funktion als Zink-Transporter in Einklang bringen. Außerdem wird SLC30A9 als ein „Außenseiter“ der SLC30-Familie angesehen, da seine Ähnlichkeit zu anderen Familien-Mitgliedern recht gering ist (Palmiter & Huang, 2004).

Das im Bank-Plasmid codierte SLC30A9-Fragment beinhaltet vier der insgesamt fünf vorhergesagten Transmembrandomänen des Proteins (Abb. 4-6). Die Analyse der Interaktion von CPn0072 und SLC30A9 mittels eines seriellen Verdünnungstropftests ergab, dass nur eine relativ schwache Aktivierung der Reportergene stattfand (Abb. 4-7). Dies könnte auf eine instabile Interaktion der beiden Partner hindeuten. Es ist aber auch möglich, dass das auf dem Bank-Plasmid codierte Fusionsprotein aufgrund der im SLC30A9-Fragment enthaltenen Transmembrandomänen zu einem gewissen Grad an membranösen Strukturen in den Hefezellen zurückgehalten wird. Somit würde nur wenig Protein in den Zellkern gelangen, um dort in Kombination mit dem CPn0072-Köderkonstrukt die Reportergene zu aktivieren. In weiterführenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass das N-terminale Ende

des CPn0072-Proteins bestehend aus den Aminosäuren 1 bis 90 die Interaktion mit SLC30A9 vermittelt, während eine Ko-Expression des CPn0072 C-Terminus bestehend aus den Aminosäuren 191 bis 335 und dem SLC30A9 Screen-Fragment zu keiner Aktivierung der Reporter gene führte (Abb. 4-8). Die Interaktion zwischen dem CPn0072 N-Terminus und SLC30A9 scheint stärker zu sein als die des CPn0072-Köderkonstrukts mit SLC30A9. Möglicherweise ergibt sich im Fall des Köderkonstrukts eine sterische Behinderung der Interaktion durch die Anwesenheit des C-terminalen Abschnitts von CPn0072. Es wäre aber auch möglich, dass sich im CPn0072 C-Terminus eine mit Membranen assoziierende Struktur befindet, welche das Fusionsprotein im Hefezytosol zurückhält. Das sehr schwache Wachstum von mit dem CPn0072-Köderkonstrukt und SLC30A9 ko-transformierten Hefen auf den Reporterplatten wäre dann ein additiver Effekt aus dem Abfangen sowohl des SLC30A9-Fusionsproteins als auch des CPn0072-Fusionsproteins an Membranstrukturen in der Hefezelle. Da in dem von Frau Dr. Kerres und Frau Dr. Herbst durchgeführten Effektor-Screen der CPn0072 C-Terminus den wachstumshemmenden Effekt verursachte, die Interaktion mit SLC30A9 jedoch über den CPn0072 N-Terminus vermittelt wird, ist diese Interaktion nicht verantwortlich für den Wachstumsdefekt der Hefe. Zudem ergab eine Blast-Suche, dass das SLC30A9-ähnlichste Protein in Hefe Mmt1p ist, wobei dies eine 47%-ige Ähnlichkeit und eine 26%-ige Identität über einen Bereich von nur 90 Aminosäuren mit SLC30A9 aufweist. Der abgedeckte Bereich von SLC30A9 besteht dabei aus den AS 238 bis 326, was ebenfalls nur einen geringen Überlapp mit dem isolierten Fragment aus dem Hefe-Zwei-Hybrid Screen besitzt. Die Tatsache, dass der N-Terminus von CPn0072 die Interaktion vermittelt, deutet darauf hin, dass dieser Bereich des Proteins derjenige ist, der zum Wirtszellzytosol hin exponiert ist. Dies wäre aber, wie oben bereits erwähnt, durch die Generierung entsprechender Domänen-spezifischer Antikörperseren noch nachzuweisen. Auf biochemischem Weg konnte die Interaktion zwischen CPn0072 und SLC30A9 bislang nicht bestätigt werden. Ein Versuch mittels Ko-Immunpräzipitation unter Nutzung von GFP-fusioniertem CPn0072 und mit einem 6x Histidin-Rest versehenem SLC30A9 ergab, dass CPn0072 auch bei Abwesenheit des SLC30A9-Konstrukts von His-Antikörper gekoppelten Magnetkügelchen präzipitiert wird (Abb. 4-9). Es müssten daher andere Reporterproteine ausgewählt und auf ihre Eignung für den Einsatz in einer Ko-Immunpräzipitation oder alternativ in einem Far Western Blot getestet werden.

Zur weitergehenden Charakterisierung der Interaktion zwischen CPn0072 und SLC30A9 sollte eine Ko-Färbung beider Proteine in infizierten Humanzellen durchgeführt werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass kein kommerzieller Immunfluoreszenz-geeigneter Antikörper zu finden war. Eine Anfrage bei der Arbeitsgruppe Chow, die im Rahmen ihrer Forschung einen spezifischen Antikörper gegen SLC30A9 bzw. HUEL generiert hatte (Sim & Chow, 1999), verlief erfolglos. Man könnte die Hypothese aufstellen, dass das SLC30A9-Protein über eine Interaktion mit CPn0072 an die Inklusionsmembran gebunden wird. Nimmt man eine Rolle

von SLC30A9 als Zink-Transporter an, wobei dies wie schon erwähnt noch nicht erwiesen ist, so könnte das Protein im Folgenden in die Inklusionsmembran inseriert werden und Zink-Ionen über die Membran transportieren. Calcium-, Natrium- und Kalium-Ionen sowie Protonen können über die Inklusionsmembran gelangen, und die Konzentration an diesen Ionen im Inklusionslumen ist gleich derjenigen im Wirtszellzytosol (Grieshaber, Swanson & Hackstadt, 2002). Die Konzentration an Zink im Inklusionslumen ist nicht bestimmt worden, es wäre daher interessant dies durchzuführen und mit der Zink-Konzentration innerhalb des Zytoplasmas der Wirtszelle zu vergleichen. Chlamydien besitzen einige Enzyme, die Zink benötigen, z. B. die Metalloprotease FtsH (CPn0998 bzw. CT841). Diese liegt in Homohexamer-Form vor und beinhaltet ein Zinkion pro Untereinheit (Quelle: UniProt). Auch die Adenylatkinase aus *C. pneumoniae* bindet Zink-Ionen, was nicht essentiell für die Aktivität – den Transfer einer Phosphatgruppe von ATP auf AMP – ist, aber für eine erhöhte Thermostabilität des Enzyms sorgt (Miura, Inouye *et al.*, 2001). Das *C. trachomatis*-Enzym LpxC, eine an der Lipid A-Biosynthese beteiligte Deacetylase, ist ebenfalls Zink-abhängig (Nguyen, Cunningham *et al.*, 2011). Durch die Insertion von SLC30A9 in die Inklusionsmembran könnte also die Versorgung der Bakterien mit Zink aus dem Wirtszellzytosol sichergestellt werden. Ein alternatives Modell wäre ein Abfangen des Zink-Transporters durch CPn0072 ohne nachfolgende Insertion in die Inklusionsmembran. Dadurch könnte dieser nicht zu seinem eigentlichen Wirkort gelangen und die Zink-Homöostase würde aus dem Gleichgewicht geraten. Da die bisher berichtete Lokalisation von SLC30A9 an Zytoskelett-Strukturen bzw. im Zellkern von Tumorzellen nicht mit einer Funktion als membrangebundener Zink-Transporter vereinbart werden kann, bleibt diese Hypothese ebenfalls fraglich. Wenn man die Annahme früherer Studien aufgreift, nach denen es sich bei SLC30A9 um ein Transkriptions- oder Zellzyklus-regulierendes Protein handeln könnte, so würde ein Abfangen des Proteins Veränderungen in der Genexpression und/oder dem Ablauf des Zellzyklus hervorrufen. Die Zielgene sind hierbei unbekannt, weshalb sie nicht analysiert werden können; es wäre aber möglich, die Geschwindigkeit des Zellzyklus zu verfolgen. Um einen Zusammenhang zwischen CPn0072 und Zink herzustellen, könnte eine Analyse des CPn0072 Transkript- und/oder Proteinniveaus bei unterschiedlichen Zink-Konzentrationen im Medium während einer Chlamydieninfektion durchgeführt werden.

## 5.2 Mitglieder der CPn1054-Proteinfamilie als potentielle Effektorproteine

Im genomweiten Effektor-Screen wurden zwei Mitglieder der hypothetischen, paralogen CPn1054-Proteinfamilie aus *C. pneumoniae* als putative Effektoren identifiziert: CPn1054 sowie CPn0043. Die gesamte Proteinfamilie ist abgesehen von bioinformatischen Analysen und Sequenzvergleichen bislang uncharakterisiert. CPn1054 wird als das Ursprungprotein dieser Familie angesehen, aus dem durch Duplikationen und nachfolgende Veränderungen

die weiteren Proteine bzw. Proteinpaare entstanden sind. Eine Suche nach konservierten Domänen ergab, dass sechs der Mitglieder – darunter CPn1054 und CPn0043 – sowohl eine vollständige IncA- als auch eine vollständige DUF1978-Domäne beinhalten (Abb. 4-11). Alle übrigen Proteine besitzen entweder nur eine von diesen beiden Domänen oder gar keine; in manchen Fällen ist die enthaltene Domäne unvollständig. Bei den Mitgliedern, die dem CPn1054 N-Terminus entsprechen, handelt es sich allesamt um vorhergesagte Inc-Proteine. Im Fall von CPn1054 führten zwei teils überlappende N-terminale sowie ein C-terminales Fragment zu der beobachteten Wachstumshemmung in Hefe; im Fall von CPn0043 wurde der Effekt durch ein N-terminales Fragment hervorgerufen (Abb. 4-10 und Abb. 4-30). Mittels eines gegen den CPn1054 C-Terminus (AS 521-811) generierten Antikörperserums konnte in Lysaten infizierter Humanzellen ein der erwarteten Größe von CPn1054 entsprechendes Protein detektiert werden (Herbst, 2011). Das Expressionsniveau nahm dabei mit fortschreitendem Infektionsverlauf von 24 hpi bis 72 hpi zu. In einer Transkriptanalyse von chlamydialen Genen zeigte sich über den gesamten Infektionsverlauf eine generell niedrige *cpn1054*-Expression, die im späten Abschnitt der Infektion (48 hpi bis 96 hpi) leicht erhöht war im Vergleich zu frühen Zeitpunkten (0 hpi bis 24 hpi) (Murra, 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels einer säulengereinigten CPn1054-Antikörperlösung sowie einer abgereicherten Fraktion des CPn1054-Antiserums spät in der Infektion (72 hpi) ein Signal rings um die Inklusion, möglicherweise Inklusionsmembran-assoziiert, beobachtet werden (Abb. 4-13, Abb. 4-15). Bei einer Färbung zum selben Zeitpunkt mittels einer membrangereinigten Antikörperlösung zeigte sich ein anderes Bild: Die Inklusionen schienen gleichmäßig punktiert angefärbt und lediglich an einzelnen Stellen gab es eine Konzentration des CPn1054-Signals an der Peripherie (Abb. 4-14). Um hier eine gesicherte Aussage machen zu können, müssen weitere Experimente durchgeführt werden. In Inklusionen, die zum Zeitpunkt 48 hpi gefärbt wurden und die noch nicht stark expandiert waren, konnte ein punktiertes Signal über die gesamte Ausdehnung hinweg detektiert werden, während zum gleichen Zeitpunkt beobachtete größere Inklusionen eine punktierte Färbung des Randbereiches sowie vereinzelt punktierte Signale im Lumen aufwiesen (Abb. 4-13, Abb. 4-14; Abb. 4-15: mit „1“ und „2“ markierte Inklusionen). Somit scheint mit fortschreitender Infektionsdauer eine Verlagerung des CPn1054-Signals von den Bakterien und/oder aus dem Lumen zum Inklusionsrand hin zu erfolgen, wobei die Inklusionsmembran-Lokalisation 72 hpi (Abb. 4-15) in weiteren unabhängigen Experimenten zukünftig bestätigt werden muss. Frühere Analysen zu den Zeitpunkten 24 hpi und 48 hpi hatten für CPn1054 eine Bakterien-Assoziation ergeben (Herbst, 2011). Es wäre möglich, dass zum Zeitpunkt 24 hpi die Ring-ähnliche Färbung noch gar nicht auftritt. Zudem können nach den oben beschriebenen Beobachtungen auch zum Zeitpunkt 48 hpi Inklusionen vorhanden sein, bei denen kein Ring-Muster auftritt. Eine Aussage über eine mögliche

Sekretion von CPn1054-Protein ins Zytosol der Wirtszelle kann aufgrund der starken Hintergrundfärbung des Antikörpers nicht gemacht werden (Abb. 4-15).

Durch Ko-Färbung mit Antikörpern gegen weitere chlamydiale Proteine bekannter Lokalisation konnte eine spezifischere Aussage zur CPn1054-Lokalisation gemacht werden. Zum Zeitpunkt 48 hpi schien es so, als ob das CPn1054-Signal innerhalb des Signals für das bekannte Inklusionsmembranprotein IncA liegt, während das vorläufige Ergebnis für den Zeitpunkt 72 hpi eine deutliche Überlagerung beider Signale zeigt, was auf eine Ko-Lokalisation hindeutet (Abb. 4-15). Dies würde die Hypothese einer Verlagerung der CPn1054-Lokalisation von einer Bakterien-Assoziation hin zu einer Inc-charakteristischen Membran-Assoziation zu späteren Infektionszeitpunkten bekräftigen. Um die Lokalisation in kleinen bzw. frühen Inklusionen genauer bestimmen zu können, wurden Ko-Färbungen mit Antikörpern gegen das chlamydiale Oberflächenprotein MOMP sowie das intrachlamydiale Protein DnaK durchgeführt. Während sich so gut wie keine Überlagerungen der Signale für CPn1054 und MOMP zeigten (Abb. 4-16 A), trat ein gewisser Grad an Ko-Lokalisation von CPn1054 mit DnaK auf (Abb. 4-16 B). Möglicherweise befindet sich CPn1054 also in der frühen Infektion innerhalb der Bakterien, um späterhin (zwischen 48 hpi und 72 hpi) sekretiert und in die Inklusionsmembran inseriert zu werden. Im Einklang mit dieser Hypothese stehen die Ergebnisse von Frau Dr. Herbst, die in zum Zeitpunkt 40 hpi über einen Gradienten gereinigten RBs im Western Blot ein deutliches Signal für CPn1054 detektieren konnte, das in zum Zeitpunkt 84 hpi gereinigten EBs wesentlich schwächer war (Herbst, 2011).

Ein weiteres charakteristisches Merkmal von Inc-Proteinen ist neben der Membran-Lokalisation ihre Exposition zum Wirtszellzytosol. Durch Färbung differentiell permeabilisierter Zellen konnte für CPn1054 eine Zugänglichkeit von der zytosolischen Seite der Wirtszelle aus nachgewiesen werden (Abb. 4-17). Aufgrund der Tatsache, dass das CPn1054-Antikörperserum gegen den C-terminalen Abschnitt aus AS 521-811 des Proteins generiert worden war und die gebildeten Antikörper eine Färbung von zytosolischer Seite aus ermöglichten, ist vermutlich zumindest diese Protein-Region exponiert. Bezieht man die Strukturvorhersage für CPn1054 mit ein, nach der sich im N-Terminus zwei Transmembrandomänen befinden (Abb. 4-10), so besitzt wahrscheinlich der gesamte Proteinbereich ab der zweiten Transmembrandomäne (AS 80-811) Kontakt zum Wirtszellzytosol und könnte mit Proteinen der Wirtszelle interagieren. Der Carboxy-Terminus des Inklusionsmembranproteins IncA aus *C. trachomatis* ist Wirtszellzytosol-exponiert (Hackstadt, Scidmore-Carlson *et al.*, 1999). Da IncA ebenso wie CPn1054 zwei Transmembrandomänen im N-Terminus besitzt und die Orientierung beider Proteine in der Inklusionsmembran daher dieselbe sein könnte, würde dies die gefundene Exposition des CPn1054 C-Terminus bekräftigen. IncA aus *C. trachomatis* geht zudem eine Selbst-Interaktion ein und vermittelt auf diese Weise die Fusion von Inklusionen in mehrfach

infizierten Humanzellen (Hackstadt, Scidmore-Carlson *et al.*, 1999). CPn1054 besitzt im N-terminalen Bereich eine IncA-Domäne und es wurde vermutet, dass das Protein daher eventuell eine Selbst-Interaktion eingehen könnte. Ein Hefe-Zwei-Hybrid Test ergab jedoch, dass dies nicht der Fall ist (Abb. 4-18).

CPn0043 ist wie bereits erwähnt ein weiteres Mitglied der CPn1054-Proteinfamilie, das 47 % Identität zu CPn1054 über seine gesamte Länge aufweist (Abb. 1-6). Der abgedeckte Bereich des CPn1054-Proteins erstreckt sich über die AS 1-656. Über das Expressionsniveau und die Lokalisation von CPn0043 im Verlauf einer Chlamydieninfektion ist bislang nichts bekannt. Um hierüber Erkenntnisse zu gewinnen, wurde ein Peptid-Antikörper gegen die C-terminalen 15 Aminosäuren von CPn0043 generiert. Die genannte Sequenz war ausgewählt worden, da sie die geringste Ähnlichkeit zu den Sequenzen der übrigen, untereinander sehr ähnlichen Mitglieder der CPn1054-Proteinfamilie aufwies und so die Gefahr einer Kreuzreaktivität minimiert werden sollte. Es zeigte sich jedoch, dass der Antikörper kein spezifisches Signal in infizierten Humanzellen generierte (Abb. 4-35). Eine Möglichkeit wäre, dass das Protein nicht exprimiert wird. Laut den Transkriptdaten ist *cpn0043*-mRNA zu allen Zeitpunkten der Infektion vorhanden, höher zu Beginn der Infektion und mit Abnahme zu späteren Zeitpunkten hin, sowie höher im Vergleich zum *cpn1054*-mRNA Niveau (Murra, 2005). Sollte also tatsächlich kein CPn0043-Protein vorhanden sein, so müsste auf posttranskriptionaler oder posttranslationaler Ebene eine Regulation der Expression erfolgen. Es besteht natürlich auch eine gewisse Wahrscheinlichkeit, dass das zur Immunisierung eingesetzte Peptid trotz der Prüfung durch ein Vorhersageprogramm der Firma Eurogentec nicht immunogen ist. Daher sollte die Generierung eines weiteren Antikörperserums unter Nutzung eines anderen Proteinabschnitts als Immunogen in Betracht gezogen werden. Allerdings müsste hier wiederum darauf geachtet werden, dass keine hohen Sequenzhomologien zu anderen Mitgliedern der CPn1054-Proteinfamilie vorliegen. Der Verdacht, dass CPn0043 von dem gegen CPn1054 generierten polyklonalen Antikörper erkannt werden könnte, ließ sich nicht bestätigen, wie ein Austesten mit einem in Hefe exprimierten CPn0043-Fusionsprotein ergab (Abb. 4-36).

Interessant wäre es zudem, die Expression weiterer Mitglieder der Proteinfamilie im Verlauf einer Infektion mittels spezifisch generierter Antikörper zu analysieren. Laut Transkriptdaten wird mRNA aller entsprechenden Gene exprimiert (Murra, 2005). Auf diese Weise könnte untersucht werden, ob es sich bei den als Inc-Proteine vorhergesagten Familienmitgliedern tatsächlich um solche handelt und welche Lokalisation die übrigen Proteine aufweisen. Für die Familie der *pmp's* (*polymorphic membrane proteins*) konnte gezeigt werden, dass es in unterschiedlichen Inklusionen zu einer selektiven Expression von nur einzelnen Mitgliedern kommt (Tan, Hsia *et al.*, 2010; Elisabeth Becker, unpubl.). Möglicherweise zeigt sich für die CPn1054-Familie ein ähnliches Muster. Bei der Generierung der Antikörper gilt es, die Gefahr einer Kreuzreaktivität durch sorgfältiges Auswählen des Immunogens zu minimieren. Zudem

sollte durch Tests mit entsprechenden Fusionsproteinen geprüft werden, ob von dem CPn1054-Antikörper weitere Mitglieder der CPn1054-Proteinfamilie erkannt werden, analog zu dem für CPn0043 bereits durchgeführten Test (Abb. 4-36). Besonders CPn0010.1 mit einer 94%-igen Identität zum CPn1054 C-Terminus wäre hier ein sehr wahrscheinlicher Kandidat für Kreuzreaktivität. Leider konnte *cpn0010.1* bislang nicht erfolgreich kloniert werden.

Durch Lokalisationsanalysen in Hefe können unter Umständen Hinweise auf einen Organelltropismus und/oder mögliche Funktionen bakterieller Proteine gewonnen werden. Ein GFP-fusioniertes, N-terminal um 13 Aminosäuren verkürztes CPn1054-Protein zeigte in Hefezellen eine punktförmige Akkumulation an der Zellperipherie (Herbst, 2011; Abb. 4-33). Zusätzlich konnte eine Assoziation mit dem Endoplasmatischen Retikulum beobachtet werden (Singer, 2012; Abb. 4-33). Diese Lokalisation zeigten neben dem beschriebenen Fusionskonstrukt sowohl der CPn1054 N-Terminus (AS 38-334) als auch der CPn1054 C-Terminus (AS 353-811) separat (Singer, 2012). Ein Fusionsprotein aus GFP und CPn0043 AS 14-642 zeigte in Hefe die Bildung zytoplasmatischer, punktförmiger Aggregate sowie vereinzelt eine Assoziation mit der Zellperipherie (Abb. 4-33). Die Unterschiede in der Lokalisation könnten in der C-terminalen Verkürzung liegen, die CPn0043 (642 AS) gegenüber CPn1054 (811 AS) aufweist (Abb. 1-6). Möglicherweise befindet sich innerhalb der C-terminalen 169 AS von CPn1054 eine Membran-assoziiierende Domäne, da wie bereits erwähnt der CPn1054 C-Terminus separat in Hefe mit dem ER und der Zellperipherie assoziierte (Singer, 2012). Es konnte im Fall von CPn0043 allerdings keine Lokalisation am Endoplasmatischen Retikulum beobachtet werden, wie sie bei CPn1054 auftrat, obgleich eine ER-Assoziation vermutlich durch Transmembrandomänen vermittelt wird, die CPn0043 ebenfalls besitzt. Rückschlüsse auf die Funktionen der Proteine ergaben sich durch die Analysen letztlich nicht.

### 5.2.1 CPn1054 besitzt mehrere putative humane Interaktionspartner

Der mit CPn1054 durchgeführte Hefe-Zwei-Hybrid Screen nach potentiellen humanen Interaktionspartnern brachte insgesamt 14 Kandidaten hervor, von denen fünf in mehr als einem Bank-Plasmid codiert waren (Tab. 4-4). In allen Plasmiden wurde ein erhebliches Fragment des jeweiligen Proteins, teilweise sogar die Vollängen-Version, codiert. Ebenso befand sich in allen Fällen die codierende Sequenz in demselben Leseraster wie die *GAL4*-Aktivierungsdomäne. Die identifizierten Kandidaten decken mehrere funktionelle Klassen ab, wie eine Recherche in den Datenbanken KEGG und UniProt zeigte (Abb. 4-20). Bei drei der Kandidaten (ACTN1, KIF5A, TNNI3) handelt es sich um Zytoskelett-assoziierte Proteine. Transfiziertes CPn1054-GFP Fusionsprotein ko-lokalisierte in Humanzellen vereinzelt mit dem Aktin-Zytoskelett (Abb. 4-21). Da bekannt ist, dass Chlamydien mit Komponenten des Aktin-Zytoskeletts sowie mit Mikrotubuli wechselwirken, könnte es interessant sein, diese

Kandidaten weiter zu verfolgen. Weitere drei potentielle Interaktionspartner sind Chromosom-assoziierte Proteine. ZWINT lokalisiert am Kinetochor und schafft vermutlich eine Verbindung zwischen dem inneren und dem äußeren Kinetochor (Vos, Famulski *et al.*, 2011). BRPF3 und MORF4A1 sind Komponenten unterschiedlicher Histon-Acetylase-Komplexe, MORF4A1 ist zusätzlich auch noch in einem Histon-Deacetylase-Komplex zu finden (Ullah, Pelletier *et al.*, 2008; Pena, Tominaga *et al.*, 2011). Durch eine Interaktion mit diesen Proteinen könnten die Chlamydien Einfluss auf die Transkriptions-Regulation nehmen. Bei NGFRAP1 handelt es sich um ein Adapterprotein, das an der Signalweiterleitung bei einer NGF-induzierten Apoptose in Nervenzellen beteiligt ist (Mukai, Hachiya *et al.*, 2000). Eine *C. pneumoniae*-Infektion ist als ein fördernder Faktor bei der Entwicklung von Krankheiten des zentralen Nervensystems wie beispielsweise Alzheimer in Betracht gekommen (Stratton & Sriram, 2003). Bei einem Übergreifen einer Infektion auf das zentrale Nervensystem könnte durch eine Interaktion mit NGFRAP1 eine Apoptose der Nervenzelle verhindert werden. Das Protein CCHCR1 spielt vermutlich eine Rolle in der Regulation von Wachstum und/oder Differenzierung von Keratinozyten sowie der Regulation des Steroid-Metabolismus der Hautzellen (Suomela, Elomaa *et al.*, 2003; Tiala, Suomela *et al.*, 2007). Auch wenn alle bis hierhin genannten Kandidaten im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter analysiert wurden, wäre dies für die Zukunft sicherlich eine interessante Option. Zunächst sollten die Interaktionen auf biochemischem Weg bestätigt werden und im Fall eines positiven Ergebnisses könnten sich Kollokalisierungs-Analysen in infizierten Zellen anschließen.

### 5.2.2 Das COP9 Signalosom ist ein mögliches Ziel chlamydialer Effektorproteine

Die COPS4-Untereinheit des COP9 Signalosoms (siehe Kap. 1.6) wurde in zwei isolierten Bank-Plasmiden als Volllängen-Protein codiert, das ebenfalls vollständige COPS6 sogar in vier Plasmiden. Aufgrund der hohen Abundanz dieser zwei Untereinheiten desselben Komplexes unter den Kandidaten wurden die weiteren Analysen hierauf fokussiert. Mittels eines seriellen Verdünnungstropftests konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von CPn1054 mit COPS4 stärker ist als diejenige mit COPS6 (Abb. 4-23). Von allen im Screen isolierten Kandidaten zeigten die beiden COP9-Untereinheiten als einzige zudem eine Interaktion mit CPn0043. In diesem Fall war die Interaktion mit COPS6 vergleichsweise stärker als die mit COPS4 (Abb. 4-31 B). Dies lässt vermuten, dass bestimmte Unterschiede in den Sequenzen der insgesamt sehr ähnlichen Proteine CPn1054 und CPn0043 Einfluss auf die Bindungsaffinität haben könnten. Durch Far Western Blots konnten die Interaktionen von COPS4 und COPS6 mit CPn1054 bzw. CPn0043 bestätigt werden (Abb. 4-25 und Abb. 4-32). Im Fall von CPn0043 war das erhaltene Signal dabei deutlicher als bei CPn1054. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Konzentration an CPn1054-GFP Fusionsprotein in dem

Lysat, mit welchem der Blot inkubiert wurde, geringer war verglichen mit dem CPn0043-GFP enthaltenden Lysat (Abb. 4-25 A und Abb. 4-32 A). CPn0043 wurde unter Auslassung der Transmembrandomänen (AS 80-642) als Fusion mit GFP exprimiert, CPn1054 unter Auslassung der kompletten InCA-Domäne (AS 200-811). Es konnte bereits gezeigt werden, dass der CPn1054 C-Terminus (AS 353-811) in Hefe mit dem ER sowie mit der Zellperipherie assoziiert (Singer, 2012). Über die Lokalisation von CPn0043 AS 80-642 in Hefe ist nichts bekannt, möglicherweise ist das Protein im Zytosol lokalisiert. Somit wäre das CPn0043 Fusionsprotein vermutlich leichter in Lösung zu bekommen, was die Unterschiede in den Konzentrationen der Lysate erklären würde.

Um die interagierende Region von CPn1054 näher einzugrenzen, wurden verschiedene Fragmente des Proteins subkloniert und im Hefe-Zwei-Hybrid System getestet. Es konnte auf diese Weise herausgefunden werden, dass der zentrale Bereich von CPn1054 bestehend aus den Aminosäuren 201 bis 600, welcher die komplette Domäne unbekannter Funktion DUF1978 enthält, die Interaktion sowohl mit COPS4 als auch mit COPS6 vermittelt (Abb. 4-24). Die durch diese als M-Fragment bezeichnete Region vermittelte Interaktion war stärker als die des im Screen eingesetzten Abschnitts von CPn1054 AS 201 bis 811. Der C-Terminus von CPn1054 (AS 580-811) zeigte hingegen keine Interaktion mit den beiden COP9-Untereinheiten (Abb. 4-24). In dem von Frau Dr. Kerres und Frau Dr. Herbst durchgeführten Effektorscreen in Hefe waren zwei N-terminale sowie ein C-terminales Fragment von CPn1054 als wachstumshemmend identifiziert worden (Abb. 4-10). Diese Fragmente besitzen keinerlei Überlapp mit dem M-Fragment, das die Interaktionen mit den COP9-Untereinheiten vermittelt. Somit ist die beobachtete Wachstumshemmung in Hefe vermutlich nicht auf eine Interaktion mit dem Hefe-Signalosom zurückzuführen. Zudem sind die einzelnen Untereinheiten des Signalosoms zwischen Mensch und Hefe nicht sehr stark konserviert, so dass nicht sicher ist, ob es auch zwischen CPn1054 und den Hefe-Signalosom-Untereinheiten zu einer Interaktion kommen würde. Der Effekt auf das Hefe-Wachstum könnte demnach durch eine Interaktion mit anderen Interaktionspartner-Kandidaten, wie beispielsweise Zytoskelett-assoziierten Proteinen, oder durch eine von Membran-assoziierten Domänen bzw. Transmembrandomänen hervorgerufene Inhibition ausgelöst worden sein. Aus Zeitgründen konnte eine Subklonierung von CPn0043-Fragmenten nicht mehr durchgeführt werden, um auch hier die interagierende Region einzugrenzen. Es wäre interessant zu sehen, ob auch in diesem Fall ein die DUF1978-Domäne enthaltendes Fragment die Interaktionen vermittelt. Zudem könnten weitere Mitglieder der CPn1054-Proteinfamilie auf eine Interaktion mit COPS4 und COPS6 getestet werden, oder zumindest solche, die ebenfalls eine DUF1978-Domäne enthalten. Es wäre weiterhin sehr interessant, die übrigen sechs COP9-Untereinheiten auf eine mögliche Interaktion mit CPn1054 und CPn0043 zu testen, auch wenn diese nicht im Screen isoliert worden sind.

Die Detektion von endogenem COPS4 und COPS6 in infizierten und nicht-infizierten Humanzellen über Immunfluoreszenz konnte leider nicht durchgeführt werden. Die von verschiedenen Antikörper-Herstellern zur Verfügung gestellten Beispielbilder zeigten uneinheitliche Färbungsmuster für beide Proteine. Bereits bei der Entdeckung des COP9-Signalosoms waren von zwei Arbeitsgruppen unterschiedliche Beobachtungen zur Lokalisation des Komplexes gemacht worden. Während Wei *et al.* mittels gegen COPS1 sowie COPS8 gerichteter Antikörper den Komplex vorwiegend im Nukleus und zu einem geringen Anteil im Zytoplasma lokalisieren konnten, beobachteten Seeger *et al.* mittels eines gegen COPS3 generierten Antikörpers eine zytoplasmatische Färbung mit Konzentration um den Kern herum (Wei & Deng, 1998; Seeger, Kraft *et al.*, 1998). Mittlerweile wird angenommen, dass das COP9 Signalosom in Form von unterschiedlichen Subkomplexen vorliegt, deren Zusammensetzung und Lokalisation sich in Abhängigkeit von den benutzten Zellen, der Zellzyklus-Phase und sonstigen experimentellen Bedingungen unterscheiden. Die genannten Arbeitsgruppen hatten unterschiedliche Zelllinien in ihren Versuchen verwendet. Da nicht bekannt war, welche Lokalisation bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen zu erwarten wäre, wurde auf den Erwerb von Antikörpern verzichtet. COPS4 und COPS6 wurden stattdessen in einen humanen Transfektionsvector kloniert und mittels des fusionierten Fluoreszenzproteins mCherry in Humanzellen lokalisiert. Unter diesen starken Expressionsbedingungen zeigte sich für beide Fusionsproteine eine Lokalisation im Zytosol, wo sie mit retikulären Strukturen, die eventuell das ER darstellen könnten, assoziierten. Das COPS4-Fusionsprotein sparte den Zellkern komplett aus, wohingegen das COPS6-Protein auch im Kern zu finden war (Abb. 4-26). Eine Assoziation mit retikulären Strukturen war für das COP9 Signalosom bislang nicht beschrieben worden. Es könnte daher sein, dass dies eine unspezifische Lokalisation darstellt, die der ektopischen Expression von großen Mengen des Proteins geschuldet ist. Es wäre eine Option, das Expressionsniveau der Fusionsproteine durch Nutzung alternativer Vektoren bzw. Promotoren zu variieren und nochmals die Lokalisation zu analysieren. Die Tatsache, dass die zwei Untereinheiten unterschiedliche Lokalisationsmuster zeigen, könnte zudem bedeuten, dass nicht beide oder möglicherweise keine von beiden in den COP9 Komplex integriert sind/ist. Möglicherweise ist es zu einer Bildung bestimmter COP9 Subkomplexe gekommen. Die übermäßige Expression einer einzelnen Untereinheit könnte somit die Assemblierung des Holokomplexes beeinflussen und darüber könnten wiederum zelluläre Abläufe verändert werden.

Nach einer *C. pneumoniae*-Infektion COPS4- bzw. COPS6-transfizierter Humanzellen änderte sich nichts im Lokalisationsmuster beider Fusionsproteine (Abb. 4-27). Die zuvor zu beobachtende retikuläre Struktur im Zytosol war nicht mehr so deutlich ausgeprägt, was vermutlich mit der Komprimierung des Zytosols durch die Anwesenheit der chlamydialen Inklusion zusammenhängt. Das COPS4-Fusionsprotein sparte weiterhin den Zellkern aus. Im Fall des COPS6-Proteins schien eine Verstärkung des Signals im Zellkern infizierter gegenüber

nicht-infizierter Zellen vorzuliegen, dies konnte jedoch nicht immer beobachtet werden und bedarf weiterer Analysen. Es kann aber festgehalten werden, dass eine deutliche Akkumulation der Fusionsproteine an der Inklusionsmembran ausblieb. Es trat lediglich eine leichte Überschneidung der Signale für CPn1054 und mCherry an der Inklusionsperipherie auf (Abb. 4-27). Möglicherweise wird eine stattfindende Signalüberlagerung jedoch von dem sehr starken mCherry-Signal ausgehend von der hohen Konzentration an Fusionsprotein in der Zelle überdeckt. Denkbar wäre auch, dass die Interaktionen von COPS4 und COPS6 mit CPn1054 durch die Anwesenheit des mCherry-Proteins sterisch behindert werden. Um dies zu testen, könnte das Reporterprotein in anderer Orientierung fusioniert und das Experiment noch einmal wiederholt werden. Gegen COPS5, die aktive Untereinheit des Signalosom-Komplexes, wurde ein IF-geeigneter Antikörper erworben. Es zeigte sich, dass endogenes COPS5 während einer *C. pneumoniae*-Infektion nicht zur Inklusion rekrutiert wird (Abb. 4-28). Somit geht anscheinend weder monomeres noch komplexiertes COPS5 eine Wechselwirkung mit chlamydialen Proteinen an der Inklusionsmembran ein. Möglicherweise wird eine Interaktion von CPn1054 mit COPS4 und/oder COPS6, die das komplette COP9-Signalosom zur Inklusion rekrutieren würde, sterisch behindert, wenn die Untereinheiten in den Holokomplex integriert sind. Somit könnten endogenes COPS4 und COPS6 entweder nur in Monomer-Form eine Interaktion eingehen, oder aber in Form von Subkomplexen, welche kein COPS5-Protein enthalten.

Durch das Verfolgen der Expression diverser COP9-Untereinheiten über den Infektionsverlauf hinweg sollte weiter untersucht werden, ob Chlamydien Einfluss auf das Signalosom nehmen. Zusammengefasst zeigten die ersten Expressionsdaten, dass die Niveaus an COPS1-, COPS6- sowie COPS7-Protein im Verlauf der Infektion abnehmen, wengleich mit unterschiedlicher Kinetik. Im Gegensatz dazu war die Expression an COPS5 in der Infektion deutlich erhöht (Abb. 4-29). Mit Ausnahme von COPS6 sind alle genannten Unterheiten bislang nur einmalig analysiert worden, sodass eine Bestätigung dieser Ergebnisse erforderlich ist. Die beobachteten Veränderungen in der Expression könnten bedeuten, dass das Signalosom tatsächlich eine Rolle während der Chlamydieninfektion spielt. Um hier weitere Hinweise zu gewinnen, könnten Untereinheiten des COP9 Signalosoms beispielsweise mittels siRNA herunterreguliert werden. Durch eine Infektion entsprechend manipulierter Zellen und einen Vergleich mit infizierten Zellen, welche das Signalosom auf normalem Niveau exprimieren, könnten eventuell Hinweise auf eine Beeinträchtigung oder eine Förderung der Chlamydien-Entwicklung durch Aktivitäten des Signalosoms gewonnen werden. Das vorläufige Ergebnis, dass während einer Chlamydieninfektion einzelne Untereinheiten eine Expressionsabnahme zeigen, spräche dafür, dass bei einer Herunterregulation des COP9-Komplexes die chlamydiale Entwicklung begünstigt wird. Dies würde jedoch nicht für COPS5 gelten, das in der ersten Analyse eine Zunahme der Expression während der Infektion zeigte. Bei einer Herunterregulation von

COPS5 mittels siRNA und nachfolgender Infektion der Zellen könnte eventuell ein für die Chlamydien positiver Effekt ausbleiben. Ein Zusammenhang zwischen der potentiellen Interaktion von COPS4 und COPS6 mit CPn1054 (sowie eventuell CPn0043) und der möglichen Veränderung in der Expression diverser COP9-Untereinheiten konnte bisher noch nicht hergestellt werden. Hierzu könnte beispielsweise CPn1054-Antikörper in infizierte Zellen transfiziert werden, um auf diese Weise eine mögliche Interaktion mit COPS4 und COPS6 zu unterbinden, und in den so behandelten Zellen wiederum das Expressionsniveau von COP9-Untereinheiten verfolgt werden. Ein solches Experiment birgt jedoch die Gefahr, dass die transfizierten Antikörper die Chlamydienbiologie grundlegend beeinträchtigen und dadurch unbeabsichtigte Veränderungen in der Zelle hervorrufen könnten.

### **5.2.3 Welche Auswirkungen könnte eine Manipulation des COP9 Signalosoms haben?**

Das COP9 Signalosom ist ein multifunktionaler Proteinkomplex, der bei vielen Regulations- und Signalwegen innerhalb der Zelle eine Rolle spielt. Es sind daher noch weitere Experimente notwendig, um herauszufinden, worin der Vorteil einer Einflussnahme auf diesen Komplex für die Chlamydien liegen könnte. Auch sind noch nicht alle Fragen bezüglich des Auftretens verschiedener COP9 Subkomplexe und deren Funktionen sowie der unterschiedlichen Lokalisation vom COP9 Signalosom bzw. von COP9 Subkomplexen und deren Bedeutung geklärt, was das Aufstellen von Hypothesen zusätzlich erschwert. Konkrete Funktionen konnten bislang lediglich dem Holokomplex sowie dem sog. „Mini-CSN“ bestehend aus den Untereinheiten COPS4/5/6/7/8 zugewiesen werden.

Das COP9-Signalosom vermittelt die Deneddylierung von Cullin-RING Ubiquitin-Ligasen (CRL). Das katalytische Zentrum liegt innerhalb der COPS5-Untereinheit, zur Ausführung der Deneddylierung muss COPS5 allerdings in den Holokomplex integriert sein. Vermutlich wirken andere Untereinheiten des Komplexes als Bindestellen, um die Ligasen korrekt zu platzieren. Es konnte beispielsweise eine Interaktion zwischen COPS2 und der Cullin-Untereinheit der Ubiquitin-Ligase nachgewiesen werden (Yang, Menon *et al.*, 2002). In früheren Studien wurde gezeigt, dass eine verminderte Expression einzelner Untereinheiten des COP9 Signalosoms zu einer proportionalen Abnahme des Holokomplexes in der Zelle führt (Peth, Boettcher *et al.*, 2007; Peth, Berndt *et al.*, 2007). Eine Sonderposition scheint hierbei jedoch COPS5 zu besitzen. In diesem Fall hatte eine Herunterregulation der Untereinheit über siRNA keinen Effekt auf die Stabilität der übrigen COP9-Komponenten und führte zur Assemblierung eines „Gerüst-Komplexes“ aus den anderen Untereinheiten, in den kein COPS5 integriert war (Peth, Berndt *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte ein erster Hinweis darauf gewonnen werden, dass die Expression von COPS1, COPS6 sowie COPS7 im Verlauf einer Chlamydieninfektion abnimmt (Abb. 4-29). In Anlehnung an die oben beschriebenen Arbeiten würde dies bedeuten, dass die Menge an COP9-Holokomplex in

infizierten Zellen abnimmt und daher die Deneddylierungs-Aktivität vermindert wird. Die Folge wäre eine Inaktivierung von Cullin-RING Ligasen und darüber die Deregulation der durch sie vermittelten Protein-Degradation. Zu den Substraten von Cullin-RING Ubiquitin-Ligasen zählen vor allem diverse Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktions-Moleküle und Proteine, die eine Rolle bei der Zellzyklus-Regulation spielen (Petroski & Deshaies, 2005). Ob und auf welche Weise CRL-Zielproteine während einer Chlamydieninfektion beeinflusst werden, muss durch weitere Experimente wie die Verfolgung der Expressionsniveaus ausgewählter Proteine über Western Blotting geklärt werden. Es ist bekannt, dass Chlamydien über die Sekretion von Proteasen wie beispielsweise CPAF Wirtszellproteine abbauen. Die Manipulation des COP9 Holokomplexes würde eine zusätzliche Möglichkeit zur Kontrolle des Proteinabbaus in der Wirtszelle darstellen. Für andere Bakterien konnte gezeigt werden, dass sie bestimmte Effektorproteine, sog. Cif's (*cycle inhibiting factors*), sekretieren, welche Nedd8 deamidieren (Crow, Hughes *et al.*, 2012). Dies führt zur Inaktivierung von CRLs und zu einem Zellzyklus-Arrest infizierter Zellen am Übergang von der G1- zur S-Phase oder der G2- zur M-Phase. Es konnte ferner gezeigt werden, dass die Zellzyklus-regulierenden Proteine p21 sowie p27 in infizierten Zellen akkumulieren (Crow, Hughes *et al.*, 2012).

Das deubiquitylierende Enzym USP15 assoziiert mit dem Signalosom (Hetfeld, Helfrich *et al.*, 2005). Es konnte nachgewiesen werden, dass USP15 Ubiquitin-Reste vom NFκB-Inhibitor IκBα entfernt (Schweitzer, Bozko *et al.*, 2007). Hierdurch wird der Inhibitor stabilisiert und der NFκB-Signalweg inhibiert. Im Fall eines Ausbleibens der CSN-assoziierten USP15-Aktivität würde IκBα abgebaut und der NFκB-Signalweg aktiviert. Die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors als Folge einer *C. pneumoniae*-Infektion ist beschrieben worden (Gencay, Tamm *et al.*, 2003; Miller, Selzman *et al.*, 2000). *C. trachomatis* hingegen sekretiert das Protein *ChlaDub1*, welches IκBα deubiquityliert, sowie CT441/Tsp, das die NFκB-Untereinheit p65 spaltet, wodurch jeweils der NFκB-Signalweg inhibiert wird (LeNegrata, Krieg *et al.*, 2008; Zhong, 2011). In *C. pneumoniae* sind diese Effektorproteine nicht vorhanden, weshalb es gut denkbar wäre, dass hier der NFκB-Signalweg über andere Proteine und in anderer Weise beeinflusst wird. Es gibt Beispiele für eine gegensätzliche Manipulation dieses Signalwegs durch Pathogene. Während einer *Legionella pneumophila*-Infektion wird der NFκB-Signalweg aktiviert, was zur Bildung inflammatorischer Chemokine und zur Expression antiapoptotischer Proteine führt (Luo, 2011). *Salmonella typhimurium* und *Yersinia*-Spezies sekretieren hingegen Effektorproteine, die den NFκB-Signalweg inhibieren (Angot, Vergunst *et al.*, 2007; Agbor & McCormick, 2011). Ob in *C. pneumoniae*-infizierten Zellen die Degradation von IκBα verstärkt ist und dies verantwortlich für eine NFκB-Aktivierung sein könnte, müsste durch Analyse des Expressionsniveaus des Inhibitors überprüft werden.

Der oben bereits erwähnte COP9 Subkomplex bestehend aus COPS4/5/6/7/8 („Mini-CSN“) vermittelt die Degradation des Zellzyklus-regulierenden Proteins p27. Bei p27 handelt es sich um einen CDK (*cyclin dependent kinase*)-Inhibitor, der den Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus kontrolliert (Yang, Menon *et al.*, 2002). Eine hohe p27-Konzentration in der Zelle hat einen Arrest in der G1-Phase zur Folge. Der COP9 Subkomplex transportiert p27 aus dem Zellkern ins Zytoplasma, wo es ubiquitinyliert und nachfolgend abgebaut wird (Tomoda, Kubota *et al.*, 2002). Würde man annehmen, dass die Menge dieses COP9 Subkomplexes während der Infektion ebenfalls abnimmt, da die Konzentration der einzelnen Untereinheiten abnimmt, so würde dies zu einer Deregulation des Zellzyklus führen: p27 würde nicht mehr effizient abgebaut und die Zellen würden in der G1-Phase zurückgehalten. Tatsächlich ist in Zellen, die COPS1 siRNA exprimieren, der Abbau von p27 beeinträchtigt (Peth, Berndt *et al.*, 2007). Falls sich das zu beobachtende erniedrigte COPS1-Niveau in *C. pneumoniae*-infizierten Humanzellen verifizieren lässt (Abb. 4-29), spräche dieser Umstand dafür, dass hier ebenfalls eine erhöhte p27-Konzentration in den Zellen vorliegen könnte. COP9 Signalosom-assoziierte Kinasen phosphorylieren den Tumor-Suppressor p53 und bewirken dessen Degradation (Bech-Otschir, Kraft *et al.*, 2001). p53 wird in der Zelle als Antwort auf beispielsweise DNA-Schädigung aktiviert und vermittelt einen Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase oder am Übergang von der G2- zur M-Phase (Bai & Zhu, 2006). Wären die Kinasen ohne Assoziation mit dem Signalosom inaktiv, so würde die p53-Konzentration in der Zelle erhöht, was wiederum einen Zellzyklus-Arrest zur Folge hätte. Es wäre daher interessant, die Zellzyklus-Geschwindigkeit der im Rahmen dieser Arbeit benutzten Zelllinien während einer Infektion zu untersuchen. Mahalingam *et al.* konnten zeigen, dass COPS6 mit dem HIV-Protein Vpr interagiert. Diese Interaktion führt zu einer Veränderung der COPS6-Lokalisation vom Nukleus hin zur nukleären Peripherie und bewirkt einen Zellzyklus-Arrest beim Übergang von der G2- zur M-Phase. Zudem führt eine Herunterregulation der COPS6-Expression ebenfalls zu einem Zellzyklus-Arrest (Mahalingam, Ayyavoo *et al.*, 1998). Während einer Chlamydieninfektion konnte keine Veränderung der Lokalisation von Fluoreszenzprotein-markiertem COPS6- oder COPS4-Protein beobachtet werden, was aber wie bereits diskutiert an der starken ektopischen Expression liegen könnte und über die Detektion der endogenen Proteine noch einmal verifiziert werden müsste. Eine Abnahme des COPS6-Proteinniveaus während einer *C. pneumoniae*-Infektion konnte hingegen nachgewiesen werden (Abb. 4-29). Es könnte hier also ebenfalls ein Arrest in der G2-Phase die Folge sein.

Im Gegensatz zu den Untereinheiten des „Gerüst-Komplexes“ ist als vorläufiges Ergebnis für COPS5 eine erhöhte Proteinexpression während einer *C. pneumoniae*-Infektion zu beobachten (Abb. 4-29). Grundsätzlich scheint die Expression der COP9 Komplex-Untereinheiten ko-reguliert zu sein. So konnte gezeigt werden, dass *COPS1*-mRNA das Ziel einer spezifischen Form von miRNA ist, welche die Translation inhibiert, und auch die

übrigen Untereinheiten des Signalosoms Bindestellen für diese miRNA aufweisen (Leppert, Henke *et al.*, 2011). Die Überexpression von COPS1 führte zu einer koordinierten Induktion der Expression aller anderen COP9-Untereinheiten, vermutlich durch ein Abfangen der miRNAs über COPS1 (Leppert, Henke *et al.*, 2011). Man könnte nun die Hypothese aufstellen, dass unmittelbar nach Start einer Chlamydieninfektion die Expression aller COP9-Untereinheiten auf noch ungeklärtem Weg stimuliert wird. COPS4, COPS6 sowie eventuell noch weitere Untereinheiten könnten durch Interaktion mit chlamydialen Proteinen an die Inklusionsmembran gebunden werden. CPn1054 zeigt ab einem Zeitpunkt von 48 hpi eine Inklusionsmembran-Lokalisation und steht vermutlich zu früheren Zeitpunkten nicht für eine Interaktion mit Wirtszellproteinen zur Verfügung. Jedoch könnte die Interaktion mit COP9-Untereinheiten in der frühen Infektion von anderen chlamydialen Effektorproteinen, eventuell anderen Mitgliedern der CPn1054-Familie, vermittelt werden. Durch das Abfangen von COP9 Untereinheiten an der Inklusion stünden diese nicht zur Bildung des Holokomplexes zur Verfügung und vermutlich wäre der Komplex damit instabil und würde zerfallen. Da jedoch die Untereinheiten des Gerüstkomplexes nur in Komplex-Form stabil sind, würden sie schnell abgebaut. Im Gegensatz dazu würde sich COPS5, das auch außerhalb des Holokomplexes stabil ist, in den infizierten Zellen anreichern. COPS5 liegt hierbei möglicherweise in der Monomer-Form oder in Assoziation mit anderen zellulären Interaktionspartnern vor. Bei vielen Krebs-Arten ist die COPS5-Expression in den betroffenen Zellen erhöht und es wurde die Hypothese aufgestellt, dass COPS5 in Assoziation mit dem/den noch unbekanntem Interaktionspartner/n die Zellproliferation stimulieren könnte (Fukumoto, Tomoda *et al.*, 2005). Dies steht der zuvor diskutierten Möglichkeit eines Zellzyklus-Arrestes bei Fehlen des COP9-Signalosoms entgegen. Daher sind weitere Experimente essentiell, um zu einer gesicherten Aussage zu kommen.

Insgesamt ergäben sich also viele Möglichkeiten zur Beeinflussung des Zellzyklus durch eine Manipulation des COP9-Signalosoms. Für *C. trachomatis* wurde eine Inhibierung des Zellzyklus berichtet. Hier wird während einer Infektion CDK1 (*cyclin dependent kinase 1*), welche am Übergang von der G2- zur M-Phase beteiligt ist, herunterreguliert; zudem wird das mitotische Cyclin B1 gespalten (Balsara, Misaghi *et al.*, 2006). Für *C. pneumoniae* zeigen bisherige Daten dagegen eine Förderung der Zellteilung. In glatten Muskelzellen des Blutgefäß-Systems ist während einer Infektion eine erhöhte Zellproliferation zu verzeichnen, vermittelt durch die Aktivität der Transkriptionsfaktoren NFκB sowie AP-1. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die chlamydiale Proteinsynthese zum Auslösen dieses Effekts notwendig ist (Miller, Selzman *et al.*, 2000). Der AP-1 Transkriptionsfaktor ist ein Dimer, zusammengesetzt aus c-Jun und Fos. COPS5 wirkt stabilisierend auf c-Jun, so dass hier möglicherweise ein Zusammenhang bestehen könnte (Claret, Hibi *et al.*, 1996). Gencay und Kollegen konnten zeigen, dass *C. pneumoniae* in Epithelzellen der Lunge die Zellproliferation fördert (Gencay, Tamm *et al.*, 2003). Diese Autoren konnten ebenfalls eine Aktivierung von

NFκB nachweisen, jedoch nicht von AP-1. *Chlamydia pneumoniae* bindet und aktiviert zudem den EGF-Rezeptor, wodurch unter anderem Signalwege initiiert werden, welche die Zellproliferation fördern (Gui & Shen, 2012; Mülleken, Becker & Hegemann, 2013). Wie bereits erwähnt, müssten die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen auf ihre Zellproliferations-Geschwindigkeit hin untersucht werden, ebenso wie auf die Expression der Proteine, die hier regulierende Funktionen ausüben und durch das COP9-Signalosom kontrolliert werden (p27, p53).

Das COP9-Signalosom beeinflusst des Weiteren die Stabilität des Transkriptionsfaktors HIF-1α (*hypoxia inducible factor 1 α*). Dieser Transkriptionsfaktor wird bei niedrigem Sauerstoff-Gehalt der Zelle (Hypoxie) aktiviert und führt zur Transkription von Genen, deren codierte Proteine beispielsweise eine Rolle in der Glukose-Aufnahme, der Angiogenese, Zellproliferation oder Apoptose spielen (Smith *et al.*, 2008). Es hat sich gezeigt, dass COPS5 mit HIF-1α interagiert und das Expressionsniveau des Transkriptionsfaktors hierdurch stabilisiert wird (Bae, Ahn *et al.*, 2002; Bemis, Chan *et al.*, 2004). Da der HIF-1α-Abbau auf der anderen Seite durch Cullin-basierte Ubiquitin-Ligasen vermittelt wird, wurde folgendes Modell zum Einfluss des COP9 Signalosoms bzw. der Untereinheit COPS5 auf das HIF-1α-Expressionsniveau aufgestellt: COPS5 in der Monomer-Form verhindert die HIF-1α-Degradation durch Verhinderung von dessen Hydroxylierung, während der Holokomplex durch die Aktivierung entsprechender Ubiquitin-Ligasen für den Abbau von HIF-1α sorgt (Bemis, Chan *et al.*, 2004). In der Chlamydieninfektion würde HIF-1α daher vermutlich stabilisiert werden, zum einen durch den Effekt der Bindung des COPS5-Monomers und zum anderen durch die Verhinderung des Abbaus aufgrund von verminderter Ubiquitin-Ligase-Aktivität, die durch die Abnahme an COP9 Holokomplex zustande kommt. Eine Analyse des HIF-1α-Expressionsniveaus während einer Chlamydieninfektion hat ergeben, dass sowohl im Fall von *C. pneumoniae* als auch von *C. trachomatis* der Transkriptionsfaktor während der frühen Phase der Infektion stabilisiert, späterhin jedoch abgebaut wird (Rupp, Gieffers *et al.*, 2007; Sharma, Machuy *et al.*, 2011). Für *C. pneumoniae* wurde gezeigt, dass für den Abbau die chlamydiale Protease CPAF verantwortlich ist (Rupp, Gieffers *et al.*, 2007). Die Stabilisierung in der frühen Phase der Infektion könnte durch ein erhöhtes COPS5-Niveau bedingt sein, während zu späteren Zeitpunkten der Effekt des Abbaus durch CPAF vorherrschen könnte, obwohl nach den vorläufigen Daten aus der vorliegenden Arbeit die COPS5-Konzentration weiterhin erhöht ist. Andererseits wurde bereits die Hypothese aufgestellt, dass die initiale Stabilisierung von HIF-1α durch eine infektionsbedingte Hypoxie in der Zelle ausgelöst werden könnte (Sharma, Machuy *et al.*, 2011). Möglicherweise handelt es sich auch um einen additiven Effekt.

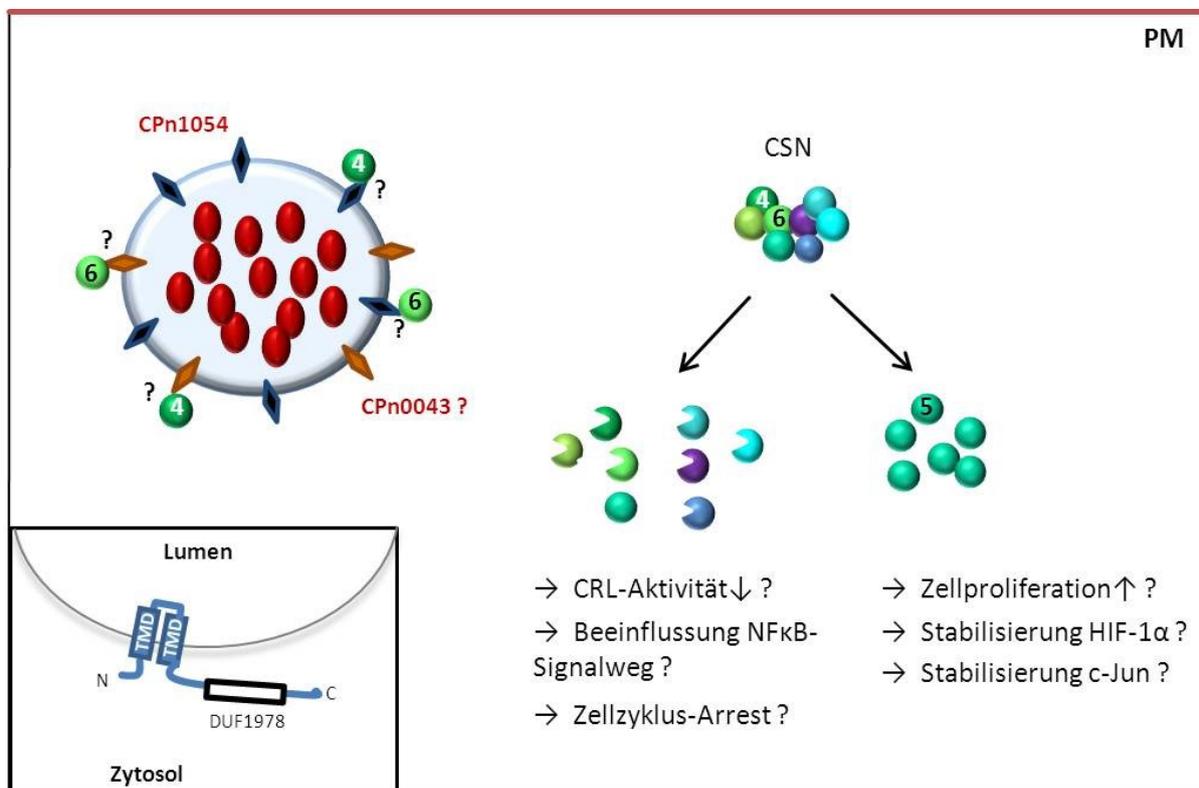
Chlamydien müssen die Wirtszellapoptose inhibieren, um ihren Entwicklungszyklus erfolgreich durchlaufen zu können. Zwei Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass während des Apoptoseprozesses die Signalosom-Untereinheit COPS6 von Caspasen gespalten wird (da

Silva Correia, Miranda *et al.*, 2007; Hetfeld, Peth *et al.*, 2008). Diese Spaltung führt nicht zur Disassemblierung des Holokomplexes, sondern hat vielmehr eine erhöhte Deneddylierungs-Aktivität zur Folge (Hetfeld, Peth *et al.*, 2008). Dies könnte zu einer verstärkten Aktivität von Cullin-RING-Ligasen und erhöhtem Protein-Abbau während des Apoptose-Prozesses führen. Eine Verminderung der Signalosom-Konzentration während der Chlamydieninfektion könnte dem entgegenwirken, was mit dazu beitragen könnte, dass Chlamydien-infizierte Zellen keine Apoptose durchlaufen.

### 5.3 Modell

Zu der putativen Interaktion von CPn0072 mit SLC30A9 liegen noch nicht genügend Daten vor, um hieraus ein Modell der Wirkungsweise von CPn0072 zu postulieren. Die Interaktion muss zunächst bestätigt und weitergehend untersucht werden. Bezüglich CPn1054 kann ein hypothetisches Funktionsmodell aufgestellt werden (Abb. 5-1). CPn1054 befindet sich nach bisherigen Erkenntnissen ab einem Zeitpunkt von etwa 48 hpi zumindest teilweise in der Inklusionsmembran mit Kontakt zum Wirtszellzytosol. Die Region, die in Kontakt mit dem Zytosol steht, ist vermutlich der gesamte C-Terminus ab der zweiten Transmembrandomäne. Innerhalb dieser Region befindet sich die komplette Domäne unbekannter Funktion DUF1978 (siehe Einsatzbild in Abb. 5-1). CPn1054 könnte potentiell mit Wirtszellproteinen interagieren und ein Screen nach humanen Interaktionspartnern mittels Hefe-Zwei-Hybrid brachte 14 Kandidaten hervor. Von diesen wurden die Proteine COPS4 und COPS6, die beide Untereinheiten desselben Proteinkomplexes sind, für weitere Analysen ausgewählt. Die vorliegenden Daten lassen vermuten, dass COPS4 wie auch COPS6 zur Inklusion rekrutiert werden könnten, was jedoch noch direkt zu zeigen wäre durch eine simultane endogene Detektion von sowohl CPn1054 als auch den beiden Kandidaten über Immunfluoreszenz. Allerdings würde CPn1054 vermutlich erst ab dem Zeitpunkt 48 hpi eine Interaktion mit Wirtszellproteinen eingehen können, da die Lokalisation in der Inklusionsmembran erst ab diesem Zeitpunkt zu beobachten ist. Möglicherweise sind weitere Proteine der CPn1054-Familie bereits zu frühen Infektionszeitpunkten an der Inklusionsmembran lokalisiert und vermitteln Interaktion mit COP9-Untereinheiten oder weiteren Wirtsproteinen. Durch ein Abfangen der beiden Untereinheiten COPS4 und COPS6 wären der Signalosom-Holokomplex und/oder Subkomplexe wie das „Mini-CSN“ vermutlich instabil und würden zerfallen, was bei den meisten Untereinheiten deren Abbau zur Folge hätte. COPS5 besitzt jedoch eine Sonderposition und ist auch in Monomer-Form stabil, was zu einer Akkumulation an COPS5-Protein in infizierten Zellen mit fortschreitender Zeit führen würde. Durch den Wegfall des Signalosom-Komplexes sowie das erhöhte Niveau an COPS5-Protein könnten verschiedene zelluläre Prozesse und Signalwege beeinflusst werden, so wie es im vorherigen Unterkapitel erörtert worden ist. Vieles spricht für eine Beeinflussung des Zellzyklus.

Auch wenn gezeigt werden konnte, dass CPn0043 – ein weiteres Mitglied der CPn1054-Proteinfamilie – ebenfalls eine Interaktion mit den COP9-Untereinheiten COPS4 und COPS6 eingeht, so sind hier noch weitergehende Analysen notwendig, um die Rolle von CPn0043 in der Infektion zu untersuchen. Mittels eines Peptid-Antikörpers konnte das Protein in infizierten Zellen nicht detektiert werden. Es bleibt also zu klären, ob CPn0043 tatsächlich exprimiert wird und wo es in der Infektion lokalisiert. Gleiches gilt für alle weiteren Mitglieder der Proteinfamilie, die bislang uncharakterisiert sind und deren Bedeutung in der Infektion ungeklärt ist. Potentiell handelt es sich bei allen Mitgliedern, die eine IncA-Domäne inklusive des doppelt gelappten Transmembranmotivs enthalten, um Inc-Proteine, die Interaktionen mit der Wirtszelle vermitteln könnten. Da viele dieser Proteine zusätzlich die Domäne unbekannter Funktion DUF1978 beinhalten, die nach bisherigen Erkenntnissen die Interaktion mit den Signalosom-Untereinheiten vermittelt, könnten sie ebenfalls mit COPS4 und COPS6 interagieren.



**Abb. 5-1: Hypothetisches Modell zur Funktion von CPn1054 und CPn0043 in der Chlamydien-Infektion.**

Die chlamydialen Proteine sind mit roter Schrift bezeichnet. Das Einsatzbild zeigt die vermutliche Orientierung des CPn1054-Proteins in der Inklusionsmembran. PM: Plasmamembran CSN: COP9 Signalosom CRL: Cullin-RING Ubiquitin-Ligase TMD: Transmembrandomäne N: Amino-Terminus C: Carboxy-Terminus.

## 5.4 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit begonnene Charakterisierung potentieller chlamydialer Effektorproteine muss weiter fortgesetzt werden. Eine Bestätigung der Interaktion von CPn0072 mit dem putativen Zinktransporter SLC30A9 oder auch dem Transkriptionsfaktor CREB3 könnte durch die Auswahl einer geeigneten biochemischen Methode gelingen. Nachfolgend sollten Kollokalisations-Analysen in Chlamydien-infizierten Humanzellen durchgeführt werden. Als besonders interessant könnte sich die weitere bzw. erstmalige Charakterisierung von Mitgliedern der *C. pneumoniae*-spezifischen CPn1054-Proteinfamilie erweisen. Die Tatsache, dass eine derart große Proteinfamilie (die zweitgrößte nach der pmp-Familie) im Genom von *C. pneumoniae* vorhanden ist, suggeriert, dass die einzelnen Mitglieder essentielle Funktionen im Verlauf der Infektion ausüben. Es sollten zunächst die Expression und die Lokalisation der einzelnen Familienmitglieder im Verlauf einer Infektion untersucht werden. Es gilt hier vor allem die Frage zu beantworten, ob alle Proteine exprimiert werden und ob es zu zeitlich versetzten Expressionen oder Inklusions-spezifischen Expressionen von nur einzelnen Mitgliedern kommt. Eventuell können Bedingungen identifiziert werden, die signifikante Veränderungen der Expressionsniveaus hervorrufen. Diese Analysen könnten dabei hilfreich sein herauszufinden, welchen Nutzen die Anwesenheit dieser großen paralogen Proteinfamilie *Chlamydia pneumoniae* bringt. Des Weiteren wäre zu untersuchen, ob eine möglicherweise stattfindende Manipulation des COP9-Signalosoms eine *C. pneumoniae*-spezifische Aktivität ist und verantwortlich für Unterschiede zwischen einer *C. pneumoniae*- und einer *C. trachomatis*-Infektion sein könnte. Es wäre ein guter Ansatz, die Proteinexpression der COP9 Signalosom-Untereinheiten während einer *C. trachomatis*-Infektion zu verfolgen und mit den Expressionsniveaus während einer *C. pneumoniae*-Infektion zu vergleichen.

## Literaturverzeichnis

- AbdelRahman, Y.M. und Belland, R.J. (2005). "The chlamydial developmental cycle." *FEMS Microbiol Rev* **29**(5): 949-959.
- Abromaitis, S. und Stephens, R.S. (2009). "Attachment and Entry of *Chlamydia* Have Distinct Requirements for Host Protein Disulfide Isomerase." *PLoS Pathog* **5**(4): e1000357.
- Agbor, T.A. und McCormick, B.A. (2011). "*Salmonella* effectors: important players modulating host cell function during infection." *Cell Microbiol* **13**(12): 1858-1869.
- Alzhanov, D., Barnes, J., Hruby, D.E. und Rockey, D.D. (2004). "Chlamydial development is blocked in host cells transfected with *Chlamydia caviae* incA." *BMC Microbiol* **4**: 24.
- Angot, A., Vergunst, A., Genin, S. und Peeters, N. (2007). "Exploitation of eukaryotic ubiquitin signaling pathways by effectors translocated by bacterial type III and type IV secretion systems." *PLoS Pathog* **3**(1): e3.
- Arnold, R., Brandmeier, S., Kleine, F., Tischler, P., Heinz, E., Behrens, S., Niinikoski, A., Mewes, H.W., Horn, M. und Rattei, T. (2009). "Sequence-Based Prediction of Type III Secreted Proteins." *PLoS Pathog* **5**(4): e1000376.
- Bae, M.K., Ahn, M.Y., Jeong, J.W., Bae, M.H., Lee, Y.M., Bae, S.K., Park, J.W., Kim, K.R. und Kim, K.W. (2002). "Jab1 interacts directly with HIF-1alpha and regulates its stability." *J Biol Chem* **277**(1): 9-12.
- Bai, L. und Zhu, W.G. (2006). "p53: Structure, Function and Therapeutic Applications." *J Cancer Mol* **2**(4): 141-153.
- Balsara, Z.R., Misaghi, S., Lafave, J.N. und Starnbach, M.N. (2006). "*Chlamydia trachomatis* infection induces cleavage of the mitotic cyclin B1." *Infect Immun* **74**(10): 5602-5608.
- Bannantine, J.P., Rockey, D.D. und Hackstadt, T. (1998). "Tandem genes of *Chlamydia psittaci* that encode proteins localized to the inclusion membrane." *Mol Microbiol* **28**(5): 1017-1026.
- Bannantine, J.P., Griffiths, R.S., Viratyosin, W., Brown, W.J. und Rockey, D.D. (2000). "A secondary structure motif predictive of protein localization to the chlamydial inclusion membrane." *Cell Microbiol* **2**(1): 35-47.
- Beatty, W.L. (2006). "Trafficking from CD63-positive late endocytic multivesicular bodies is essential for intracellular development of *Chlamydia trachomatis*." *J Cell Sci* **119**(Pt 2): 350-359.
- Beatty, W.L. (2008). "Late endocytic multivesicular bodies intersect the chlamydial inclusion in the absence of CD63." *Infect Immun* **76**(7): 2872-2881.
- Bébéar, C. und de Barbeyrac, B. (2009). "Genital *Chlamydia trachomatis* infections." *Clin Microbiol Infect* **15**: 4-10.

- Bech-Otschir, D., Kraft, R., Huang, X., Henklein, P., Kapelari, B., Pollmann, C. und Dubiel, W. (2001). „COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system.“ *EMBO J* **20**(7): 1630-1639.
- Beeckman, D.S.A. und Vanrompey, D.C.G. (2010). "Bacterial Secretion Systems with an Emphasis on the Chlamydial Type III Secretion System." *Curr Issues Mol Biol* **12**: 17-42.
- Beier, H. und Grimm, M. (2001). "Misreading of termination codons in eukaryotes by natural nonsense suppressor tRNAs." *Nucleic Acids Res* **29**(23): 4767-4782.
- Belland, R.J., Zhong, G., Crane, D.D., Hogan, D., Sturdevant, D., Sharma, J., Beatty, W.L. und Caldwell, H.D. (2003). "Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*." *Proc Natl Acad Sci* **100**(14): 8478-8483.
- Belland, R.J., Oullette, S.P., Gieffers, J. und Byrne, G.I. (2004). "*Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis." *Cell Microbiol.* **6**(2): 117-127.
- Bemis, L., Chan, D.A., Finkielstein, C.V., Qi, L., Sutphin, P.D., Chen, X., Stenmark, K., Giaccia, A.J. und Zundel, W. (2004). „Distinct aerobic and hypoxic mechanisms of HIF-alpha regulation by CSN5.“ *Genes Dev* **18**(7): 739-44.
- Betts, H.J., Twigg, L.E., Sal, M.S., Wyrick, P.B. und Fields, K.A. (2008). "Bioinformatic and Biochemical Evidence for the Identification of the Type III Secretion System Needle Protein of *Chlamydia trachomatis*." *J Bacteriol* **190**(5): 1680-1690.
- Betts-Hampikian, H. J. und Fields, K.A. (2010). "The chlamydial type III secretion mechanism: revealing cracks in a tough nut." *Front Microbiol* **1**: 1-13.
- Bhavsar, P.K., Brand, N.J., Yacoub, M.H. und Barton, P.J. (1996). "Isolation and characterization of the human cardiac *troponin I* gene (TNNI3)." *Genomics* **35**(1): 11-23.
- Birkelund, S., Lundemose, A.G. und Christiansen, G. (1990). "The 75-kilodalton cytoplasmic *Chlamydia trachomatis* L2 polypeptide is a DnaK-like protein." *Infect Immun* **58**(7): 2098-2104.
- Blasi, F., Tarsia, P. und Aliberti, S. (2009). "*Chlamydophila pneumoniae*." *Clin Microbiol Infect* **15**: 29–35.
- Brown, W.J., Skeiky, Y.A., Probst, P. und Rockey, D.D. (2002). "Chlamydial antigens colocalize within IncA-laden fibers extending from the inclusion membrane into the host cytosol." *Infect Immun* **70**(10): 5860-5864.
- Burns, D.L. (2003). "Type IV transporters of pathogenic bacteria." *Curr Opin Microbiol* **6**(1): 29-34.
- Burton, M.J. und Mabey, D.C.W. (2009). "The Global Burden of Trachoma: A Review." *PLoS Negl Trop Dis* **3**(10):e460
- Bush, R.M. und Everett, K.D.E. (2001). "Molecular evolution of the *Chlamydiaceae*." *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 203-220.

- Campbell, L.A., Puolakkainen, M., Lee, A., Rosenfeld, M.E., Garrigues, H.J. und Kuo, C.C. (2012). "*Chlamydia pneumoniae* binds to the lectin-like oxidized LDL receptor for infection of endothelial cells." *Microbes Infect* **14**(1): 43-49.
- Carabeo, R.A., Grieshaber, S.S., Fischer, E. und Hackstadt, T. (2002). "*Chlamydia trachomatis* induces remodeling of the actin cytoskeleton during attachment and entry into HeLa cells." *Infect Immun* **70**(7): 3793-3803.
- Carabeo, R.A., Mead, D.J. und Hackstadt, T. (2003). "Golgi-dependent transport of cholesterol to the *Chlamydia trachomatis* inclusion." *Proc Natl Acad Sci* **100**(11): 6771-6776.
- Carabeo, R.A., Grieshaber, S.S., Hasenkrug, A., Dooley, C. und Hackstadt, T. (2004). "Requirement for the Rac GTPase in *Chlamydia trachomatis* invasion of non-phagocytic cells." *Traffic* **5**(6): 418-425.
- Carabeo, R.A., Dooley, C.A., Grieshaber, S.S. und Hackstadt, T. (2007). "Rac interacts with Abi-1 and WAVE2 to promote an Arp2/3-dependent actin recruitment during chlamydial invasion." *Cell Microbiol* **9**(9): 2278-2288.
- Chan, C.P., Kok, K.H. und Jin, D.Y. (2011). "CREB3 subfamily transcription factors are not created equal: Recent insights from global analyses and animal models." *Cell Biosci* **1**(1): 6.
- Chen, A.L., Johnson, K.A., Lee, J.K., Sütterlin, C. und Tan, M. (2012). "CPAF: A Chlamydial Protease in Search of an Authentic Substrate." *PLoS Pathog* **8**(8): e1002842.
- Christian, J., Vier, J., Paschen, S.A. und Häcker, G. (2010). "Cleavage of the NF- $\kappa$ B family protein p65/RelA by the chlamydial protease-like activity factor (CPAF) impairs proinflammatory signaling in cells infected with Chlamydiae." *J Biol Chem* **285**(53): 41320-41327.
- Claret, F.X., Hibi, M., Dhut, S., Toda, T. und Karin, M. (1996). "A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors." *Nature* **383**(6599): 453-7.
- Clausen, J.D., Christiansen, G., Holst, H.U. und Birkelund, S. (1997). "*Chlamydia trachomatis* utilizes the host cell microtubule network during early events of infection." *Mol Microbiol* **25**(3): 441-449.
- Clifton, D.R., Fields, K.A., Grieshaber, S.S., Dooley, C.A., Fischer, E.R., Mead, D.J., Carabeo, R.A. und Hackstadt, T. (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* **101**(27): 10166-10171.
- Clifton, D.R., Dooley, C.A., Grieshaber, S.S., Carabeo, R.A., Fields, K.A. und Hackstadt, T. (2005). "Tyrosine phosphorylation of the chlamydial effector protein Tarp is species specific and not required for recruitment of actin." *Infect Immun* **73**(7): 3860-3868.
- Cocchiaro, J.L., Kumar, Y., Fischer, E.R., Hackstadt, T. und Valdivia, R.H. (2008). "Cytoplasmic lipid droplets are translocated into the lumen of the *Chlamydia trachomatis* parasitophorous vacuole." *Proc Natl Acad Sci* **105**(27): 9379-9384.
- Conant, C.G. und Stephens, R.S. (2007). "*Chlamydia* attachment to mammalian cells requires protein disulfide isomerase." *Cell Microbiol* **9**(1): 222-232.

- Cope, G.A., Suh, G.S., Aravind, L., Schwarz, S.E., Zipursky, S.L., Koonin, E.V. und Deshaies, R.J. (2002). "Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1." *Science* **298**(5593): 608-611.
- Cornelis, G.R. (2006). "The type III secretion injectisome." *Nat Rev Microbiol* **4**(11): 811-825.
- Cortes, C., Rzomp, K.A., Tvinnereim, A., Scidmore, M.A. und Wikel, B. (2007). "*Chlamydia pneumoniae* inclusion membrane protein Cpn0585 interacts with multiple Rab GTPases." *Infect Immun* **75**(12): 5586-5596.
- Crow, A., Hughes, R.K., Taieb, F., Oswald, E. und Banfield, M.J. (2012). "The molecular basis of ubiquitin-like protein NEDD8 deamidation by the bacterial effector protein Cif." *Proc Natl Acad Sci* **109**(27): e1830-8.
- da Silva Correia, J., Miranda, Y., Leonard, N. und Ulevitch, R.J. (2007). "The subunit CSN6 of the COP9 signalosome is cleaved during apoptosis." *J Biol Chem* **282**(17): 12557-12565.
- Daugaard, L., Christiansen, G. und Birkelund, S. (2001). "Characterization of a hypervariable region in the genome of *Chlamydophila pneumoniae*." *FEMS Microbiol Letters* **203**: 241-248.
- Davis, C.H., Raulston, J.E. und Wyrick, P.B. (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): 3413-3418.
- Dehoux, P., Flores, R., Dauga, C., Zhong, G. und Subtil, A. (2011). "Multi-genome identification and characterization of chlamydiae-specific type III secretion substrates: the Inc proteins." *BMC Genomics* **12**: 109.
- Delevoe, C., Nilges, M., Dautry-Varsat, A. und Subtil, A. (2004). "Conservation of the Biochemical Properties of IncA from *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia caviae*." *J Biol Chem* **279**(45): 46896-46906.
- Delevoe, C., Nilges, M., Dehoux, P., Paumet, F., Perrinet, S., Dautry-Varsat, A. und Subtil, A. (2008). "SNARE Protein Mimicry by an Intracellular Bacterium." *PLoS Pathog* **4**(3): e1000022.
- Derré, I., Swiss, R. und Agaisse, H. (2011). "The Lipid Transfer Protein CERT Interacts with the *Chlamydia* Inclusion Protein IncD and Participates to ER-*Chlamydia* Inclusion Membrane Contact Sites." *PLoS Pathog* **7**(6): e1002092.
- DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D., Abe, A., Ruschkowski, S. und Finlay, B.B. (1999). "Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Produces Tir, Which Is Translocated to the Host Cell Membrane but Is Not Tyrosine Phosphorylated." *Infect Immun* **67**(5): 2389-2398.
- Dong, F., Pirbhai, M., Xiao, Y., Zhong, Y., Wu, Y. und Zhong, G. (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): 1861-1864.
- Dong, F., Zhong, Y., Arulanandam, B. und Zhong, G. (2005). "Production of a proteolytically active protein, chlamydial protease/proteasome-like activity factor, by five different *Chlamydia* species." *Infect Immun* **73**(3): 1868-1872.

- Elwell, C.A., Ceesay, A., Kim, J.H., Kalman, D. und Engel, J.N. (2008). "RNA Interference Screen Identifies Abl Kinase and PDGFR Signaling in *Chlamydia trachomatis* Entry." *PLoS Pathog* **4**(3): e1000021.
- Entian, K.D., Schuster, T. 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.E., Bush, R.M. und Andersen, A.A. (1999). "Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms." *Int J Syst Bacteriol* **49**: 415-440.
- Everett, K.D.E. (2000). "*Chlamydia* and *Chlamydiales*: more than meets the eye." *Veterinary Microbiology* **75**: 109-126.
- Fadel, S. und Eley, A. (2007). "*Chlamydia trachomatis* OmcB protein is a surface-exposed glycosaminoglycan-dependent adhesin." *J Med Microbiol* **56**: 15-22.
- Fan, B.T., Lu, H., Hu, H., Shi, L., McClarty, G.A., Nance, D.M., Greenberg, A.H. und Zhong, G. (1998). "Inhibition of Apoptosis in *Chlamydia*-infected Cells: Blockade of Mitochondrial Cytochrome c Release and Caspase Activation." *J Exp Med* **187**(4): 487-496.
- Fan, P., Dong, F., Huang, Y. und Zhong, G. (2002). "*Chlamydia pneumoniae* Secretion of a Protease-Like Activity Factor for Degrading Host Cell Transcription Factors Is Required for Major Histocompatibility Complex Antigen Expression." *Infect Immun* **70**(1): 345-349.
- Fields, K.A., Mead, D.J., Dooley, C.A. und Hackstadt, T. (2003). "*Chlamydia trachomatis* type III secretion: evidence for a functional apparatus during early-cycle development." *Mol Microbiol* **48**(3): 671-683.
- Filloux, A. (2004). "The underlying mechanisms of type II protein secretion." *Biochim Biophys Acta* **1694**(1-3): 163-179.
- Fischer, S.F., Vier, J., Kirschnek, S., Klos, A., Hess, S., Ying, S. und Häcker, G. (2004). "*Chlamydia* Inhibit Host Cell Apoptosis by Degradation of Proapoptotic BH3-only Proteins." *J Exp Med* **200**(7): 905-916.
- Fukumoto, A., Tomoda, K., Kubota, M., Kato, J.Y. und Yoneda-Kato, N. (2005). "Small Jab1-containing subcomplex is regulated in an anchorage- and cell cycle-dependent manner, which is abrogated by ras transformation." *FEBS Lett* **579**(5): 1047-1054.
- Fukushi, H. und Hirai, K. (1992). "Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* Strains Derived from Ruminants." *Int J Syst Bacteriol* **42**(2): 306-308.
- Gencay, M.M., Tamm, M., Glanville, A., Perruchoud, A.P. und Roth, M. (2003). "*Chlamydia pneumoniae* activates epithelial cell proliferation via NF-kappaB and the glucocorticoid receptor." *Infect Immun* **71**(10): 5814-5822.

- Germain, R.N. (1995). "The biochemistry and cell biology of antigen presentation by MHC class I and class II molecules. Implications for development of combination vaccines." *Ann N Y Acad Sci* **754**:114-125.
- Grayston, J.T. (2000). "Background and Current Knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and Atherosclerosis." *J Infect Dis* **181** Suppl 3: 402-410.
- Greub, G. (2010). "International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of the *Chlamydiae*. Minutes of the inaugural closed meeting, 21 March 2009, Little Rock, AR, USA." *Int J Syst Evol Microbiol* **60**: 2691–2693.
- Grieshaber, S., Swanson, J.A. und Hackstadt, T. (2002). "Determination of the physical environment within the *Chlamydia trachomatis* inclusion using ion-selective ratiometric probes." *Cell Microbiol* **4**(5): 273-283.
- Grieshaber, S.S., Grieshaber, N.A. und Hackstadt, T. (2003). "*Chlamydia trachomatis* uses host cell dynein to traffic to the microtubule-organizing center in a p50 dynamitin-independent process." *J Cell Sci* **116**(18): 3793-3802.
- Groisman, R., Polanowska, J., Kuraoka, I., Sawada, J., Saijo, M., Drapkin, R., Kisselev, A.F., Tanaka, K. und Nakatani, Y. (2003). "The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage." *Cell* **113**(3): 357-367.
- Gui, T. und Shen, K. (2012). "The epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in epithelial ovarian cancer." *Cancer Epidemiology* **36**: 490-496.
- Hackstadt, T., Rockey, D.D., Heinzen, R.A. und Scidmore, M.A. (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): 964-977.
- Hackstadt, T., Scidmore-Carlson, M.A., Shaw, E.I. und Fischer, E.R. (1999). "The *Chlamydia trachomatis* InCA protein is required for homotypic vesicle fusion." *Cell Microbiol* **1**(2): 119-130.
- Hahn, D.L., Azenabor, A.A., Beatty, W.L. und Byrne, G.I. (2002). "*Chlamydia pneumoniae* as a respiratory pathogen." *Front Biosci* **7**:e66-76.
- Hatch, T.P. (1996). "Disulfide Cross-Linked Envelope Proteins: the Functional Equivalent of Peptidoglycan in Chlamydiae?" *J Bacteriol* **178**(1): 1-5.
- Herbst, F. (2011). Identifizierung und Charakterisierung potentieller neuer Effektorproteine aus *Chlamydia pneumoniae*. Dissertation am Lehrstuhl für Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Hetfeld, B.K., Helfrich, A., Kapelari, B., Scheel, H., Hofmann, K., Guterman, A., Glickman, M., Schade, R., Kloetzel, P.M. und Dubiel, W. (2005). "The zinc finger of the CSN-associated deubiquitinating enzyme USP15 is essential to rescue the E3 ligase Rbx1." *Curr Biol* **15**(13): 1217-1221.

- Hetfeld, B.K., Peth, A., Sun, X.M., Henklein, P., Cohen, G.M. und Dubiel, W. (2008). "The COP9 signalosome-mediated deneddylation is stimulated by caspases during apoptosis." *Apoptosis* **13**(2): 187-195.
- Heuer, D., Rejman Lipinski, A., Machuy, N., Karlas, A., Wehrens, A., Siedler, F., Brinkmann, V. und Meyer, T.F. (2009). "Chlamydia causes fragmentation of the Golgi compartment to ensure reproduction." *Nature* **457**: 731-735.
- Hower, S., Wolf, K. und Fields, K.A. (2009). "Evidence that CT694 is a novel *Chlamydia trachomatis* T3S substrate capable of functioning during invasion or early cycle development." *Mol Microbiol* **72**(6):1423-37.
- Hsia, R.C., Pannekoek, Y., Ingerowski, E. und Bavoil, P.M. (1997). "Type III secretion genes identify a putative virulence locus of *Chlamydia*." *Mol Microbiol* **25**(2): 351-359.
- Hu, V. H., Harding-Esch, E.M., Burton, M.J., Bailey, R.L., Kadimpeul, J. und Mabey, D.C.W. (2010). „Epidemiology and control of trachoma: systematic review.“ *Trop Med Int Health* **15**(6):673-691.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S. und O’Shea, E.K. (2003). "Global analysis of protein localization in budding yeast." *Nature* **425**(6959): 686-91.
- Hybiske, K. und Stephens, R.S. (2007). "Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*." *Proc Natl Acad Sci* **104**(27): 11430-11435.
- Jacob-Dubuisson, F., Fernandez, R. und Coutte, L. (2004). "Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways." *Biochim Biophys Acta* **1694**(1-3): 235-257.
- Jantos, C.A., Heck, S., Roggendorf, R., Sen-Gupta, N. und Hegemann, J.H. (1997). "Antigenic and molecular analyses of different *Chlamydia pneumoniae* strains." *J Clin Microbiol* **35**(3): 620-623.
- Jewett, T.J., Fischer, E.R., Mead, D.J. und Hackstadt, T. (2006). "Chlamydial TARP is a bacterial nucleator of actin." *PNAS* **103**(42): 15599-15604.
- Jewett, T.J., Dooley, C.A., Mead, D.J. und Hackstadt, T. (2008). "*Chlamydia trachomatis* Tarp is phosphorylated by Src family tyrosine kinases." *Biochem Biophys Res Commun* **371**(2): 339-344.
- Jutras, I., Abrami, L. und Dautry-Varsat, A. (2003). "Entry of the lymphogranuloma venereum strain of *Chlamydia trachomatis* into host cells involves cholesterol-rich membrane domains." *Infect Immun* **71**(1): 260-266.
- Kato, J.Y. und Yoneda-Kato, N. (2009). "Mammalian COP9 signalosome." *Genes to Cells* **14**: 1209-1225.
- Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D.J., Frey, E.A. und Finlay, B.B. (1997). „Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Transfers Its Receptor for Intimate Adherence into Mammalian Cells.“ *Cell* **91**: 511-520.
- Kerr, K., Entrican, G., McKeever, D. und Longbottom, D. (2005). "Immunopathology of *Chlamydia abortus* infection in sheep and mice." *Res Vet Sci* **78**(1): 1-7.

- Kumar, Y., Cocchiari, J. und Valdivia, R.H. (2006). "The obligate intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis* targets host lipid droplets." *Curr Biol* **16**(16): 1646-1651.
- Lad, S.P., Li, J., da Silva Correia, J., Pan, Q., Gadwal, S., Ulevitch, R.J. und Li, E. (2007). "Cleavage of p65/RelA of the NF-kappaB pathway by *Chlamydia*." *Proc Natl Acad Sci* **104**(8): 2933-2938.
- Lane, B.J., Mutchler, C., Khodor, S.A., Grieshaber, S.S. und Carabeo, R.A. (2008). "Chlamydial Entry Involves TARP Binding of Guanine Nucleotide Exchange Factors." *PLoS Pathog* **4**(3): e1000014.
- LeNegrate, G., Krieg, A., Faustin, B., Loeffler, M., Godzik, A., Krajewski, S. und Reed, J.C. (2008). „*ChlaDub1* of *Chlamydia trachomatis* suppresses NF-kappaB activation and inhibits I kappa Balpha ubiquitination and degradation." *Cell Microbiol* **10**(9): 1879-1892.
- Leppert, U., Henke, W., Huang, X., Müller, J.M. und Dubiel, W. (2011). "Post-transcriptional fine-tuning of COP9 signalosome subunit biosynthesis is regulated by the c-Myc/Lin28B/let-7 pathway." *J Mol Biol* **409**(5): 710-721.
- Lichten, L.A. und Cousins, R.J. (2009). "Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation." *Annu Rev Nutr* **29**: 153-176.
- Luo, J., Jia, T., Zhong, Y., Chen, D., Flores, R. und Zhong, G. (2007). "Localization of the hypothetical protein Cpn0585 in the inclusion membrane of *Chlamydia pneumoniae*-infected cells." *Microb Pathog* **42**(2-3): 111-116.
- Luo, Z.Q. (2011). "*Legionella* secreted effectors and innate immune responses." *Cell Microbiol* **14**(1): 19-27.
- Lutter, E.I., Martens, C. und Hackstadt, T. (2012). "Evolution and Conservation of Predicted Inclusion Membrane Proteins in Chlamydiae." *Comp Funct Genomics* 2012:362104.
- Mabey, D. und Peeling, R.W. (2002). "Lymphogranuloma venereum." *Sex Transm Infect* **78**: 90–92.
- Mahalingam, S., Ayyavoo, V., Patel, M., Kieber-Emmons, T., Kao, G.D., Muschel, R.J. und Weiner, D.B. (1998). "HIV-1 Vpr interacts with a human 34-kDa mov34 homologue, a cellular factor linked to the G2/M phase transition of the mammalian cell cycle." *Proc Natl Acad Sci* **95**(7): 3419-3424.
- Manavi, K. (2006). "A review on infection with *Chlamydia trachomatis*." *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. **20**(6): 941-951.
- Miller, S.A., Selzman, C.H., Shames, B.D., Barton, H.A., Johnson, S.M. und Harken, A.H. (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., Balsara, Z.R., Catic, A., Spooner, E., Ploegh, H.L. und Starnbach, M.N. (2006). "*Chlamydia trachomatis*-derived deubiquitinating enzymes in mammalian cells during infection." *Mol Microbiol* **61**(1): 142-150.
- Mital, J., Miller, N.J., Fischer, E.R. und Hackstadt, T. (2010). "Specific chlamydial inclusion membrane proteins associate with active Src family kinases in microdomains that interact with the host microtubule network." *Cell Microbiol* **12**(9): 1235-1249.

- Miura, K., Inouye, S., Sakai, K., Takaoka, H., Kishi, F., Tabuchi, M., Tanaka, T., Matsumoto, H., Shirai, M., Nakazawa, T. und Nakazawa, A. (2001). "Cloning and Characterization of Adenylate Kinase from *Chlamydia pneumoniae*". J Biol Chem **276**(16): 13490-13498.
- Moelleken, K. und Hegemann, J.H. (2008). "The *Chlamydia* outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding." Mol Microbiol **67**(2): 403–419.
- Moelleken, K., Schmidt, S. und Hegemann, J.H. (2010). "Members of the Pmp protein family of *Chlamydia pneumoniae* mediate adhesion to human cells via short repetitive peptide motifs." Mol Microbiol **78**(4): 1004-1017.
- Mölleken, K., Becker, E. und Hegemann, J.H. (2013). "The *Chlamydia pneumoniae* Invasin Protein Pmp21 Recruits the EGF Receptor for Host Cell Entry." PLoS Pathog **9**(4): e1003325.
- Mota, L.J. und Cornelis, G.R. (2005). "The bacterial injection kit: type III secretion systems." Ann Med **37**(4): 234-249.
- Mukai, J., Hachiya, T., Shoji-Hoshino, S., Kimura, M.T., Nadano, D. et al. (2000). "NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR." J Biol Chem **275**(23): 17566-17570.
- Mukhopadhyay, S., Good, D., Miller, R.D., Graham, J.E., Mathews, S.A., Timms, P. und Summersgill, J.T. (2006). "Identification of *Chlamydia pneumoniae* proteins in the transition from reticulate to elementary body formation." Mol Cell Proteomics **5**(12):2311-2318.
- Murra, G. (2005). Untersuchungen zu DNA-Microarray-Studien des genomweiten Genexpressions-profiles von *Chlamydia pneumoniae*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Murra, G. (2010). Identifizierung und Charakterisierung von Adhäsionsproteinen des humanpathogenen Erregers *Chlamydia pneumoniae*. Dissertation am Lehrstuhl für Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Newhall, W.J. und Jones, R.B. (1983). "Disulfide-Linked Oligomers of the Major Outer Membrane Protein of Chlamydiae." J Bacteriol **154**(2): 998–1001.
- Nguyen, B.D., Cunningham, D., Liang, X., Chen, X., Toone, E.J., Raetz, C.R.H., Zhou, P. und Valdivia, R.H. (2011). "Lipooligosaccharide is required for the generation of infectious elementary bodies in *Chlamydia trachomatis*." Proc Natl Acad Sci **108**(25): 10284-10289.
- Oikonomou, K.G., Zachou, K. und Dalekos, G.N. (2011). "Alpha-actinin: a multidisciplinary protein with important role in B-cell driven autoimmunity." Autoimmun Rev **10**(7): 389-396.
- Ossewaarde, J.M., de Vries, A., Bestebroer, T. und Angulo, A.F. (1996). "Application of a *Mycoplasma* group-specific PCR for monitoring decontamination of *Mycoplasma*-infected *Chlamydia* sp. strains." Appl Environ Microbiol **62**(2): 328-331.
- Palmiter, R.D. und Huang, L. (2004). "Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers." Pflugers Arch **447**(5): 744-751.

- Paumet, F., Wesolowski, J., García-Díaz, A., Delevoye, C., Aulner, N., Shuman, H.A., Subtil, A. und Rothman, J.E. (2009). "Intracellular Bacteria Encode Inhibitory SNARE-Like Proteins." *PLoS ONE* **4**(10): e7375.
- Pedersen, L.B., Miller, M.S., Geimer, S., Leitch, J.M., Rosenbaum, J.L. und Cole, D.G. (2005). „*Chlamydomonas* IFT172 is encoded by FLA11, interacts with CrEB1, and regulates IFT at the flagellar tip." *Curr Biol* **15**(3): 262-266.
- Peeling, R.W. und Brunham, R.C. (1996). "Chlamydiae as Pathogens: New Species and New Issues." *Emerg Infect Dis* **2**(4): 307-319.
- Pena, A.N., Tominaga, K. und Pereira-Smith, O.M. (2011). "MRG15 activates the cdc2 promoter via histone acetylation in human cells." *Exp Cell Res* **317**(11): 1534-1540.
- Peters, J., Wilson, D.P., Myers, G., Timms, P. und Bavoil, P.M. (2007). "Type III secretion à la *Chlamydia*." *Trends Microbiol* **15**(6): 241-251.
- Peth, A., Berndt, C., Henke, W. und Dubiel W. (2007). "Downregulation of COP9 signalosome subunits differentially affects the CSN complex and target protein stability." *BMC Biochem* **8**: 27.
- Peth, A., Boettcher, J.P. und Dubiel W. (2007). "Ubiquitin-dependent proteolysis of the microtubule end-binding protein 1, EB1, is controlled by the COP9 signalosome: possible consequences for microtubule filament stability." *J Mol Biol* **368**(2): 550-563.
- Petroski, M.D. und Deshaies, R.J. (2005). "Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(1): 9-20.
- Petrovay, F. und Balla, E. (2008). "Two fatal cases of psittacosis caused by *Chlamydophila psittaci*." *J Med Microbiol* **57**: 1296–1298.
- Piper, R.C. und Luzio, J.P. (2001). "Late endosomes: sorting and partitioning in multivesicular bodies." *Traffic* **2**(9): 612-621.
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Revel, A.T., Sturtevant, D. und Mekalanos, J.J. (2007). "Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin." *PNAS* **104**(39): 15508-15513.
- Puolakkainen, M., Kuo, C.C. und Campbell, L.A. (2005). "*Chlamydia pneumoniae* uses the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor for infection of endothelial cells." *Infect Immun* **73**(8): 4620–4625.
- Qin, X.W., Wan, F., Sun, F.Y., Zhang, P.P., Han, L.W. et al. (2001). "Cloning and characterization of a novel gene (C17orf25) from the deletion region on chromosome 17p13.3 in hepatocellular carcinoma." *Cell Res* **11**(3): 209-216.
- Rajalingam, K., Sharma, M., Paland, N., Hurwitz, R., Thieck, O., Oswald, M., Machuy, N. und Rudel, T. (2006). "IAP-IAP complexes required for apoptosis resistance of *C. trachomatis*-infected cells." *PLoS Pathog* **2**(10): e114.

- Rani, D.S., Nallari, P., Priyamvada, S., Narasimhan, C., Singh, L. und Thangaraj, K. (2012). "High prevalence of Arginine to Glutamine substitution at 98, 141 and 162 positions in Troponin I (TNNI3) associated with hypertrophic cardiomyopathy among Indians." *BMC Med Genet* **13**: 69.
- Raulston, J.E., Davis, C.H., Schmiel, D.H., Morgan, M.W. und Wyrick, P.B. (1993). "Molecular characterization and outer membrane association of a *Chlamydia trachomatis* protein related to the hsp70 family of proteins." *J Biol Chem* **268**(31): 23139-23147.
- Reid, E., Kloos, M., Ashley-Koch, A., Hughes, L., Bevan, S. et al. (2002). "A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10)." *Am J Hum Genet* **71**(5): 1189-1194.
- Rocha, E.P.C., Pradillon, O., Bui, H., Sayada, C. und Denamur, E. (2002). "A new family of highly variable proteins in the *Chlamydophila pneumoniae* genome." *Nucleic Acids Research* **30**(20): 4351-4360.
- Rockey, D.D., Heinzen, R.A. und Hackstadt, T. (1995). "Cloning and characterization of a *Chlamydia psittaci* gene coding for a protein localized in the inclusion membrane of infected cells." *Mol Microbiol* **15**(4): 617-626.
- Rodolakis, A. und Mohamad, K.Y. (2010). "Zoonotic potential of *Chlamydophila*." *Veterinary Microbiology* **140**: 382-391.
- Rupp, J., Gieffers, J., Klinger, M., van Zandbergen, G., Wrase, R., Maass, M., Solbach, W., Deiwick, J. und Hellwig-Burgel, T. (2007). "„*Chlamydia pneumoniae* directly interferes with HIF-1alpha stabilization in human host cells." *Cell Microbiol* **9**(9): 2181-2191.
- Rurangirwa, F.R., Dilbeck, P.M., Crawford, T.B., McGuire, T.C. und McElwain, T.F. (1999). "Analysis of the 16s rRNA gene of microorganism WSU 86-1044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order *Chlamydiales* : proposal of *Waddliaceae* fam. nov., *Waddlia chondrophila* gen. nov., sp. nov." *Int J Syst Bacteriol* **49**: 577-581.
- Rzomp, K.A., Moorhead, A.R. und Scidmore, M.A. (2006). "The GTPase Rab4 interacts with *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane protein CT229." *Infect Immun* **74**(9): 5362-5373.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning: A laboratory manual." 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schachter, J. und Caldwell, H.D. (1980). "Chlamydiae." *Annu Rev Microbiol* **34**: 285-309.
- Schachter, J., Stephens, R.S. et al. (2001). "Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet." *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 249.
- Schautteet, K. und Vanrompey, D. (2011). "*Chlamydiaceae* infections in pig." *Veterinary Research* **42**: 29.
- Schwechheimer, C., Serino, G., Callis, J., Crosby, W.L., Lyapina, S., Deshaies, R.J., Gray, W.M., Estelle, M. und Deng, X.W. (2001). "Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIR1 in mediating auxin response." *Science* **292**(5520): 1379-1382.

- Schweitzer, K., Bozko, P.M., Dubiel, W. und Naumann, M. (2007). "CSN controls NF-kappaB by deubiquitylation of IkappaBalpha." *EMBO J* **26**(6): 1532-1541.
- Scidmore-Carlson, M.A., Shaw, E.I., Dooley, C.A., Fischer, E.R. und Hackstadt, T. (1999). "Identification and characterization of a *Chlamydia trachomatis* early operon encoding four novel inclusion membrane proteins." *Mol Microbiol* **33**(4): 753-765.
- Scidmore, M.A. und Hackstadt, T. (2001). "Mammalian 14-3-3 $\beta$  associates with the *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane via its interaction with IncG." *Mol Microbiol* **39**(6): 1638-1650.
- Seeger, M., Kraft, R., Ferrell, K., Bech-Otschir, D., Dumdey, R., Schade, R., Gordon, C., Naumann, M. und Dubiel, W. (1998). "A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits." *FASEB J* **12**(6): 469-478.
- Seve, M., Chimienti, F., Devergnas, S. und Favier, A. (2004). "In silico identification and expression of SLC30 family genes: an expressed sequence tag data mining strategy for the characterization of zinc transporters' tissue expression." *BMC Genomics* **5**(1): 32.
- Sharma, M., Machuy, N., Böhme, L., Karunakaran, K., Mäurer, A.P., Meyer, T.F. und Rudel, T. (2011). "HIF-1 $\alpha$  is involved in mediating apoptosis resistance to *Chlamydia trachomatis*-infected cells." *Cell Microbiol* **13**(10): 1573-1585.
- Sharon, M., Mao, H., Boeri Erba, E., Stephens, E., Zheng, N. und Robinson, C.V. (2009). "Symmetrical modularity of the COP9 signalosome complex suggests its multifunctionality." *Structure* **17**(1): 31-40.
- Siggers, K.A. und Lesser, C.F. (2008). "The Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a versatile model system for the identification and characterization of bacterial virulence proteins." *Cell Host Microbe* **4**(1): 8-15.
- Silverman, J.M., Brunet, Y.R., Cascales, E. und Mougous, J.D. (2012). "Structure and regulation of the type VI secretion system." *Annu Rev Microbiol* **66**: 453-472.
- Sim, D.L. und Chow, V.T. (1999). "The novel human HUEL (C4orf1) gene maps to chromosome 4p12-p13 and encodes a nuclear protein containing the nuclear receptor interaction motif." *Genomics* **59**(2): 224-233.
- Sim, D.L., Yeo, W.M. und Chow, V.T. (2002). "The novel human HUEL (C4orf1) protein shares homology with the DNA-binding domain of the XPA DNA repair protein and displays nuclear translocation in a cell cycle-dependent manner." *Int J Biochem Cell Biol* **34**(5): 487-504.
- Singer, A. (2012). Funktionsanalyse von Mitgliedern der CPn1054-Proteinfamilie aus *Chlamydia pneumoniae*. Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Sisko, J.L., Spaeth, K., Kumar, Y. und Valdivia, R.H. (2006). "Multifunctional analysis of *Chlamydia*-specific genes in a yeast expression system." *Mol Microbiol* **60**(1): 51-66.

- Starr, D.A., Saffery, R., Li, Z., Simpson, A.E., Choo, K.H., Yen, T.J. und Goldberg, M.L. (2000). "HZwint-1, a novel human kinetochore component that interacts with HZW10." *J Cell Sci* **113** (Pt 11): 1939-1950.
- Stenner-Liewen, F., Liewen, H., Zapata, J.M., Pawlowski, K., Godzik, A. und Reed, J.C. (2002). "CADD, a *Chlamydia* protein that interacts with death receptors." *J Biol Chem* **277**(12):9633-9636.
- Stephens, R.S., Myers, G., Eppinger, M., und Bavoil, P.M. (2009). "Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of *Chlamydia* resolved." *FEMS Immunol Med Microbiol* **55**: 115–119.
- Storz, J. und Page, L.A. (1971). "Taxonomy of the Chlamydiae: Reasons for Classifying Organisms of the Genus *Chlamydia*, Family *Chlamydiaceae*, in a Separate Order, *Chlamydiales* ord. nov." *Int J Syst Bacteriol* **21**(4): 332-334.
- Stratton, C.W. und Sriram, S. (2003). "Association of *Chlamydia pneumoniae* with central nervous system disease." *Microbes and Infection* **5**: 1249–1253.
- Su, H., Raymond, L., Rockey, D.D., Fischer, E., Hackstadt, T. und Caldwell, H.D. (1996). "A recombinant *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells." *Proc Natl Acad Sci* **93**: 11143-11148.
- Subtil, A., Parsot, C. und Dautry-Varsat, A. (2001). "Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery." *Mol Microbiol* **39**(3): 792-800.
- Subtil, A., Wyplosz, B., Balan, M.E. und Dautry-Varsat, A. (2004). "Analysis of *Chlamydia caviae* entry sites and involvement of Cdc42 and Rac activity." *J Cell Sci* **117**: 3923-3933.
- Subtil, A., Delevoe, C., Balan, M.E., Tastevin, L., Perrinet, S. und Dautry-Varsat, A. (2005). "A directed screen for chlamydial proteins secreted by a type III mechanism identifies a translocated protein and numerous other new candidates." *Mol Microbiol* **56**(6): 1636-1647.
- Suchland, R.J., Rockey, D.D., Bannantine, J.P. und Stamm, W.E. (2000). "Isolates of *Chlamydia trachomatis* that occupy nonfusogenic inclusions lack IncA, a protein localized to the inclusion membrane." *Infect Immun* **68**(1): 360-367.
- Sun, Y., Wilson, M.P. und Majerus, P.W. (2002). "Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase associates with the COP9 signalosome by binding to CSN1." *J Biol Chem* **277**(48): 45759-45764.
- Suomela, S., Elomaa, O., Asumalahti, K., Kariniemi, A.L., Karvonen, S.L. et al. (2003). "HCR, a candidate gene for psoriasis, is expressed differently in psoriasis and other hyperproliferative skin disorders and is downregulated by interferon-gamma in keratinocytes." *J Invest Dermatol* **121**(6): 1360-1364.
- Swanson, A.F. und Kuo, C.C. (1994). "Binding of the Glycan of the Major Outer Membrane Protein of *Chlamydia trachomatis* to HeLa Cells." *Infect Immun* **62**(1): 24-28.
- Tan, C., Hsia, R.C., Shou, H., Carrasco, J.A., Rank, R.G. und Bavoil, P.M. (2010). "Variable expression of surface-exposed polymorphic membrane proteins in in vitro-grown *Chlamydia trachomatis*." *Cell Microbiol* **12**(2): 174-187.

- Tanzer, R.J. und Hatch, T.P. (2001). "Characterization of outer membrane proteins in *Chlamydia trachomatis* LGV serovar L2." *J Bacteriol* **183**(8): 2686-2690.
- Thalmann, J., Janik, K., May, M., Sommer, K., Ebeling, J., Hofmann, F., Genth, H. und Klos A. (2010). "Actin Re-Organization Induced by *Chlamydia trachomatis* Serovar D - Evidence for a Critical Role of the Effector Protein CT166 Targeting Rac". *PLoS ONE* **5**(3): e9887.
- Tiala, I., Suomela, S., Huuhtanen, J., Wakkinen, J., Hölttä-Vuori, M. et al. (2007). "The *CCHCR1 (HCR)* gene is relevant for skin steroidogenesis and downregulated in cultured psoriatic keratinocytes." *J Mol Med (Berl)* **85**(6): 589-601.
- Toh, H., Miura, K., Shirai, M. und Hattori, M. (2003). "In silico Inference of Inclusion Membrane Protein Family in Obligate Intracellular Parasites Chlamydiae." *DNA Research* **10**: 9-17.
- Tomoda, K., Kubota, Y., Arata, Y., Mori, S., Maeda, M., Tanaka, T., Yoshida, M., Yoneda-Kato, N. und Kato, J.Y. (2002). "The cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27Kip1 mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 signalosome complex." *J Biol Chem* **277**(3): 2302-2310.
- Tseng, T.T., Tyler, B.M. und Setubal, J.C. (2009). "Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology." *BMC Microbiol* **9**(Suppl 1): S2.
- Uhle, S., Medalia, O., Waldron, R., Dumdey, R., Henklein, P., Bech-Otschir, D., Huang, X., Berse, M., Sperling, J., Schade, R. und Dubiel, W. (2003). "Protein kinase CK2 and protein kinase D are associated with the COP9 signalosome." *EMBO J* **22**(6): 1302-1312.
- Ullah, M., Pelletier, N., Xiao, L., Zhao, S.P., Wang, K. et al. (2008). "Molecular architecture of quartet MOZ/MORF histone acetyltransferase complexes." *Mol Cell Biol* **28**(22): 6828-6843.
- Valdivia, R.H. (2008). "Chlamydia effector proteins and new insights into chlamydial intracellular microbiology." *Curr Opin Microbiol* **11**: 1-7.
- Vandahl, B.B.S., Birkelund, S. und Christiansen, G. (2004). "Genome and proteome analysis of *Chlamydia*." *Proteomics* **4**: 2831-2842.
- Verbeke, P., Welter-Stahl, L., Ying, S., Hansen, J., Häcker, G., Darville, T. und Ojcius, D.M. (2006). "Recruitment of BAD by the *Chlamydia trachomatis* vacuole correlates with host-cell survival." *PLoS Pathog* **2**(5): e45.
- Viratyosin, W., Campbell, L.A., Kuo, C.C. und Rockey, D.D. (2002). "Intrastrain and interstrain genetic variation within a paralogous gene family in *Chlamydia pneumoniae*." *BMC Microbiol* **2**: 38.
- Vos, L.J., Famulski, J.K. und Chan, G.K. (2011). "hZwint-1 bridges the inner and outer kinetochore: identification of the kinetochore localization domain and the hZw10-interaction domain." *Biochem J* **436**(1): 157-168.
- Wehrl, W., Brinkmann, V., Jungblut, P.R., Meyer, T.F. und Szczepek, A.J. (2004). "From the inside out – processing of the Chlamydial autotransporter PmpD and its role in bacterial adhesion and activation of human host cells." *Mol Microbiol* **51**(2): 319-334.
- Wei, N., Chamovitz, D.A. und Deng, X.W. (1994). "*Arabidopsis* COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development." *Cell* **78**(1): 117-124.

- Wei, N. und Deng, X.W. (1998). "Characterization and purification of the mammalian COP9 complex, a conserved nuclear regulator initially identified as a repressor of photomorphogenesis in higher plants." *Photochem Photobiol* **68**(2): 237-41.
- Wei, N. und Deng, X.W. (2003). "The COP9 Signalosome." *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 261-286.
- Wei, N., Serino, G. und Deng, X.W. (2008). "The COP9 signalosome: more than a protease." *Trends Biochem Sci* **33**(12): 592-600.
- Wolf, K., Fischer, E. und Hackstadt, T. (2000). "Ultrastructural Analysis of Developmental Events in *Chlamydia pneumoniae*-Infected Cells." *Infect Immun* **68**(4): 2379-2385.
- Wolf, K. und Hackstadt, T. (2001). "Sphingomyelin trafficking in *Chlamydia pneumoniae*-infected cells." *Cell Microbiol* **3**(3): 145-152.
- Wuppermann, F.N., Hegemann, J.H. und Jantos, C.A. (2001). "Heparan Sulfate-like Glycosaminoglycan Is a Cellular Receptor for *Chlamydia pneumoniae*." *J Infect Dis* **184**: 181-187.
- Wuppermann, F.N., Moelleken, K., Julien, M., Jantos, C.A. und Hegemann, J.H. (2008). "*Chlamydia pneumoniae* GroEL1 protein is cell surface associated and required for infection of HEp-2 cells." *J Bacteriol* **190**(10): 3757-3767.
- Wylie, J.L., Hatch, G.M. und McClarty, G. (1997). "Host cell phospholipids are trafficked to and then modified by *Chlamydia trachomatis*." *J Bacteriol* **179**(23): 7233-7242.
- Yang, X., Menon, S., Lykke-Andersen, K., Tsuge, T., Di Xiao, Wang, X., Rodriguez-Suarez, R.J., Zhang, H. und Wei, N. (2002). "The COP9 signalosome inhibits p27(kip1) degradation and impedes G1-S phase progression via deneddylation of SCF Cul1." *Curr Biol* **12**(8): 667-672.
- Ying, S., Seiffert, B.M., Häcker, G. und Fischer, S.F. (2005). "Broad Degradation of Proapoptotic Proteins with the Conserved Bcl-2 Homology Domain 3 during Infection with *Chlamydia trachomatis*." *Infect Immun* **73**(3): 1399-1403.
- Ying, S., Christian, J.G., Paschen, S.A. und Häcker, G. (2008). "*Chlamydia trachomatis* can protect host cells against apoptosis in the absence of cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins and Mcl-1." *Microbes Infect* **10**(1): 97-101.
- Zhong, G., Fan, T. und Liu, L. (1999). "*Chlamydia* inhibits interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class II expression by degradation of upstream stimulatory factor 1." *J Exp Med* **189**(12):1931-1938.
- Zhong, G., Liu, L., Fan, T., Fan, P. und Ji, H. (2000). "Degradation of transcription factor RFX5 during the inhibition of both constitutive and interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class I expression in *chlamydia*-infected cells." *J Exp Med* **191**(9): 1525-1534.
- Zhong, G., Fan, P., Ji, H., Dong, F. und Huang, Y. (2001). "Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors." *J Exp Med* **193**(8):935-942.
- Zhong, G. (2011). "*Chlamydia trachomatis* secretion of proteases for manipulating host signaling pathways." *Front Microbiol* **2**: 1-5.

Zrieg, R. (2009). The Dual Function of the *Chlamydia pneumoniae* CPn0572 Protein in Modulating the Host Actin Cytoskeleton. Dissertation am Lehrstuhl für Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Taxonomie der Chlamydiales.....	- 1 -
Abb. 1-2: Überblick über den chlamydialen Entwicklungszyklus. ....	- 4 -
Abb. 1-3: Das chlamydiale Typ III-Injektisom.....	- 12 -
Abb. 1-4: Chlamydiale, Wirtszellzytosol-lokalisierte Effektorproteine. ....	- 15 -
Abb. 1-5: Chlamydiale Inklusionsmembranproteine.....	- 17 -
Abb. 1-6: Überblick über die Mitglieder der CPn1054-Proteinfamilie und die Identität auf Aminosäuresequenz-Ebene zum Ursprungprotein CPn1054. ....	- 21 -
Abb. 1-7: Übersicht über die Struktur des COP9 Signalosom-Komplexes und die in den Untereinheiten enthaltenen Domänen. ....	- 23 -
Abb. 4-1: Übersicht über die Struktur des CPn0072-Proteins.....	- 73 -
Abb. 4-2: Lokalisationsanalyse von CPn0072 in der Infektion. ....	- 74 -
Abb. 4-3: Ko-Lokalisationsanalyse von CPn0072 und chlamydialen Markerproteinen in der Infektion..	- 76 -
Abb. 4-4: CPn0072 ist von der zytosolischen Seite der Wirtszelle aus zugänglich.....	- 78 -
Abb. 4-5: CPn0072-Konstrukt für den Hefe-Zwei-Hybrid Screen.....	- 79 -
Abb. 4-6: Übersicht über die Struktur des Proteins SLC30A9 und die Lage des im Screen isolierten Fragments.....	- 83 -
Abb. 4-7: CPn0072 zeigt im Hefe-Zwei-Hybrid System eine Interaktion mit SLC30A9. ....	- 84 -
Abb. 4-8: Der CPn0072 N-Terminus vermittelt die Interaktion mit SLC30A9 im Hefe-Zwei-Hybrid System. ....	- 85 -
Abb. 4-9: Mittels Ko-Immünpräzipitation konnte keine spezifische Interaktion zwischen CPn0072 und SLC30A9 nachgewiesen werden.....	- 86 -
Abb. 4-10: Domänenstruktur des Proteins CPn1054 und Übersicht über die im Effektor-Screen identifizierten Fragmente.....	- 88 -
Abb. 4-11: Konservierte Domänen in Mitgliedern der CPn1054-Proteinfamilie. ....	- 90 -
Abb. 4-12: Test der Spezifität des CPn1054-Antikörperserums.....	- 91 -

Abb. 4-13: Färbung infizierter HEp2-Zellen mit einer CPn1054-Antikörperpräparation, die gegen säulengebundenes Antigen aufgereinigt worden war. ....	- 92 -
Abb. 4-14: Färbung infizierter HEp2-Zellen mit einer CPn1054-Antikörperpräparation, die gegen membrangebundenes Antigen aufgereinigt worden war. ....	- 93 -
Abb. 4-15: Ko-Lokalisationsanalyse von CPn1054 und IncA in der Infektion. ....	- 95 -
Abb. 4-16: Ko-Lokalisationsanalyse von CPn1054 und MOMP bzw. DnaK in der Infektion. ....	- 97 -
Abb. 4-17: CPn1054 ist von der zytosolischen Seite der Wirtszelle her zugänglich. ....	- 98 -
Abb. 4-18: CPn1054 zeigt keine Selbst-Interaktion im Hefe-Zwei-Hybrid System. ....	- 99 -
Abb. 4-19: Im Hefe-Zwei-Hybrid Screen eingesetztes CPn1054-Konstrukt. ....	- 101 -
Abb. 4-20: Klassifizierung der potentiellen CPn1054-Interaktionspartner nach ihren vorhergesagten Funktionen. ....	- 105 -
Abb. 4-21: Ektopisch exprimiertes CPn1054-GFP Fusionsprotein könnte mit Aktin-Strukturen assoziieren. ....	- 106 -
Abb. 4-22: Übersicht über die Struktur der COP9 Signalosom-Untereinheiten COPS4 und COPS6. -	108 -
Abb. 4-23: CPn1054 zeigt im Hefe-Zwei-Hybrid System eine starke Interaktion mit den COP9-Untereinheiten COPS4 und COPS6. ....	- 109 -
Abb. 4-24: Test unterschiedlicher Fragmente des CPn1054-Proteins auf Interaktion mit COPS4 und COPS6. ....	- 111 -
Abb. 4-25: Far Western Blot zum Nachweis der Interaktion zwischen CPn1054 und COPS4 sowie COPS6. ....	- 113 -
Abb. 4-26: Lokalisationsanalyse von COPS4- und COPS6-Fusionsproteinen in Humanzellen. ....	- 115 -
Abb. 4-27: Lokalisationsanalyse der COPS4- und COPS6-Fusionsproteine während einer <i>C. pneumoniae</i> -Infektion. ....	- 116 -
Abb. 4-28: Lokalisationsanalyse von endogenem COPS5 in nicht-infizierten und <i>C. pneumoniae</i> -infizierten Humanzellen. ....	- 118 -
Abb. 4-29: Das Expressionsniveau mehrerer COP9-Untereinheiten ist während einer Chlamydien-Infektion verändert. ....	- 119 -
Abb. 4-30: Übersicht über die Domänenstruktur von CPn0043 und das im Effektorscreen isolierte Fragment. ....	- 121 -
Abb. 4-31: CPn0043 zeigt Interaktion mit COPS4 und COPS6 im Hefe-Zwei-Hybrid System. ....	- 122 -

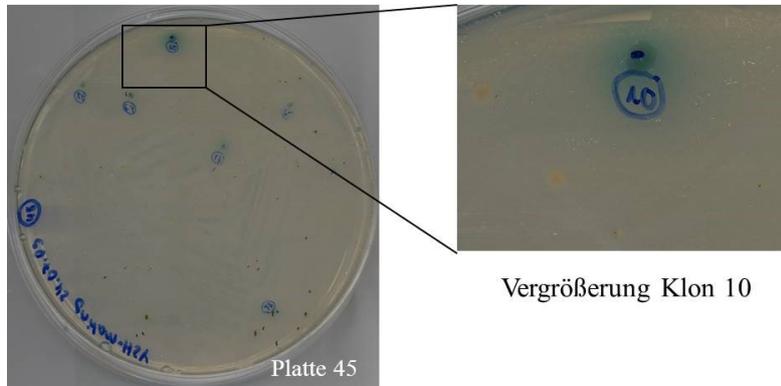
Abb. 4-33: Lokalisationsanalyse von CPn0043- und CPn1054-Fusionsproteinen in Hefe.....	- 125 -
Abb. 4-34: Zur Antikörper-Generierung eingesetztes CPn0043-Peptid.....	- 126 -
Abb. 4-35: Immunfluoreszenz-Analyse infizierter Humanzellen mit dem CPn0043-Peptidantikörper... -	128 -
Abb. 4-36: CPn0043 wird von dem CPn1054-Antikörper nicht erkannt. ....	- 129 -
Abb. 5-1: Hypothetisches Modell zur Funktion von CPn1054 und CPn0043 in der Chlamydien- Infektion. ....	- 151 -

## Tabellenverzeichnis

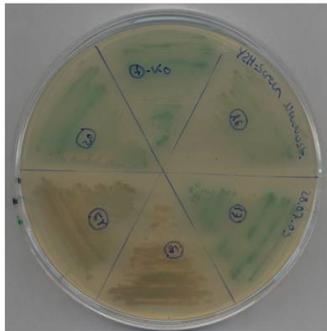
Tabelle 2-1: Gebrauchsmaterial.....	-26-
Tabelle 2-2: Chemikalien.....	-26-
Tabelle 2-3: Geräte.....	-30-
Tabelle 2-4: Primärantikörper.....	-32-
Tabelle 2-5: Sekundärantikörper.....	-33-
Tabelle 2-6: Oligonukleotide zur Klonierung.....	-34-
Tabelle 2-7: Oligonukleotide zur Sequenzierung.....	-36-
Tabelle 2-8: Ursprungsplasmide.....	-37-
Tabelle 2-9: klonierte Plasmide.....	-38-
Tabelle 2-10: Zusammensetzung des Dropout-Mixes.....	-42-
Tabelle 3-1: PCR-Programm zum Nachweis von <i>Mycoplasma</i> -DNA.....	-59-
Tabelle 3-2: PCR-Programm zur Amplifizierung von Genen für die Klonierung.....	-60-
Tabelle 3-3: Zusammensetzung von Trenngelen unterschiedlicher Prozentualität.....	-65-
Tabelle 3-4: Puffer für die schrittweise Renaturierung.....	-68-
Tabelle 4-1: Gegenüberstellung der Kennzahlen des CPn0072-Interaktionspartnerscreens.....	-80-
Tabelle 4-2: Insert-Analyse der sequenzierten Bank-Plasmide aus dem CPn0072-Screen.....	-81-
Tabelle 4-3: Gegenüberstellung der Kennzahlen des CPn1054-Interaktionspartnerscreens.....	-102-
Tabelle 4-4: Insert-Analyse der isolierten Bank-Plasmide aus dem CPn1054-Screen.....	-102-

## Anhang

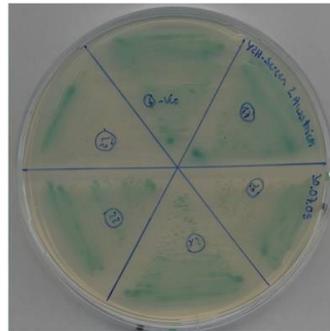
### A. Beispielbilder aus der Durchführung des CPn1054 Hefe-Zwei-Hybrid Screens



1. Ausstrich Klone 16-20



2. Ausstrich Klone 17-23



Große, mittelstringente Screenplatten wurden nach deutlich blau gefärbten Hefekolonien durchmustert (Beispiel oben: Klon 10). Diese Hefen wurden auf kleinen Platten mit hochstringentem Reportermedium vereinzelt. Hefen, die keine reproduzierbare Aktivierung aller Reportergene zeigten, wurden aussortiert (Beispiel unten: Klone Nr. 18 und 19 wurden nicht weiter berücksichtigt.). Zur Sicherheit wurde der Vereinzlungsschritt für nach dem 1. Ausstrich positive Hefen noch einmal wiederholt (Beispiel unten: Klone Nr. 17 und 20 aus der ersten Vereinzlung wurden noch einmal getestet.).

### B. Rohdaten zur Berechnung der Kennzahlen eines Screens

#### B.1 CPn0072

1) Auszählung der Kolonien versch. Verdünnungen des Bank-Aliquots, ausgestrichen auf SD/-Leu Selektionsplatten, zur Berechnung des Bank-Titers.

Verdünnungsstufe	Ausgezählte Kolonien
1:100	n.a.
1:1000	n.a.
1:10000	693

n.a.: nicht anwendbar (Auszählung nicht möglich, da Platte zu dicht bewachsen war)

2) Auszählung der Kolonien versch. Verdünnungen der gepaarten Hefekultur, ausgestrichen auf untersch. Selektionsplatten, zur Ermittlung der Paarungseffizienz und der Anzahl gescreenter Klone

Verdünnungsstufe	Ausgezählte Kolonien		
	SD/-Leu	SD/-Trp	SD/-Leu/-Trp
1:10	n.a.	n.a.	n.a.
1:100	n.a.	n.a.	266
1:1000	674	n.a.	26
1:10000	59	625	2

n.a.: nicht anwendbar (Auszählung nicht möglich, da Platte zu dicht bewachsen war)

Resuspensionsvolumen: 12 ml

## B.2 CPn1054

1) Auszählung der Kolonien versch. Verdünnungen des Bank-Aliquots, ausgestrichen auf SD/-Leu Selektionsplatten, zur Berechnung des Bank-Titers

Verdünnungsstufe	Ausgezählte Kolonien
1:100	n.a.
1:1000	n.a.
1:10000	1310

n.a.: nicht anwendbar (Auszählung nicht möglich, da Platte zu dicht bewachsen war)

2) Auszählung der Kolonien versch. Verdünnungen der gepaarten Hefekultur, ausgestrichen auf untersch. Selektionsplatten, zur Ermittlung der Paarungseffizienz und der Anzahl gescreenter Klone

Verdünnungsstufe	Ausgezählte Kolonien		
	SD/-Leu	SD/-Trp	SD/-Leu/-Trp
1:10	n.a.	n.a.	n.a.
1:100	n.a.	n.a.	993
1:1000	1505	n.a.	150
1:10000	242	1494	14

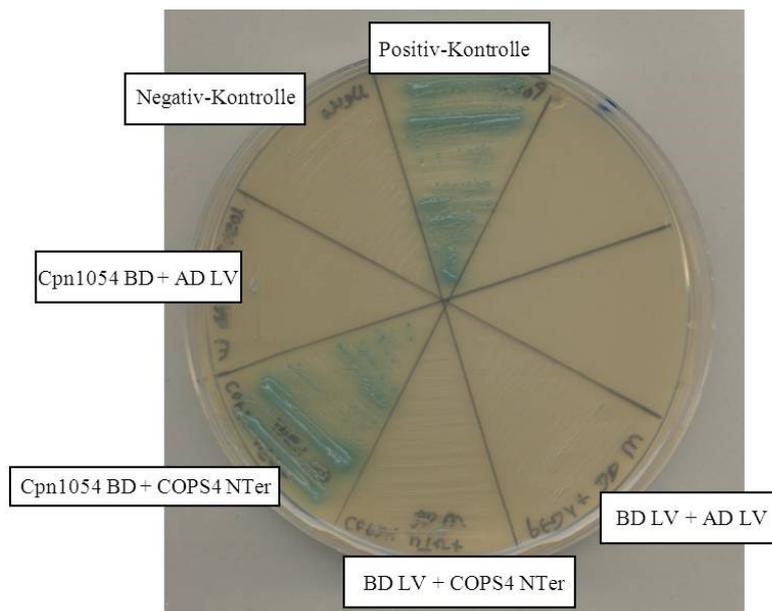
n.a.: nicht anwendbar (Auszählung nicht möglich, da Platte zu dicht bewachsen war)

Resuspensionsvolumen: 11 ml

### C. Nachweis der Interaktion des COPS4 N-Terminus mit CPn1054 mittels Hefe-Zwei-Hybrid

COPS4 AS 1-250 (COPS4-N) wurde als Fusionsprotein mit der Gal4p Aktivierungsdomäne exprimiert (Plasmid: # 2248) und mit ko-exprimiertem CPn1054 BD auf Interaktion getestet. Der Test erfolgte auf hochstringentem Reportermedium unter Mitführung entsprechender Kontrollen.





### Reportermedium

Plasmide der Positivkontrolle: pGBKT7-p53 (# 1302) + pGADT7-T (# 1676)

Plasmide der Negativkontrolle: pGBKT7-Lam (# 1677) + pGADT7-T (# 1676)

AD LV: Leervector pGADT7 (# 1675)    BD LV: Leervector pGBKT7 (#1301)

CPn1054 BD: Köderkonstrukt für den Hefe-Zwei-Hybrid Screen (# 2216)

## Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Entstehung dieser Arbeit begleitet, unterstützt und motiviert haben.

Zunächst einmal geht mein Dank an Herrn Prof. Dr. Johannes H. Hegemann für die Möglichkeit, die Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen und für die Überlassung des sehr interessanten Themas. Ebenso vielen Dank für die vielen Gespräche, wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen im Verlauf meiner Promotion.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Eckhard Lammert für die bereitwillige Übernahme des Koreferats.

Dann natürlich ein ganz großes Dankeschön an alle Kolleginnen und Kollegen aus dem Hefelabor (Astrid, Boris, Sebastian, Steffi, Sören, Irina, Anne und Frauke), aus dem Chlamydienlabor (Elli, Sonja, Katja, Tim, Rafat, Jan) sowie aus dem Pombe-Labor (Visnja, Marcus, Boris, Jenny, Pascal, Eva, Anand, Andrea) für die immer sehr gute und heitere Arbeitsatmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft. Besonderen Dank an Rafat, Katja und Boris T. für die Hilfe am Konfokalmikroskop und an Steffi K. für die Hilfe bei diversen Experimenten in der Schlussphase der Dissertation. Aber auch Danke an alle für die vielen Aktivitäten neben der Arbeit, wie die Grillabende, Karnevalsfeiern, Scotti's-Abende etc. Zudem Danke auch an PD Dr. Ursula Fleig, Dr. Inge Krümpelbeck, Steffi Hesse, Gabi Abel und Klaus Meyer. Des Weiteren einen ganz lieben Dank an „meine“ Bachelor-Studentin Anna und ihre Mitstreiter Kristina und André.

Als nächstes möchte ich allen Freunden in der Heimat danken, die immer für mich da sind und schon so manches mit mir durchgestanden haben. Allen voran meine beste Freundin Ela, aber auch Irina, Adam, Jocki, Stevie, David, Dirk und Ina. Auch denjenigen, die nicht namentlich genannt sind: vielen lieben Dank für Eure Freundschaft! Ich bin froh, dass es Euch alle gibt!

Zuletzt geht das dickste Dankeschön natürlich an meine Familie: meine Schwester Mona und Tim, meine Mutter und meine Oma. Daneben auch an meine Tante, an Nina und Christian mit Leo sowie an Jens und Steffi. Danke für Eure Unterstützung und die manchmal nötigen Ablenkungen, für die Ihr gesorgt habt!

## Eidesstattliche Erklärung

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



Sandra Vergin