

Charakterisierung des OmcB Adhäsins von *Chlamydia pneumoniae*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
(Fachbereich Biologie)

vorgelegt von
Katja Mölleken
aus Oberhausen

Düsseldorf 2005

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. Rolf Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 31. 01. 2006

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	2
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
ZUSAMMENFASSUNG	10
1. EINLEITUNG	12
1.1. Chlamydiale Spezies	12
1.1.1. Human-pathogene Chlamydien	12
1.1.2. Tier-pathogene Chlamydien	14
1.2. Mechanismen der zellulären Invasion durch human-pathogene Bakterien	14
1.3. Lebenszyklus der Chlamydien	15
1.3.1. Adhäsion von Chlamydien an die humane Zelle	17
1.3.2. Internalisierung	18
1.3.3. Differenzierung vom EB zum RB	19
1.3.4. Replikationsphase	20
1.3.5. Re-Differenzierung	20
1.3.6. Austritt aus der Zelle	21
1.4. Besonderheit der chlamydialen Außenmembran	21
1.4.1. Proteine des cOMC (chlamydia outer membrane complex)	22
1.5. Die Funktion von Glykosaminoglykanen (GAGs)	26
1.5.1. Zelluläre Funktionen von GAGs	27
1.5.2. GAGs und die Adhäsion von Pathogenen an die humane Zelle	28
1.5.3. Einfluss von GAGs auf die chlamydiale Infektion	29
1.6. Funktionelle Analyse zur Charakterisierung von bakteriellen Adhäsinen	30
1.6.1. Verschiedene Präsentationssysteme	30
1.6.2. Das Hefe-Display System	31
1.7. Zielsetzung	33
2. MATERIALIEN	34
2.1. Gebrauchsartikel	34
2.3. Chemikalien	34
2.4. Enzyme	36
2.4.1. Nukleasen	36
2.4.2. Restriktionsenzyme	36
2.4.3. Polymerasen	36
2.4.4. Andere Enzyme	36
2.5. Antikörper	37
2.6. Kits	37

2.7. DNA Größenstandard	38
2.8. Proteingrößenstandard	38
2.9. Oligonukleotide	38
2.9.1. Oligonukleotide zur Amplifikation	38
2.9.2. Oligonukleotide zur Sequenzierung	39
2.10. Plasmide	40
2.11. Zellen und Zelllinien	41
2.11.1. Prokaryotische Zellen / Zelllinien	41
2.11.2. Eukaryotische Zellen / Zelllinien	42
2.12. Medien und Medienzusätze	42
2.12.1. Zell- und Chlamydienkulturmedium	43
2.12.2. Medien für <i>Escherichia coli</i>	43
2.12.3. Medien für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
3. METHODEN	45
3.1. Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
3.1.1. Induktion von Oberflächen-präsentierten Proteinen in der Hefe <i>S. cerevisiae</i>	45
3.1.2. Methoden der direkten Zellfärbung von Hefezellen	45
3.1.3. Indirekte Immunfluoreszenz (IF)	46
3.2. Kultivierung von eukaryotischen Zellen in der Zellkultur	47
3.2.1. Herstellung des Zellkulturmediums	47
3.2.2. Herstellung aller Stammlösungen für die Zellkultur	47
3.2.3. Auftauen von HEp-2 Zellen	48
3.2.4. Trypsinbehandlung von HEp-2 Zellen	48
3.2.6. Passagieren von adhärenenten epithelialen Zellen	48
3.2.7. Einfrieren von eukaryotischen Zellen	49
3.2.8. Bestimmung von Zellzahlen	49
3.3. Chlamydienkultur	50
3.3.1. Herstellung des Chlamydienkulturmediums	50
3.3.2. Lösungen für die Chlamydienkultur	50
3.3.3. Auftauen von Chlamydien zur Kultivierung	50
3.3.4. Passage von Chlamydien in Gewebekulturröhrchen (GK's)	50
3.3.5. Passage von Chlamydien in kleinen Zellkulturflaschen	50
3.3.6. Sedimentation und Einfrieren von Chlamydien	51
3.3.7. Reinigung von Chlamydien durch Zentrifugation	51
3.3.8. Titration von Chlamydien suspensionen	52
3.3.9. Infektion von Zellen durch Chlamydien ohne Zentrifugation	53
3.3.10. Test von Zellkultur- und Chlamydienkultur auf Kontaminationen durch <i>Mycoplasma sp.</i>	53
3.3.11. Immunologischer Nachweis von Chlamydien mittels Fluoreszenzmikroskopie	54
3.3.12. Behandlung von HEp-2 Zellen mit Heparinase I	56
3.4. Molekularbiologische Methoden	56
3.4.1. Gewinnung von chlamydialer DNA für PCR-Reaktionen	56
3.4.2. Gewinnung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> Kulturen	56
3.4.3. DNA-Mengenbestimmung durch photometrische Messung	56
3.4.4. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	57
3.4.5. Auftrennung von DNA-Molekülen durch Gelelektrophorese in Agarosegelen	57

3.4.6. DNA-Fällung	57
3.4.7. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	57
3.4.8. Berechnung der optimalen Annealing Temperatur von Oligonukleotiden	58
3.4.9. PCR-Reaktion (Polymerase Chain Reaction)	58
3.4.10. Generierung von Einzelbasenpaar-Austauschen mittels Mutagenese-PCR	59
3.4.11. Ein-Minuten-Transformation	59
3.4.13. Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	59
3.4.14. DNA-Isolation aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59
3.4.15. Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	59
3.4.16. Integration von DNA-Fragmenten über homologe <i>in vivo</i> Rekombination	59
3.5. Biochemische Methoden	60
3.5.1. Reinigung von cOMCs aus <i>C. pneumoniae</i>	60
3.5.2. Induktion der Genexpression in <i>E. coli</i>	60
3.5.3. Affinitätschromatografische Aufreinigung von Proteinen	60
3.5.4. Proteinprobenaufarbeitung für SDS-Polyacrylamidgele	61
3.5.5. Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	62
3.5.6. Färbung eines Proteingels mittels Coomassie-Blau	63
3.5.7. Silberfärbung eines Proteingels	63
3.5.8. Westernblotanalyse	63
3.5.9. Adhäsionsversuche durch proteinbeschichtete Latexkügelchen	64
3.5.10. Neutralisation der chlamydialen Infektion mit rekombinantem OmcB _{6His} -Protein	66
3.5.11. Bestimmung der Adhäsion chlamydialer Partikel an eukaryotische Zellen mittels ELISA-Methode (Enzym linked immunoabsorbent assay)	66
3.5.12. Generierung polyklonaler OmcB _{6His} -Antikörper	67
3.5.13. Neutralisation der chlamydialen Infektion durch Zugabe von polyklonalen OmcB-Antikörpern	67
3.5.15. Protease-Verdau von Oberflächen präsentierten Proteinen	68
3.5.16. Adhäsions-Test	68
3.5.17. Vorbehandlung von Hefezellen für Adhäsions-Tests	69
4. ERGEBNISSE	71
4.1. Etablierung eines funktionellen Hefe-Adhäsionstests	71
4.1.1. Präsentation einer <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> Invasin Proteindomäne im Hefe-System	71
4.1.2. Das Aga2p-Invasin-AD Fusionsprotein adhärirt an humane HEp-2 Zellen	73
4.2. Das <i>C. pneumoniae</i> GroEL-1 Protein besitzt im Gegensatz zum Momp Protein adhäsive Eigenschaften	75
4.2.1. Expression der chlamydialen Proteine Momp und GroEL-1 im Hefe-System	75
4.2.2. Aga2p-GroEL-1 präsentierende Hefen adhäreren an HEp-2 Zellen	76
4.3. Nachweis der Adhäsions-Funktion des <i>C. pneumoniae</i> OmcB Proteins mittels des Hefeoberflächen-Präsentationssystems	77
4.3.1. Das <i>C. pneumoniae</i> OmcB Protein ist auf der chlamydialen Oberfläche lokalisiert	77
4.3.2. Expression des <i>C. pneumoniae</i> OmcB Proteins im Hefe-System	80
4.3.3. Das Aga2p-OmcB Fusionsprotein vermittelt signifikante Adhäsion an humane HEp-2 Zellen	80
4.4. Die Adhäsion der Hefen erfolgt über das chlamydiale OmcB Protein auf der Hefezelloberfläche	81
4.5. Identifizierung der N-terminalen Adhäsionsdomäne im <i>C. pneumoniae</i> OmcB Protein	83

4.5.1. Der N-Terminus des OmcB Proteins vermittelt die Adhäsion der Hefen an eukaryotische HEP-2 Zellen	84
4.6. Die Adhäsion von Aga2p-OmcB ist abhängig von Glykosaminoglykanen auf der eukaryotischen Zelloberfläche	84
4.6.1. Einfluss verschiedener exogener GAGs auf die Adhäsion von Aga2p-OmcB exprimierenden Hefen	85
4.6.2. Die Aga2p-OmcB Adhäsion wird Dosis-abhängig durch Heparin reduziert	86
4.6.3. Enzymatische Entfernung Heparansulfat-ähnlicher Strukturen von der HEP-2 Zelloberfläche reduziert die Adhäsion von Aga2p-OmcB Hefen	87
4.6.4. Aga2p-OmcB exprimierende Hefen vermitteln keine Adhäsion an GAG-defiziente CHO-Zelllinien	88
4.7. Die N-terminale Bindedomäne des OmcB Proteins vermittelt die GAG-abhängige Adhäsion	89
4.8. Die Deletion basischer Aminosäuren in der Bindedomäne des OmcB führt zum Verlust der Adhäsivität des Proteins	90
4.9. Identifizierung wichtiger basischer Aminosäuren des Heparinbindemotivs	92
4.9.1. Die verschiedenen OmcB-BD Mutanten zeigen reduzierte adhäsive Eigenschaften	93
4.10. Rekombinant hergestelltes OmcB_{6His} Protein zeigt Adhäsivität	94
4.11. Vorbehandlung der Humanzellen mit OmcB_{6His} Protein reduziert die <i>C. pneumoniae</i> Infektion	99
4.12. Vorbehandlung der <i>C. pneumoniae</i> EBs mit dem OmcB-Serum reduziert ebenfalls die Infektion	100
4.13. Das chlamydiale OmcB Protein vermittelt die Adhäsion von Chlamydien an Humanzellen	102
4.14. Die OmcB Proteine der chlamydialen Spezies <i>C. trachomatis</i> LGV und E sowie <i>C. psittaci</i> GPIC zeigen Adhäsion an humane Zellen	104
4.14.1. Lokalisierung der OmcB Proteine von <i>C. trachomatis</i> Serovar LGV und E in infizierten Zellen	105
4.14.2. Die verschiedenen OmcB Proteine zeigen unterschiedliche adhäsive Eigenschaften	105
4.14.3. Die <i>C. trachomatis</i> OmcB _{6His} Proteine reduzieren die <i>C. trachomatis</i> LGV und E Infektion	107
4.14.4. Die GAG-Abhängigkeit der OmcB-vermittelten Adhäsion weist Unterschiede zwischen den Spezies auf	108
4.15. Die GAG-Spezifität der <i>C. trachomatis</i> OmcB Proteine ist auf eine Änderung in der Aminosäuresequenz zurückzuführen	110
5. DISKUSSION	114
5.1. Aufbau eines funktionellen Adhäsionstests mit Hefezellen und humanen HEP-2 Zellen	114
5.1.1. Die Präsentation des Invasin-AD Fragments führt zur Adhäsion von Hefen an humane Zellen	114
5.2. Das <i>C. pneumoniae</i> GroEL-1 Protein vermittelt Adhäsion an HEP-2 Zellen	116

5.3. Das <i>C. pneumoniae</i> OmcB Protein zeigt Adhäsion an Humanzellen	118
5.3.1. Lokalisierung des OmcB Proteins auf der chlamydialen Oberfläche	118
5.3.2. Aga2p-OmcB Hefen adhäreren signifikant an humane Zellen	119
5.3.5. Die OmcB-vermittelte Adhäsion ist abhängig von Glykosaminoglykanen auf der humanen Zelloberfläche	120
5.3.4. Identifizierung der N-terminalen Adhäsionsdomäne	121
5.3.5. Spezifische basische Aminosäuren der Adhäsionsdomäne des OmcB sind verantwortlich für die Adhäsionsfunktion	122
5.4. Rekombinant hergestelltes <i>C. pneumoniae</i> OmcB Protein bindet an humane Zellen	125
5.5. Das OmcB Protein ist das chlamydiale Adhäsिन bei der <i>C. pneumoniae</i> Infektion	126
5.6. Charakterisierung der Adhäsionsfunktion des OmcB Proteins verschiedener chlamydialer Spezies	129
5.6.1. Die OmcB Proteine anderer chlamydialer Spezies vermitteln ebenfalls Adhäsion an humane Zellen	129
5.6.2. Die OmcB-vermittelte Adhäsion der einzelnen Chlamydien-Spezies weist eine unterschiedliche GAG-Spezifität auf	132
5.6.3. Die GAG-Spezifität der <i>C. trachomatis</i> OmcB Proteine wird durch die Unterschiede in der Proteinsequenz determiniert	134
7. LITERATURVERZEICHNIS	137
8. ANHANG	150
8.1. Zusätzliche Abbildungen zum Ergebnisteil	150
8.2. Rohdaten zu den Diagrammen im Ergebnisteil	155
8.2.1. Hefeadhäsionstests	155
8.2.2. Bindungstests mit Protein-beschichteten Latexkugeln	157
8.2.3. Neutralisations-Experimente	158
8.2.4. ELISA	159
8.3. Abbildungsverzeichnis	160
DANKSAGUNG	162
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	163

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	Adhäsionsdomäne
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserum Albumin
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl-Phosphat
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CHO	chinese hamster ovarian
cOMC	chlamydia outer membrane complex
deion.	deionisiert
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EB	Elementarkörper
ELISA	Enzyme linked immunosorbend assay
et al	und andere
FKS	Fötale Kälberserum
GAG	Glykosaminoglykan
GK	Gewebekulturöhrchen
g	Gramm
h	Stunde
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horse redish peroxidase)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IFU	Inclusion forming units (Einschluss bildende Einheiten)
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LGV	lymphogranuloma vereum
LPS	Lipopolysaccharid
min	Minute
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
MOI	multiplicity of infektion
NBT	Nitro Blue Tetrazolium

OD	optische Dichte
PBS	physiologischer Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RB	Retikularkörper
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TRL2	toll like receptor 2
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute

Zusammenfassung

Chlamydien sind Gram-negative, obligat intrazelluläre Bakterien, die sich in einem einzigartigen biphasischen Lebenszyklus vermehren. Zu den human-pathogenen Vertretern dieser Spezies gehören *Chlamydia pneumoniae* und *Chlamydia trachomatis*. *C. pneumoniae* tritt als Erreger respiratorischer Erkrankungen wie Pneumonien und Bronchitis in Erscheinung und wird außerdem mit verschiedenen systemischen Erkrankungen wie Atherosklerose, reaktive Arthritis und Alzheimer in Verbindung gebracht. Der kausale Zusammenhang zwischen der *C. pneumoniae* Infektion und den systemischen Krankheitsbildern ist jedoch noch ungeklärt. Die verschiedenen *C. trachomatis* Serovare sind die häufigsten Erreger sexuell übertragbarer Erkrankungen mit weltweit 340 Millionen Infizierter. Neben Infektionen des Urogenital-Trakts, die zur Infertilität führen können, treten auch Augen-Infektionen auf, die bei Nichtbehandlung zur Erblindung führen. Über den primären Schritt der Infektion, die Adhäsion der Bakterien an die humane Zelle, ist wenig bekannt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung von chlamydialen Proteinen, die als Adhäsine im initialen Prozess der Infektion eine Rolle spielen.

Im ersten Teil wurde ein heterologes Hefe-Oberflächen-Präsentationssystem als funktionelles Testsystem zur Untersuchung adhäsiver Proteineigenschaften etabliert. Durch die Präsentation des bekannten bakteriellen Adhäsins Invasin auf der Hefezelloberfläche konnte dessen Adhäsion an humane Zellen studiert werden. Mit Hilfe des Hefe-Systems wurde schließlich die Adhäsion der Oberflächen-lokalisierten *C. pneumoniae* Proteine Momp, OmcB sowie GroEL-1 an humane Zellen untersucht. Während Momp keine adhäsiven Eigenschaften besitzt, konnte für OmcB und GroEL-1 gezeigt werden, dass sie signifikant an humane Zellen adhäreren.

Im Folgenden wurde die Adhäsion des *C. pneumoniae* OmcB Proteins an Glykosaminoglykane (GAGs) der Wirtszelle detailliert analysiert. Das OmcB Protein bindet über eine im N-Terminus identifizierte Domäne an GAG-Strukturen auf der humanen Zelloberfläche. Durch Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass spezifische Aminosäuren innerhalb der Domäne für die GAG-vermittelte Adhäsion verantwortlich sind. Rekombinant hergestelltes OmcB Protein bestätigte die zuvor im Hefe-System festgestellten adhäsiven Eigenschaften des Proteins.

In weiterführenden Analysen konnte nachgewiesen werden, dass das OmcB Protein im Infektionsprozess von *C. pneumoniae* die Adhäsion der Chlamydien an die GAG-Strukturen auf den humanen Zellen vermittelt. Die Inhibierung der OmcB-Funktion durch die Vorbehandlung der chlamydialen Elementarkörperchen mit einem OmcB-spezifischen

Antikörper oder durch die Vorinkubation der Humanzellen mit dem rekombinanten OmcB Protein, reduzierte signifikant die Infektivität der Chlamydien.

Im letzten Abschnitt der Arbeit wurden die OmcB Proteine der verwandten chlamydialen Spezies *C. trachomatis* Serovar LGV und E sowie *C. psittaci* Biovar GPIC untersucht. Für das OmcB Protein von *C. trachomatis* LGV und *C. psittaci* GPIC konnte gezeigt werden, dass sie ein ähnliches Adhäsionsverhalten mit einer ähnlichen GAG-Spezifität wie das *C. pneumoniae* Protein aufweisen. Das OmcB von *C. trachomatis* Serovar E hingegen zeigte Unterschiede bezüglich der Adhäsionsstärke und der GAG-Spezifität. In Analysen zur Aminosäuresequenz konnten die Unterschiede im Adhäsionsverhalten der beiden *C. trachomatis* Proteinen anhand eines Aminosäureaustausches und den potentiellen Änderungen in der Sekundärstruktur festgemacht werden.

Die vorliegenden Daten belegen, dass das OmcB Protein als chlamydiales Adhäsins für die Bindung der Bakterien an die eukaryotische Wirtszelle wichtig ist. Dabei bindet OmcB je nach Chlamydien-Art an unterschiedliche GAGs und trägt wahrscheinlich zum Zelltropismus der verschiedenen Spezies bei.

1. Einleitung

1.1. Chlamydiale Spezies

Chlamydien sind obligate intrazelluläre, gram-negative Bakterien, die einen einzigartigen biphasischen Lebenszyklus aufweisen und als human-pathogene oder Tier-pathogene Erreger in Erscheinung treten. Aufgrund der Unterschiede zu anderen Gram-negativen Bakterien wurden sie in eine eigene Ordnung, die *Chlamydiales*, eingeteilt. Diese Ordnung enthält nur eine Familie, *Chlamydiaceae* mit den beiden Gattungen *Chlamydia* und *Chlamydophila*. Zur Gattung *Chlamydia* gehören die Spezies *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia suis* und *Chlamydia muridarum*. Die Gattung *Chlamydophila* beinhaltet insgesamt 6 Spezies: *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia felis*, *Chlamydia caviae* und *Chlamydia abortus* (Moulder, Hatch et al. 1984), (Grayston, Kuo et al. 1989), (Fukushi and Hirai 1992). Bei phylogenetischen Analysen wurden weitere verwandte Spezies, zu denen unter anderem die Parachlamydien (Umweltchlamydien), Waddliaceae und Simkaniaceae gehören, systematisch den *Chlamydiaceae* zugeordnet (Everett, Bush et al. 1999), (Horn, Fritsche et al. 1999).

1.1.1. Human-pathogene Chlamydien

1.1.1.1. *C. pneumoniae*

Zu den human-pathogenen Erregern der *Chlamydiaceae* gehören die Spezies *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* und *C. psittaci*. *C. pneumoniae* tritt weltweit als pathogenes Bakterium bei respiratorischen Erkrankungen in Erscheinung. Dazu gehören Infektionen der oberen Atemwege wie Pharyngitis oder Sinusitis, sowie Infektionen der unteren Atemwege, die Bronchitis oder Pneumonien zur Folge haben (Grayston, Aldous et al. 1993), (Kuo, Jackson et al. 1995). *C. pneumoniae* wird für 5-15% aller ambulant erworbener Pneumonien verantwortlich gemacht und nach seroepidemiologischen Untersuchungen wurde eine 60%ige Durchseuchung bei Erwachsenen im Alter von 20 Jahren errechnet. Damit kann davon ausgegangen werden, dass jeder Mensch im Laufe seines Lebens eine *C. pneumoniae* Infektion durchläuft (Peeling and Brunham 1996), (Kuo, Jackson et al. 1995). Zusätzlich zu den Infektionen des Respirationstrakts wurde für *C. pneumoniae* ein Zusammenhang mit verschiedenen anderen systemischen Infektionen angedeutet. Dabei handelt es sich um Erkrankungen wie Asthma, Athereosklerose, reaktive Arthritis, Multiple-Sklerose und Alzheimer (Hahn, Dodge et al. 1991), (Kuo, Shor et al. 1993), (Wong, Gallagher et al. 1999), (Ngeh, Anand et al. 2002), (Hannu, Puolakkainen et al. 1999), (Sriram, Ljunggren-Rose et al. 2005), (Balin, Gerard et al. 1998). In den meisten Fällen beruht die Assoziation von *C. pneumoniae* mit den oben

erwähnten Krankheitsbildern auf verschiedenen Erregernachweisen. Die Bakterien wurden direkt in Gewebeproben detektiert oder bei serologischen Analysen wurden Antikörper gegen verschiedene chlamydiale Antigene festgestellt. Am Beispiel der Athereosklerose konnte *C. pneumoniae* in athereosklerotischen Plaques mittels elektronenmikroskopischen und immunologischen Analysen, sowie durch PCR-basierte Detektionen nachgewiesen werden (Kuo, Gown et al. 1993), (Maass, Bartels et al. 1998). Es gelang sogar lebensfähige Chlamydien aus den Läsionen zu isolieren (Ramirez and group 1996), (Campbell, ER et al. 1995). Weiterhin wurde bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen ein hoher Antikörpertiter gegen *C. pneumoniae*, speziell gegen das chlamydiale GroEL-1 (Hsp60), detektiert (Saikku, Leinonen et al. 1988), (Jantos, Krombach et al. 2000). Jedoch ist bei allen systemischen Krankheitsbildern noch kein Nachweis erbracht worden, dass *C. pneumoniae* der Auslöser der Erkrankungen ist.

1.1.1.2. *C. trachomatis*

Für die verschiedenen Serovare von *C. trachomatis* (A-K) ermittelte die WHO (Welt-Gesundheits-Organisation) für das Jahr 1999 weltweit 340 Millionen Infizierte, von denen 146 Millionen Infektionen des Auges, sogenannte Trachoma, aufwiesen. Die Ausbildung von Trachomen, wird von den *C. trachomatis* Serovaren A-C verursacht und führt bei Nicht-Behandlung zur Erblindung (Whitcher, Srinivasan et al. 2001), (Tabbara 2001). Die Serovare D-K werden heute mit ca. 98 Millionen neuer Infektionen pro Jahr, als die häufigsten Erreger von sexuell übertragbaren Infektionen ausgewiesen (Peeling and Brunham 1996), (Gerbase, Rowley et al. 1998), (WHO, 2001). Sie verursachen bei Männern und Frauen asymptomatisch und symptomatisch verlaufende Infektionen des Urogenitaltrakts, die Erkrankungen wie Salpingitis, Epididymitis, Urethritis, Endometritis, Cervicitis hervorrufen. Besonders bei Frauen führen diese unter Umständen zur Unfruchtbarkeit, da die chlamydiale Infektion häufig eine Vernarbung der Eierstöcke und Eileiter zur Folge hat (Cates and Wasserheit 1991), (Brunham, Zhang et al. 2000), (Igietseme, Black et al. 2002). Da bei den sexuell übertragbaren *C. trachomatis* Infektionen Unterschiede bei der Ausbreitung der Infektion im Organismus auftreten, hat man die Erreger in nicht-dissimilierende Serovare (D-K) und dissimilierende Serovare (LGV, lymphogranuloma venereum, L1-L3) eingeteilt. Für die Serovare D-K ist beschrieben, dass sie die epithelialen Gewebe und Schleimhäute des Urogenitaltrakts infizieren, während diese Gewebe für die LGV Serovare nur die Eintrittspforte in den Organismus darstellen (Schachter and Osoba 1983). *C. trachomatis* LGV verbreitet sich aus diesen Epithelien in tiefer liegende Gewebe bis zu den Lymphknoten und verursacht dort eine als Lymphadenopathie bezeichnete Erkrankung des lymphatischen Systems (Stamm and Holmes 1990).

1.1.2. Tier-pathogene Chlamydien

Bei den verschiedenen Tier-pathogenen Chlamydienarten handelt es sich um Erreger, die in verschiedenen Nutztieren wie Rindern, Schafen, Ziegen und Pferden nachweisbar sind. Sie treten aber auch bei Katzen und einigen Nagetieren wie Mäusen, Hamstern und Meerschweinchen auf. Bei den australischen Koalabären sind sie ein weit verbreiteter Erreger, der für die Sterilität weiblicher Tiere verantwortlich gemacht wird (McColl, Martin et al. 1984). Die Spezies *C. suis*, *C. muridarum*, *C. psittaci*, *C. felis*, *C. caviae*, *C. pecorum* und *C. abortus* infizieren bei Tieren ebenfalls Epithelgewebe der Augen, des Respirationstrakts, des Magen-Darm-Trakts und des Urogenitaltrakts. Die chlamydialen Infektionen in Tierbeständen verursachen große wirtschaftliche Schäden, besonders die Infektionen mit *C. suis*, *C. pecorum* und *C. abortus*, führen bei den Tieren zu starken respiratorischen und intestinalen Erkrankungen, sowie zur Infertilität und zum Abort von Föten (Chanton-Greutmann, Thoma et al. 2002), (Derbigny, Kerr et al. 2005). Außerdem bestehen bei sogenannten Zoonose hervorgerufen durch den engen Kontakt zwischen Mensch und infiziertem Tier die Möglichkeit der Übertragung der Infektion (Smith, Bradley et al. 2005), (Pospischil, Thoma et al. 2002).

C. psittaci ist ein chlamydialer Erreger, der hauptsächlich intestinale aber auch respiratorische Infektionen, sogenannte Psittakosen, bei Vögeln verursacht. Neben Vögeln sind auch fast alle Haustiere Reservoir für *C. psittaci* (Peeling and Brunham 1996). Psittakosen sind meldepflichtige Erkrankungen, die durch respiratorische Sekrete, Exkremente und Federn auf den Menschen übertragbar sind. Beim Menschen ruft die Infektion die verschiedensten Krankheitsbilder hervor und kann sogar tödlich verlaufen (Fryden, Kihlstrom et al. 1989), (Peeling and Brunham 1996).

1.2. Mechanismen der zellulären Invasion durch human-pathogene Bakterien

Beim Menschen treten die verschiedensten Arten von Human-pathogenen Bakterien auf, die unterschiedliche Zell- und Gewebetypen infizieren und so dem Organismus Schaden zufügen. Man unterscheidet dabei im Allgemeinen zwei Typen von Erregern: die einen leben fakultativ intrazellulär, die anderen obligat intrazellulär. Solche Pathogene, die fakultativ intrazellulär leben, infizieren häufig zuerst die Schleimhäute und epitelialen Oberflächen der Atemwege, des Magen-Darm- oder Urogenitaltrakts. Dazu gehören Bakterien wie *Listeria monocytogenes*, Yersinien, Salmonellen, *Helicobacter pylori*, *Neisseria gonorrhoeae*, Shigellen. Neben oberflächlichen Infektionen von Geweben können sie auch in die Zellen einwandern und überleben dort im Zytoplasma (Cossart and Sansonetti 2004), (Finlay and Cossart 1997), (Boyle and Finlay 2003), (Vazquez-Torres and Fang 2000). Durch Rezeptor-vermittelte Endozytose werden sie in ein Membran-

umschlossenes Phagosom in die Zelle aufgenommen (Finlay and Cossart 1997). Der Prozess der Adhäsion und Internalisierung kann dabei mittels des „Zipper“ oder „Trigger“ Mechanismus erfolgen, verläuft aber immer abhängig von Modulationen des Aktinzytoskeletts (Cossart and Sansonetti 2004), (Selbach and Backert 2005).

Beim „Zipper“ Mechanismus interagieren Adhäsionsmoleküle der Bakterienzelle mit Rezeptoren oder Oberflächenstrukturen auf der humanen Zelle und lösen so ihre Aufnahme in die Zelle aus. In vielen Fällen erfolgt über die Bindung an zelluläre Rezeptoren die Interaktion mit dem Aktinzytoskelett (Boyle and Finlay 2003). Beispiele für bakterielle Adhäsine sind die Internaline A und B von *Listeria monocytogenes*, die Opa Proteine von *Neisseria gonorrhoeae* oder das Invasin von Yersinien (Drevets, Sawyer et al. 1995), (Dehio, Freissler et al. 1998), (Dersch and Isberg 1999). Beim „Trigger“ Mechanismus wird der Kontakt zwischen Bakterium und Wirtszelle über das Typ III Sekretionssystem (TTSS) hergestellt (Cossart and Sansonetti 2004). Bakterielle Effektorproteine werden damit ins Zytoplasma der humanen Zelle transloziert und interagieren dort mit den Komponenten des Aktinzytoskeletts, um so die Aufnahme des Bakteriums in die Zelle zu unterstützen (Miao, Brittnacher et al. 2003), (Guiney and Lesnick 2005). Nach der Invasion verbleiben manche Erreger wie Salmonellen im Phagosom, um sich dort zu vermehren (Holden 2002). Andere Spezies wie *Listeria monocytogenes* und Shigellen zerstören das Phagosom und vermehren sich im Zytoplasma (Lasa and Cossart 1996), (Nhieu, Enninga et al. 2005). Dabei konnte für diese Bakterien gezeigt werden, dass sie sich über Aktin-gesteuerte Bewegungen im Zytoplasma oder von Zelle zu Zelle bewegen (Selbach and Backert 2005), (Gouin, Welch et al. 2005), (Cossart and Sansonetti 2004).

Zu den obligat intrazelluläre Bakterien gehören Rickettsien, Mycoplasmen und Chlamydien. Über die Mechanismen der Adhäsion und Internalisierung ist bei diesen Spezies noch wenig bekannt. Die Aufnahme in die Zelle erfolgt aber ebenso über Rezeptor-vermittelte Endozytose. Rickettsien verlassen das Phagosom, vermehren sich im Zytoplasma und bewegen sich Aktin-gesteuert (Walker, Valbuena et al. 2003). Chlamydien durchlaufen hingegen ihren Entwicklungszyklus im Phagosom.

1.3. Lebenszyklus der Chlamydien

Bei *C. pneumoniae* kann wie bei allen obligat intrazellulären Chlamydien während des Entwicklungszyklus zwischen zwei Lebensformen unterschieden werden (Abb. 1). Chlamydien existieren zum einen als infektiöse, metabolisch inaktive Elementarkörperchen (EBs), zum anderen als metabolisch aktive, nicht infektiöse Retikularkörperchen (RBs) (Miyashita, Kanamoto et al. 1993). Die chlamydialen EBs adhären an die humane Wirtszelle und werden über Phagozytosen in die Zelle

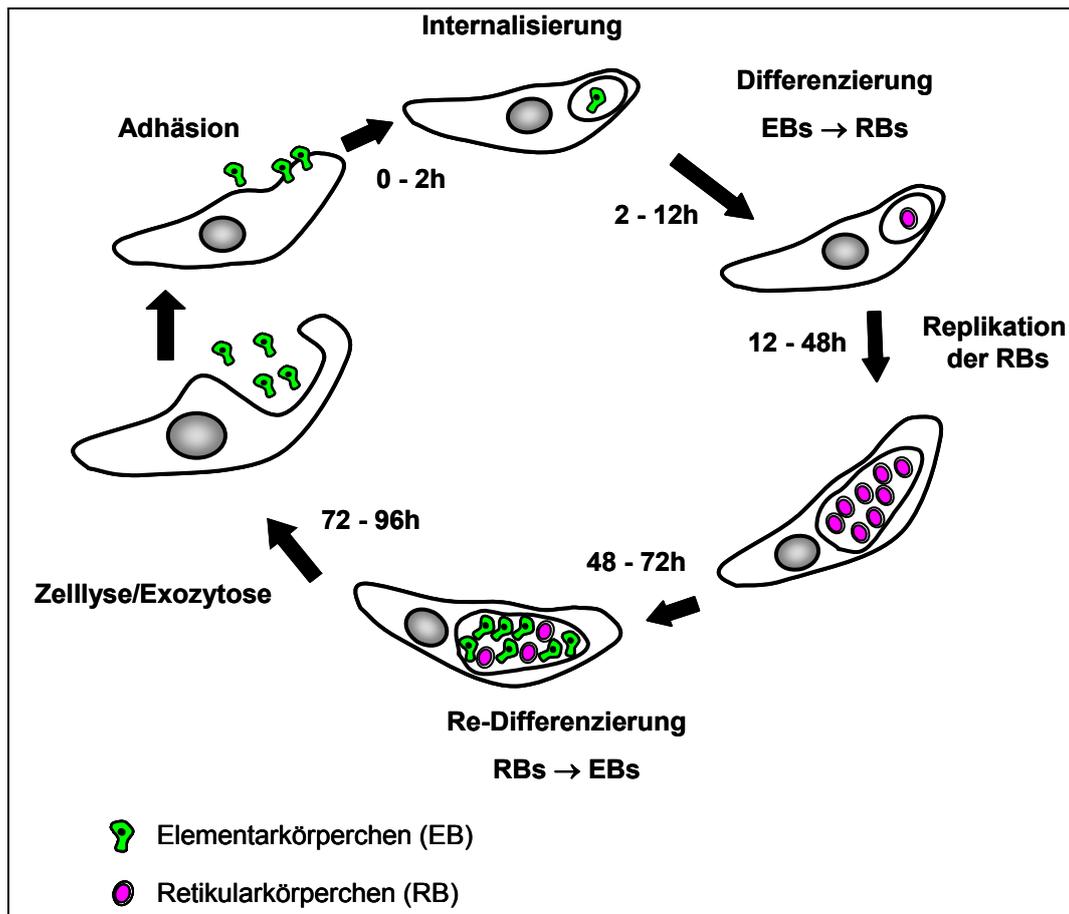


Abbildung 1: Entwicklungszyklus der Chlamydien.

Zeitangaben beziehen sich auf den Zyklus von *Chlamydia pneumoniae* (Wolf et al., 2000).

aufgenommen. Sie liegen nach der Internalisierung in einem Membran-umschlossenen Phagosom vor, das als Einschlusskörper (Inklusion) bezeichnet wird. Innerhalb der ersten 8-12 Stunden differenzieren sich die Elementarkörperchen in der Inklusion zu den größeren RBs und diese beginnen sich über Zweiteilung zu vermehren (Wolf, Fischer et al. 2000). Während der Teilungsphase (12-48h) sind die RBs metabolisch aktiv, dennoch sind Chlamydien als Energieparasiten auf die Zufuhr von Nukleotiden, ATP und Aminosäuren von der Wirtszelle angewiesen (McClarty 1994). 48 bis 72 Stunden nach der Infektion beginnen die RBs mit der Re-Differenzierung zurück zu infektiösen EBs, bis die Inklusion hauptsächlich mit EBs gefüllt ist. Der Entwicklungszyklus von *C. pneumoniae* endet zwischen 72 und 96 Stunden mit Exozytose oder der Lyse der Zelle. Dabei werden die EBs freigesetzt und können so weitere Zellen infizieren (Miyashita, Kanamoto et al. 1993), (Wolf, Fischer et al. 2000).

Die Dauer des Infektionszyklus variiert bei den verschiedenen chlamydialen Spezies. Der Zyklus der *C. trachomatis* Serovare A-K dauert ähnlich wie bei *C. pneumoniae* 72-96h (Davis and Wyrick 1997). Die LGV Serovare von *C. trachomatis* vermehren sich am schnellsten, bei ihnen ist die Entwicklung nach 48h mit der Lyse der Zelle abgeschlossen (Davis and Wyrick 1997).

1.3.1. Adhäsion von Chlamydien an die humane Zelle

Der Infektionszyklus von *C. pneumoniae* beginnt mit der Adhäsion der infektiösen EBs an die humane Zelle und der anschließenden Internalisierung der chlamydialen Partikel in die Membran-umschlossene Inklusion (Abb.1). Über den mechanistischen Ablauf des Adhäsionsprozesses und den daran beteiligten Komponenten, d.h. chlamydiale Adhäsine und Wirts-spezifische Rezeptoren, ist noch wenig bekannt.

Vorrangegangene Studien haben gezeigt, dass die Infektion von *C. pneumoniae* abhängig von Glykosaminoglykan-Strukturen (GAGs) auf der eukaryotischen Wirtszelle ist (Wuppermann, Hegemann et al. 2001), (Beswick, Travelstead et al. 2003). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Chlamydien an GAGs binden und so Kontakt zwischen Bakterium und Wirtszelle herstellen. Entfernte man die GAGs, trat eine 90%ige

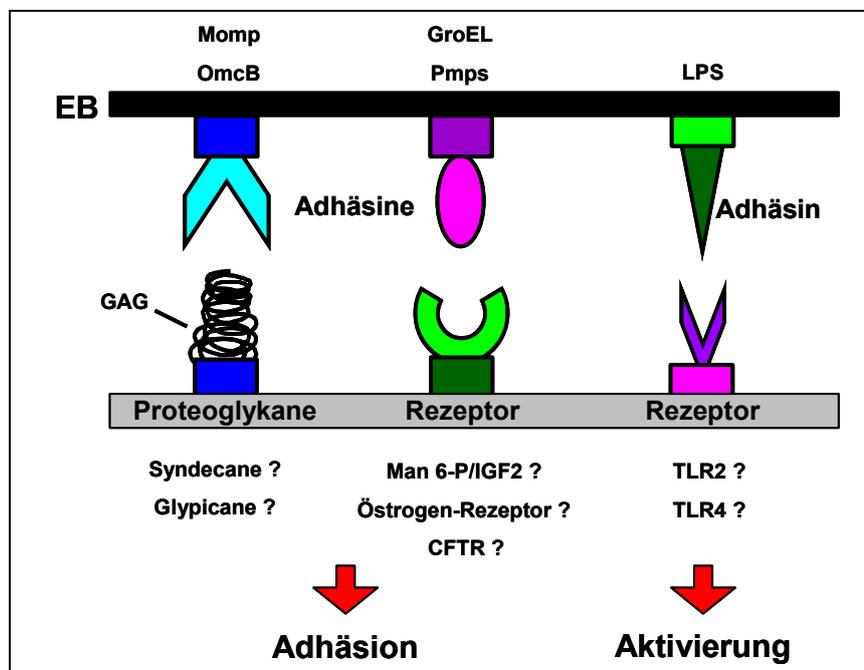


Abbildung 2: Modell der chlamydialen Adhäsion an die humane Zelle.

Infektionsreduktion ein die zeigt, dass die Glykosaminoglykan-Strukturen essentiell für die Infektion sind. (Wuppermann, Hegemann et al. 2001), (Beswick, Travelstead et al. 2003). Da jedoch keine vollständige Inhibierung der Infektion feststellbar war, kann man schließen, dass es neben der Adhäsion an GAGs wahrscheinlich einen zweiten Rezeptor-vermittelten Adhäsionsmechanismus gibt (Abb. 2) (Wuppermann, Hegemann et al. 2001). Analysen der *C. trachomatis* LGV Infektion einer mutierten CHO-Zelllinie beschrieben die GAG-vermittelte Adhäsion als reversiblen Schritt, während die Bindung an den potentiellen Rezeptor irreversibel ist (Carabeo and Hackstadt 2001). Bei der Identifikation von chlamydialen Proteinen, die am Adhäsionsprozess beteiligt sein könnten, werden hauptsächlich bekannte oder unbekannte Komponenten des chlamydialen

Außenmembrankomplex (cOMC) in Betracht gezogen (Siehe Abschnitt 1.4.) (Su, Watkins et al. 1990), (Ting, Hsia et al. 1995), (Wehrl, Brinkmann et al. 2004). Ein humaner Rezeptor, der spezifisch mit einem chlamydialen Protein interagiert, wurde bisher noch nicht eindeutig identifiziert. Diskutiert wurde jedoch die Bedeutung des Mannose 6-Phosphat-IGF2 (Insulin-like growth factor 2) Rezeptors bei der *C. pneumoniae* Infektion, sowie der Östrogenrezeptor bei einer *C. trachomatis* Serovar E Infektion (Puolakkainen, Kuo et al. 2005), (Davis, Raulston et al. 2002). Die Präferenz der einzelnen Chlamydien für einen bestimmten humanen Rezeptor, trägt mit zum unterschiedlichen Zelltropismus der Spezies bei. Während eine Vielzahl von Zelltypen von *C. pneumoniae* infiziert wird, zeigt z.B. *C. trachomatis* Serovar E eine deutliche Beschränkung auf Epithelzellen des Urogenitaltrakts (Krull, Maass et al. 2005), (Davis and Wyrick 1997). *C. trachomatis* Serovar LGV bevorzugt hingegen Epithelien des lymphatischen Systems (Davis and Wyrick 1997). Jede Zelle präsentiert ein anderes Spektrum an Rezeptoren, die von den verschiedenen Chlamydien erkannt und gebunden werden.

Unterstützt werden diese Befunde dadurch, dass Chlamydien Cholesterol-reiche Membran-Mikrodomänen (Lipid rafts) bei der Adhäsion und Internalisierung bevorzugen (Jutras, Abrami et al. 2003), (Stuart, Webley et al. 2003), (Webley, Norkin et al. 2004). In diesen Domänen befindet sich eine Vielzahl von zellulären Rezeptoren, die in die Adhäsion involviert sein können und gleichzeitig wichtig für die Phagozytose der chlamydialen EBs sind (Simons and Ikonen 1997), (Brumell and Grinstein 2003). Alle bisher durchgeführten Untersuchungen zum Adhäsionsprozess von *C. pneumoniae* zeigen, dass neben der GAG-vermittelten Adhäsion auch ein humaner Rezeptor am Infektionsprozess beteiligt sein kann. Es ist dabei auch nicht auszuschließen, dass beide Mechanismen benötigt werden, um die Zelle zu infizieren.

1.3.2. Internalisierung

Nach der Adhäsion der Bakterien erfolgt innerhalb von 2 Stunden die Internalisierung über Phagozytose. Dabei wurde in ultrastrukturellen Analysen gezeigt, dass die Aufnahme von EBs in Mikrovilli-Strukturen der humanen Zelle erfolgt (Wolf, Fischer et al. 2000), (Carabeo, Grieshaber et al. 2002). Diese Strukturen entstehen durch Remodulierungen des Aktinzytoskeletts, hervorgerufen durch die Interaktion der Chlamydien mit Komponenten des Aktinnetzwerks (Schramm and Wyrick 1995), (Carabeo, Grieshaber et al. 2004), (Carabeo, Grieshaber et al. 2002), (Subtil, Wyplosz et al. 2004), (Balana, Niedergang et al. 2005). Die Assoziation von EBs an die eukaryotische Zelle führt zu einer lokalen Polymerisation des Aktins an der Eintrittsstelle der Bakterien. Ohne funktionsfähiges Aktinzytoskelett können die Chlamydien zwar an die Zelle binden, werden jedoch kaum mehr in die Zelle aufgenommen (Carabeo, Grieshaber et al. 2002).

Die Polymerisation des Aktins wird über Bakterien-vermittelte Aktivierung von GTPasen wie Rac, Cdc42 und ARF6 bewerkstelligt (Carabeo, Grieshaber et al. 2004), (Subtil, Wyplosz et al. 2004), (Balana, Niedergang et al. 2005). Für *C. trachomatis* konnte bereits Tarp, ein von den Bakterien sekretiertes Protein identifiziert werden, dass in der Lage ist Aktin an die bakterielle Eintrittsstelle zu rekrutieren (Clifton, Fields et al. 2004), (Clifton, Dooley et al. 2005), (Engel 2004). Welche genaue Funktion Tarp bei der Rekrutierung des Aktins hat und wie die Chlamydien die Polymerisation des Aktins aktivieren, ist jedoch noch ungeklärt. Während der Phase der Adhäsion und Internalisierung erfolgt auch gleichzeitig eine Aktivierung von verschiedenen Signalkaskaden in der Wirtszelle (Krüll, Klucken et al. 1999), (Coombes and Mahony 2002). Es kommt zu einer MEK vermittelten Aktivierung von ERK1/2, sowie eine PI 3-Kinase vermittelte Aktivierung von Akt. Beide Kinasen ERK1/2 und Akt sind in die verschiedensten zellulären Prozesse, wie Regulation des Aktinzytoskeletts oder Kontrolle von Proliferation bzw. Apoptose involviert (Coombes and Mahony 2002). Als weiteren Hinweis für die Aktivierung von Wirtszellproteinen konnte gezeigt werden, dass die Infektion zu einem vermehrten Auftreten von Phospho-Tyrosinproteine in der Zelle führt (Virok, Nelson et al. 2005). Über die gezielte Aktivierung verschiedener zellulärer Prozesse fördern die Bakterien ihren Eintritt in die Zelle.

1.3.3. Differenzierung vom EB zum RB

Die in der Inklusion internalisierten chlamydialen EBs, beginnen sich in die nicht-infektiösen RBs zu differenzieren (2-12h). Dazu wird die regide Struktur des cOMC (chlamydia outer membrane complex) aufgelöst, indem die Disulfidbrücken zwischen den Cystein-reichen Proteine aufgehoben werden (Siehe Abschnitt 1.4.). Gleichzeitig werden durch die EUO-Protease auch die Histon-ähnlichen Proteine Hc1 und Hc2 von der DNA entfernt und das Chromatin dekondensiert (Kaul, Hoang et al. 1997). Genomweite Studien haben gezeigt, dass für den Differenzierungsprozess und die Einleitung der biosynthetischen Aktivitäten, die Transkription der frühen oder „immediate early“ Gene benötigt werden. Dazu gehören Gene wie *euo*, die *inc*-Gene und Gene des chlamydialen Metabolismus (Shaw, Dooley et al. 2000), (Belland, Zhong et al. 2003). Ebenso werden die ersten chlamydialen Genprodukte, die Interaktionen zwischen Wirtszellproteinen und der Inklusion herstellen, erforderlich. Eines der frühen Ereignisse in der Infektion ist die Wanderung der Inklusion entlang der Mikrotubuli, in die Nähe des Zellkerns und des Golgi-Apparates (Clausen, Christiansen et al. 1997). Für *C. trachomatis* konnte gezeigt werden, dass die Bakterien mit dem Motorprotein Dynein interagieren, um entlang der Mikrotubuli transportiert zu werden. Für *C. pneumoniae* wurde diese Interaktion nicht nachgewiesen, trotzdem werden auch sie zur Kernperipherie transportiert (Clausen, Christiansen et al. 1997), (Grieshaber, Grieshaber et al. 2003).

1.3.4. Replikationsphase

Die chlamydialen RBs vermehren sich während der Replikationsphase (12-48h) durch Zweiteilung und sind dabei auf die Zufuhr von ATP, Nukleotide, Eisenionen oder Aminosäuren wie Tryptophan angewiesen. Für das Wachstum der Inklusion und der Bakterien werden außerdem Membrankomponenten wie Cholesterin und Sphingomyelin benötigt. Diese gelangen über exozytische Vesikel der Wirtszelle, die mit der Einschlußmembran fusionieren, in die chlamydiale Inklusion (Hackstadt, Scidmore et al. 1995), (Carabeo, Mead et al. 2003).

Gleichzeitig erreichen die Bakterien durch Einlagerung von chlamydialen Inc Proteinen eine Veränderung der Einschlußmembran die dazu beiträgt, dass diese nicht mit Lysosomen fusioniert (Rockey, Scidmore et al. 2002), (Rzomp, Scholtes et al. 2003), (Scidmore, Rockey et al. 1996). Die Chlamydien entkommen so der Wirtszellabwehr, sind aber trotzdem in der Lage, die zellulären Transportprozesse für ihr Wachstum zu nutzen. Sie interferieren während der Infektion mit verschiedenen zellulären Prozessen, um so ihre Entwicklung in der Zelle zu gewährleisten. Es konnte gezeigt werden, dass sie aktiv die Apoptose infizierter Zellen inhibieren, indem sie proapoptische Faktoren degradieren (Rajalingam, Al-Younes et al. 2001), (Dong, Pirbhai et al. 2005). Außerdem sekretieren Chlamydien eine Protease, CPAF (chlamydia proteasome-like activity factor), die in der Wirtszelle Transkriptionsfaktoren für die Regulation der Immunantwort zerstört (Zhong, Fan et al. 2001), (Dong, Zhong et al. 2005), (Dong, Sharma et al. 2004).

1.3.5. Re-Differenzierung

Im Anschluss an die Vermehrungsphase, in der die Chlamydien aktiv auf Prozesse der eukaryotischen Zelle einwirken, um den Verlauf der Infektion zu gewährleisten, beginnen die chlamydialen RBs sich in EBs zurück zu differenzieren. Der gesamte Prozess der Re-Differenzierung (48-72h) verläuft deutlich asynchron. Während einige RBs noch in der Vermehrungsphase sind, beginnen andere schon mit der Umwandlung (Wolf, Fischer et al. 2000). Die für den Prozess der Re-Differenzierung benötigten Genprodukte werden in dieser Phase deutlich hochreguliert. Studien der Genexpression während des Entwicklungszyklus haben gezeigt, dass die Komponenten der chlamydialen Außenmembran besonders stark exprimiert werden (Shaw, Dooley et al. 2000), (Belland, Zhong et al. 2003). Die vermehrte Bildung von Hüllproteinen und deren Vernetzung über Disulfidbrücken ist erforderlich, um die EBs mit ihrer typischen rigiden Außenmembran zu versehen. Des Weiteren wird die DNA durch Assoziation mit Histon-ähnlichen Proteinen kondensiert und damit transkriptionell stillgelegt.

1.3.6. Austritt aus der Zelle

Am Ende des chlamydialen Entwicklungszyklus nimmt die mit EBs gefüllte Inklusion einen großen Teil der humane Zelle ein. Je nach chlamydialer Spezies kann sie mit bis zu 1000 chlamydialen Partikeln gefüllt sein (Moulder 1991), (Wolf, Fischer et al. 2000). Die Freisetzung der Chlamydien kann auf zwei verschiedene Arten erfolgen: entweder wird die Zelle lysiert oder der Inhalt der Inklusion wird durch Exozytose aus der Zelle entlassen (Moulder 1991). Bei den meisten Spezies wie z.B. bei den *C. trachomatis* LGV Serovaren beobachtet, findet fast ausschließlich eine Lyse der Zelle statt (Todd and Caldwell 1985). Die EBs können nach dem Verlassen der Zelle neue benachbarte Zellen infizieren oder sogar durch Besiedlung von Makrophagen, Dentritischen Zellen oder Monozyten über den Blutstrom im Organismus dissimulieren (Hackstadt 1999), (Krull, Maass et al. 2005), (Gaydos, Summersgill et al. 1996).

1.4. Besonderheit der chlamydialen Außenmembran

Wie schon unter Abschnitt 1.1. beschrieben, bilden Chlamydien eine eigene Ordnung, da sie sich in grundlegenden Eigenschaften von anderen Gram-negativen Bakterien unterscheiden. Neben dem einzigartigen biphasischen Lebenszyklus ist es vor allem die besondere Beschaffenheit der chlamydialen Außenmembran (cOMC, chlamydia outer membrane complex), die für die Einteilung der Chlamydien in eine eigene Ordnung herangezogen wird. Dabei ist der generelle Aufbau der Außenmembran wie der anderer Gram-negativer Bakterien (Abbildung 3). Er lässt sich unterteilen in eine innere Membran (IM), die durch den Periplasmatischen Raum (PM) von der äußeren Membran (AM) getrennt ist (Everett and Hatch 1995). Chlamydien besitzen ein Genus-spezifisches Lipopolysaccharid (LPS), welches aufgrund seiner chemischen Zusammensetzung als sogenanntes „rauhes LPS“ bezeichnet wird (Brade, Brade et al. 1987), (Nurminen, Leinonen et al. 1983). Es liegt auf der Außenmembran auf und besitzt wie andere bakterielle LPS endotoxische Aktivität (Heine, Muller-Loennies et al. 2003). Für das *C. trachomatis* LPS konnte gezeigt werden, dass es vermittelt über TLR 2 (toll like receptor) Rezeptoren eine Aktivierung des NF κ B Signalwegs auslöst (Erridge, Pridmore et al. 2004). Bei Untersuchungen zur *C. pneumoniae* Infektion konnte mit einem LPS-Antikörper sogar die Infektion neutralisiert werden (Peterson, de la Maza et al. 1998).

Ein essentieller Unterschied zwischen der chlamydialen Außenmembran und der anderer Gram-negativer Bakterien ist, dass sie keine detektierbaren Mengen an Peptidoglykan aufweist, obwohl Gene für einige Enzyme der Synthesekette im Genom vorhanden sind (Barbour, Amano et al. 1982), (Rockey, Lenart et al. 2000). Das Fehlen dieser wichtigen Struktur-gebenden Komponente, wird bei den Chlamydien durch das Vorhandensein von

Cystein-reichen Proteinen kompensiert. Diese werden über Disulfidbrücken miteinander vernetzt und verleihen so der EB-Oberfläche ihre besondere Regidität (Hatch 1996).

Die verschiedene Proteine des cOMC wurden in biochemischen Untersuchungen der Außenmembran und über genomweite bioinformatrische Analysen identifiziert (Raulston 1995), (Kubo and Stephens 2000), (Montigiani, Falugi et al. 2002).

1.4.1. Proteine des cOMC (chlamydia outer membrane complex)

Zur Aufrechterhaltung der Integrität der Bakterienhülle verfügen alle Chlamydien-Spezies über drei wichtige Proteine: Momp (major outer membrane protein), OmcA und OmcB (outer membrane complex protein A, B). Diese sind durch Ausbildung von Disulfidbrücken miteinander vernetzt und tragen so zur Stabilität der EB-Oberfläche bei (Everett and Hatch 1995). Aus Untersuchungen zur Zusammensetzung der Außenhülle von *C. psittaci* 6BC wurde ein stöchiometrisches Verhältnis der Proteine von Momp (5) : OmcA (2) : OmcB (1) kalkuliert (Everett and Hatch 1995). Neben diesen Hauptkomponenten des cOMC, wurden verschiedene andere Proteine identifiziert. Hierzu gehört die Familie der Pmps (polymorphic membrane proteins) und das PorB Protein (Stephens, Kalman et al. 1998), (Kubo and Stephens 2000).

1.4.1.1. Momp (major outer membrane protein)

Das Momp/OmpA Protein ist ein 40 kDa Protein, dass bei allen Human- und Tier-pathogenen Chlamydien-Spezies vorhanden ist und 60% des cOMCs ausmacht (Raulston 1995). Es bildet durch Oligomerisierung Poren in der Membran, aber besitzt keine spezifische Transportfunktion (Wyllie, Ashley et al. 1998), (Wyllie, Longbottom et al. 1999). Sequenzvergleiche zwischen den chlamydialen Spezies haben gezeigt, dass das Protein über vier variable Domänen (VD1-4) verfügt, anhand derer man die Chlamydien in Serotypen unterteilen kann (Baehr, Zhang et al. 1988), (Su, Watkins et al. 1990). Für *C. trachomatis* und *C. psittaci* konnte die Oberflächen-Lokalisierung von Epitopen der variablen Domänen gezeigt werden. Diese Momp-Epitope sind bei Infektionen mit diesen Spezies als starke Immunogene in der Antikörperreaktion nachzuweisen (Hatch, Allan et al. 1984), (Su, Watkins et al. 1990). Ganz im Gegensatz dazu, ist Momp bei *C. pneumoniae* zwar Oberflächen-lokalisiert, aber nicht das immundominanteste Antigen einer *C. pneumoniae* Infektion (Campbell, Kuo et al. 1990), (Klein, Kotz et al. 2003).

Obwohl Momp die wichtigste Komponente der chlamydialen Oberfläche ist, wurde bisher nur für ein *C. trachomatis* Serovar (MoPn, Mäuse-Pneumonie-Serovar) postuliert, dass es in den Adhäsionsprozess der Bakterien involviert ist (Su, Watkins et al. 1990). Untersuchungen mit rekombinant hergestelltem MoPn-Momp Protein zeigten, dass es an Heparansulfat-Strukturen auf eukaryotischen Zellen bindet (Su, Raymond et al. 1996).

Eine weitere Besonderheit des Momp von *C. trachomatis* ist die *N*-Glykosylierung des Proteins (Kuo, Takahashi et al. 1996), (Kuo, Lee et al. 2004). Es wird diskutiert, dass es über die Glykosylierung mit Mannose-6-Phosphat Rezeptoren der humanen Zelle interagieren kann und so an der Adhäsion beteiligt ist (Kuo, Takahashi et al. 1996), (Kuo, Lee et al. 2004), (Puolakkainen, Kuo et al. 2005).

1.4.1.2. OmcA/B (outer membrane complex proteins A/B)

Neben Momp sind die beiden Cystein-reichen Proteine OmcA und OmcB, die zweithäufigste Komponente des cOMC und sorgen über starke Vernetzung durch Disulfidbrücken für die Integrität der EB Hülle (Everett and Hatch 1995). OmcA ist ein 9 kDa großes Lipoprotein, welches über seine Lipidreste an der Innenseite der äußeren Membran verankert ist (Everett and Hatch 1995). Das *omcA* Gen liegt zusammen mit dem *omcB* Gen in einem bicistronischen Operon (Lambden, Everson et al. 1990). Verschiedene Transkript-Analysen zeigten, dass beide Gene spät im Entwicklungszyklus, bei der Umwandlung von RBs zu EBs, stark hochreguliert werden (Shaw, Dooley et al. 2000), (Haranaga, Ikejima et al. 2002), (Belland, Zhong et al. 2003).

OmcB ist ein 60 kDa großes Cystein-reiches Protein mit hoher Aminosäureidentität zwischen den Spezies (Siehe Tabelle 1) (Abb. 51).

Spezies	Aminosäure-Identität in %
<i>C. pecorum</i>	85%
<i>C. psittaci</i>	84%
<i>C. caviae</i>	82%
<i>C. felis</i>	82%
<i>C. abortus</i>	80%
<i>C. trachomatis</i> Serovare C, D, E, LGV	72-70%
<i>Parachlamydia</i> UWE25	33%

Tabelle 1: Vergleich der Aminosäureidentität des *C. pneumoniae* OmcB mit OmcB Proteinen verschiedener chlamydialer Spezies.

Analysen der Proteinsequenz haben gezeigt, dass zwei Signalpeptidschnittstellen (AS-Position 20 und 40) für unterschiedliche posttranslationale Prozessierungen verantwortlich sind (Allen and Stephens 1989), (Sanchez-Campillo, Bini et al. 1999). Außerdem zeigten diese Analysen, dass sich das OmcB Protein in einen kleinen N-terminalen Teil, mit starker Spezies-spezifischer Variabilität der Aminosäuresequenz (18-29% Identität) und einen konservierten C-terminalen Teil unterteilen lässt (Mygind, Christiansen et al. 1998). Die bioinformatischen Untersuchungen ergaben weitere Unterschiede zwischen N- und C-Terminus des Proteins (Abb. 3). Für einen kleinen N-terminalen Teil (AS 40-90) konnte festgestellt werden, dass dieser stark hydrophil ist und demzufolge potentiell Oberflächen-

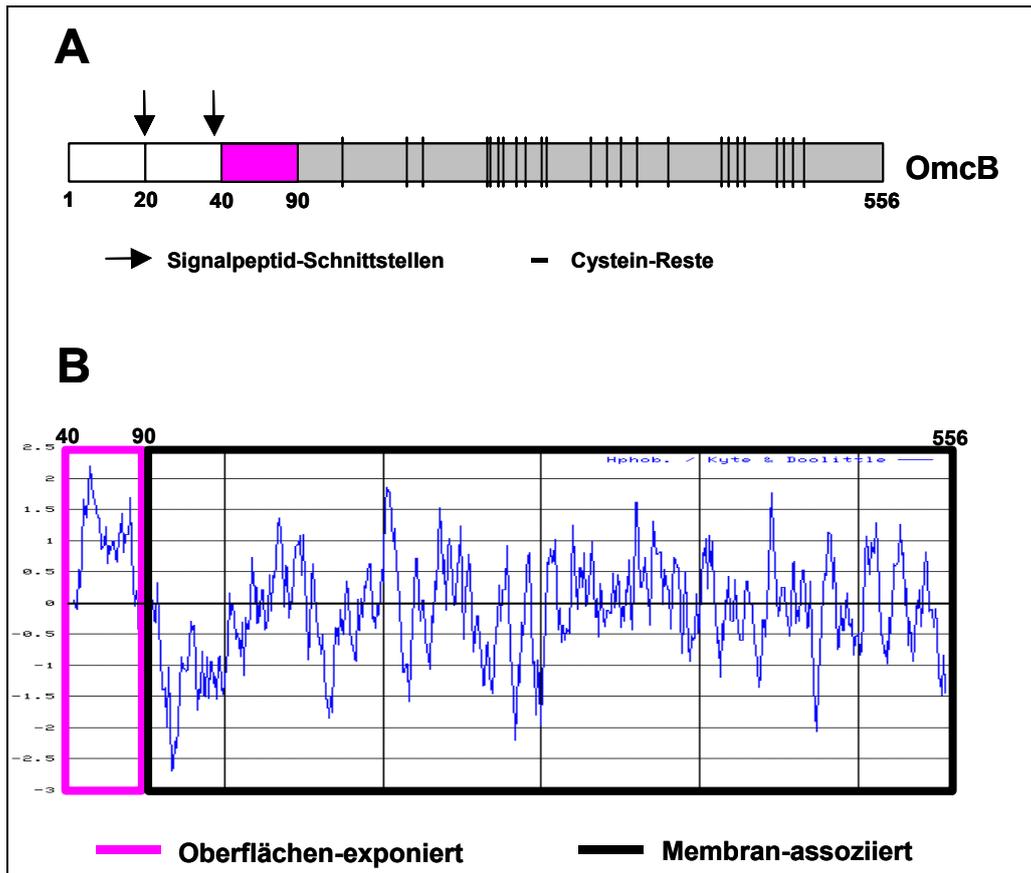


Abbildung 3: Schematische Darstellung des *C. pneumoniae* OmcB Proteins.

A) Darstellung der Prozessierungs-Schnittstellen an Aminosäure-Position 20 und 40, sowie die Verteilung von Cystein-Resten innerhalb des Proteins. B) Hydrophobizitäts-Analyse des OmcB Proteins von Aminosäure 40 bis 556 nach Kyte und Doolittle (www.expasy.ch/tools/). Die Aminosäuren 40-90 sind stark hydrophil und daher potentiell Oberflächen-lokalisiert, die Aminosäuren 91-556 sind aufgrund der Hydrophobizität potentiell Membran-assoziiert.

exponiert, während der C-Terminus überwiegend hydrophob ist und daher Membran-assoziiert vorliegt. Des weiteren liegen alle für die Ausbildung der Disulfidbrücken benötigten Cysteine, im C-terminalen Teil des Proteins (Abb. 3) (Mygind, Christiansen et al. 1998).

Die Oberflächen-Lokalisierung des Proteins ist bisher nicht eindeutig für alle untersuchten Chlamydien-Spezies nachgewiesen. In frühen Untersuchungen wurde über die Protease-Sensitivität von Proteinen des cOMC auf ihre Oberflächen-Lokalisierung geschlossen. Bei *C. psittaci* Serovar 6BC konnte keine Sensitivität des OmcB Proteins gegenüber der proteolytischen Behandlung von EBs festgestellt werden, während bei Serovar GPIC ein kleiner N-terminaler Teil des Proteins mittels Trypsin entfernt wurde (Everett and Hatch 1995), (Ting, Hsia et al. 1995). In weiteren Westernblot-Analysen konnten für das OmcB von *C. trachomatis* Serovar LGV ebenfalls N-terminale Epitope auf der EB-Oberfläche detektiert werden (Stephens, Koshiyama et al. 2001). Wurde die Lokalisierung des Proteins jedoch mittels Immunofluoreszenz nachgewiesen, gelang dies erst nach Behandlung der EBs mit reduzierenden Agenzien (Mygind, Christiansen et al. 1998). Für

C. pneumoniae hingegen konnte die Lokalisierung des OmcB Proteins auf der chlamydialen Oberflächen gezeigt werden (Vandahl, Pedersen et al. 2002). Im Gegensatz zu der unterschiedlichen Lokalisierung bestätigt sich für OmcB aller Spezies, dass es eines der stärksten chlamydialen Antigene ist. Patienten mit einer nachgewiesenen *C. pneumoniae* oder *C. trachomatis* Infektion haben zu 95 % Antikörper gegen das OmcB Protein gebildet (Mygind, Christiansen et al. 1998), (Portig, Goodall et al. 2003). Bei Untersuchungen hat sich gezeigt, dass humane OmcB Antikörper eine starke Kreuzreaktivität zwischen *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* aufweisen und das hauptsächlich C-terminale Peptide des Proteins am stärksten immunogen wirken (Watson, Lambden et al. 1994). Dies bestätigten Analysen von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen, die ebenfalls C-terminale OmcB Epitope erkennen (Goodall, Beacock-Sharp et al. 2001), (Gervassi, Grabstein et al. 2004).

1.4.1.3. Pmps (polymorphic membrane proteins)

Im Gegensatz zu den schon früh identifizierten Komponenten Momp, OmcA und OmcB wurde die Lokalisierung und potentielle Funktion der Pmp Proteine, erst in den letzten Jahren, durch besonders umfangreiche biochemische Arbeiten und Analysen der Genomsequenzen vorangetrieben. Die Analysen der verschiedenen Genome ergab, dass sich die Anzahl der *pmp* Gene bei *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* deutlich unterscheidet. *C. pneumoniae* verfügt über 21 *pmp* Gene, während *C. trachomatis* nur neun besitzt (Stephens, Kalman et al. 1998), (Kalman, Mitchell et al. 1999), (Rockey, Lenart et al. 2000). In beiden Spezies werden alle Gene der Pmp-Familie transkribiert, aber nicht alle werden auch translatiert. Im Falle von *C. pneumoniae* werden 17 Gene exprimiert, während bei vier weiteren Verschiebungen des Leserasters zum Abbruch der Proteinsynthese führen (Shirai, Hirakawa et al. 2000). Die Proteinsequenz der translatierten Pmps ist mit nur 37 % maximaler Identität sehr heterogen. Gemeinsam haben sie nur repetitive Aminosäuremotive FXXN, GGAI im N-Terminus und eine konservierte „ β -barrel“ Struktur des C-Terminus, die für die Pmp Proteine eine potentielle Funktion als Autotransporter vermuten lässt (Grimwood and Stephens 1999), (Grimwood, Olinger et al. 2001), (Henderson and Lam 2001).

In einer weitreichenden Untersuchung konnte für die Pmps 6, 8, 10, 11, 20 und 21 von *C. pneumoniae* eine Oberflächen-Lokalisierung nachgewiesen werden (Vandahl, Pedersen et al. 2002). Außerdem wurde gezeigt, dass die rekombinant hergestellten Pmp 20 und 21 Proteine über die Aktivierung des NF κ B-Signalweg, die Ausschüttung pro-inflammatorischer Mediatoren in humanen Zellen bewirken können (Niessner, Kaun et al. 2003). Die Oberflächen-Lokalisierung bestimmter Pmps und die Tatsache, dass sie in Wechselwirkung mit der eukaryotischen Wirtszelle stehen, lässt vermuten, dass sie

adhäsive Eigenschaften besitzen. In der Tat konnte bereits für Pmp21 eine Funktion als Adhäsion ermittelt werden (Wehrl, Brinkmann et al. 2004), (Georgoudis 2004).

1.4.1.4. PorB (porin B)

Auch beim PorB Protein handelt es sich um ein relativ neu entdecktes, Oberflächen-lokalisiertes Protein des cOMC. Es wurde über Analysen der Genomsequenzen von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* als ein Protein mit geringer Homologie (~20%) zum Momp Protein gefunden. Wie bereits für Momp beschrieben, formt auch das PorB Protein Poren in der Außenmembran und besitzt eine unspezifische Transportfunktion (Wyllie, Ashley et al. 1998), (Kubo and Stephens 2000).

1.4.1.5. GroEL-1 (Hsp60)

Das chlamydiale GroEL-1 ist im eigentlichen Sinne kein Bestandteil des cOMC, wurde jedoch in verschiedenen Studien als Oberflächen-lokalisiert beschrieben (Schmiel, Knight et al. 1991), (Wuppermann 2001), (Raulston, Paul et al. 1998). Das Protein wurde als Chaperonin identifiziert, da es deutliche Homologien zum GroEL (Hitzeschockprotein) von *E. coli* aufweist (Kikuta, Puolakkainen et al. 1991). In serologischen Untersuchungen tritt GroEL-1 häufig als immunodominantes Antigen in Erscheinung (Sanchez-Campillo, Bini et al. 1999). Dabei konnten Antikörper sowohl gegen das *C. trachomatis*, als auch das *C. pneumoniae* Protein mit verschiedenen Chlamydien-verursachten Krankheiten in Verbindung gebracht werden (Peeling, Bailey et al. 1998), (Cerrone, Ma et al. 1991), (Horner, Cain et al. 1997), (Domeika, Domeika et al. 1998), (Jantos, Krombach et al. 2000), (Xu, Schett et al. 2000). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Protein einen stimulatorischen Effekt auf verschiedene Zelltypen ausübt (Costa, Kirschning et al. 2002), (Da Costa, Wantia et al. 2004), (Krull, Maass et al. 2005), (Kol, Lichtman et al. 2000). Die Stimulation der Zellen erfolgt dabei über die Assoziation von GroEL-1 mit TLR 2 und TLR 4 Rezeptoren und hat die Aktivierung verschiedener Signaltransduktions-Kaskaden zur Folge (Bulut, Faure et al. 2002), (Prebeck, Kirschning et al. 2001), (Sasu, LaVerda et al. 2001), (Costa, Kirschning et al. 2002), (Da Costa, Wantia et al. 2004). Für rekombinant hergestelltes GroEL-1 Protein von *C. pneumoniae* konnten außerdem adhäsive Eigenschaften nachgewiesen werden (Wuppermann 2001).

1.5. Die Funktion von Glykosaminoglykanen (GAGs)

Glykosaminoglykane werden von den verschiedensten pathogenen Organismen zur Adhäsion und Internalisierung in humane Zellen genutzt, weil sie ubiquitär auf Zelloberflächen und in der Extrazellulären Matrix (ECM) vorhanden sind (Rostand and Esko 1997), (Bernfield, Gotte et al. 1999), (Linhardt and Toida 2004).

Glykosaminoglykane sind lineare, langkettige Polysaccharide mit einem Rückgrad aus sich wiederholenden Disaccharid-Untereinheiten. Die Untereinheiten setzen sich dabei aus den Aminosuckern: *N*-Acetylglukosamin oder *N*-Acetylgalaktosamin und den Uronsäurevarianten: D-Glucuronsäure oder L-Iduronsäure zusammen (Capila and Linhardt 2002), (Bernfield, Gotte et al. 1999) (Esko and Selleck 2002). Durch verschiedene Kombinationen dieser Einzelkomponenten entstehen die unterschiedlichen Gruppen von GAGs: Heparin/Heparansulfat, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Keratansulfat und Hyaluronsäure. Neben den unterschiedlichen Untereinheiten unterscheiden sich die GAGs auch durch verschiedene Kettenlängen sowie durch Modifikationen, wie Deacetylierungen oder *N*- und *O*-Sulfatierungen. Dies führt zu einer großen Heterogenität der Glykosaminoglykan-Moleküle (Capila and Linhardt 2002), (Hileman, Fromm et al. 1998), (Mulloy and Forster 2000), (Bernfield, Gotte et al. 1999). Alle GAGs die L-Iduronsäure Untereinheiten enthalten zeigen außerdem eine deutliche erhöhte Flexibilität der helikalen Molekülkette (Capila and Linhardt 2002), (Mulloy and Forster 2000).

1.5.1. Zelluläre Funktionen von GAGs

GAGs kommen in biologischen Systemen zumeist nicht frei vor, sondern sind kovalent mit Proteinen assoziiert und werden als Protein-GAG Komplex, Proteoglykane (PGs) genannt. Diese Proteoglykane sind Syndecane und Glypicane, die hauptsächlich mit Heparansulfat (HS) und Chondroitinsulfate (CS) assoziiert vorliegen. Man findet sie auf nahezu allen eukaryotischen Zelloberflächen oder in der ECM und sie sind dort mit einer Fülle von zellulären Funktionen verbunden (Linhardt and Toida 2004), (Capila and Linhardt 2002).

GAGs sind auf diese Weise in zelluläre Prozesse wie z.B. die Zell-Zell Adhäsion involviert. Dabei binden Proteine der ECM (Fibronectin, Vitronectin, Collagen etc.) zunächst an das Heparansulfat der Proteoglykane, um schließlich mit Integrin-Rezeptoren zu interagieren (San Antonio, Slover et al. 1993). Durch diese trimolekulare Wechselwirkung wird die Integrität von Geweben gewährleistet. Des weiteren sind GAGs durch Bindung von löslichen Chemokinen und Wachstumsfaktoren in regulatorische Prozesse des Immunsystems, der Signaltransduktion und der zellulären Kommunikation eingebunden. Dabei handelt es sich um so wichtige Mechanismen wie die Reaktion des Immunsystems auf Inflammation (Handel, Johnson et al. 2005), den Aufbau von Signalgradienten bei der Morphogenese (Hacker, Nybakken et al. 2005), die Metastasierung von Krebs (Filmus 2001) und die Regulation von biochemischen Kaskaden wie die Blutgerinnung (Bourin and Lindahl 1993) und die Komplementkaskade (Weiler, Edens et al. 1992).

Die Voraussetzungen eines Proteins zur Bindung von GAGs wie Heparin oder Heparansulfat, wird durch das Vorhandensein einer Ansammlung von basischen Aminosäuren (Arginin, Lysin oder Histidin) bestimmt. Diese gehen elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Sulfatgruppen des GAG-Moleküls ein. Dabei können die basischen Aminosäuren in Form einer definierten Konsensus-Sequenz vorliegen oder durch entsprechende Faltung des Proteins, in Position gebracht werden (Cardin and Weintraub 1989), (Hileman, Fromm et al. 1998).

1.5.2. GAGs und die Adhäsion von Pathogenen an die humane Zelle

Die Adhäsion der Chlamydien an Glykosaminoglykane auf der eukaryotischen Wirtszelle ist ein Mechanismus, den viele Viren, Bakterien und Parasiten sich zu eigen gemacht haben (Menozzi, Pethe et al. 2002), (Rostand and Esko 1997). Die pathogenen Erreger haben für die Adhäsion an humane Zellen zwei Arten von Virulenzfaktoren entwickelt. Die eine sind Adhäsine, die spezifisch mit eukaryotischen Rezeptoren wie Integrinen, Cadherinen und Immunglobulinen interagieren (Boyle and Finlay 2003), (Cossart and Sansonetti 2004). Die anderen sind Adhäsine, die genau wie eukaryotische Proteine an bestimmte GAGs binden (Menozzi, Pethe et al. 2002), (Rostand and Esko 1997). Beispiele für die weit verbreitete Strategie der GAG-Bindung sind bei viralen Erregern die Glykoproteine gC, gB und gD der *Herpes simplex* Hülle. Diese binden an Heparansulfat auf epithelialen und neuronalen Zellen und sorgen so für den Eintritt in die Wirtszelle (Spear, Shieh et al. 1992). Auch bei HIV-1 Viren ist es ein virales Glykoprotein gp120, welches an GAGs von Zellen der Blut-Hirn-Schranke bindet und so Zellen im Gehirn infizieren kann (Bobardt, Salmon et al. 2004). Weitere Viren, die über GAG bindende Hüllproteine verfügen, sind die Cytomegaloviren, das Maul und Klauenseuche Virus, Hepatitis C und Dengue Viren etc. (Compton, Nowlin et al. 1993), (Jackson, Ellard et al. 1996), (Barth, Schafer et al. 2003), (Chen, Maguire et al. 1997). Neben viralen Erregern konnte auch für verschiedene Parasiten gezeigt werden, dass sie GAGs bestimmter Zelltypen für die Adhäsion und Invasion in humane Zellen und Gewebe nutzen. Dazu gehören der Erreger der Malaria *Plasmodium falciparum*, dessen CS-Protein spezifisch an stark sulfatiertes Heparansulfat auf Leberzellen bindet (Rathore, McCutchan et al. 2001). Für weitere human-pathogene Parasiten wie *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* und *Toxoplasma gondii* wurden ebenfalls Interaktionen mit GAGs der eukaryotischen Wirtszelle nachgewiesen (Ortega-Barria and Pereira 1992), (Love, Esko et al. 1993), (Carruthers, Hakansson et al. 2000).

In bakteriellen Systemen gibt es sowohl bei Gram-positiven als auch Gram-negativen Bakterien eine Vielzahl von GAG bindenden Adhäsinen, die für die Adhäsion und Internalisierung in die humane Zelle wichtig sind. Beispiele dafür sind das OpaA Protein

von *Neisseria gonorrhoeae*, das ActA von *Listeria monocytogenes*, das Tia Protein von ETEC (Enterotoxigenic *E. coli*) oder das Alpha C-Protein von Streptococcen (van Putten, Duensing et al. 1998), (Alvarez-Dominguez, Vazquez-Boland et al. 1997), (Fleckenstein, Holland et al. 2002), (Baron, Bolduc et al. 2004).

1.5.3. Einfluss von GAGs auf die chlamydiale Infektion

In frühen Untersuchungen zur Abhängigkeit der chlamydialen Infektion von GAGs wurde ein trimolekularer Mechanismus der bakteriellen Adhäsion vorgeschlagen (Zhang and Stephens 1992). Damals wurde vermutet, dass GAG wird von den Chlamydien synthetisiert und bildet eine Brücke zwischen einem chlamydialen und einem eukaryotischen GAG-bindenden Protein. Dabei zeigten die Untersuchungen verschiedener *C. trachomatis* Serovare (B und LGV) die gleiche GAG-Abhängigkeit bei der Infektion (Chen and Stephens 1994). Es konnte bestätigt werden, dass ein Decasaccharid notwendig für die Adhäsion der Chlamydien an die humane Zelle war (Chen, Zhang et al. 1996). Da bei den Genomsequenzanalysen jedoch keine Gene für die GAG-Biosynthese gefunden wurden, ist fraglich, ob die Adhäsion tatsächlich über einen trimolekularen Mechanismus bewerkstelligt wird (Rasmussen-Lathrop, Koshiyama et al. 2000).

Auch für Chlamydien-Spezies wie *C. pneumoniae* oder *C. psittaci* GPIC wurde eine GAG-Abhängigkeit der Infektion nachgewiesen (Wuppermann, Hegemann et al. 2001), (Beswick, Travelstead et al. 2003), (Gutierrez-Martin, Ojcius et al. 1997). In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass die chlamydialen EBs an GAG-Strukturen auf der eukaryotischen Zelle binden. Dabei ist die festgestellte GAG-Abhängigkeit der *C. pneumoniae* Adhäsion und Infektion deutlich stärker als die von *C. psittaci* GPIC (Wuppermann, Hegemann et al. 2001), (Gutierrez-Martin, Ojcius et al. 1997). Wird die GAG-abhängige Adhäsion inhibiert, führt dies bei *C. pneumoniae* zu einer 90%igen Infektionsreduktion (Wuppermann, Hegemann et al. 2001).

Bei neueren Untersuchungen zur GAG-Abhängigkeit von verschiedenen *C. trachomatis* Serovaren bestätigten sich die für *C. pneumoniae* und *C. psittaci* ermittelten Befunde (Beswick, Travelstead et al. 2003), (Taraktchoglou, Pacey et al. 2001), (Davis and Wyrick 1997). Für *C. trachomatis* Serovar LGV konnte eine deutliche Abhängigkeit der Infektion von Heparansulfat-Strukturen auf der eukaryotischen Wirtszelle nachgewiesen werden (Beswick, Travelstead et al. 2003), (Taraktchoglou, Pacey et al. 2001), (Yabushita, Noguchi et al. 2002), (Davis and Wyrick 1997). Detailliertere Analysen bestätigten, dass die 6-O-Sulfatierung der Heparansulfat-Strukturen wichtig für die Adhäsion von *C. trachomatis* Serovar LGV ist (Yabushita, Noguchi et al. 2002). In den Untersuchungen durchgeführt mit *C. trachomatis* Serovar E, deuten alle Ergebnisse auf eine GAG-

unabhängige Infektion dieses Serovars hin (Beswick, Travelstead et al. 2003), (Taraktchoglou, Pacey et al. 2001), (Davis and Wyrick 1997). Keines der getesteten GAG-Moleküle hatte einen negativen Einfluss auf die Adhäsion oder die Infektion von *C. trachomatis* Serovar E (Beswick, Travelstead et al. 2003), (Davis and Wyrick 1997). Es stellt sich daher für alle chlamydialen Spezies die Frage, welche bakteriellen Adhäsionsmoleküle in den GAG-abhängigen oder unabhängigen Infektionsmechanismus involviert sind.

1.6. Funktionelle Analyse zur Charakterisierung von bakteriellen Adhäsinen

Um bakterielle Adhäsine zu identifizieren und zu charakterisieren benötigt man ein Testsystem, mit dem die adhäsiven Eigenschaften eines Proteins nachzuweisen sind. Bei der Untersuchung von chlamydialen Proteinen ist dies besonders wichtig, da keine gentechnischen Arbeiten mit dem Organismus möglich sind. Um die Funktion von Proteinen zu analysieren, die bei der Adhäsion des Bakteriums an die eukaryotische Wirtszelle eine wichtige Rolle spielen, ist demnach ein heterologes Testsystem erforderlich. Grundlegende Voraussetzung für die Auswahl des Systems, ist die Möglichkeit funktionelle Untersuchungen verschiedener chlamydialer Proteine durchzuführen. Wichtig ist dabei zum einen die Präsentation von Proteine verschiedenster Größe und Funktion. Zum anderen sollte eine einfache, standardisierte Analyse der Adhäsivität eines Proteins möglich gemacht werden.

1.6.1. Verschiedene Präsentationssysteme

In der Vergangenheit wurden verschiedene Technologien entwickelt, die zur Präsentation von Proteinen auf einer Oberfläche geeignet sind. Dabei handelt es sich um die unterschiedlichsten Systeme. Die einen basieren auf der Beschichtung von Latexkugeln mit rekombinant hergestellten Proteinen, die anderen nutzen die Präsentation von Proteine auf der Oberfläche heterologer Organismen (Dersch and Isberg 1999), (Lang, Maki et al. 2000), (Dubel, Breitling et al. 1993), (Sternberg and Hoess 1995), (Becker, Theile et al. 2005). Die Verwendung der Latexkugeln erfordert die quantitative und qualitative Reinigung der zu testenden Proteine. Sollte ein weitreichendes „screening“ potentieller Adhäsine durchgeführt werden, eignet sich dieses System nicht da viele verschiedene Proteine, zum Teil auch Membranproteine, nicht ohne großen Arbeitsaufwand zu reinigen sind.

Für die Präsentation von Peptiden wurde das sogenannte „Phagen-Display“ entwickelt, bei dem Peptide fusioniert an Hüllproteine von filamentösen Phagen, auf der Phagenoberfläche exponiert vorliegen (Chiswell and McCafferty 1992). Auf diese Weise

wurden die verschiedensten Interaktionen zwischen Proteinen oder Antikörpern und Liganden nachgewiesen (McCafferty, Griffiths et al. 1990), (Li, Kilpatrick et al. 2000), (Chang, Abdo et al. 2005). Das Phagen-System eignet sich jedoch nicht zur Präsentation ganzer Proteine, daher wurden zu diese Anwendung bakterielle Präsentations-System entwickelt. Das System, welches Gram-negative Bakterien wie z.B. *E. coli* nutzt, basiert auf der Fusion von heterologen Proteinen an Proteine der bakteriellen Außenmembran oder an Fimbrien- und Flagellenproteine (Francisco, Stathopoulos et al. 1993), (Francisco and Georgiou 1994), (Klemm and Hedegaard 1990), (Newton, Kotb et al. 1991). Außerdem wurde ein *E. coli* System entwickelt, welches über die Fusion heterologer Proteine an Domänen eines bakteriellen Autotransporterproteins, die Translokation auf die Bakterienoberfläche erlaubt (Jose and Handel 2003), (Maurer, Jose et al. 1997). Ein Oberflächen-Präsentationssystem für Gram-positive Bakterien wie z.B. Staphylococccen nutzt die Fusion heterologer Proteine an das Zellwandprotein Protein A und damit ebenfalls die Präsentation auf der Bakterienzellwand (Samuelson, Hansson et al. 1995). Neben den bakteriellen Systemen wurden Systeme entwickelt, die die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als Organismus zur Präsentation von Proteinen verschiedenster Herkunft nutzen (Matsumoto, Fukuda et al. 2002), (Ueda and Tanaka 2000), (Boder and Wittrup 1997). Dabei können heterologe Proteine an verschiedene Mannoproteine, lokalisiert in der Hefezellwand, fusioniert werden. Verwendete Mannoproteine sind die α - und α -Agglutininrezeptoren, sowie das Flocculinprotein Flo1p (Boder and Wittrup 1997), (Kato, Maeda et al. 2005), (Sato, Matsumoto et al. 2002), (Matsumoto, Fukuda et al. 2002). Hefen und die auf ihrer Zelloberfläche präsentierten Proteine werden sowohl im Bereich medizinischer Forschung als auch für Biotechnologische Zwecke eingesetzt (Wadle, Mischo et al. 2005), (Kondo, Shigechi et al. 2002), (Fujita, Ito et al. 2004). Dabei werden zumeist Antikörper, Enzyme oder Rezeptoren auf der Hefe präsentiert (Kondo and Ueda 2004). Als eukaryotischer Modellorganismus eignen sich Hefezellen besonders gut, weil sie unter dem Aspekt der Arbeitssicherheit als unbedenklich eingestuft werden. Sie lassen sich sehr gut genetisch manipulieren und sind dabei einfach zu kultivieren. Außerdem sind die Funktionen und Komponenten der Sekretionsmaschinerie weitgehend aufgeklärt und können zu einer Verbesserung der Proteinsekretion und Präsentation auf der Hefe positiv verändert werden.

1.6.2. Das Hefe-Display System

In dieser Arbeit wurde ein Oberflächen-Präsentationssystem verwendet, welches den α -Agglutininrezeptor der Hefe *S. cerevisiae* als Präsentationsmolekül nutzt (Boder and Wittrup 1997), (Kieckhefer, Cho et al. 1997).

Der α -Agglutininrezeptor (*MAT a* Zellen) ist ein in der Zellwand verankertes Mannoprotein, dass bei der Hefepaarung benötigt wird. Es interagiert mit dem α -Agglutininrezeptor (*MAT α* Zellen) und leitet so die Zell-Zell Adhäsion und spätere Zellfusion ein. Der

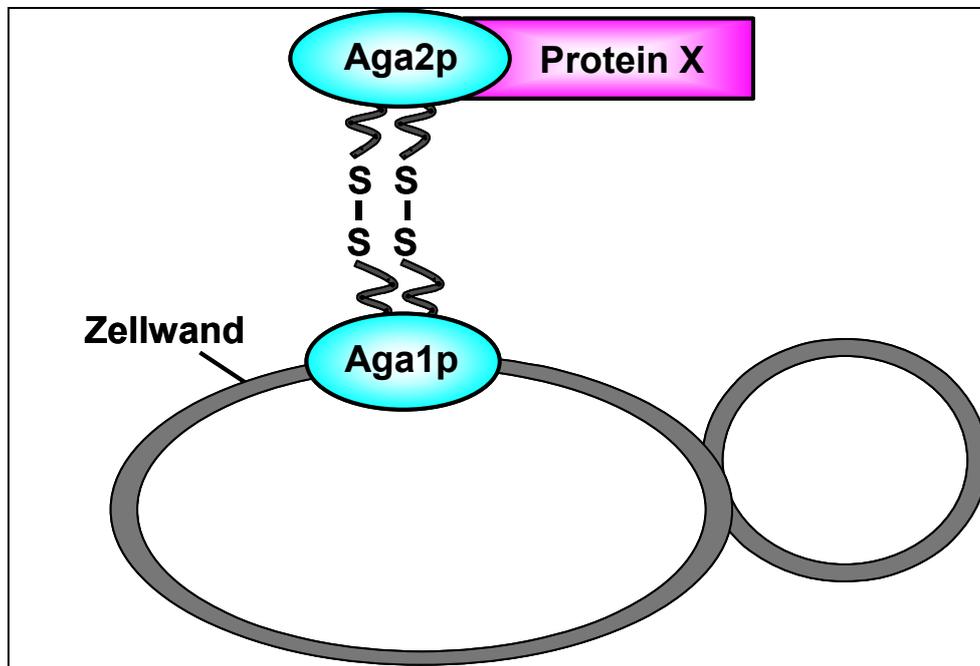


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Hefe-Oberflächen-Präsentationssystems (Yeast Surface Display).

Rezeptor setzt sich aus den zwei Proteinen Aga1p und Aga2p zusammen (Cappellaro, Hauser et al. 1991), (Cappellaro, Baldermann et al. 1994), (Shen, Wang et al. 2001). Aga1p ist ein 73 kDa großes, stark O-glykosyliertes Mannoprotein, welches über einen GPI-Anker in der Zellwand verankert ist und so auf der Außenseite der Zellwand lokalisiert. Aga2p ist ein 7 kDa kleines, ebenfalls stark O-glykosyliertes Protein, dass unter Ausbildung von zwei Disulfidbrücken kovalent mit dem Aga1p verbunden ist (Shen, Wang et al. 2001).

In Abbildung 4 ist eine schematische Darstellung des verwendeten Hefe-Display System nach (Boder and Wittrup 1997) gezeigt. Das System basiert auf zwei Komponenten: einem modifizierten Hefestamm, der das *AGA1*-Gen unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors im Hefegenom trägt und einem Expressionsvektor. Im Expressionsvektor ist das *AGA2*-Gen kodiert und steht ebenfalls unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors. Bisher wurde das System zur Präsentation spezifischer Antikörper-Fragmente und T-Zell-Rezeptor-Domänen auf der Hefe eingesetzt (Boder and Wittrup 1997), (Boder, Midelfort et al. 2000), (Kieke, Cho et al. 1997), (Shusta, Holler et al. 2000). Mit den präsentierten Proteinen wurden Studien zu Interaktion zwischen Antigen und Antikörper bzw. Antigen und T-Zell-Rezeptor durchgeführt.

1.7. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten chlamydiale Adhäsine identifiziert und charakterisiert werden, die im initialen Prozess einer *C. pneumoniae* Infektion, nämlich der Adhäsion der Bakterien an die Wirtszelle, eine entscheidende Rolle spielen. Zur funktionellen Analyse der Adhäsion Oberflächen-lokalisierter chlamydialer Proteine wie Momp, GroEL-1 und OmcB an humane Zellen sollte das Hefe-Oberflächen-Präsentationssystem als neuartiges Testsystem etabliert werden. Dazu sollte zunächst die Bindefähigkeit eines bekannten bakteriellen Adhäsins mit Hilfe des Hefe-System studiert werden, um anschließend mit dem selben Verfahren die adhäsiven Eigenschaften der verschiedenen Chlamydienproteine zu untersuchen. Proteine, die Adhäsivität zeigen, sollten in weiterführenden Experimenten eingehender charakterisiert werden. Hierzu waren Analysen der Bindungseigenschaften der rekombinant hergestellten Proteine geplant. Letztendlich sollte so die Funktion der chlamydialen Proteine während des Infektionsprozesses untersucht werden.

In einem weiteren Abschnitt der Arbeit sollte analysiert werden, ob die für *C. pneumoniae* identifizierten Adhäsine auch bei verwandten chlamydialen Spezies die gleiche Funktion erfüllen und somit bei allen Chlamydienarten konserviert sind.

2. Materialien

2.1. Gebrauchsartikel

Dialyseschlauch	Serva
Gewebekultur-Röhrchen (GK): PS-Röhrchen, 6 ml, steril	Greiner
Gewebekulturplatten (96 Vertiefungen)	Costar
Gewebekulturplatten (24 Vertiefungen)	Costar
Gasperlen ($\varnothing \sim 0,5$ mm)	Braun
Glasplättchen (für Chlamydienkultur in Gewebekultur-Röhrchen): Deckgläser, \varnothing 12 mm	Roth
Immobilon-P Membran	Millipore
Isopropanol-Einfrierbox	Roth
Kulturflaschen: Polystyrene-Flaschen, 25 cm ² /50 ml und 80 cm ² /260 ml, steril	Nunc
Kryo-Röhrchen (1,8 ml)	Nunc
Latexkügelchen (Durchmesser 1 μ m)	Sigma
Multiwell Objektträger (12 Wells)	Dunn
Saugpapier für Westernblots	Schleicher & Schuell
Zentrifugationsröhrchen, 12 ml: PP-Röhrchen, steril	Greiner
Zentrifugationsröhrchen, 50 ml: PP-Röhrchen, steril mit Schraubverschluss	Sarstaedt
Zellschaber: 23 cm, steril	Nunc

2.2. GERÄTE UND MASCHINEN

Avanti Zentrifuge J-25	Beckmann
Biofuge pico (mit Hereus Sepatech-Rotor #3324)	Heraeus
Biofuge Primo R	Heraeus
Blotapparatur	Biometra
Brutschrank Thermo Forma Sterikult 100	Thermo
Centrifuge J2-21	Beckmann
Megafuge 1.0 (mit Tragringrotor (#3360))	Heraeus
PCR-Thermocycler: Gene Amp 9700	MJ Research
Photometer DU-800 Spectrophotometer	Beckmann
Proteingelsystem SE260	Hoefer
Rotanta 460R (mit Rotor #4444 und Einsätzen #4428)	Hettich
Speed-Vac Vacuum-Concentrator	Savant
Schüttler Polymax 2040	Heidolph
Ultrazentrifuge TL100	Beckmann
Ultraschallstab Sonoplus HD2200	Bandelin
Ultraschallwasserbad RK102H	Bandelin
Vibrax VXR	IKA
Neubauer Zählkammer	Marienfeld

2.3. Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamidlösung (30%: 0,8% Bisacrylamid)	Roth
Actidione (Cycloheximid)	Sigma
Adenin	Roth
Agar	Difco
Agarose: SeaKem LE	Biozym
Ammoniumacetat (NH ₄ OAc)	Roth

Chemikalien	Hersteller
Ammoniumpersulfat	Merck
Ampicillin	Sigma
Bradford Reagenz	Biorad
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva
Bacto Trypton	Difco
5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)	Sigma
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Sigma
Bromphenolblau	Fluka
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth
Calcofluor White	Sigma
Casein Pepton	Difco
Chondroitinsulfat A, B, C	Sigma
Coomassie Brilliant Blau R250	Serva
Desoxynukleosid-5'-Triphosphat (dNTPs)	MBI Fermentas
Dimethylformamid (DMF)	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma
Essigsäure	Riedel-deHaën
Ethanol (96 %)	J.T. Baker
Ethidiumbromidlösung (10mg/ml)	Roth
Ethylendiamintetraacetat (Na ₂ -EDTA)	Roth
Ficoll 400	Pharmacia
Formaldehyd-Lösung (37%)	J.T. Baker
Galaktose	Roth
Gastrographin	Schering
Glucose Monohydrat	Roth
Glycin	Roth
Glyzerin	Roth
Harnstoff	J.T. Baker
Hefeextrakt	Difco
Hefe Stickstoffquelle (YNB)	Difco
Heparin Natriumsalz	Sigma
Imidazol	Sigma
Isopropanol	Roth
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Peqlab
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Chemikalien	Hersteller
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
λ Phagen DNA	MBI Fermentas
Lachssperma DNA	Sigma
Latexkügelchen (Ø 1µm)	Sigma
Lithiumacetat (LiOAc)	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ + 6 H ₂ O)	Roth
Methanol	Riedel-deHaën
Methylenblau	Sigma
Milchpulver	Roth
Natriumacetat (NaOAc)	Roth
Natriumcarbonat (NaCO ₃)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker
Natriumdodecylsulphat (SDS)	Serva
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	J.T. Baker
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma
N-Lauroylsarcosin	Sigma
Nickel-NTA Agarose	Qiagen

Chemikalien	Hersteller
Percoll	Amersham
Polyethylenglycol 3350 (PEG)	Sigma
Poly-L-Lysin	Sigma
Proteaseinhibitoren Cocktail	Roche
Saccharose Monohydrat	Roth
Salzsäure (HCl)	Roth
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck
Silbernitrat (AgNO ₃)	Roth
Sorbitol	Roth
TEMED	Serva
Turbo TMB (1-step ELISA solution)	Perbio
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Merck
Trypton Pepton	Difco
Tween 20	Merck
Vectashield (Anti-fade, mounting fluid)	Linaris
Xylencyanol	Serva

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

2.4. Enzyme

2.4.1. Nukleasen

DNase I (RNase frei)	Roche
RNase A	Qiagen

2.4.2. Restriktionsenzyme

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

*Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Hinc*II, *Not*I, *Pvu*I, *Pvu*II, *Xho*I, *Xba*I

2.4.3. Polymerasen

Taq DNA Polymerase	eigene Herstellung durch Frau Volfson
Platinum PFX DNA Polymerase	Invitrogen
Pfu DNA Polymerase	Stratagene

2.4.4. Andere Enzyme

Heparinase I (aus <i>Flavobacterium heparinum</i>)	Sigma
Proteinase K	Roche
Trypsin/EDTA	Invitrogen
α-Mannosidase (aus <i>Canavalia ensiformis</i>)	Sigma
Lysozym	Sigma

2.5. Antikörper

Primär-Antikörper	Reaktivität gegenüber	Ursprung	Verdünnung	Referenz
Pathfinder	chlamydiales LPS	Maus	1:4 Immunfluoreszenz	Bio-Rad
Momp-Serum	Momp	Kaninchen	1:10 Immunfluoreszenz 1:100 Westernblot	(Wuppermann 2001)
DnaK	DnaK	Kaninchen	1:50 Immunfluoreszenz 1:500 Westernblot	(Birkelund, Lundemose et al. 1990)
Penta His AK	6 Histidin-Tag	Maus	1:2500 Westernblot	Qiagen
Anti-Xpress AK	Xpress Epitope	Maus	1:500 Immunfluoreszenz 1:5000 Westernblot	Invitrogen
Anti-V5 AK	V5 Epitope	Maus	1:500 Immunfluoreszenz 1:5000 Westernblot	Invitrogen
#1277	<i>C. pn</i> OmcB _{6His}	Kaninchen	1:250 Immunfluoreszenz 1:2000 Westernblot	diese Arbeit
#1276	<i>C. pn</i> OmcB _{6His}	Kaninchen	1:250 Immunfluoreszenz 1:2000 Westernblot	diese Arbeit
OmcB Pab 111	<i>C. trachomatis</i> OmcB Pos. 167-434	Kaninchen	1:10 Immunfluoreszenz 1:500 Westernblot	(Mygind, Christiansen et al. 1998)
OmcB Pab 113	<i>C. trachomatis</i> OmcB Pos. 420-547	Kaninchen	1:10 Immunfluoreszenz 1:500 Westernblot	(Mygind, Christiansen et al. 1998)
OmcB Pab 152	<i>C. trachomatis</i> OmcB Pos. 23-282	Kaninchen	1:10 Immunfluoreszenz 1:500 Westernblot	(Mygind, Christiansen et al. 1998)
<i>C. pn</i> OmcB	<i>C. pneumoniae</i> OmcB	Kaninchen	1:200 Immunfluoreszenz 1:4000 Westernblot	(Ciervo, Visca et al. 2002)
MAb-Cp	<i>C. pneumoniae</i>	Maus	1:500 ELISA	(Birkelund, Lundemose et al. 1990)
guinea pig serum	<i>C. caviae</i> GPIC	Kaninchen	1:250 Westernblot	Dr. R. Rank

Tabelle 3: Verwendete Primär-Antikörper

Sekundär-Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Referenz
Cy3-Anti Maus	Kaninchen	1:200 Immunfluoreszenz	Sigma
Cy3-Anti Kaninchen	Maus	1:200 Immunfluoreszenz	Sigma
AP-Anti Maus	Kaninchen	1:7500 Westernblot	Promega
AP-Anti Kaninchen	Maus	1:7500 Westernblot	Promega
AP-Anti-Meerschweinchen	Ziege	1:15000 Westernblot	Sigma
HRP-Anti-Maus	Kaninchen	1:2000 ELISA	Dako

Tabelle 4: Verwendete Sekundär-Antikörper

2.6. Kits

Stratagene Quick Change II Site directed mutagenesis Kit

QiaexII Gel Extraction Kit

Qiagen Qiagen Plasmid Midi Kit

Qiagen Genomic Kit G20/G100

2.7. DNA Größenstandard

λ DNA <i>EcoRI/HindIII</i>	Herstellung durch Frau Volfson
Fragmentgrößen in bp:	23100, 21200, 9420, 6560, 5150, 5000, 4250, 3540, 2300, 2030, 1910, 1580, 1380, 950, 830, 560, 130
pUC19 <i>Sau3A</i>	eigene Herstellung durch Frau Volfson
Fragmentgrößen in bp:	955, 580, 341, 258, 141, 105, 78

2.8. Proteingrößenstandard

Seebblue Plus2	Invitrogen
Proteingrößen in kDa:	250, 148, 98, 64, 50, 36, 22, 16, 6, 4

2.9. Oligonukleotide

2.9.1. Oligonukleotide zur Amplifikation

Oligo-nukleotid Nr.	Name	Sequenz (5' – 3')
C-145	Inv hin	TACGACGATGACGATAAGGTACCAGGATCCAGTGTGGTGGAAATA TCCCTATTCCCGGTACC
C-146	Inv her	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCGAGTATTGA CAGCGCACAGAG
C-156	OmcB hin	TACGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGTGTGGTGGAAATG TCCAAACTCATCAGACGA
C-157	OmcB her	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCGAGATACAC GTGGGTATTTTCTG
C-158	OmcB-BD her	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCGAGTCTTCC GTAGCAAGACTCTTG
C-159	OmcB-C hin	TACGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGTGTGGTGGAACTT GGCGATAAAAAGGTATTT
C-160	OmcB-N her	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCGAGAATACC TTTTTATCGCCAGGT
C-171	Momp hin	TACGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGTGTGGTGGAAAGG CTCCTTACAAGCCTTGCTT
C-172	Momp her	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCGAGGAATCT GAACTGACCAGATACGTG
C-185	OmcB R57A	CCTATGACAGCGAAGAAGGTTGCACTTGTCCGTAGAAAATAAACAA CCA
C-186	OmcB KKRA	ACAAAGCCAGCACCTGTTCCCTATGACAGCGGGCGGGTTCACCTT GTCCGTAGAAAATAAACAAACCAGTTGAA
C-187	OmcB K54A	CCTGTTCCCTATGACAGCGGCGAAGGTTAGACTTGTCCGT
C-188	OmcB K55A	GTTCCCTATGACAGCGAAGGCGGTTAGACTTGTCCGTAGA
C-193	OmcB K54Ac	GGACAAGGATACTGTCCGCGCTTCCAATCTGAACAGGCA
C-194	OmcB K55Ac	CAAGGATACTGTCCGCTTCCGCAATGTGAACAGGCATCT
C-195	OmcB R57Ac	GGATACTGTCCGCTTCTTCCAACGTGAACAGGCATCTTTATTTGTTG GT
C-196	OmcB KKRAc	TGTTTCGGTTCGTGGACAAGGATACTGACGCCGCCGCCAACGTG AACAGGCATCTTTATTTGTTGGTCAACTT
C-236	GroEL-1 hin	TACGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGTGTGGAAATGGCA GCGAAAAATATTAATA
C-237	GroEL-1 her	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCGAGGTAGTC CATTCTGCGCTTG
C-282	OmcB-L1-BD6his- start	AGGTGTTTTACGAGCACTTACCAACAAGGACCATAGATTATGAG AGGATCGCATCACCATCACCATCACTTAGCTGACACCAAAGCGAA A
C-357	pYD1delta her	TGCTGAGCCTCTACAGGTTGACATCGTCCCTCTTACAGGGATAA AATTCTGTTTCCGCACTAGCGACAT
C-360	pAC2 delta hin	TCACCATCACCATCACCTGCAGGTGCGTAGTGCGGAAACAGAATT TTATCCCTGTGAAGAG
C-361	pAC2 delta her	CCAGGCGATCGATTTTCCAG
C-380	L1 LvsP	CACAGCAAAGAGACTCTCGTAAACCGT
C-381	L1her	TTTAAGAGGTTTTACCCATAC
C-428	OmcB-GPIC hin	TACGACGATGACGATAAGGTACCAGGATCCAGTGTGGTGGAAATG TCCAAACTCTCAGACGA

Oligo-nukleotid Nr.	Name	Sequenz (5' – 3')
C-429	OmcB-GPIC her	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCGAGATAAAC GTGTGTGTTTTCCGT
C-430	pAC2 E/L1 her	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGTTTTAAT AGATGTGTGATTCTCT
C-476	OmcB-L1 hin	TACGACGATGACGACAAGGTACCAGGATCCAGTGTGGTGGAAATG AACAAACTCATCAGACGA
C-477	OmcB-L1 her	AGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCGAGATAGAT GTGTGTATTCTCTGT
C-118	MGSO	TGCACCATCTGTCACTCCGTTAACCTC
C-119	GPO3	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT

Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide zur Amplifikation

2.9.2. Oligonukleotide zur Sequenzierung

Oligo-nukleotid Nr.	Name	Sequenz (5' – 3')
C-110	MalE seq comp	GATTAAGTTGGGTAACGCCAG
C-130	GroELseqB	GAAATCGCTCAAGTAGCTAC
C-131	GroELseqC	CAATGTTAGGAAAAGCTAAG
C-132	GroELseqB2	CATCACAAAAGAAATCGCTCAAGTAG
C-191	Aga2-Seq1	CCCCGGATCGGACTACTAGC
C-192	Aga2-Seq2	ATGCAAGGAGTTTTTGAATAT
C-203	Aga2-Seq3	TCAGCGGGTTTAAACTC
C-153	Inv rev	GCCATCGTATATCCACCGATT
C-165	OmcB Seq1	GCTAGCATGACTGGTGGACA
C-166	OmcB Seq2	GTGAATCTTCCAGGAACCTGAG
C-167	OmcB Seq3	GATATTTACTTGTACACAAGGC
C-168	OmcB Seq4	CAAATGGCTGGTTGACCGCAT
C-220	Seq his fwd pAC-2	ACAGCCAGTCCGTTTAGGTGT
C-229	MOMP1251Seq	TGCCGTAGATAGACCTAAC
C-230	MOMP1601Seq	AACCTAAAGTTGAAGAACTT
C-231	MOMP1951Seq	TTCTCAGACTTCATGCAAAT
C-238	seq L1OmcB 1121	ACAGCAAAGAGACTCCCGTA
C-239	seq L1OmcB 1401	TCCTACTGCTGATGGTAAGC
C-240	seq L1OmcB 1701	CGCTCATTCTTCTGGACAGC
C-241	seq L1OmcB 2001	CACTCTTCTCCCGGAGTCA
C-345	seqE1081	GACAACACTTCTCATAAAAG
C-346	seqE1481	AACCTCTTAAAGAAGGTTGC
C-347	seqE1881	GCCTTGCGTACAAGTAAGTA
C-348	seqE2281	GAAAATACTGTTTACCGTAT
C-358	delta ver hin	TCGGAAGCTGTGGTATGGCT
C-359	delta ver her	GGGCAATAGCAGATCCTGTG
C-447	GPIC1	TGCCAATCATCAGTAGATAC
C-448	GPIC2	CTATTTGCATTAAGCAAGAA
C-449	GPIC3	GGATCTTAAACTTTACGATG

Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide zur Sequenzierung

2.10. Plasmide

Name	Nr. Plasmidsammlung	Vektor	Konstruktion
pAC2	# 1070		(Culjak 2001)
pYD1	# 1104		Invitrogen
pMJ	# 1115	pAC2	<i>C. pneumoniae</i> OmcB-6Histidin Variante
OmcB-BD _{wt}	# 1116	pAC2	Labor-interne Plasmidsammlung <i>C. pneumoniae</i> OmcB-BD (Pos.121-309) 6Histidin Variante
OmcB-BD _{KKRA}	# 1119	pAC2	Labor-interne Plasmidsammlung <i>C. pneumoniae</i> OmcB-BD (Pos.121-309) 6Histidin Variante mit Einzelbasenaustausch K ₅₄ K ₅₅ R ₅₇ A
pKM1	# 1123	pYD1 linearisiert mit <i>EcoRI/NotI</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i> <i>Inv-AD</i> Fragment (Pos.790-986), generiert mit den Oligonukleotiden C-145 / C-146 auf pRI284
pKM2	# 1124	s.o.	<i>C. pneumoniae</i> <i>omcB</i> Gen generiert mit den Oligonukleotiden C-156 / C-157 auf GiD gen. DNA
pKM3	# 1126	s.o.	<i>C. pneumoniae</i> <i>omcB-N</i> Fragment (Pos.1-869) generiert mit den Oligonukleotiden C-156 / C-160 auf GiD gen. DNA
pKM4	# 1125	s.o.	<i>C. pneumoniae</i> <i>omcB-C</i> Fragment (Pos. 850-1677) generiert mit den Oligonukleotiden C-157 / C-159 auf GiD gen. DNA
pKM5	# 1127	s.o.	<i>C. pneumoniae</i> <i>omcB-BD</i> Fragment (Pos.1-309) generiert mit den Oligonukleotiden C-156 / C-158 auf GiD gen. DNA
pKM6	# 1128	s.o.	<i>C. pneumoniae</i> <i>omcB-BD</i> Fragment mit Einzelbasenaustausch K ₅₄ A generiert mit den Oligonukleotiden C-187 / C-193 auf GiD gen. DNA
pKM7	# 1129	s.o.	<i>C. pneumoniae</i> <i>omcB-BD</i> Fragment mit Einzelbasenaustausch K ₅₅ A generiert mit den Oligonukleotiden C-188 / C-194 auf GiD gen. DNA
pKM8	# 1130	s.o.	<i>C. pneumoniae</i> <i>omcB-BD</i> Fragment mit Einzelbasenaustausch R ₅₄ A Fragment generiert mit den Oligonukleotiden C-185 / C-195 auf GiD gen. DNA
pKM9	# 1131	s.o.	<i>C. pneumoniae</i> <i>omcB-BD</i> Fragment mit Einzelbasenaustausch K ₅₄ K ₅₅ R ₅₇ A generiert mit den Oligonukleotiden C-186 / C-196 auf GiD gen. DNA
pKM10	# 1132	s.o.	<i>C. pneumoniae</i> <i>groEI-1</i> Gen generiert mit den Oligonukleotiden C-236/C-237 auf GiD gen. DNA
pKM12	# 1135	s.o.	<i>C. pneumoniae</i> <i>ompA</i> Gen generiert mit den Oligonukleotiden C-171 / C-172 auf GiD gen. DNA

pKM18	# 1212	s.o.	<i>C. trachomatis</i> Serovar LGV <i>omcB</i> Gen generiert mit den Oligonukleotiden OmcB-L1 hin / OmcB-L1 her auf <i>C. trachomatis</i> Serovar LGV1 gen. DNA
pKM19	# 1213	s.o.	<i>C. trachomatis</i> Serovar LGV <i>omcB</i> -N Fragment (Pos.1-360) generiert auf <i>C. trachomatis</i> Serovar LGV1 gen. DNA (Cooperation A. Eley,UK)
pKM20	# 1214	s.o.	<i>C. trachomatis</i> Serovar LGV <i>omcB</i> -C Fragment (Pos.361-1641) generiert auf <i>C. trachomatis</i> Serovar LGV1 gen. DNA (Cooperation A. Eley,UK)
pKM21	# 1215	s.o.	<i>C. trachomatis</i> Serovar E <i>omcB</i> Gen generiert mit den Oligonukleotiden OmcB-L1 hin / OmcB-L1 her auf <i>C. trachomatis</i> Serovar E gen. DNA
pKM24	# 1218	pAC2 linearisiert mit <i>EcoRI/BglII</i>	<i>C. pneumoniae omcB</i> Δ 33 _{6His} Fragment generiert mit den Oligonukleotiden C-360 / C-361 auf Plasmid-DNA # 1115 (Labor interne Sammlung, <i>C. pneumoniae</i> OmcB _{6His})
pKM25	# 1219	pKM2 linearisiert mit <i>XhoI</i>	<i>C. pneumoniae omcB</i> Δ 33 Fragment generiert mit den Oligonukleotiden C-357 / C-192 auf pKM2 DNA
pKM26	# 1220	pKM14 linearisiert mit <i>Bpu10I</i>	<i>C. trachomatis</i> Serovar LGV <i>omcB</i> Gen mit Einzelbasenaustausch P ₁₉₈ L generiert mit den Oligonukleotiden C-380 / C-381 auf pKM18 DNA
pKM27	# 1221	pAC2 linearisiert mit <i>EcoRI/BglII</i>	<i>C. trachomatis</i> Serovar E <i>omcB</i> _{6His} Variante generiert mit den Oligonukleotiden C-282 / C-430 auf pKM21 DNA
pKM28	# 1222	pYD1 linearisiert mit <i>EcoRI/NotI</i>	<i>C. psittaci</i> GPIC <i>omcB</i> Gen generiert mit den Oligonukleotiden C-428 / C-429 auf <i>C. psittaci</i> GPIC gen. DNA
pKM29	# 1223	pAC2 linearisiert mit <i>EcoRI/BglII</i>	<i>C. trachomatis</i> Serovar LGV <i>OmcB</i> _{6His} Variante generiert mit den Oligonukleotiden C-282 / C-430 auf pKM20 DNA

Tabelle 7: Verwendete Plasmide

2.11. Zellen und Zelllinien

2.11.1. Prokaryotische Zellen / Zelllinien

2.11.1.1. *Chlamydia pneumoniae*

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

2.11.1.2. *Chlamydia trachomatis*

***C. trachomatis* LGV L2/434/Bu :** (ATCC Nr.: VR-902B)

***C. trachomatis* E UW-5:** (ATCC N.: VR-348B)

2.11.1.3. *Escherichia coli*

XL₁-blue: supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac⁻ [F'proAB lac1^q ZΔM15 Tn10(tet^r)] (Stratagene)

2.11.2. Eukaryotische Zellen / Zelllinien

2.11.2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

EBY-100: MATa *ura 3-52 trp1 leu2Δ1 his3Δ200 pep4::HIS3 prb1Δ.6Rcan1 GAL AGA1::pIU211* (Boder and Wittrup 1997)

YKM1: MATa *ura 3-52 trp1 leu2Δ1 his3Δ200 pep4::HIS3::GAL1p loxP-KanMx-loxP-YEGFP prb1Δ.6Rcan1 GAL AGA1::pIU211*

CEN.PK 2-1C: MATa *leu2-3,112 ura 3-52 trp1-289 his3Δ1 MAL2-8^c SUC2* (Entian, Schuster et al. 1999)

2.11.2.2. Adhärenzte Zellkulturzellen

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

HeLa 229 Zelllinie: epitheliale Zelllinie, menschlichen Ursprungs (Cervix Karzinom) (ECACC Nr.: 86090201; ATCC Nr.: CCL-2.1)

CHO-K1: Hamsterzelllinie; Wildtypkontrollstamm zu den anderen CHO-Zelllinien. (ATCC Nr.: CCL-61)

CHO-pgsA-745: Hamsterzelllinie; Phänotyp: Defizient in Gag-Biosynthese; Defekt in Xylosyltransferase (Esko, Stewart et al. 1985), (Esko, Rostand et al. 1988), (Lidholt, Weinke et al. 1992). (ATCC Nr.: CRL-2242)

CHO-pgsD-677: Hamsterzelllinie; Phänotyp: Heparansulfat-defizient, aber akkumuliert Chondroitinsulfat; Defekte in den Enzymen *N*-Acetylglucosaminyltransferase und Glucuronosyltransferase (Esko, Stewart et al. 1985), (Esko, Rostand et al. 1988), (Lidholt, Weinke et al. 1992). (ATCC Nr.: CRL-2244)

Hec-1B Zelllinie: epitheliale Zelllinie, menschlichen Ursprungs (Endometriales Epithelium) (ATCC Nr.: HTB-113)

2.12. Medien und Medienzusätze

Cycloheximid (Actidione) (0,1 mg/ml)	Sigma
Fötale Kälberserum (FKS), dialysiert	Invitrogen
Fungizone (Amphotericin B)	Invitrogen
Gentamycin	Invitrogen
L-Glutamin (100 x)	Invitrogen
Nicht-essentielle Aminosäuren (MEM) Endkonzentration (100 x)	Invitrogen
Vitaminlösung (MEM) Endkonzentration (100 x)	Biochrom
Hanks' Salzlösung (HBSS)	Invitrogen

2.12.1. Zell- und Chlamydienkulturmedium

Minimal essential Medium, with Earle's Salts,
mit HEPES, ohne L-Glutamin
Ham's F12-K Nutrient mixture

Invitrogen
Invitrogen

2.12.2. Medien für *Escherichia coli*

LB Medium

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

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

2.12.3. Medien für *Saccharomyces cerevisiae*

YPD⁺-Medium

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

In 894 ml deion. Wasser lösen und autoklavieren. 20 g Glucose in 100 ml deion. Wasser lösen getrennt autoklavieren. Alle Zutaten in einem Endvolumen von 1 Liter lösen, in 250 ml Flaschen portionieren und autoklavieren.

SD- Minimalmedium (Platten):

20,0	g	Glucose
20,0	g	Agar
1,7	g	Hefe Nitrogen Base (YNB)
5,0	g	Ammoniumsulfat
2,0	g	Aminosäure-Mix

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

Aminosäure-Mix:

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

Adenin	0,5 g	Leucin	10,0 g
Alanin	2,0 g	Lysin	2,0 g
Arginin	2,0 g	Methionin	2,0 g
Asparagin	2,0 g	para-Aminobenzoesäure	2,0 g
Asparaginsäure	2,0 g	Phenylalanin	2,0 g
Cystein	2,0 g	Prolin	2,0 g

Glutamin	2,0 g	Serin	2,0 g
Glutaminsäure	2,0 g	Threonin	2,0 g
Glycin	2,0 g	Tryptophan	2,0 g
Histidin	2,0 g	Tyrosin	2,0 g
Inositol	2,0 g	Uracil	2,0 g
Isoleucin	2,0 g	Valin	2,0 g

Tabelle 8: Zusammensetzung des Aminosäure-Mixes

SD-Minimalmedium (flüssig):

- 1,7 g Hefe Stickstoffquelle (YNB)
- 5,0 g Ammoniumsulfat
- 2,0 g Aminosäure-Mix

Die entsprechende Aminosäure oder Base für die Selektion im Minimalmedium nicht dazu geben. In 1000 ml deion. Wasser lösen. Die entsprechende Kohlenstoffquelle wird als 20%ige Stocklösung separat autoklaviert und nachträglich dem Medium zugefügt.

3. Methoden

3.1. Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

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

3.1.1. Induktion von Oberflächen-präsentierten Proteinen in der Hefe *S. cerevisiae*

3.1.1.1. Ansetzen der Induktionskultur

Um die Genexpression Oberflächen-präsentierter Proteine in der Hefe zu induzieren, müssen die Zellen in Induktionsmedien kultiviert werden. In dem hier genutzten Hefe-Expressionssystem unterliegen die Gene der Kontrolle des *GAL1*-Promotors (Boder and Wittrup 1997). Um die Proteinexpression zu ermöglichen, wird Induktionsmedium mit Galaktose verwendet. Damit der *GAL1*-Promotor nicht reprimiert vorliegt, muss das Induktionsmedium frei von Glukose sein, daher werden die Hefezellen zunächst in Medium kultiviert, welches 2 % Raffinose als Kohlenstoffquelle enthält und anschließend in Medium mit 2 % Galaktose überimpft.

Die selektive Hefeinduktionskultur wird wie folgt angesetzt:

- 5 ml Minimalmedium (SD Trp⁻, Raffinose) wird mit einer frischen Hefekolonie beimpft und bei 30 °C unter rotierendem Schütteln über Nacht inkubiert.
- Nach 12 h wird die OD₆₀₀ der Kultur bestimmt und auf eine OD₆₀₀ von 0.3 in 5 ml Minimalmedium (SD Trp⁻, Galaktose) übergeimpft.
- Die Kultur wird für weitere 24 h unter rotierendem Schütteln bei 30 °C inkubiert. Nach weiteren 24 h wird die OD₆₀₀ photometrisch bestimmt und die Zellen können nun den verschiedenen Verwendungszwecken wie Adhäsionstests (siehe Abschnitt 3.5.16.) zugeführt werden.

3.1.1.2. Aufarbeitung von Proteinproben für SDS-Polyacrylamidgele

- Zum Nachweis der Proteininduktion wird die OD₆₀₀ von Hefezellen nach 24 h Kultivierung in Galaktose-Medium bestimmt.
- Für Proteinextrakte aus Hefezellen wird eine OD₆₀₀ von 4 an Zellen geerntet und für 1 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert.
- Das Zellpellet wird in 1 ml ddH₂O gewaschen und erneut für 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert.
- Das Pellet wird in 32,5 µl dest. Wasser resuspendiert.
- Es werden 12,5 µl Ladegelpuffer (4fach konzentriert) (50 mM Tris/HCL pH 6,9; 2 % SDS; 0,1 % Bromphenolblau; 5 % Glycerin) zugegeben.
- Es werden 5 µl 1 M DTT zugegeben.
- Die Probe wird 30 min bei 100 °C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt.
- Die Probe wird mittels Westernblot analysiert.

3.1.2. Methoden der direkten Zellfärbung von Hefezellen

3.1.2.1. Färbung mit Methyleneblau

Mittels der Methyleneblau Färbung können tote von lebenden Zellen unterschieden werden, da nur lebende Zellen den blauen Farbstoff aus den Zellen hinausschleusen können. Sie

erscheinen farblos im Kontrastmikroskop, während tote Zellen den Farbstoff akkumulieren und daher blau gefärbt werden.

- Die Hefezellen die zuvor entweder mit PBS oder mit PBS und verschiedenen Proteasen vorbehandelt wurden, werden mit Methylenblaulösung (4 mg/ml) versetzt und 10 min bei RT inkubiert.
- 5 µl der Suspension wird auf einen Objektträger getropft und mikroskopisch analysiert.

3.1.2.2. Färbung von Zellen mit Calcofluor-White

Mittels der Calcofluor-White Färbung kann man die Zellwand von Hefezellen anfärben, da Calcofluor-White das eingelagerte Chitin sichtbar macht. Die Chitinfärbung wird unter Verwendung von UV-Licht sichtbar.

- Die Hefezellen die zuvor entweder mit PBS oder mit PBS und verschiedenen Proteasen vorbehandelt wurden, werden mit Calcofluor-White (20 mg/ml) versetzt und 5 min bei RT inkubiert.
- 5 µl der Suspension wird auf einen Objektträger getropft und mikroskopisch analysiert.

3.1.3. Indirekte Immunfluoreszenz (IF)

3.1.3.1. Präparation und Fixierung der Hefezellen

- Eine 5 ml Hefe-Induktionskultur (siehe Abschnitt 3.1.1.1.) wird mit 500 µl frisch angesetztem para-Formaldehyd (37%) versetzt, und für 5 min bei RT inkubiert.
- Die Zellen werden 2 min bei 3500 Upm (Megafuge 1.0) bei RT abzentrifugiert.
- Das Pellet wird vorsichtig zweimal mit 5 ml PBS gewaschen.
- Das Zellpellet wird in 1 ml PBS resuspendiert und kann bei 4 °C etwa zwei Tage gelagert werden.

3.1.3.2. Fluoreszenz-Markierung Oberflächen-präsentierter Proteine

- Ein Multiwell Objektträger wird mit Wasser gewaschen und anschließend getrocknet.
- Pro Vertiefung werden 20 µl Poly-L-Lysin (0,5 mg/ml) aufgetragen und für 10 min bei RT inkubiert.
- Das Poly-L-Lysin wird mit dest. Wasser vom Objektträger abgewaschen und erneut getrocknet.
- Pro Vertiefung werden 20 µl Hefezellsuspension aufgetragen und für 10 min bei RT in einer feuchten, geschlossenen Kammer inkubiert.
- Die Zellen werden abgenommen und es wird 20 µl Blockierungslösung (BSA 1 %, Tween 20 0.5 %, PBS pH 7.4) aufgetropft und für weitere 30 min in der feuchten Kammer inkubiert.
- Der primäre Antikörper (Anti-Xpress) wird 1:500 in Blockierungslösung verdünnt und pro Well werden 20 µl aufgetragen und für 2 h bei RT (oder ÜN bei 4°C) inkubiert.
- Die Vertiefungen werden viermal mit je 20 µl Blockierungspuffer gewaschen.
- Der sekundären Antikörper (Cy3-Anti-Maus) wird 1:200 in Blockierungslösung verdünnt und pro Well werden 20 µl aufgetragen. Die Inkubation erfolgt für 1 h bei RT.
- Die Vertiefungen werden viermal mit je 20 µl Blockierungspuffer gewaschen.

- Die Zellen werden auf den Vertiefungen angetrocknet und mit 1 µl Vectashield beschichtet, mit einem Deckglas abgedeckt und durch Nagellack versiegelt.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop kann die Fluoreszenz betrachtet werden.

3.2. Kultivierung von eukaryotischen Zellen in der Zellkultur

3.2.1. Herstellung des Zellkulturmediums

Minimal Essential Medium (MEM) + HEPES (25 mM) + „Earle´s salts“; (ohne Glutamin) wurde für die Kultivierung von HEp-2, HeLa sowie Hec-1B Zellen verwandt. Für die Kultivierung von CHO-Zellen wurde Ham´s F12-K Nutrient mixture Medium eingesetzt.

500 ml Medium wurden mit folgenden Zusätzen versetzt:

- + 50 ml hitzeinaktiviertes FKS (Endkonzentration: 10 %),
- + 7.5 g Glukose (Endkonzentration: 56 mM),
- + 5 ml Amphotericin B (Endkonzentration: 2,5 µg/ml),
- + 0.5 ml Gentamycin (Endkonzentration: 50 µg/ml),
- + 5 ml L-Glutamin (Endkonzentration: 2 mM),
- + 5 ml Vitamine (Endkonzentration: 1x),
- + 5 ml nicht essentielle Aminosäuren (Endkonzentration: 1x).

3.2.2. Herstellung aller Stammlösungen für die Zellkultur

3.2.2.1. Hitzeinaktivierung von fötalem Kälber-Serum (FKS)

- Das Kälber-Serum wird bei Raumtemperatur 90 min aufgetaut, so dass sich zwischen Eis und Flaschenglas ein Flüssigkeitsfilm bilden kann.
- Erwärmung bei 20 °C im Wasserbad für 25 min unter leichtem Schütteln.
- Erwärmung für 35 min bei 37 °C im Wasserbad, bis das FKS aufgetaut ist.
- Die Hitzeinaktivierung erfolgt bei 56 °C für 60 min im Wasserbad, dabei sollte das FKS durch gelegentliches Schütteln gemischt werden.
- Zuletzt wird das FKS steril portioniert und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

3.2.2.2. Herstellung einer Glukoselösung

- 100 g Glukosemonohydrat (w / v) werden unter Rühren und leichtem Erwärmen (max. 40 °C) mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.
- Nach dem Autoklavieren wird die sterile Lösung á 5 ml steril portioniert und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

3.2.2.3. Vitamine, Aminosäuren und Antibiotika

Vitamine, L-Glutamin und Amphotericin (siehe Abschnitt 3.2.1.) werden ebenfalls in gebrauchsfertige Portionen aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

3.2.2.4. Herstellung der Trypsinlösung

10 x Trypsin/EDTA-Lösung (Invitrogen) wird in 5 ml Aliquots portioniert und zum Gebrauch werden 5 ml mit 95 ml Hank´s Lösung (HBSS) ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ verdünnt. Die Gebrauchslösung (0,5 x Trypsin/EDTA) wird bei 4 °C gelagert.

3.2.3. Auftauen von HEp-2 Zellen

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

3.2.4. Trypsinbehandlung von HEp-2 Zellen

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

3.2.6. Passagieren von adhärenenten epithelialen Zellen

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

Die Passage von HEp-2 Zellen wird im Folgenden exemplarisch beschrieben. Die Passage der anderen adhärenenten Zelllinien wurde nach denselben Protokollen durchgeführt abweichend werden verschiedene Wachstumsmedien für die unterschiedlichen Zellen eingesetzt.

3.2.6.1. Passage von HEp-2 Zellen in Gewebekulturröhrchen (GK)

- Die GK's werden steril geöffnet und ein steriles Glasplättchen wird mit einer Pinzette in das GK hineingelegt.
- Es wird ein 12 ml Zentrifugenröhrchen mit 9 ml Zellkulturmedium gefüllt und bereit gestellt.
- Die durch Abtrypsinisieren gewonnene Zellsuspension wird aufgeschüttelt.
- 1 ml wird aus dieser Suspension entnommen, den 9 ml Zellkulturmedium in dem Zentrifugenröhrchen zugesetzt und gut gemischt.
- Aus dieser Lösung wird jeweils 1 ml entnommen und in eines der vorbereiteten GK's pipettiert, so dass keine Luft zwischen dem Boden des GK's und dem Glasplättchen gelangt.
- Die GK's werden nun mehrere (2-3) Tage bei 37 °C inkubiert bis sich ein konfluenter Zellrasen ausgebildet hat.

3.2.6.2. Passage von HEp-2 Zellen in kleinen Zellkulturflaschen (25 cm²)

- In jede Flasche werden 6 ml Zellkulturmedium vorgelegt.
- Die durch Abtrypsinisieren gewonnene Suspension wird aufgeschüttelt und in jede Zellkulturflasche werden 0,5 – 0,8 ml Suspension pipettiert.
- Die Flaschen werden gut verschlossen und leicht geschwenkt, um die Zellen im Medium zu verteilen.
- Die Zellkulturflaschen werden bei 37 °C, 6 % CO₂ und leicht geöffnetem Deckel für 3-4 Tage inkubiert.

3.2.6.3. Passage von HEp-2 Zellen in großen Zellkulturflaschen (80 cm²)

- In jede Zellkulturflasche werden 15 ml Zellkulturmedium pipettiert.
- Die durch Abtrypsinisieren gewonnene Zellsuspension wird aufgeschüttelt und anschließend werden 1-1,5 ml dieser Suspension in jede Zellkulturflasche pipettiert.
- Durch leichtes Schwenken werden die Zellen im gesamten Medium verteilt.
- Die Zellkulturflaschen werden 3-4, maximal 7 Tage bei 37 °C, 6 % CO₂ und leicht geöffnetem Deckel inkubiert.

3.2.7. Einfrieren von eukaryotischen Zellen

- Aus einer konfluent bewachsenen 80 cm² Zellkulturflasche wird das Zellkulturmedium abgesaugt.
- Der Monolayer wird mit 10 ml HBSS-Lösung vorsichtig gespült, um Mediumreste zu entfernen.
- Die HBSS-Lösung wird vollständig abgesaugt.
- Zum Ablösen der Zellen werden diese mit 5 ml Trypsin/EDTA (0,5 x) überschichtet und bei leichtem Schwenken der Flasche bei 37 °C inkubiert.
- Zugabe von 5 ml Zellkulturmedium und vorsichtiges Mischen der Suspension.
- Die Suspension wird in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 43,3 x g zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen und das Sediment in 1 ml Einfriermedium (90 % FKS, 10 % DMSO) resuspendiert.
- Die Suspension wird in ein Kryo-Röhrchen überführt.

Die Zellen werden schonend in einer Isopropanol-Einfrierbox bei -70 °C eingefroren.

3.2.8. Bestimmung von Zellzahlen

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

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

3.3. Chlamydienkultur

3.3.1. Herstellung des Chlamydienkulturmediums

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

3.3.2. Lösungen für die Chlamydienkultur

10 mg Cycloheximid werden in 100 ml HBSS aufgelöst, steril filtriert und aliquotiert. Die Aliquots werden bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

3.3.2.1. Herstellung des Saccharose-Phosphat-Glutaminsäure-Puffer (SPG-Puffer)

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

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

3.3.3. Auftauen von Chlamydien zur Kultivierung

- Ein Kryo-Röhrchen wird aus -70 °C entnommen und im Brutschrank bei 37 °C erwärmt.
- Die Chlamydien suspension wird in 10 ml Zellkulturmedium pipettiert und leicht gemischt.

Bei geringen Infektionsdosen (<1000 IFU / ml) infiziert man mit dieser Suspension GK's. Bei hohen Infektionsdosen können 1-4 kleine Zellkulturflaschen infiziert werden.

3.3.4. Passage von Chlamydien in Gewebekulturröhrchen (GK's)

- 10 GK's, welche konfluent bewachsen und nicht älter als 3 Tage sind, werden für die Infektion verwendet.
- Eine zu passagierende Chlamydien suspension (1-5 ml) wird in 10 ml Zellkulturmedium pipettiert und gemischt.
- In jedes GK wird 1 ml der infektiösen Suspension pipettiert.
- Die Gewebekulturröhrchen werden für 60 min bei 30 °C und 4000 x g in der Rotanta 460R Zentrifuge zentrifugiert, daran schließt sich eine einstündige Inkubation bei 37 °C an (Adsorptionsphase).
- Nach der Adsorptionsphase wird das Medium aus jedem GK abgezogen und vorsichtig durch 1 ml Chlamydienkulturmedium ersetzt.
- Die GK's werden dann 3-5 Tage bei 37 °C und gut verschlossenen Deckeln inkubiert.
- Nach 3-5 Tagen wird ein Gewebekulturröhrchen zur Detektion chlamydialer Einschlüsse gefärbt (siehe Abschnitt 3.3.11.).

3.3.5. Passage von Chlamydien in kleinen Zellkulturflaschen

- Eine aufgetaute Chlamydien suspension wird durch Zugabe von Medium auf ein Volumen von 6 ml pro Zellkulturflasche (25 cm²) aufgefüllt.

- Die Zellkulturflaschen (25 cm²) werden unter sterilen Bedingungen geöffnet und das überstehende Zellkulturmedium wird abgezogen.
- Die Chlamydien suspension wird vorsichtig in die Flasche pipettiert.
- Die Flaschen werden fest verschlossen und 60 min bei 1560 x g (3000 Upm / Rotanta 460R), 30 °C zentrifugiert und anschließend 60 min zur Adsorption bei 37 °C inkubiert.
- Nach der Adsorption werden die Flaschen unter sterilen Bedingungen geöffnet und das Medium wird vorsichtig abgesaugt.
- Die infizierten Zellen jeder Flasche werden vorsichtig mit 6 ml Chlamydienmedium überschichtet.
- Dann werden die infizierten Zellen bei 37 °C und 6 % CO₂ für 3-5 Tage inkubiert.
- Nach 3-5 Tagen werden die Flaschen aus dem Brutschrank entnommen und im Phasenkontrastmikroskop bei 100- 200facher Gesamtvergrößerung durchgemustert. Ein Ablösen der Zellen und das Auftreten von Einschlusskörpern in den Zellen deutet auf eine starke Infektion hin.
- Bei starker Ablösung der Zellen vom Flaschengrund liegt eine starke Infektion vor und die Chlamydien können bei der nächsten Passage 1:4 oder stärker verdünnt werden. Ist das aber nicht der Fall, dann sollte bei der nächsten Passage keine Verdünnung der Chlamydien vorgenommen werden.
- Mit Hilfe eines sterilen Zellschabers werden die infizierten Zellen vom Flaschengrund gelöst.
- Die Suspension von bis zu 6 kleinen Flaschen wird in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml) pipettiert. Zur Verdünnung wird in ein solches Röhrchen eine entsprechende Menge an Zellkulturmedium vorgelegt, bei einer 1:2 Verdünnung werden 12 ml Medium vorgelegt und die Suspension aus 2 Flaschen (2 x 6 ml) hinzugefügt.
- Die Suspension wird 45 s mit dem Ultraschallstab beschallt.
- Die Suspension wird 10 min bei 1560 x g (3000 Upm / Rotanta 460R) und 20 °C zentrifugiert (Differentialzentrifugation).
- Der Überstand wird in ein neues Röhrchen überführt und die Zentrifugation wird wiederholt.
- Der Überstand des zweiten Zentrifugationsschrittes wird zur Infektion neuer Zellkulturflaschen verwendet oder eingefroren.

3.3.6. Sedimentation und Einfrieren von Chlamydien

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

3.3.7. Reinigung von Chlamydien durch Zentrifugation

Chlamydien werden mittels Dichtegradientenzentrifugation von eukaryotischen Zelltrümmern gereinigt oder es erfolgt die Trennung von RBs und EBs. Für die Reinigung werden die Chlamydien ernten von bis zu 30 kleinen Zellkulturflaschen auf einem Gradienten aufgetrennt.

3.3.7.1. Percoll-Reinigung von Chlamydien

- Die differentialzentrifugierte Chlamydiensuspension wird bei 15.000 Upm (Hereaus Biofuge Primo R) und 4 °C für 30 min sedimentiert.
- Das Pellet wird in 1 ml PBS resuspendiert und vorsichtig in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert, in welches 9 ml 30 % Percoll in PBS vorgelegt wurden.
- Die Probe wird 30 min bei 30000 x g und 4 °C (Beckmann J2-21) zentrifugiert.
- Die Chlamydien erscheinen als zwei (RBs und EBs) Banden mit einer Dichte von etwa 1,18 bis 1,21 g/ml.
- Die Chlamydien werden vorsichtig abpipettiert und mit etwa 10 ml PBS versetzt.
- Die Suspension wird erneut für 30 min bei 30000 x g und 4 °C zentrifugiert.
- Die Chlamydiensuspension wird erneut zweimal gewaschen und wird anschließend in SPG oder Einfriermedium weggefroren.

3.3.7.2. Gastrografin-Reinigung von Chlamydien

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

3.3.8. Titration von Chlamydiensuspensionen

Chlamydiensuspensionen werden titriert, um ihre Infektiösität und die Menge an einschlussbildenden Einheiten pro Milliliter zu ermitteln.

- Eine Chlamydiensuspension wird 1:10 bis zur Verdünnungsstufe 10^{-10} schrittweise mit Medium verdünnt.
- Eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen, in die zwei Tage zuvor Zellen (HEp-2) ausgesät wurden, wird bereitgestellt. Der Zellrasen muss dazu konfluent sein.
- Das Medium wird vorsichtig aus den Vertiefungen abgesaugt.
- Die Chlamydiensuspension (100 µl) wird in die Vertiefungen pipettiert; dabei werden mit jeder Verdünnungsstufe 4 Vertiefungen inokuliert.
- Die Platte wird für die *C. pneumoniae* Infektionen für 60 min bei 30 °C und 1560 x g (3000 Upm / Rotanta 460R) zentrifugiert.
- Danach folgt eine Adsorptionsphase von 60 min im Brutschrank bei 37 °C und 6 Vol.% CO₂.
- Nachdem das Inokulum abgesaugt wurde, werden die Vertiefungen mit 200 µl frischem Chlamydienwachstumsmedium beschickt (siehe Abschnitt 3.3.1.).
- Nach 3 Tagen wird die Platte ausgeklopft und die Zellen mit 100 µl Methanol je Vertiefung für mind. 10 min fixiert.
- Danach werden die infizierten Zellen gefärbt, mittels eines gattungsspezifischen FITC-markierten Antikörpers, der gegen das chlamydiale LPS gerichtet ist (siehe Abschnitt 3.3.11.2.).
- Die Einschlüsse je Vertiefung werden gezählt und die Zahl der Einschlussbildenden Partikel/ ml in der Ausgangssuspension errechnet.

3.3.9. Infektion von Zellen durch Chlamydien ohne Zentrifugation

Für Adhäsionsversuche wurde auf das Aufzentrifugieren der Chlamydien auf die Zellen verzichtet.

- Das Zellkulturmedium wird abgezogen und die Zellen werden zweimal mit eiskaltem PBS gespült.
- Die Chlamydien suspension wird auf die Zellen pipettiert.
- Die Zellen werden 2 h bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Bei dieser Temperatur können die Chlamydien an die Zellen binden, werden aber nicht aufgenommen.
- Die Zellen werden dreimal mit je 1 ml eiskaltem PBS gespült und mit Chlamydienwachstumsmedium (siehe Abschnitt 3.3.1.) überschichtet.
- 3 Tage nach der Infektion werden die Zellen fixiert und die Einschlusszahlen von mind. 10 Gesichtsfeldern pro Deckgläschen bestimmt.

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

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

3.3.10.1. Probenherstellung

- Die Probe, welche sowohl Zellmaterial als auch Medium beinhaltet, wird 30 min bei 15000 Upm (HeraeusBiofuge pico) und 20 °C sedimentiert.
- Das Pellet wird in 100 µl Wasser resuspendiert.
- Es wird Proteinase K (Endkonzentration: 4 mg/ml, in Wasser gelöst) zugegeben und 3 h bei 55 °C inkubiert.
- Hitzeinaktivierung der Proteinase K bei 98 °C für ≥25 min.
- Die Probe kann weggefroren werden (-20 °C).
- Als Matrizen-DNA werden 5 µl je 50 µl PCR-Ansatz verwendet.

3.3.10.2. PCR-Bedingungen

Ansatz:

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

Programm:

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

3. finale Elongation

10 min bei 72 °C

3.3.10.3. Analyse

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

3.3.11. Immunologischer Nachweis von Chlamydien mittels Fluoreszenzmikroskopie

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

Es gibt verschiedene Verfahren, um Zellen zur immunologischen Analyse zu fixieren. Im Folgenden wird die Fixierung mittels Methanol oder durch 3,7 % Formaldehyd in PBS beschrieben.

Fixierung durch Methanol

- Das Zellkulturmedium wird vorsichtig abgezogen und verworfen.
- Die Zellen werden mit Methanol überschichtet und für mindestens 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei längerer Lagerung der fixierten Zellen sollte das Fixationsmittel spätestens nach 24 h entfernt werden und die Zellen mit PBS überschichtet werden.
- Die fixierten Zellen können bei 4 °C mehrere Wochen gelagert werden.

Fixierung durch Formaldehyd

- Das Zellkulturmedium wird vorsichtig abgezogen und verworfen.
- Die Zellen werden mit 3,7 % Formaldehyd in PBS überschichtet und für mindestens 1 h bei 4 °C inkubiert. Bei längerer Lagerung der fixierten Zellen sollte das Fixationsmittel spätestens nach 20 h entfernt werden und die Zellen mit PBS überschichtet werden.
- Die fixierten Zellen können bei 4 °C eine Woche gelagert werden.

Die Zellen werden durch dreimaliges Waschen mit 0,2 % TritonX-100 in PBS permeabilisiert. Die Chlamydien werden durch diese Behandlung nicht permeabilisiert.

3.3.11.2. Direkte Immunfluoreszenz

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

- Die fixierten Zellen werden dreimal mit 1 ml PBS gewaschen.
- Das Glasplättchen wird vorsichtig, ohne die Zellen zu beschädigen, aus dem Gewebekulturröhrchen in eine Gewebekulturplatte mit 24 Vertiefungen transferiert (bewachsene Seite muss stets oben bleiben).
- Es werden 20 µl Antikörper (genusspezifischer FITC-konjugierter *Chlamydia* spezifischer Antikörper 1:4 in PBS verdünnt) auf dem Plättchen verteilt.
- Das Plättchen wird für 30 min in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert.
- Auf einen Objektträger wird ein Tropfen Vectashield aufgesetzt.
- Das Plättchen wird in der Mikrotiterplatte zweimal 5 min mit PBS gespült, anschließend entnommen und getrocknet.
- Dann wird das Glasplättchen mit dem Zellrasen nach unten auf den Tropfen Vectashield gelegt.

- Mittels des Fluoreszenzmikroskops können die Chlamydien in den Zellen als grüne Einschlüsse nachgewiesen werden.
- Zur längeren Lagerung eines solchen Präparates wird der Rand des Plättchens mit Nagellack abgedichtet.

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

3.3.11.3. Indirekter immunologischer Nachweis von Chlamydien in der Zellkultur

Der indirekte immunologische Nachweis von chlamydialen Einschlüssen erfolgt über die Verwendung von *Chlamydia pneumoniae* bzw. *Chlamydia trachomatis* spezifischen Primär-Antikörpern in Kombination mit Fluoreszenz-konjugierten Sekundär-Antikörpern. Alle indirekten Immunofluoreszenzfärbungen wurden nach diesem Protokoll, unter Verwendung verschiedener Primär und Sekundär-Antikörper, durchgeführt.

- Die infizierten Zellen aus einem GK werden fixiert und gewaschen.
- Das Glasplättchen wird vorsichtig, ohne die Zellen zu beschädigen, aus dem Gewebekulturröhrchen in eine Gewebekulturplatte mit 24 Vertiefungen transferiert (bewachsene Seite muss stets oben bleiben).
- Ein Primär-Antikörper wird nach Herstellerangaben mit PBS verdünnt, und 20 µl dieser Verdünnung werden auf das Glasplättchen gegeben.
- Inkubation für 30 min bei 37 °C in einem Brutschrank mit hoher Luftfeuchtigkeit.
- Das Plättchen wird mit dreimal 5 min mit PBS unter leichtem schwenken gewaschen.
- 20 µl eines fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörper (verdünnt nach Herstellerangaben mit PBS) werden auf das Glasplättchen getropft.
- Die Inkubation erfolgt für 30 min bei 37 °C.
- Es folgt dreimaliges Waschen mit PBS für 5 Minuten bei leichtem Schütteln.
- Das Präparat wird getrocknet und wie für die direkte Immunofluoreszenz weiter behandelt.

3.3.11.4. Mikroimmunfluoreszenz (MIF)

Neben der Detektion von chlamydialen Einschlüssen in eukaryotischen Zellen können auch Epitope auf Gradientengereinigten, unfixierten Chlamydien mittels indirekter Immunfluoreszenz detektiert werden.

- 20 µl Gradienten-gereinigte Chlamydien (siehe Abschnitt 3.3.7.) werden auf eine Vertiefung eines Multiwell Objektträgers getropft und bei 37°C getrocknet, bis die Flüssigkeit vollständig verdampft ist.
- Die chlamydialen Partikel sind nun fest auf dem Glas fixiert und werden mit 20 µl Primär-Antikörper (verdünnt in PBS) überschichtet.
- Es erfolgt eine Inkubation mit dem Primär-Antikörper für 45 min bei 37°C.
- Durch dreimaliges Waschen der Chlamydien mit jeweils 20 µl PBS wird ungebundener Antikörper entfernt.
- 20 µl des Sekundär-Antikörpers (Fluoreszenz-gekoppelt, verdünnt in PBS) wird zu den Zellen gegeben und erneut für 45 min bei 37°C inkubiert.
- Nach dem der Antikörper entfernt wurde, werden die chlamydialen Partikel dreimal mit PBS gewaschen und auf dem Objektträger getrocknet.
- Pro Vertiefung wird 1 µl Vectashield aufgetragen und die Zellen werden mit einem Deckgläschen verschlossen und mit Nagellack versiegelt.
- Das Präparat kann nun mikroskopiert werden.

3.3.12. Behandlung von HEp-2 Zellen mit Heparinase I

Mit diesem Versuch sollte der Einfluss von GAG-Lyasen auf die Bindung von Aga2p-OmcB exprimierenden getestet werden. Mittels eines spezifischen Enzyms werden Heparansulfat Glykosaminoglykane sequenzspezifisch geschnitten und entfernt. Die hier verwendete Methode ist das leicht modifizierte Protokoll nach (Neyts, Snoeck et al. 1992).

- Benötigt werden konfluent gewachsene HEp-2 Zellen die in 24 Well Platten auf Glasplättchen ausgebracht wurden. Die Heparinase I (E.C. 4.2.2.7; 100 Units) wird in 210 µl PBS mit 0,1 % BSA gelöst.
- Die HEp-2 Zellen werden mit PBS gewaschen.
- Pro Well werden die Zellen bei 37 °C mit 100 µl Heparinase I (50 Units) bzw. nur mit Puffer für 1 h behandelt.
- Die HEp-2 Zellen werden 3 x mit PBS gewaschen.
- Anschließend sind die Zellen für weitere Experimente wie Adhäsionstests verwendbar (siehe Abschnitt 3.5.16.)

3.4. Molekularbiologische Methoden

3.4.1. Gewinnung von chlamydialer DNA für PCR-Reaktionen

Genomische chlamydiale DNA wurde unter Verwendung der Genomic Kit G20 von Qiagen aus Gradienten gereinigte Chlamydien isoliert. Die Aufreinigung der DNA erfolgte nach Herstellerangaben.

3.4.2. Gewinnung von Plasmid DNA aus *E. coli* Kulturen

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

3.4.2.1. Plasmid-Minipräparation

Bei der Plasmid-Minipräparation wird Plasmid-DNA aus 2 ml *E. coli* Kultur isoliert.

3.4.2.2. Plasmid Midipräparation

Die Methode beruht auf dem Verfahren der alkalischen Lyse und der Reinigung der DNA über eine Säule. Diese Technik ist als Qiagen Plasmid Kit der Firma Qiagen beschrieben und stellt eine Plasmidpräparation in größerem Maßstab dar. Alle Puffer, deren Zusammensetzung nicht näher erläutert sind, wurden kommerziell mit dem Kit erworben.

3.4.3. DNA-Mengenbestimmung durch photometrische Messung

- Eine DNA-Lösung wird 1:20 in einem Endvolumen von 100 µl dest. H₂O verdünnt und in eine Quarzküvette pipettiert.
- Der Abgleich erfolgt gegen 100 µl dest. H₂O.
- Das Absorptionsergebnis bei 260 nm ist die Menge DNA in µg pro µl in der Ausgangslösung. Die Reinheit der DNA-Lösung kann durch Messung des Quotienten zwischen der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt werden. Dieser Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.4.4. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die Spaltungen der DNA mit den jeweiligen Enzymen erfolgt im Regelfall in dem vom Hersteller mitgelieferten Spezialpuffer unter den angegebenen Reaktionsbedingungen. Zur Überprüfung der Spaltung wird ein Zehntel des Reaktionsansatzes auf einem 0,7 %igen Agarosegel aufgetrennt.

3.4.5. Auftrennung von DNA-Molekülen durch Gelelektrophorese in Agarosegelen

Zur Darstellung von DNA wurde die jeweilige Probe auf ein 0,7-1,0 %iges Agarosegel aufgetragen und bei 80-120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Zugabe von Ethidiumbromid wird die DNA unter UV-Licht sichtbar.

Zur Längenbestimmung der einzelnen DNA-Fragmente wird auf jedes Gel als Längenmarker entweder *EcoRI/HindIII* gespaltener λ -Phagen-DNA oder pUC19 *Sau3A* aufgetragen.

3.4.5.1. Gelelektrophoresepuffer

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

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

3.4.6. DNA-Fällung

- Die DNA-haltige Lösung (100 μ l) wird in ein Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert.
- Der Lösung werden 10 μ l NaAc (3M, entspricht 1/10 des Volumens der DNA-Lösung) zupipettiert, und mit der dreifachen Menge Ethanol (96 %) aufgefüllt.
- Die Probe wird gevortext und für 30 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert.
- Der Überstand wird möglichst vollständig entnommen und verworfen.
- Das Präzipitat wird mit 1ml eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen.
- Das ERG wird 10 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert und der Überstand verworfen.
- Die DNA wird 10 min im Vakuum-Konzentrator getrocknet und in mindestens 20 μ l ddH₂O resuspendiert.

3.4.7. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

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

3.4.8. Berechnung der optimalen Annealing Temperatur von Oligonukleotiden

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

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

3.4.9. PCR-Reaktion (Polymerase Chain Reaction)

3.4.9.1. Bedingungen der PCR-Reaktion

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

	Temperatur	Zeit
1. Erste Denaturierung	95°C	5 min
2. Denaturierung	95°C	1 min
3. Annealing	48-50°C	1 min
4. Elongation	68°C	1-3 min
5. finale Elongation	68°C	7 min
Zyklen (von 2-4)	35-40	

Tabelle 9: PCR-Programm

3.4.9.2. Ansetzen einer PCR-Reaktion

Das Reaktionsvolumen beträgt in der Regel 100 µl.

- 1 µl Matrizen DNA (10-100 ng)
- 50 pmol pro Oligonukleotid
- 200 µM dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- MgCl₂ zur Endkonzentration von 2,5 mM
- 1-2 U Polymerase
- auffüllen auf 100 µl mit dest. Wasser.

Die Reaktion wird im Thermocycler durchgeführt.

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

3.4.9.3. PCR auf Hefezellen

Die PCR kann auch auf Hefe-Zellen durchgeführt werden. Hierfür werden als Template DNA ungefähr 1×10^5 Zellen eines frisch ausgestrichenen Hefestammes mit einer

Mikropipettenspitze abgenommen und dem PCR-Ansatz zugefügt. Die PCR-Reaktion wird wie unter 3.4.9. beschrieben durchgeführt.

3.4.10. Generierung von Einzelbasenpaar-Austauschen mittels Mutagenese-PCR

Um gezielt einzelne Basen in einem DNA-Fragment auszutauschen wurde das Stratagen-Mutagenese-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die Oligonukleotide für die Mutagenese-PCR werden dabei so konstruiert, dass die gewünschten Austausche in der Mitte des Oligonukleotids liegen.

3.4.11. Ein-Minuten-Transformation

Um eine Plasmid-DNA in *E.coli* zu transformieren, wurde eine 1-Minuten-Transformation durchgeführt. Sie geht sehr schnell, ist aber aufgrund der niedrigen Effizienz nur für die Transformation von Plasmid-DNA geeignet.

- 7 µl DMSO kompetente Zellen (Hergestellt durch die Arbeitsgruppen Hegemann und Fleig) werden auf Eis aufgetaut.
- Die Zellen werden mit 1 µl DNA (1-100 ng) auf Eis gemischt .
- Der Ansatz wird für 1 min bei 42°C erhitzt.
- Sofort wird die Probe in 100 µl LB aufgenommen und auf einer LB+ Ampicillin Platte ausplattiert.

Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.4.13. Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Diese Methode wurde von Maniatis (Sambrook, Maniatis et al. 1989) beschrieben angewandt. Die elektrokompenten *E. coli* XL₁-blue Zellen (Hergestellt durch die Arbeitsgruppen Hegemann und Fleig) wurden für die Transformation eingesetzt.

3.4.14. DNA-Isolation aus *Saccharomyces cerevisiae*

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

3.4.15. Transformation von *S. cerevisiae*

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

3.4.16. Integration von DNA-Fragmenten über homologe *in vivo* Rekombination

Um ein gewünschtes DNA-Fragment in einen Expressionsvektor einzubringen, wird das DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert. Für die PCR werden zwei spezifische Oligonukleotide verwendet, die jeweils 40 Nukleotide Homologie zur Ziel-Plasmid sowie 18-22 Nukleotide Homologie zum Zielgen besitzen.

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

mittels PCR eine sogenannte Integrationskassette generiert, die wie oben beschrieben 40 Nukleotide Homologie zur Ziel-DNA sowie 18-22 Nukleotide Homologie zum Zielgen besitzt. Die Integrationskassette wird über die Homologien zur Ziel-DNA in den genomischen Locus integriert.

3.5. Biochemische Methoden

3.5.1. Reinigung von cOMCs aus *C. pneumoniae*

Für die Isolierung von chlamydialen Proteinen aus dem Außenmembrankomplex (cOMC) werden Gradienten-gereinigte Chlamydien (1×10^9 IFU/ml) benötigt.

- Nach der Gradientenreinigung wie unter Abschnitt 3.3.7. beschrieben, werden die chlamydialen Partikel für 30 min bei 15.000 Upm (Hereaus Biofuge Primo R) und 4 °C sedimentiert.
- Das Pellet wird in 50 µl PBS im Ultraschallbad resuspendiert.
- Es werden 150 µl Sarkosylpuffer (2% Sarkosyl, 1.5 mM EDTA) zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert.
- Die Suspension wird 1 h bei 100000 x g (42000Upm, Ultrazentrifuge, TLA45 Rotor) zentrifugiert.
- Das Pellet wird zweimal mit jeweils 100 µl Sarkosylpuffer gewaschen.
- Das Pellet wird mit 100 µl DNase-Puffer überschichtet und mit 200 Units DNase I und 5 µl Puffer P1 (mit 100µg/ml RNase I) für zwei Stunden bei 37°C inkubiert.
- Die Suspension wird erneut bei 100000 x g zentrifugiert und das Pellet im Anschluss zweimal mit PBS gewaschen.
- Das Pellet enthält alle Bestandteile des cOMCs und wird für Westernblot-Analysen mit Ladepuffer und DTT aufbereitet.

3.5.2. Induktion der Genexpression in *E. coli*

Zur Expression von Fusionsproteinen unter der Kontrolle des *lac*-Promotors wird der *E. coli* Kultur bei einer OD₆₀₀ von 0,5 IPTG zugesetzt, so dass die Endkonzentration 1 mM im Medium entspricht. Die Induktion der Genexpression wird durch Aufarbeitung von Proteinproben und deren gelelektrophoretische Analyse auf einem SDS-Gel überwacht.

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

3.5.3. Affinitätschromatografische Aufreinigung von Proteinen

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

3.5.3.1. Reinigung von denaturierten Proteinen

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

- Es wird eine Säule mit einem Durchmesser von etwa 1 cm verwendet, die unten durch eine Klemme verschlossen wird. Innen befindet sich ein Gazestopfen, der die Ni-NTA Agarose daran hindert durchzulaufen.
- Das Zellpellet einer induzierten 1 l Kultur wird vorsichtig aufgetaut und in 5 ml pro Gramm Nassgewicht Puffer B (8 M Harnstoff; 0,1 M NaH₂PO₄, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0) resuspendiert.
- Die Zellen werden 60 min geschüttelt (150 Upm, 20 °C) und auf diese Weise lysiert.
- Das Lysat wird 20 min bei 10000 x g (Avanti J-25) und 20 °C zentrifugiert.
- Der geklärte Überstand wird weiter verwendet.
- Es wird zu dem klaren Lysat (etwa 30 ml) 3 ml Ni-NTA Agarose zugegeben und 2 h geschüttelt (150 Upm, 20 °C).
- Die leere Säule wird mit diesem Material durch Einschweben beladen. Die Durchflussrate sollte etwa 2 ml/min betragen.
- Die Säule wird anschließend mit 15 ml Puffer B (2 ml/min) gewaschen.
- Die Säule wird mit 15 ml Puffer C (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH₂PO₄, 10 mM Tris/HCl, pH 6.3, 10 mM Imidazol) gewaschen.
- Das 6 x Histidin-markierte Protein wird mit 10 ml Puffer C (+ 250 mM Imidazol) eluiert. Dazu wird die Säule mit dem Elutionspuffer beladen und 5 min inkubiert. Dann werden die einzelnen Fraktionen aufgefangen.
- Es erfolgt eine Totalelution von der Säule mit 5 ml Puffer C (+ 500 mM Imidazol). Alle Fraktionen werden in 2 ml Portionen aufgefangen und mittels einer Gelelektrophorese auf einem SDS-Gel analysiert.

3.5.3.2. Dialyse von denaturierten Proteinen

- Der in 10 cm lange Abschnitte geteilte Dialyseschlauch wird 10 min in deion. Wasser bei 100°C erhitzt.
- Die Proteinsuspension (2 ml) wird mittels einer sterilen Pipette in einen Dialyseschlauch-Abschnitt gefüllt, der durch sterile Klemmen an einem Ende verschlossen wurde.
- Der Dialyseschlauch wird am verbleibenden Ende mit einer weiteren Klammer luftblasenfrei verschlossen.
- Die Proteinsuspension wird dreimal gegen 2 l PBS für 10-12 h unter leichtem Rühren bei 4 °C dialysiert.
- Die Suspension wird aus der Dialysekammer mittels einer sterilen Pipette entnommen. Es wird eine Proteinmengenbestimmung durchgeführt und die Proteinlösungen werden auf Proteingelen weiter analysiert.

3.5.4. Proteinprobenaufarbeitung für SDS-Polyacrylamidgele

Proteinproben müssen denaturiert werden, um sie der Größe nach über ein Polyacrylamidgel zu separieren. Bei Proteinextrakten aus eukaryotischen Zellen wird eine Wachstumsfläche von 1 cm² geerntet. Bei Proteinextrakten aus *E. coli* Kulturen wird 1 OD₆₀₀ Zellen aufgearbeitet.

- Die Zellsuspension wird für 1 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge Pico) zentrifugiert.
- Das Zellpellet wird in 32.5 µl dest. Wasser aufgenommen und resuspendiert.

- Es werden 12.5 µl Ladegelpuffer (4fach konzentriert) (50 mM Tris/HCL pH 6.9; 2 % SDS; 0.1 % Bromphenolblau; 5 % Glyzerin) zugegeben.
- Es werden 5 µl 1 M DTT zugesetzt.
- Die Probe wird 10 min bei 100 °C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt.
- Bei Proteinproben aus der Affinitätschromatographie oder der Dialyse werden 32.5 µl Probe wie oben beschrieben mit Ladegelpuffer sowie DTT versetzt und 10 min bei 100 °C erhitzt.

3.5.5. Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

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

3.5.5.1. Herstellung des Trenngels

Prozentigkeit des Trenngels	Acrylamidlösung	4x-Trenngelpuffer	Ammonium-persulfat	TEMED	ddH ₂ O
10 %	13.3 ml	10 ml	200 µl	50 µl	16.5 ml
12 %	16.0 ml	10 ml	200 µl	50 µl	13.8 ml
15 %	20.0 ml	10 ml	200 µl	50 µl	10.0 ml

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

Im Trenngel werden die Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe separiert.

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

3.5.5.2. Herstellung des Sammelgels

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

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

3.5.5.3. SDS-Gelelektrophorese

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

3.5.6. Färbung eines Proteingels mittels Coomassie-Blau

3.5.6.1. Herstellung der Coomassie-Färbelösung

- 0,25 g Coomassie Brilliant Blau (R250) werden in 90 ml eines Wasser : Methanol Gemisches (1:1 v/v) und 10 ml Eisessig gelöst.
- Die Lösung wird durch einen Faltenfilter gefiltert und kann direkt zur Färbung von Proteingelen verwendet werden.

3.5.6.2. Färbung und Entfärbung von Proteingelen

- Das Proteingel wird mit der Färbelösung für mindestens 1 h unter leichtem Schwenken inkubiert.
- Die Färbelösung wird vorsichtig abgenommen und entsorgt.
- Das Gel wird mit einer Entfärbelösung (45 % Methanol, 10 % Eisessig, 45 % dest. Wasser) für 1 –3 h unter leichtem Schwenken inkubiert.

3.5.7. Silberfärbung eines Proteingels

Die Silberfärbung von Proteingelen erlaubt die Detektion von geringen Proteinmengen, da sie sehr sensitive ist. Die Lösungen müssen immer frisch angesetzt werden. Es sollte vermieden werden das Proteingel während der Färbeprozedur zu berühren.

- Das Gel wird mit der Fixierlösung (50 % Methanol, 12 % Eisessig, 500 µl Formaldehyd) über Nacht inkubiert.
- Es folgt dreimaliges Waschen mit 50 %igem Ethanol für 20 min.
- Die Waschlösung wird entfernt und das Gel wird 1 min in $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ Lösung (0.1 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ in 500 ml H_2O) inkubiert.
- Das Gel wird dreimal kurz mit wasser gewaschen und anschließend 20 min mit der Silbernitratlösung (0.5 g AgNO_3 , 187.5 µl Formaldehyd in 250 ml H_2O) inkubiert.
- Es folgt erneut dreimal kurzes Waschen mit Wasser.
- Die Färbung wird durch Zugabe von Entwicklerlösung (15 g NaCO_3 , 125 µl Formaldehyd, 5 ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ Lösung in 250 ml H_2O) eingeleitet und durch Zugabe von konzentrierter Essigsäure abgestoppt.

3.5.8. Westernblotanalyse

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

3.5.8.1. Aufbau der Blotapparatur

- Es werden 6 Filterpapiere zurechtgeschnitten; die Maße betragen 7 cm x 9 cm. Die Filterpapiere werden in Transferpuffer (48 mM Tris/HCL, 39 mM Glycin, 0,037 % (v/v) SDS, 20 % Methanol) inkubiert.

- Es wird ein Stück Nylonmembran (7 cm x 9 cm) in Methanol inkubiert und dann mit dest. Wasser gespült.
- Drei Filterpapiere werden sorgfältig gestapelt auf die Graphitplatte der Blotapparatur gelegt und alle Luftblasen werden entfernt.
- Die Membran wird aufgelegt und sichergestellt, dass sich keine Luftblasen zwischen Membran und Filterpapier befinden.
- Die Gelapparatur wird auseinandergelöst und das Gel wird von der Glasplatte gelöst und luftblasenfrei auf die Membran gelegt.
- Der Stapel wird einschließlich mit den restlichen drei Filterpapieren bedeckt.
- Luftblasen werden durch vorsichtiges Auswalzen mittels einer sterilen Glaspipette entfernt.
- Die zweite Graphitplatte wird auf den Stapel gelegt und die Kontakte an das Stromgerät angeschlossen. Ein Gewicht von etwa 1 kg wird auf die Apparatur gestellt, um den Transfer zu begünstigen.
- Bei 300 mA findet der Transfer der Proteine auf die Membran für 1 h 15 min statt.

3.5.8.2. Abbau der Blotapparatur

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

3.5.8.3. Antikörperreaktion auf der Nylonmembran

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

- Die Membran wird mit dem Primär-Antikörper (5 ml), welcher das spezifische Protein erkennt inkubiert. Die Verdünnung des Antikörpers geschieht mittels Blockierungslösung.
- Die Nylonmembran wird 2 h bei Raumtemperatur mit der Antikörperlösung unter leichtem Schwenken inkubiert.
- Die Antikörperlösung wird abgezogen und die Membran dreimal mit PBS für jeweils 10 min gewaschen.
- Es folgt die Inkubation der Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundär-Antikörper (Anti-Kaninchen bzw. Anti-Maus), welcher konjugiert mit alkalischer Phosphatase vorliegt. Der Sekundär-Antikörper wird 1:7500 in Blockierungspuffer verdünnt.
- Die Membran wird dreimal 10 min mit PBS gewaschen.

3.5.8.4. Farb-Entwicklung von Westernblots mittels alkalischer Phosphatase

- Die Membran wird für 5 min in Detektionspuffer (0,1 M Tris/HCl, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5) inkubiert.
- Anschließend wird die Membran mit 20 ml Farbsubstrat-Lösung (Detektionspuffer +33 µl BCIP-Lösung (0.5 g BCIP in 10 ml DMF) + 66 µl NBT-Lösung (0.5 g NBT in 10 ml 70 %igem DMF) für mindestens 5 min bis zu 45 min inkubiert.
- Die Farbreaktion wird durch mehrfaches Waschen mit Wasser abgestoppt.

3.5.9. Adhäsionsversuche durch proteinbeschichtete Latexkugeln

Mit Hilfe von Latexkugeln können die Adhäsionseigenschaften von verschiedenen Proteinen an eukaryotische Zellen untersucht werden. Hierzu werden Latexkugeln mit

Proteinen beschichtet und anschließend mit den Zellen inkubiert. Gebundene Kügelchen können durch mikroskopische Analyse dokumentiert werden. Es werden dazu 1000 eukaryotische Zellen gezählt und ebenso die daran gebundenen Latexkügelchen.

3.5.9.1. Bindung von Proteinen an Latexkügelchen

- Es werden zu 1 ml PBS 20 µl Latexkügelchen (Durchmesser 1 µm, 10^{11} Kügelchen/ml) pipettiert und anschließend bei 12000 Upm für 5 min (Heraeus Biofuge Pico) zentrifugiert.
- Die Latexkügelchen werden in 1 ml PBS gewaschen und erneut bei 12000 x Upm (Heraeus Biofuge Pico) für 5 min zentrifugiert.
- Die Latexkügelchen werden in 1 ml Bindungspuffer (0.2 M NaHCO₃, pH 8.6; 0.5 M NaCl) resuspendiert.
- Die Suspension wird für 5 min bei 12000 x Upm (Heraeus Biofuge Pico) zentrifugiert.
- Die Latexkügelchen werden in 100 µl Bindungspuffer resuspendiert.
- Zu der Suspension wird das Protein zugegeben, so dass die Endkonzentration 10-200 µg/ml beträgt.
- Es folgt eine Inkubation für 1 h bei 37 °C.
- Es werden 500 µl Bindungspuffer hinzupipettiert und für 3 min im Ultraschallwasserbad sonifiziert.
- Zu der Suspension werden 500 µl BSA (40 mg/ml in Bindungspuffer) gegeben.
- Die Suspension wird für 1 h bei 37 °C inkubiert.
- Die proteinbeschichteten Latexkügelchen werden einmal mit 1 ml PBS + 1 mg/ml BSA gewaschen.
- Die Latexkügelchen werden in 1 ml PBS + 0,2 mg/ml BSA bei 4 °C gelagert.

3.5.9.2. Bestimmung der Beschichtungsqualität

Zur Bestimmung der Beschichtungsqualität wird ein Aliquot mittels Westernblot analysiert.

- 100 µl beschichteter Latexkügelchen werden bei 13000 x Upm für 5 min (Heraeus Biofuge Pico) sedimentiert.
- Der Überstand wird abgenommen und die Latexkügelchen werden mit 32.5 µl H₂O, 12.5 µl Ladegelpuffer und 5 µl DTT resuspendiert.
- Die Kügelchen werden 10 min bei 100 °C erhitzt.
- 10 µl dieser Probe werden mittels Westernblot analysiert.

3.5.9.3. Adhäsion von proteinbeschichteten Latexkügelchen an eukaryotische Zellen

Für diesen Versuch werden HEp-2 Zellen halbkonfluent (1×10^5 Zellen/ml) auf Deckgläschen ausgesät und nach 24 h zweimal mit PBS gespült.

- Ein Aliquot der Latexkügelchen, beschichtet mit verschiedenen Proteinen, wird entnommen, 1/10 verdünnt und die Konzentration der Latexkügelchen/ml wird durch Auszählen in einer Zählkammer ermittelt.
- Die Latexkügelchen werden in 1 ml Zellkulturmedium aufgenommen und auf die gespülten HEp-2 Zellen pipettiert. Die Konzentration an sollte 100 Latexkügelchen pro HEp-2 Zelle betragen.
- Die Zellen werden 5 min bei 43,3 x g zentrifugiert.
- Die Zellen werden mitsamt der Latexkügelchen für 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

- Die Suspension wird vorsichtig von den Zellen abgezogen und die Zellen werden dreimal mit 1 ml eiskaltem PBS gespült.
- Die HEp-2 Zellen werden mit 3,7 % Formaldehyd in PBS fixiert und können zur mikroskopischen Analyse weiter behandelt werden.

3.5.10. Neutralisation der chlamydialen Infektion mit rekombinantem OmcB_{6His}-Protein

Um den Einfluss von OmcB bei der chlamydialen Infektion zu untersuchen, wurden HEp-2 Zellen infiziert, die zuvor mit rekombinantem OmcB_{6His}-Protein vorbehandelt wurden. Zur Durchführung dieses Experimentes werden Gradienten-gereinigte chlamydiale Partikel, sowie rekombinant hergestelltes und affinitätsgereinigtes Protein benötigt.

- HEp-2 Zellen werden auf ein Deckgläschen ausgesät und zwei bis drei Tage im Brutschrank inkubiert, bis sich ein konfluenter Zellrasen ausgebildet hat.
- Das Wachstumsmedium wird von den Zellen abgenommen und durch 500 µl Proteinsuspension ersetzt. Dazu wird rekombinant hergestelltes Protein in PBS (20-200 µg/ml) mit Medium versetzt.
- Kontrollen des Experimentes sind Medium mit BSA als unspezifisches Protein, sowie Medium mit PBS ohne Proteinzusatz.
- Die Zellen werden für 1 h bei 37°C unter leichtem Schwenken mit der Proteinsuspension inkubiert.
- Anschließend wird 50 µl Chlamydien suspension (gereinigte Chlamydien in SPG-Puffer, MOI=100) der Zell-Proteinsuspension zugesetzt und erneut unter leichtem Schwenken bei 37°C für 1 h inkubiert.
- Die Suspension wird abgenommen und die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen und dann mit 1 ml Chlamydienkulturmedium überschichtet.
- Das Chlamydienwachstum erfolgt für 48 h bei 37°C im Brutschrank, dann werden die Zellen mit Methanol fixiert.
- Wie unter Abschnitt 3.3.11.2. beschrieben werden die Einschlüsse mittels direkter Immunfluoreszenz angefärbt. Mikroskopisch werden zehn Gesichtsfelder ausgewertet und die Anzahl der Einschlüsse gezählt.

3.5.11. Bestimmung der Adhäsion chlamydialer Partikel an eukaryotische Zellen mittels ELISA-Methode (Enzym linked immunoabsorbent assay)

Die Adhäsion chlamydialer Partikel an HEp-2 Zellen kann mittels Antikörper gekoppelter Farbreaktion basierend auf der ELISA-Methode nachgewiesen werden.

- Dazu werden, wie unter 3.5.10. beschrieben, Zellen mit verschiedenen Proteinsuspensionen vorinkubiert, bevor 50 µl Chlamydien suspension (MOI=100) unbehandelt oder zusammen mit Heparin (~600µg/ml) zu der Proteinsuspension zugesetzt und erneut unter leichtem Schwenken bei 37°C für 1 h inkubiert werden.
- Die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 1 ml PBS mit 3.7% Formaldehyd für 1 h fixiert.
- Das Formaldehyd wird durch zweimaliges waschen mit PBS entfernt.
- Freie Bindungsstellen auf den Deckgläschen werden durch Zugabe von Blockierungspuffer (3% BSA, 0.05% Tween 20 in PBS) abgesättigt. Die Inkubation erfolgt bei 37°C für 1 h.
- Der Blockierungspuffer wird abgenommen und es werden 200 µl primärer Antikörper (Mab-Gemisch 1:500 in PBS) zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert.
- Die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen.

- 200 µl des sekundären Antikörpers (HRP-gekoppelt, Kaninchen Anti-Maus 1:2000 in PBS) werden zu den Zellen gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert.
- Die Zellen werden erneut dreimal mit PBS gewaschen.
- Die Farbentwicklung erfolgt durch Zugabe von 400 µl Entwicklerlösung (TMB, Perbio) für 5 min bei RT.
- Abgestoppt wird die Farbreaktion durch Zugabe von 400 µl 2 M Schwefelsäure.
- Die Gelbfärbung der Farbreaktion wird photometrisch bei 420 nm gemessen.

3.5.12. Generierung polyklonaler OmcB_{6His}-Antikörper

Für die Immunisierungen von Kaninchen wurde OmcB_{6His} Protein wie unter Abschnitt 3.5.3. beschrieben unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt und anschließend gegen PBS dialysiert. 800 µg Protein wurden über ein 10%tiges SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie Lösung angefärbt. Das OmcB_{6His} Protein wurde aus dem Gel ausgeschnitten und der Firma Eurogentech zugesandt. Das Protein wurde zwei Kaninchen injiziert, um polyklonale Antikörper gegen OmcB_{6His} zu generieren. Generiert wurden die OmcB_{6His} Antikörper #1276 sowie #1277 (siehe Tabelle 3). Vor der Verwendung des Antikörpers in experimentellen Ansätzen wie Immunofluoreszenz oder Westernblot-Analysen sowie Neutralisations-Experimenten, wurde das Serum 1:25 in PBS bzw. PBS + Milchpulver verdünnt und für 12-24h bei 4°C auf HEp-2 Zellen oder HEp-2 Zellextrakten voradsorbiert.

3.5.13. Neutralisation der chlamydialen Infektion durch Zugabe von polyklonalen OmcB-Antikörpern

Um den Einfluss von OmcB bei der chlamydialen Infektion weiter zu untersuchen werden Chlamydien, die zuvor mit dem polyklonalen OmcB-Antikörper vorbehandelt wurden, in Infektionsversuchen mit HEp-2 Zellen eingesetzt. Zur Durchführung dieses Experimentes werden Gradienten-gereinigte chlamydiale Partikel, sowie gegen HEp-2 Zellen voradsorbierte OmcB_{6His}-Antikörper benötigt.

- Für die Neutralisation der chlamydialen Infektion werden HEp-2 Zellen auf ein Deckgläschen ausgesät und zwei bis drei Tage im Brutschrank inkubiert, bis sich ein konfluenter Zellrasen ausgebildet hat.
- 50 µl Chlamydien suspension (gereinigte Chlamydien in SPG-Puffer, MOI=100) werden zu 500 µl Antikörperlösung (voradsorbierter Antikörper 1:250 in PBS) gegeben und 1 h bei 4 °C unter leichtem schwenken inkubiert.
- Kontrollen für dieses Experiment sind Chlamydien, die nur in PBS oder in PBS mit Prä-Immunsereum vorinkubiert wurden.
- Das Wachstumsmedium wird von den Zellen abgenommen und die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen. Pro Deckgläschen werden 500 µl Chlamydien in Antikörpersuspension zu den Zellen gegeben und für 1 h bei 37°C unter leichtem Schwenken inkubiert.
- Die Suspension wird entfernt und die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen bevor sie mit 1 ml Chlamydienwachstumsmedium überschichtet werden.
- Das Chlamydienwachstum erfolgt für 48 h bei 37°C im Brutschrank, dann werden die Zellen mit Methanol fixiert.
- Wie unter Abschnitt 3.3.11.2. beschrieben werden die Einschlüsse mittels direkter Immunofluoreszenz angefärbt. Mikroskopisch werden zehn Gesichtsfelder ausgewertet und die Anzahl der gebildeten Einschlüsse gezählt.

3.5.15. Protease-Verdau von Oberflächen präsentierten Proteinen

3.5.15.1. Deglykosylierung von Proteinproben durch das Enzym α -Mannosidase

Da das Aga2p des Hefe-Oberflächenpräsentationssystems bekanntermaßen einer starken O-Glykosylierung unterliegt (Shen, Wang et al. 2001), zeigt sich in Westernblot-Analysen eine Abweichungen zwischen dem erwarteten und dem apparenten Laufverhalten. Um jedoch die tatsächlichen Molekulargewichte des Aga2p sowie der Aga2p-Fusionsproteine mittels Westernblot genau darstellen zu können wurden Proteinextrakte aus den Hefekulturen isoliert und mit α -Mannosidase behandelt.

- Von einer SD-Hefekultur (SD Trp⁻, Galaktose) werden 10 OD₆₀₀ Zellen geerntet und für 1 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert.
- Die Zellen werden einmal mit 1 ml PBS gewaschen und erneut pelletiert.
- Das erhaltene Zellsediment wird mit 150 μ l PBS und 50 μ l Proteaseinhibitoren-Cocktail versetzt.
- 2/3 des Probenvolumens werden als Glasperlen zugefügt und der Zellaufschluss erfolgt bei 4°C für 20 min auf dem Vibrax.
- Der Überstand wird in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 13000 Upm bei 4°C zentrifugiert.
- Der klare Überstand wird abgenommen und mit 1 U α -Mannosidase versetzt.
- Die Probe wird für mind. 2 Stunden bei 37°C inkubiert.
- Es werden 50 μ l SDS-Probenpuffer und 20 μ l 1 M DTT zugegeben.
- Die Probe wird 10 min bei 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und kann dann mittels Westernblot analysiert werden.

3.5.15.2. Enzymatische Entfernung von Oberflächen-präsentierten Proteinen mittels ProteinaseK / Trypsin Behandlung

Durch die proteolytische Entfernung der Aga2p Fusionsproteine von der Hefeoberfläche kann überprüft werden, ob die die Bindung der Hefen an humane Zellen auf die Präsentation bestimmter Proteine zurückzuführen ist. Die Protein-präsentierende Hefezellen wurden daher mit verschiedenen Proteasen behandelt. Die Vollständigkeit der Protease-Behandlung wurde mittels indirekter Immunofluoreszenz (Abschnitt 3.1.3.) sowie direkter Zellfärbung (Abschnitt 3.1.2.) überprüft. Im Anschluss wurden die Hefezellen in Adhäsions-Tests verwendet.

- Benötigt werden 1×10^6 Hefezellen, die 1 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert werden.
- Das Zellpellet wird einmal mit PBS gewaschen und die Zellen werden in 100 μ l PBS oder PBS mit Trypsin (2.5 mg/ml) bzw. Proteinase K (0.4 mg/ml) resuspendiert.
- Die Zellsuspension wird 1 Std. bei 37°C inkubiert.
- Die proteolytische Aktivität der Enzyme wird durch Zugabe von 100 μ l PBS mit 3% BSA auf Eis abgestoppt.
- Die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen und können nun zur Überprüfung der vollständigen Entfernung oberflächlicher Proteine in indirekter Immunofluoreszenz sowie direkter Zellfärbung eingesetzt werden.

3.5.16. Adhäsions-Test

Durch den Hefeadhäsionstest kann die Bindung von Proteinen präsentiert auf der Hefezelloberfläche, an eukaryotische Zellen untersucht werden. Verwendet werden Hefen, die Aga2p oder Fusionsproteine von Aga2p und chlamydialen Oberflächenproteinen exprimieren, sowie unterschiedliche epitheliale Zelllinien. Auf diese Weise kann die Rolle

chlamydialer Oberflächenproteinen analysiert werden, um Rückschlüsse auf ihre Funktion beim Adhäsionsprozess, dem ersten Schritt der Infektion, zu ziehen. Beispielhaft ist im Folgenden die Durchführung des Adhäsions-Tests mit HEp-2 Zellen beschrieben.

- Eine 24 Well-Platte wird mit Deckgläschen bestückt und pro Deckgläschen werden 1×10^5 HEp-2 Zellen ausgesät.
- Die HEp-2 Zellen wird für 48 h im Inkubationsschrank bei 37 °C inkubiert.
- Am selben Tag werden Induktionskulturen wie unter Abschnitt 3.1.1.1. beschrieben mit den zu testenden Hefezellen angesetzt. Nach 12 h werden die Hefezellen in Galaktose-Medium umgeimpft.
- Nach weiteren 24 h wird die Hefe-Zellzahl mikroskopisch bestimmt.
- Von den Hefezellen werden 1×10^6 (MOI=10) Zellen in jeweils 1 ml PBS gegeben.
- Das Zellkulturmedium der HEp-2 Zellen wird verworfen und die Zellen werden mit 1 ml PBS gewaschen.
- Die Hefezellen in PBS werden zu den HEp-2 Zellen gegeben und für 1 h unter leichtem Schwenken bei 4° C inkubiert.
- Die Hefezellsuspension wird abgenommen und die HEp-2 Zellen werden unter mikroskopischen Beobachtung dreimal mit PBS gewaschen bis die Zellzwischenräume frei sind von ungebundenen Hefezellen.
- Die Zellen werden mit 1 ml PBS mit Formaldehyd (3.7%) für mindestens 1 h fixiert und können dann bei 4 °C gelagert werden.

3.5.16.1. Auswertung des Adhäsions-Tests

- Die Fixierungslösung wird abgenommen und verworfen.
- Die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen.
- Das Deckgläschen wird aus der 24-Wellplatte entnommen und mit Druckluft getrocknet.
- Auf einen Objektträger werden ca. 5 µl Glycerin/PBS-Lösung (1:9) gegeben und das Deckgläschen wird mit den Zellen nach unten in die Glyzerinlösung gelegt.
- Unter 63facher Vergrößerung wird die Adhäsion der Hefen an die HEp-2 Zellen ausgewertet.

Methode A

Ausgewertet wurden pro Deckgläschen 20 Gesichtsfelder. Ermittelt wurde das Verhältnis von HEp-2 Zellen zu HEp-2 Zellen die mind. eine Hefezellen gebunden hatten. Angewendet wurde dieses Verfahren im ersten experimentellen Ansatz (Abb. 8).

Methode B

Gezählt wurden pro Deckgläschen 1000 HEp-2 Zellen und die daran gebunden Anzahl an Hefezellen. Ermittelt wurde so das Verhältnis von Hefen pro 1000 HEp-2 Zellen. Angewendet wurde dieses Verfahren in allen weiteren Hefeadhäsionstests (Abb. 10 und folgende).

3.5.17. Vorbehandlung von Hefezellen für Adhäsions-Tests

3.5.17.1. Behandlung von Hefezellen mit Heparinase I

Unter Abschnitt 3.3.10.1. wurde beschrieben wie humane HEp-2 mit dem Enzym Heparinase I behandelt wurden. Es wurden mit dem gleichen Enzym auch Hefezellen behandelt, die Aga2p-Fusionsproteine auf ihrer Oberfläche präsentieren.

- Benötigt werden 1×10^6 Hefezellen, die einmal mit PBS gewaschen werden.

- Die Heparinase I (100 Units) wird in 210 µl PBS mit 0.1 % BSA gelöst.
- Die Hefezellen werden bei 37 °C mit 100 µl Heparinase I (50 Units) bzw. nur mit Puffer für 1 h behandelt.
- Anschließend werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen.

3.5.17.2. Inkubation mit löslichen Glykosaminoglykanen

Um den Einfluss von verschiedenen Glykosaminoglykanen (GAGs) auf die Bindung von Aga2p-OmcB exprimierenden Hefen zu untersuchen, wurden die Hefezellen mit unterschiedlichen GAGs vorbehandelt bevor sie in Adhäsions-Tests eingesetzt werden.

- 1×10^6 Hefezellen werden für 1 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge pico) abzentrifugiert und in 500 µl PBS resuspendiert.
- Zu den Zellen werden lösliche GAGs wie Heparin oder Chondroitinsulfate in der Konzentration 500 µg/ml zugesetzt und für 1 h bei 4 °C unter rotierendem Schwenken inkubiert.
- Die Zellen werden anschließend zweimal mit 500 µl PBS gewaschen.

4. Ergebnisse

4.1. Etablierung eines funktionellen Hefe-Adhäsionstests

Um aufzuklären welche chlamydialen Proteine am primären Schritt der Infektion, der Adhäsion an die humane Zelle, beteiligt sind, wurde nach Adhäsionsproteinen gesucht. Zur Analyse der adhäsiven Eigenschaften von *C. pneumoniae* Proteinen wurde ein funktionelles Testsystem etabliert, welches auf dem Hefe-Oberflächenpräsentations-System (Boder and Wittrup 1997) basiert. Dabei werden Proteine auf der Hefezelloberfläche präsentiert und anschließend die Bindung der Hefen an humane Zellen analysiert. Dies ermöglicht Rückschlüsse über die Adhäsivität der untersuchten Proteine.

Um zu testen, ob im Hefe-System die adhäsive Funktion bakterieller Proteine studiert werden kann, wurde zunächst ein bekanntes bakterielles Adhäsins im Hefe-System exprimiert und dessen Oberflächen-Lokalisierung nachgewiesen. Im Anschluss daran wurden die adhäsiven Eigenschaften von Hefezellen, die dieses Protein präsentieren, in Adhäsionsstudien untersucht.

4.1.1. Präsentation einer *Yersinia pseudotuberculosis* Invasin Proteindomäne im Hefe-System

Als Positivkontrolle für den Einsatz des Hefe-Oberflächenpräsentations-Systems in Zell-Adhäsionsstudien, wurde ein Fragment des Invasin Proteins aus *Y. pseudotuberculosis* mittels in der Hefe exprimiert. Hierbei handelt es sich um die im C-Terminus lokalisierte, 194 Aminosäuren große Adhäsionsdomäne (AD), die sowohl Adhäsion als auch Internalisierung des Bakteriums in die eukaryotische Wirtszelle vermittelt (Dersch and

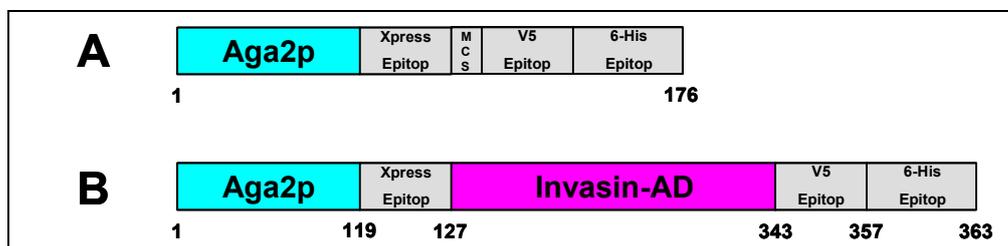


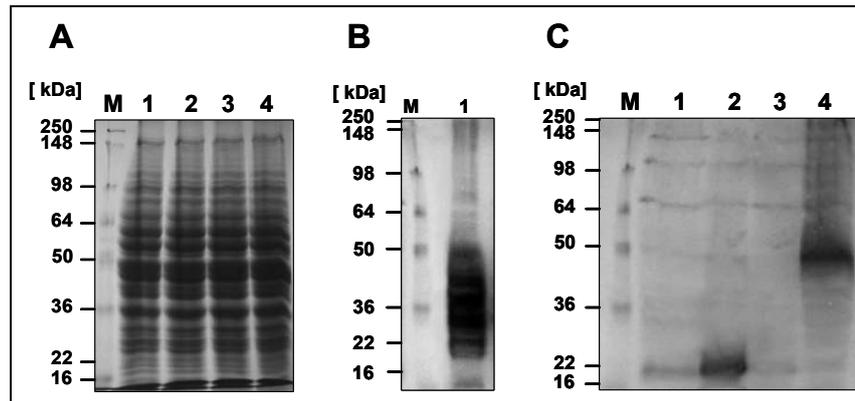
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Aga2p-Kassette.

A) Aga2p-Kassette mit Xpress, V5 und 6-His Epitopen. B) Aga2p-Invasin-AD Fusionsprotein mit verschiedenen Epitopen zur Detektion.

Isberg 1999). Das Invasin-AD Proteinfragment wurde im Hefe-System als Fusionsprotein mit dem Aga2p generiert (Abb. 5).

Die Genexpression des Aga2p sowie der Aga2p-Fusionsproteine steht dabei unter Kontrolle des

Galaktose-abhängigen *GAL1*-Promotors. Mittels Westernblot-Analyse wurde zunächst die Proteinexpression von Aga2p exprimierenden Zellen



überprüft (Abb. 6B). Da das Protein stark O-glykosyliert vorliegt (Shen, Wang et al. 2001), werden Proteinbanden in der Größenordnung von 20-50 kDa

detektiert, obwohl das Protein ein theoretisches Molekulargewicht von 17 kDa aufweist. Um distinkte Proteinbanden für Aga2p bzw. Aga2p-Invasin-AD nachzuweisen, wurden die Proteinextrakte durch α -Mannosidase Behandlung deglykosyliert (Siehe Abschnitt 3.5.15.1.). In weiteren Westernblots wurde die Aga2p und Aga2p-Invasin-AD Proteinexpression nach der Deglykosylierung der Proteinextrakte untersucht (Abb. 6C). Wurden die Zellen unter nicht-induzierenden Bedingungen (Raffinose-Medium)

kultiviert, zeigte sich keine Expression von Aga2p (Abb. 6C, Spur 1) oder von Aga2p-Invasin-AD (Abb. 6C, Spur 3). Es konnten nur verschiedene schwache, unspezifische Hintergrundbanden detektiert werden. Wurden die Hefezellen jedoch unter induzierenden Bedingungen (Galaktose-Medium) kultiviert, konnte für Aga2p eine Proteinbande bei zirka 22 kDa detektiert werden (Abb. 6C, Spur 2). Die Proteinbande des Aga2p-Invasin-AD Fusionsprotein

Abbildung 6: Expression von Aga2p und Aga2p-Invasin-AD im Hefe-System.

A) Ladungskontrolle, Coomassie-gefärbtes 10%iges SDS-Gel; B, C) Westernblot-Analyse detektiert mit dem Anti-penta His Antikörper (1:2500 verd.) und dem AP-konjugierten Anti-Maus Antikörper (1:7500 verd.); M: Größenstandard; B) Proteinextrakt aus 4 OD₆₀₀ Aga2p exprimierenden Zellen ohne α -Mannosidase Vorbehandlung. C) Proteinextrakte aus 10 OD₆₀₀ *S. cerevisiae* Zellen angezogen in Raffinose-Medium (Spur 1, 3) oder in Galaktose-Medium (Spur 2, 4). Die Zellen wurden zu Proteinextrakten aufgearbeitet und mit α -Mannosidase behandelt. Proteinextrakte Aga2p exprimierender Hefezellen (Spur 2); Proteinextrakte Aga2p-Invasin-AD exprimierender Hefen (Spur 4).

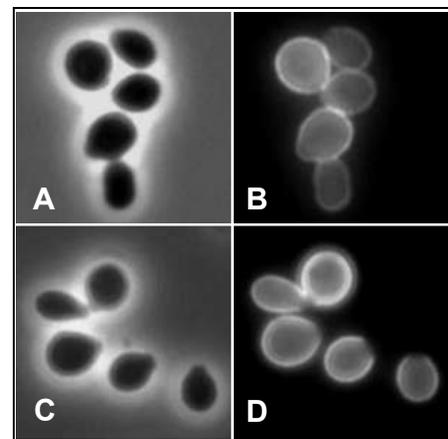


Abbildung 7: Oberflächen-Präsentation von Aga2p Fusionsproteinen.

A,C) Phasenkontrastaufnahmen; B, D) Immunfluoreszenzaufnahmen (63-fache Objektiv-Vergrößerung). Aga2p (A, B) und Aga2p-Invasin-AD (C, D) exprimierende Hefezellen wurden in Galaktose-Medium kultiviert und mit 3,7% para-Formaldehyd fixiert. Die Detektion der Oberflächen-Präsentation der Aga2p-Fusionsproteine erfolgte unter Verwendung des Anti-Xpress Antikörpers (1:500 verd.) und des Cy3-konjugierten Anti-Maus Antikörpers (1:200 verd.).

wurde bei zirka 48 kDa nachgewiesen (Abb. 6C, Spur 4). Das theoretische Molekulargewicht des Fusionsproteins beträgt 36 kDa. In weiteren Westernblot-Analysen unter Verwendung eines Invasin-spezifischen Antikörpers wurde das Protein auf gleicher Laufhöhe detektiert (Daten nicht gezeigt).

Durch indirekte Immunofluoreszenz wurde die Expression von Aga2p und Aga2p-Invasin-AD auf der Oberfläche von fixierten, jedoch nicht permeabilisierten Hefezellen nachgewiesen (Abb. 7). Die Antikörperfärbung führte zu einer intensiven Färbung der gesamten Zelloberfläche der Hefen. Quantitative Analysen zeigten, dass zirka 80 % der Hefezellen fluoreszieren und somit Aga2p-Fusionsproteine auf ihrer Oberfläche präsentieren (Tabelle 11).

	Aga2p	Aga2p-Invasin-AD
% fluoreszierende Hefen	79,59%	78,49%

Tabelle 11: Anzahl fluoreszierender Hefen aus 1000 analysierten Hefezellen (n=4).

4.1.2. Das Aga2p-Invasin-AD Fusionsprotein adhärirt an humane HEP-2 Zellen

Nach der Überprüfung der erfolgreichen Präsentation des Invasin-AD Fragments auf der Hefezelloberfläche erfolgte die Untersuchung der adhäsiven Eigenschaften des Proteins in Hefeadhäsionstests. Dabei wurde ermittelt, wie sich die Bindung von Aga2p präsentierenden Hefezellen von der Aga2p-Invasin-AD präsentierender Hefezellen unterscheidet. In ersten Adhäsionstests wurden HEP-2 Zellen mit einer steigenden Zahl an Hefezellen inkubiert und die relative Adhäsion der eingesetzten Hefen bestimmt. Analysiert wurde ein Verhältnis von Hefen zu HEP2-Zellen von 1:1, 1:5, 1:10 und 1:25. Hefezellen, die das Aga2p-Invasin-AD Fusionsprotein auf ihrer Oberfläche präsentieren, adhärirten im Vergleich zu den Kontrollen (Aga2p exprimierende Hefen, Hefezellen ohne Aga2p Präsentation) signifikant an HEP-2 Zellen (Abb. 8A). Beim Verhältnis von 1:1 (Hefezelle zu HEP-2 Zelle) zeigten *EBY100* Zellen und Aga2p exprimierende Hefezellen eine relative Adhäsion von 1 %. Aga2p-Invasin-AD exprimierende Hefen hingegen vermittelten eine relative Adhäsion von 13 %. Mit steigender Anzahl an Hefezellen pro HEP-2 Zelle konnte für die Aga2p-Invasin-AD Hefen eine deutliche Zunahme der relativen Adhäsion festgestellt werden. Bei einem Verhältnis von 1:5 wurde eine relative Adhäsion von 24 % ermittelt, die auf 38 % bzw. 62 % anstieg, wurden ein 10 oder 25-facher Überschuss an Aga2p-Invasin-AD präsentierenden Hefen eingesetzt (Abb. 8A).

Die Analyse der beide Negativkontrollen zeigte, dass diese bei Erhöhung der Hefezellzahl nur einen schwachen Anstieg der relativen Adhäsion aufwiesen. Bei einem 5-fachen Überschuss an Hefezellen konnte sowohl für die *EBY100* Zellen als auch für die Aga2p exprimierende Hefen eine relative Adhäsion von 2 % festgestellt werden. Die weitere

Erhöhung der Hefezellzahl resultierte bei beiden Negativkontrollen in einer relativen Adhäsion von 3 % (1:10) bzw. 7 % (1:25) (Abb. 8A).

Mittels des Hefe-Systems konnten also die adhäsiven Eigenschaften des Invasin-AD Fragments nachgewiesen werden. In weiterführenden Analysen wurde außerdem untersucht, ob die Präsentation des Aga2p-Invasin-AD auf den Hefen dazu führt, dass diese in die humanen Zellen aufgenommen werden können (Daten nicht gezeigt). In diesen vorläufigen Analysen konnte jedoch keine Internalisierung der Hefezellen festgestellt werden. Jedoch konnte die Ausbildung von Zellhaufen der Aga2p-Invasin-AD Hefen auf den HEp-2 Zelloberflächen beobachtet werden, was als Konzentrierung der humanen Invasin-bindenden Rezeptoren interpretiert werden könnte.

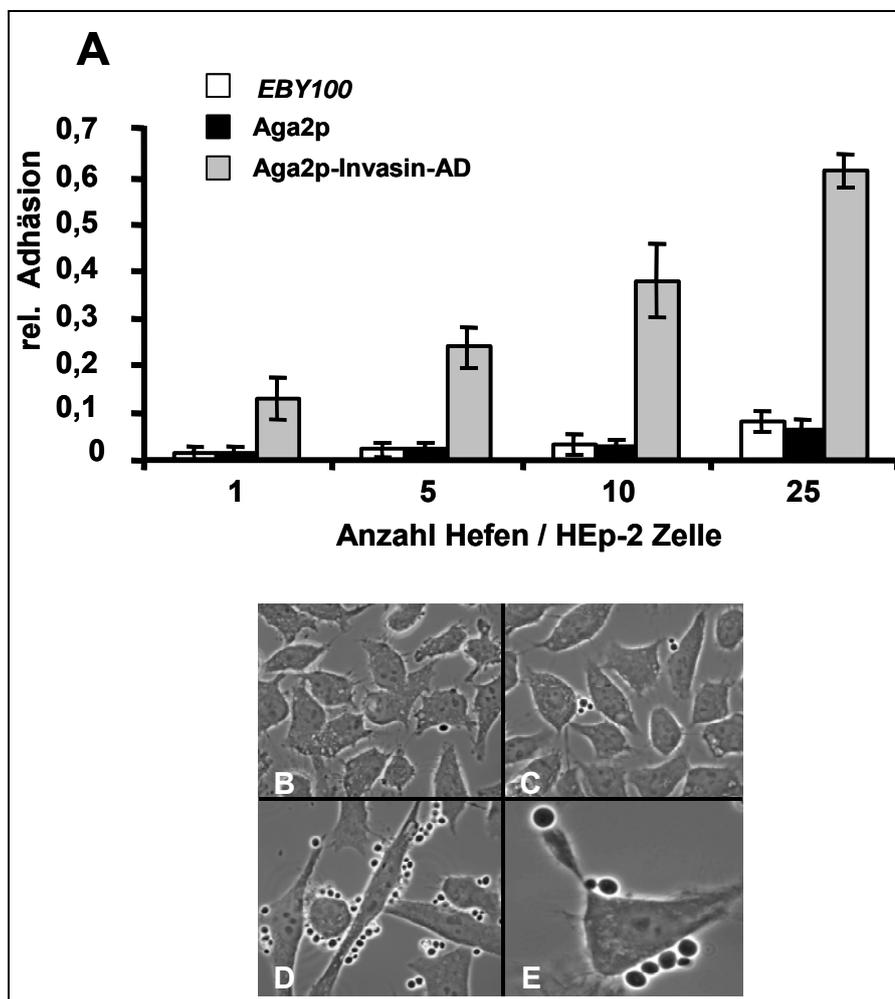


Abbildung 8: Einstellen der experimentellen Parameter eines Adhäsionstests mit humanen HEp-2 Zellen.

A) Quantifizierung des Hefeadhäsionstests nach Methode A wie unter 3.5.16.1. beschrieben (n=4); B-E) Phasenkontrast-Mikroskopie der Hefeadhäsion unter Verwendung von 1×10^5 HEp-2 Zellen und einem zehnfachen Überschuss an Hefezellen (63-fache Objektiv-Vergrößerung); EBY100 Zellen ohne Aga2p Präsentation (B), Aga2p exprimierende Hefen (C) und Aga2p-Invasin-AD exprimierende Hefen (D, E); E) 4-fache Ausschnittsvergrößerung der Aga2p-Invasin-AD Adhäsion.

4.2. Das *C. pneumoniae* GroEL-1 Protein besitzt im Gegensatz zum Momp Protein adhäsive Eigenschaften

4.2.1. Expression der chlamydialen Proteine Momp und GroEL-1 im Hefe-System

Der Nachweis des Invasin Proteins auf der Hefezelloberfläche zeigte, dass ein bakterielles Adhäsion in diesem System exprimiert werden kann. Außerdem konnte in Adhäsionstests für Aga2p-Invasin-AD exprimierende Hefen eine signifikante Adhäsion an humane Zellen festgestellt werden. Im Folgenden sollte nun das *C. pneumoniae* Außenmembranprotein Momp (major outer membrane protein) und das Oberflächen-lokalisierte GroEL-1 Protein präsentiert werden, um deren adhäsive Eigenschaften zu untersuchen. Das Momp Protein aus *C. trachomatis* MoPn wurde bereits als Adhäsion beschrieben, während für das *C. pneumoniae* Homolog keine Daten vorlagen (Su, Raymond et al. 1996). In vorangegangenen Studien zum *C. pneumoniae* GroEL-1 konnte gezeigt werden, dass das rekombinant hergestellte GroEL-1 Protein an humane Zellen adhärert (Wuppermann 2001). Das *ompA* (Momp) und das *groEL-1* Gen wurden mittels homologer *in vivo* Rekombination in Hefe in den Expressionsvektor pYD1 kloniert. Die

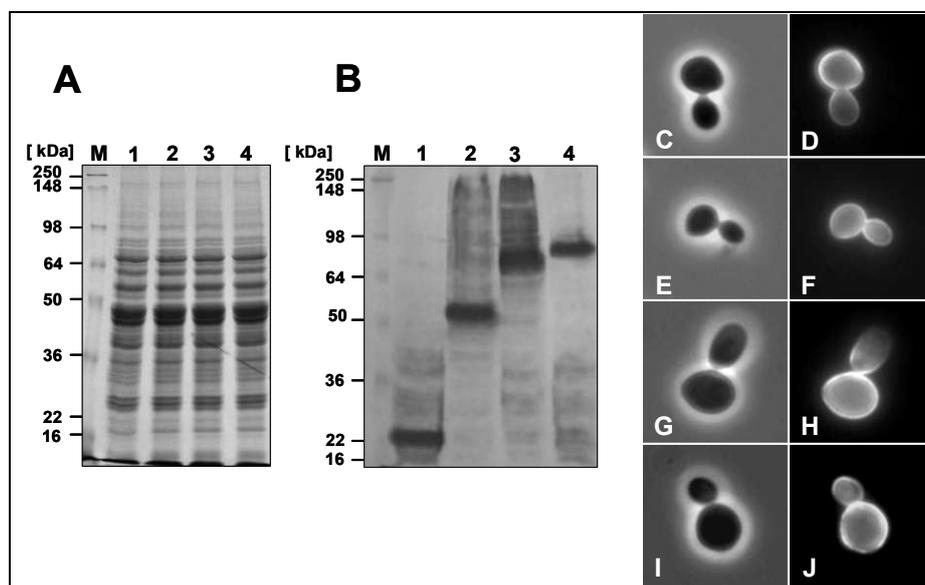


Abbildung 9: Expression der Aga2p-GroEL-1 und Aga2p-Momp Fusionsproteine im Hefe-System.

A) Ladungskontrolle, Coomassie-gefärbtes 10 %iges SDS-Gel.; B) Westernblot-Analyse detektiert mit dem Anti-penta His Antikörper und dem AP-konjugierten Anti-Maus Antikörper; M: Größenstandard; Proteinextrakte von Hefezellen die Aga2p (Spur 1), Aga2p-Invasin-AD (Spur 2), Aga2p-Momp (Spur 3) oder Aga2p-GroEL-1 (Spur 4) exprimieren, wurden mit α -Mannosidase behandelt. C, E, G, I) Phasenkontrastaufnahmen; D, F, H, J) Immunofluoreszenzaufnahmen (63-fache Objektiv-Vergrößerung); Die Detektion der Oberflächen-Präsentation von Aga2p (C, D), Aga2p-Invasin-AD (E, F), Aga2p-Momp (G, H) und Aga2p-GroEL-1 (I, J) erfolgte unter Verwendung des Anti-Xpress Antikörpers und des Cy3-konjugierten Anti-Maus Antikörpers.

Expression der generierten Aga2p Fusionsproteine wurde mittels Westernblot-Analyse nachgewiesen (Abb. 9). Im Vergleich zu den Kontrollen Aga2p (Abb. 9B, Spur 1) sowie Aga2p-Invasin-AD (Abb. 9B, Spur 2) konnte das Aga2p-Momp Fusionsprotein auf einer Laufhöhe von zirka 75 kDa detektiert werden (Abb. 9B, Spur 3) (theoretisches Molekulargewicht: 57 kDa). Die Proteinbande des Aga2p-GroEL-1 wurde bei einer Laufhöhe von zirka 85 kDa nachgewiesen (Abb. 9B, Spur 4) (theoretisches Molekulargewicht: 71 kDa). Durch indirekte Immunfluoreszenz konnte wie für Aga2p (Abb. 9C, D) und Aga2p-Invasin-AD (Abb. 9E, F) die Präsentation der Aga2p-Momp (Abb. 9G, H) und Aga2p-GroEL-1 (Abb. 9I, J) Fusionsproteine auf der Hefeoberfläche gezeigt werden.

4.2.2. Aga2p-GroEL-1 präsentierende Hefen adhäreren an HEp-2 Zellen

Nach der Überprüfung der Expression wurden die adhäsiven Eigenschaften der Aga2p-Momp und Aga2p-GroEL-1 Fusionsproteine in Bindungstests mit HEp-2 Zellen analysiert. Während Aga2p exprimierende Hefen eine relative Adhäsion von 8 % aufwiesen, zeigten

Aga2p-Invasin-AD exprimierende Hefen eine relative Adhäsion von 50 %. Für Hefezellen mit dem Aga2p-GroEL-1 Fusionsprotein auf ihrer Oberfläche konnte eine signifikante Adhäsion von 35% an die HEp-2 Zellen festgestellt werden. Aga2p-Momp exprimierende Hefen wiesen nur eine relative Adhäsion von 10 % auf,

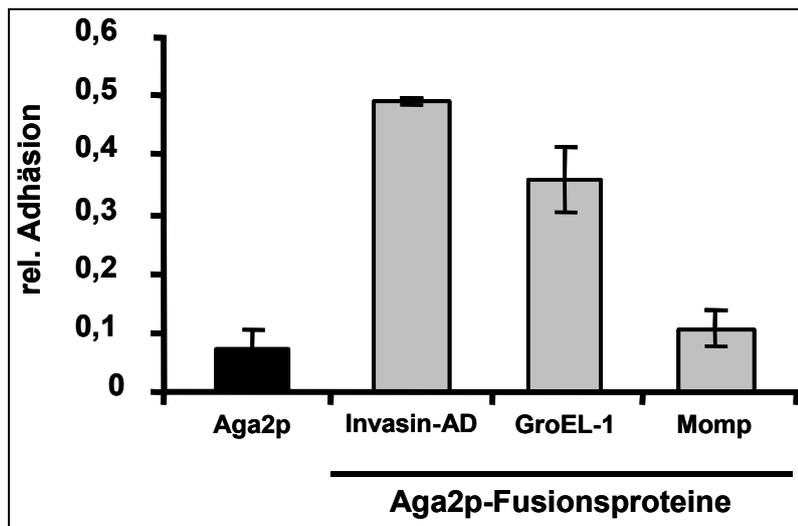


Abbildung 10: Aga2p-GroEL-1 exprimierende Hefen zeigen anders als Aga2p-Momp Hefen Bindung an humane Zellen.

Hefeadhäsionstests durchgeführt mit 1×10^5 HEp-2 Zellen und einem zehnfachen Überschuss an Aga2p, Aga2p-Invasin-AD, Aga2p-GroEL-1 und Aga2p-Momp präsentierenden Hefezellen (n=4). Ausgewertet nach Methode B (Siehe Abschnitt 3.5.16.1.).

festgestellt werden. Aga2p-Momp

exprimierende Hefen wiesen nur eine relative Adhäsion von 10 % auf, die im Bereich der Negativkontrolle liegt (Abb. 10). In diesem experimentellen Ansatz konnten keine adhäsiven Eigenschaften für das *C. pneumoniae* Momp Protein festgestellt werden. Das *C. pneumoniae* GroEL-1 vermittelt hingegen signifikante Adhäsion an humane HEp-2 Zellen.

4.3. Nachweis der Adhäsions-Funktion des *C. pneumoniae* OmcB Proteins mittels des Hefeoberflächen-Präsentationssystems

In Untersuchungen zum *C. psittaci* Außenmembrankomplex (cOMC) konnte gezeigt werden, dass der isolierte Komplex, einschließlich der enthaltenen Proteinkomponenten, in der Lage ist, an eukaryotische Zellen zu binden (Eissenberg, Wyrick et al. 1983), (Levy and Moulder). Da für das *C. pneumoniae* Momp Protein keine adhäsiven Eigenschaften festgestellt werden konnten, stellt sich die Frage, welches andere chlamydiale Außenmembranprotein als Adhäsion fungiert. Das OmcB Protein ist das zweithäufigste Protein des cOMC und außerdem ist es eines der immundominantesten Proteine der Chlamydien (Mygind, Christiansen et al. 1998), (Cunningham and Ward 2003), (Portig, Goodall et al. 2003). Für das *C. psittaci* OmcB Protein isoliert aus dem cOMC wurde nachgewiesen, dass es die Fähigkeit besitzt an humane Zellen zu binden (Ting, Hsia et al. 1995). Aufgrund dieser Eigenschaften wurde das Protein ausgewählt, um es im Hefe-System genauer zu untersuchen und die potentiell vorhandene Adhäsionsfunktion zu charakterisieren.

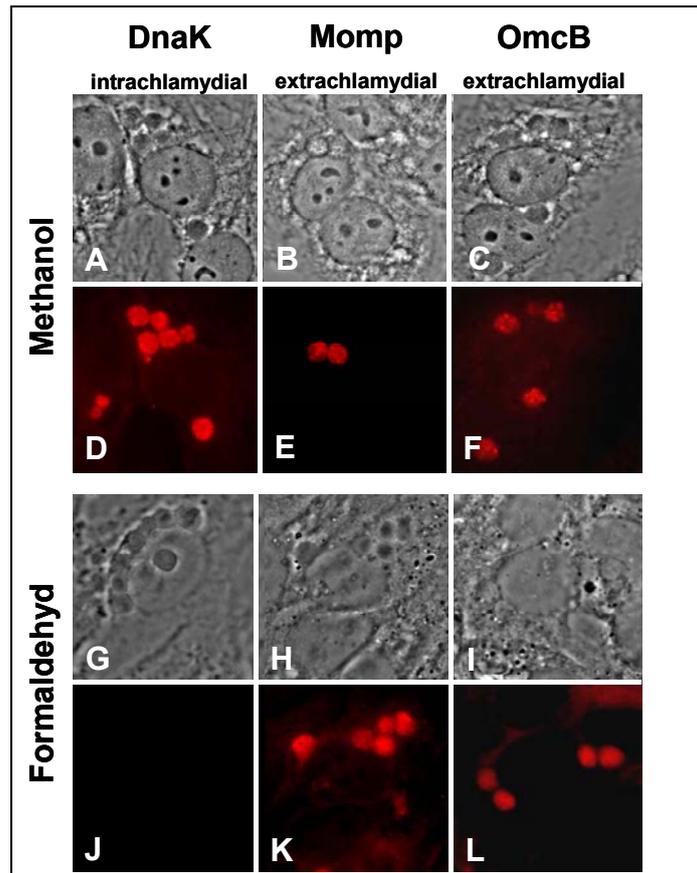
4.3.1. Das *C. pneumoniae* OmcB Protein ist auf der chlamydialen Oberfläche lokalisiert

Um die Funktion eines chlamydialen Adhäsionsmoleküls zu erfüllen, muss das Protein auf der EB-Zelloberfläche lokalisiert sein. Daher wurde zunächst die Lokalisation von OmcB auf der *C. pneumoniae* Oberfläche determiniert. Infizierte HEp-2 Zellen wurden dazu, wie unter 3.3.11.1. beschrieben, mittels differentieller Fixierung fixiert, bevor durch indirekte Immunfluoreszenz (siehe Abschnitt 3.3.11.3.) verschiedene chlamydiale Proteine detektiert wurden (Abb. 11).

Wurden *C. pneumoniae* infizierte HEp-2 Zellen mit Methanol fixiert, konnten unter Verwendung spezifischer Antikörper für das intrachlamydiale Hitzeschockprotein DnaK (Abb. 11D), das extrachlamydiale Momp (Abb. 11E) und das *C. pneumoniae* OmcB Protein (Abb. 11F) alle drei Antigene im Einschluss detektiert werden. Die Methanolfixierung permeabilisiert sowohl die eukaryotische Wirtszelle als auch den chlamydialen Einschluss und erlaubt somit auch die Detektion von intrachlamydialen Epitopen. Bei Fixierung mit Formaldehyd wird nur die Einschlussmembran, nicht aber das Chlamydium selbst durchlässig für die verwendeten Antikörper, so dass intrachlamydiale Epitope nicht zugänglich sind. Wie erwartet ergab der DnaK Antikörper keine Färbung des Einschlusses (Abb. 11J). Für die Detektion des Momp Proteins mittels des spezifischen Antikörpers (Abb. 11K) konnte dagegen eine eindeutige Färbung der chlamydialen Partikel im Einschluss gezeigt werden, was die bekannte Oberflächen-Lokalisierung des

Proteins bestätigt. Ebenso konnte für das OmcB Protein, durch Detektion mit dem *C. pneumoniae*-spezifischen OmcB Antikörper, eine Lokalisierung auf der chlamydialen Zelloberflächen nachgewiesen werden (Abb. 11L).

In einer detaillierteren Analyse sollte als nächstes die Lokalisierung und Zugänglichkeit verschiedener Epitope des Proteins gezeigt werden (Abb. 12). Für die indirekte Immunfluoreszenz nach differentieller Fixierung wurden hierbei verschiedene



polyklonale *C. trachomatis* OmcB Antikörper eingesetzt. Diese weisen eine deutliche Kreuzreaktivität zum *C. pneumoniae* Protein auf und sind gegen unterschiedliche Bereiche des OmcB Proteins gerichtet (Mygind, Christiansen et al. 1998). Die Verwendung

des Pab 152 Antikörpers (AS 23-282) detektierte das *C. pneumoniae* OmcB auf der Oberfläche der chlamydialen Partikel, sowohl nach Methanol Fixierung (Abb. 12D) als auch nach Fomaldehyd Fixierung (Abb. 12J). Für die Verwendung des Pab111 Antikörpers (AS 167-443) bestätigt sich die Lokalisierung des OmcB Proteins (Abb. 12E, K), genauso wie bei der Verwendung des Pab113 Antikörpers (AS 420-547) (Abb. 12F, L).

Abbildung 11: Lokalisierung des OmcB Proteins in differenziell fixierten, *C. pneumoniae* infizierten HEp-2 Zellen.

A-C) Phasenkontrastaufnahmen, D-F) Immunfluoreszenzaufnahmen von Methanol-fixierten Zellen (63-fache Objektiv-Vergrößerung). G-I) Phasenkontrastaufnahmen, J-L) Immunfluoreszenzaufnahmen von Formaldehyd-fixierten und permeabilisierten Zellen. Die HEp-2 Zellen wurden 48 h nach der Infektion fixiert. Die Detektion von DnaK (D, J) erfolgte durch Verwendung eines polyklonalen DnaK Serums (1:50 verd.). Momp (B, K) wurde mit einem polyklonalen Momp Serum (1:10 verd.) detektiert und OmcB (F, L) durch den *C. pneumoniae*-spezifischen OmcB Antikörper (1:200 verd.) nachgewiesen. Als Sekundär-Antikörper wurde in allen Experimenten ein Cy3-konjugierter Anti-Kaninchen Antikörper (1:200 verd.) eingesetzt.

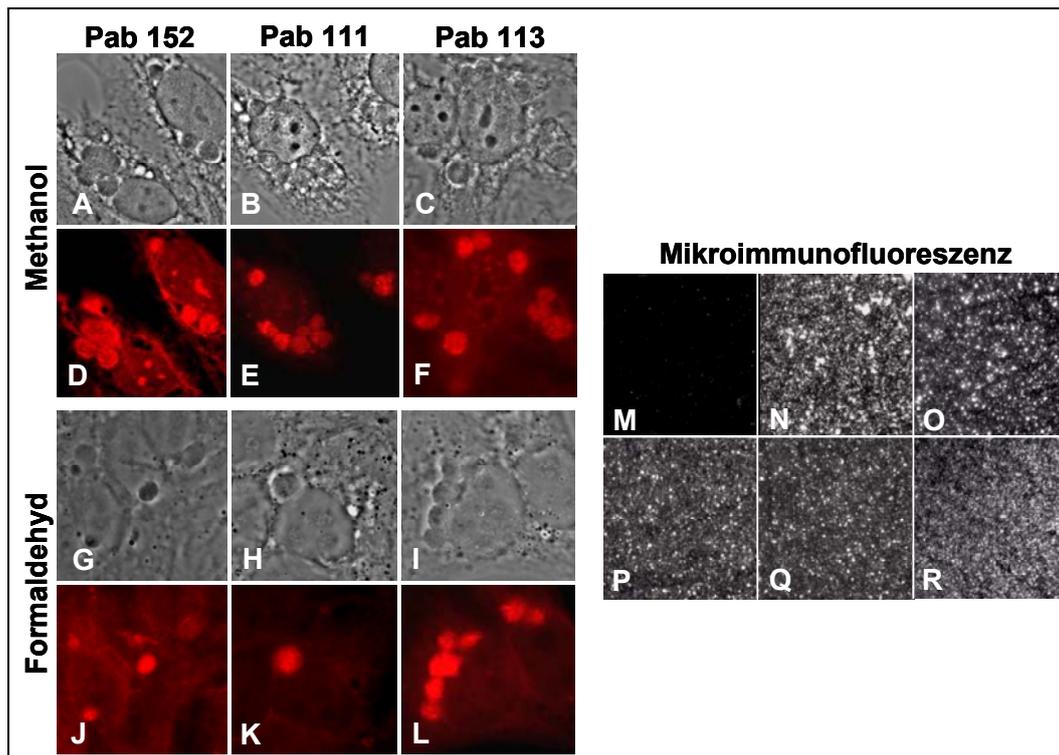


Abbildung 12: Detektion von OmcB im chlamydialen Einschluss und auf der Oberfläche chlamydialer Partikel.

A-C) Phasenkontrastaufnahmen und D-F) Immunofluoreszenzaufnahmen von Methanol-fixierten Zellen; G-I) Phasenkontrastaufnahmen und J-L) Immunofluoreszenzaufnahmen von Formaldehyd-fixierten, permeabilisierten Zellen. Die Zellen wurden 48h nach der Infektion fixiert. Die Detektion des OmcB erfolgte durch Verwendung der *C. trachomatis* OmcB-Seren Pab152 (D, J), Pab 111 (E, K) und Pab 113 (F, L). Abbildung 31: Adhäsion von OmcB6His oder oimmunofluoreszenz (MIF) von nicht-fixierten chlamydialen Partikeln (63-fache Objektiv-Vergrößerung). Die chlamydialen Partikel wurden nach Anreicherung durch einen Percoll-Gradienten ohne Fixierung angefärbt. Bei der MIF wurden DnaK (M) und Momp (N) durch Verwendung der entsprechenden Seren detektiert. OmcB wurde durch den *C. pneumoniae*-spezifischen OmcB-Antikörper (O) sowie durch die *C. trachomatis* Seren Pab152 (P), Pab111 (Q) und Pab113 (R) nachgewiesen.

Um das OmcB Protein auf der Oberfläche von gereinigten, nicht-fixierten und nicht-permeabilisierten *C. pneumoniae* Partikeln zu detektieren, wurden alle Antikörper auch für die Mikroimmunofluoreszenz verwendet (Abb. 12M-R). Da es sich um intakte, unbehandelte chlamydiale Partikel handelt, können nur extrachlamydiale Epitope detektiert werden, nicht aber intrachlamydiale Proteine wie das DnaK (Abb. 12M). Dagegen konnte das Momp Protein unter Verwendung des Momp-spezifischen Antikörpers auf den chlamydialen Partikeln detektiert werden (Abb. 12N). Aber auch das OmcB Protein zeigte bei allen getesteten Antikörpern ein Oberflächen-lokalisiertes Signal (Abb. 12O, P, Q, R). Die Lokalisierungsstudien zeigen, dass es sich beim *C. pneumoniae* OmcB um ein Oberflächen-lokalisiertes Protein handelt, welches auf der Oberfläche chlamydialer Partikel nachgewiesen werden konnte.

4.3.2. Expression des *C. pneumoniae* OmcB Proteins im Hefe-System

Nach der Detektion von OmcB auf der Oberfläche der Chlamydien sollten im Folgenden die adhäsiven Eigenschaften des Proteins mittels des Hefe-Systems näher untersucht werden. Dazu wurde das

C. pneumoniae *omcB* Gen in den Expressionsvektor pYD1 integriert und exprimiert. Die Westernblot-Analyse von Aga2p und Aga2p-OmcB exprimierenden Hefen zeigte für das Aga2p Protein eine Proteinbande bei 22 kDa (Abb. 13A, Spur 1). Außer den

spezifischen Proteinbanden wurden schwache zusätzliche Proteinbanden, entsprechend dem unvollständig deglykosylierten Aga2p detektiert (Abb.13A, Spur 1). Für das Aga2p-OmcB Fusionsprotein wurde eine Proteinbande bei

einer Laufhöhe von zirka 90 kDa detektiert (Abb. 13A, Spur 2) (theoretisches Molekulargewicht 72 kDa). Auch beim Aga2p-OmcB traten Nebenbanden auf, die wahrscheinlich auf Degradationsprodukte zurückzuführen sind (Abb. 13A, Spur 2). Mittels indirekter Immunfluoreszenz konnte das Aga2p-OmcB Fusionsprotein auch auf der Hefeoberfläche detektiert werden (Abb. 13E).

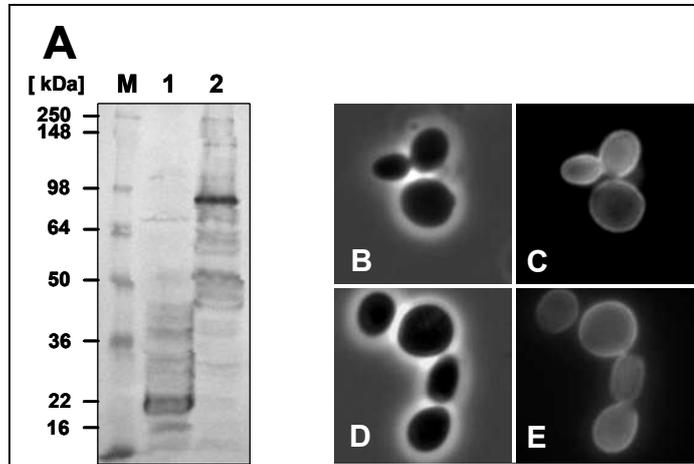


Abbildung 13: Nachweis des Aga2p-OmcB Fusionsproteins.

A) Westernblot-Analyse eines 10 %igen SDS-Gels; M: Größenstandard; Proteinextrakte von Aga2p (Spur 1) und Aga2p-OmcB exprimierenden Hefezellen (Spur 2) wurden mit α -Mannosidase behandelt. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte durch den Anti-penta His Antikörper und den AP-konjugierten Anti-Maus Antikörper; B, D) Phasenkontrastaufnahmen; C, E) Immunfluoreszenzaufnahmen (63-fache Objektiv-Vergrößerung); Die Detektion der Oberflächen-Präsentation von Aga2p (B, C) und Aga2p-OmcB (D, E) erfolgte unter Verwendung des Anti-Xpress Antikörpers und des Cy3-konjugierten Anti-Maus Antikörpers.

4.3.3. Das Aga2p-OmcB Fusionsprotein vermittelt signifikante Adhäsion an humane HEp-2 Zellen

Als nächstes wurden Adhäsionstests mit humanen HEp-2 Zellen und Aga2p-OmcB exprimierenden Hefen durchgeführt. Die Quantifizierung der Adhäsionstests zeigte für Aga2p präsentierende Hefen eine relative Adhäsion von 5 %, für Aga2p-Invasin-AD präsentierende Hefen dagegen eine relative Adhäsion von 50 % (Abb. 14). Auch Aga2p-OmcB exprimierende Hefen zeigten eine signifikante Adhäsion an eukaryotische Zellen und vermittelten eine relative Adhäsion von 43 % (Abb. 14). Das Ergebnis zeigt, dass das

C. pneumoniae OmcB im Hefe-System eine ebenso signifikante Adhäsion an humane Zellen vermittelt wie das Invasin.

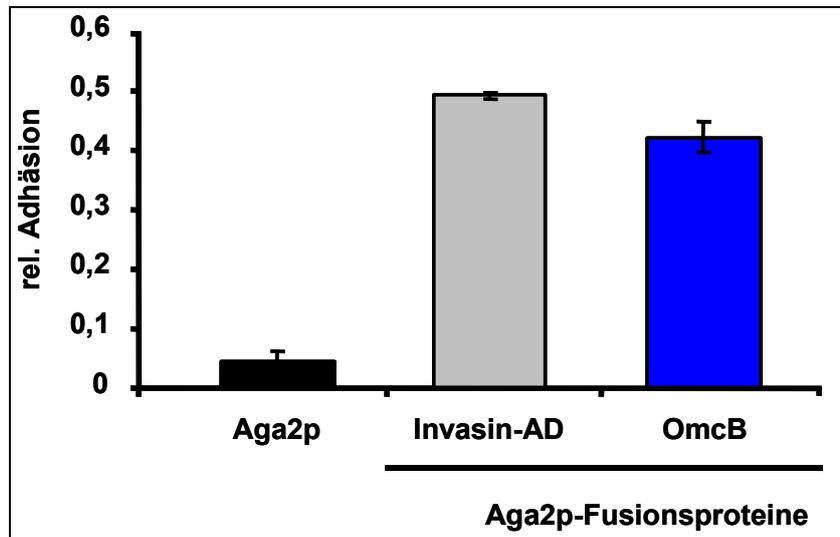


Abbildung 14: Adhäsionstests von Aga2p-OmcB exprimierenden Hefen.

1×10^5 HEp-2 Zellen und ein zehnfacher Überschuss an Aga2p, Aga2p-Invasin-AD und Aga2p-OmcB präsentierenden Hefezellen wurde eingesetzt (n=4).

4.4. Die Adhäsion der Hefen erfolgt über das chlamydiale OmcB Protein auf der Hefezelloberfläche

Um zu klären, ob die Adhäsion der Aga2p-OmcB exprimierenden Hefen an humane Zellen auf der Präsentation des OmcB beruht, wurden die Hefezellen einer Behandlung

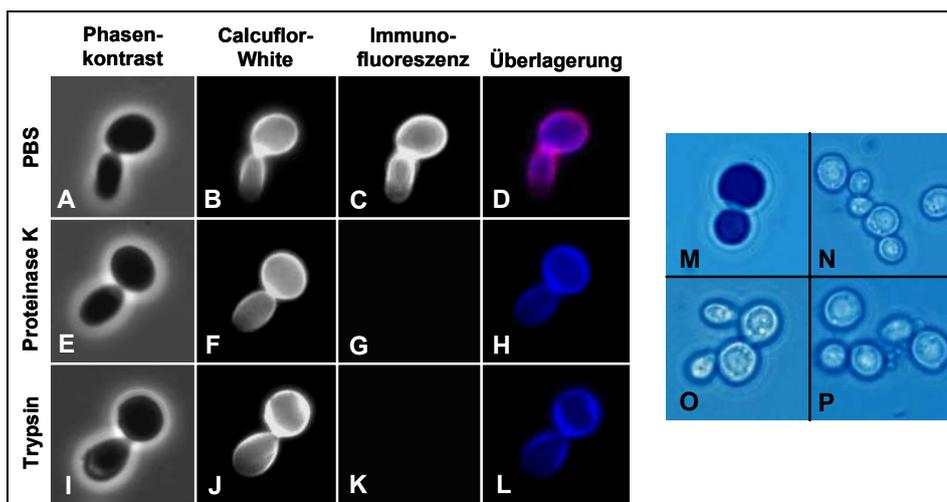


Abbildung 15: Nachweis der proteolytischen Entfernung Oberflächenlokalisierter Aga2p-OmcB Proteine.

Mikroskopische Aufnahmen von Aga2p-OmcB exprimierenden Hefen (A-P) (63-fache Objektiv-Vergrößerung). Die Hefezellen wurden unter induzierenden Bedingungen kultiviert und anschließend mit PBS, Proteinase K oder Trypsin inkubiert. B, F, J) Calcuflor-White Färbung; C, G, K) Immunofluoreszenz Färbung mit dem monoklonalen Xpress Antikörper und dem Cy3-gekoppelten Anti-Maus Antikörper; D, H, L) Überlagerungsbilder der Calcuflor-White und der Immunofluoreszenz Färbung; M-P) Methylenblau-Färbung von Zellen behandelt mit SDS (M), mit PBS (N), mit Proteinase K (O) und mit Trypsin (P).

mit verschiedenen Proteasen unterzogen.

Nach Behandlung Aga2p-OmcB exprimierender Hefezellen mit Proteinase K oder Trypsin wurden die Hefen mit Calcuflor-White angefärbt, um das Chitin in der Hefezellwand nachzuweisen. Unbehandelte wie auch Protease-behandelte Zellen wiesen eine identische Anfärbung auf, was auf die Vollständigkeit des Chitingerüsts hindeutet (Abb. 15B, F, J). Die Immunofluoreszenz-Detektion des Aga2p-OmcB auf der Hefeoberfläche ergab nur bei PBS-behandelten Zellen eine positive Färbung (Abb. 15C). Nach Protease-Behandlung war keine Detektion des Fusionsproteins auf der Zelloberfläche mehr möglich (Abb. 15G, K). In der Überlagerung der Calcuflor-White und der Immunofluoreszenz Färbung zeigt sich, dass nur unbehandelte Aga2p-OmcB Zellen beide Anfärbungen aufweisen, während Protease behandelte Zellen nur die Calcuflor-White Färbung zeigen (Abb. 15D, H, L).

Mittels einer Methylenblau Färbung wurde außerdem die Lebensfähigkeit der behandelten Zellen überprüft. Nur lebende Zellen können den verwendeten blauen Farbstoff aus der Zelle hinausschleusen und erscheinen daher in mikroskopischen Aufnahmen farblos. Tote Zellen akkumulieren den Farbstoff und erscheinen blau. Zellen die mit SDS abgetötet wurden, zeigten eine starke Blaufärbung (Abb. 15M). Aga2p-OmcB exprimierende Hefen, die nur mit PBS behandelt wurden, erscheinen dagegen ebenso farblos, wie die Protease-behandelten Zellen (Abb. 15N, O, P). Die durchgeführte Protease-Behandlung entfernt demnach nur die Oberflächen-lokalisiereten Aga2p Fusionsproteine, greift aber nicht die Zellwand an und tötet die Zellen nicht ab.

Nach der Protease-Behandlung wurden die Hefezellen in Adhäsionstests mit humanen HEp-2 Zellen eingesetzt. Hefezellen die nur das Aga2p Protein auf ihrer Oberfläche präsentieren, zeigten unabhängig von der Vorbehandlung eine relative Adhäsion von zirka 9 %. Für PBS-behandelte Aga2p-OmcB exprimierende Hefen

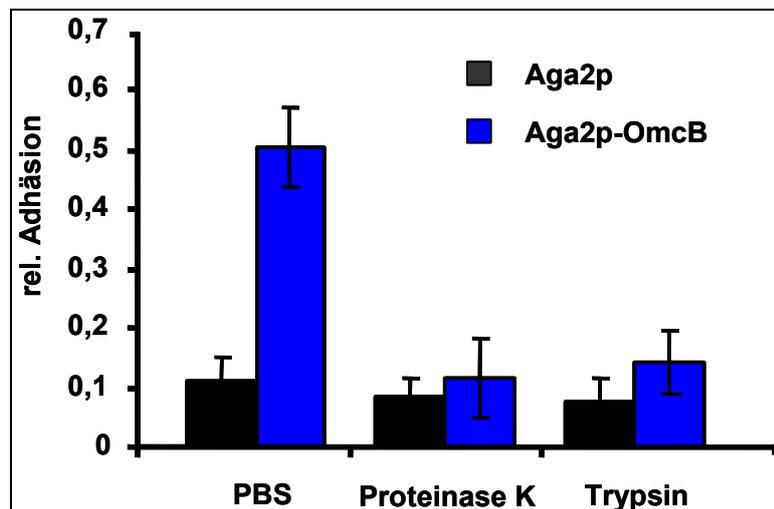


Abbildung 16: Proteolytische Entfernung des Aga2p-OmcB von der Hefezelloberfläche reduziert die Adhäsion.

Hefeadhäsionstests durchgeführt mit 1×10^5 HEp-2 Zellen und einem zehnfachen Überschuss an Aga2p und Aga2p-OmcB präsentierenden Hefezellen. Die verwendeten Hefezellen wurden mit PBS, Proteinase K oder Trypsin vorbehandelt und anschließend in die Adhäsionstests eingesetzt (n=4).

konnte eine relative Adhäsion von 50 % bestimmt werden. Die Vorinkubation mit Proteinase K oder mit Trypsin reduzierte die Adhäsion auf 11 % bzw. 14 % (Abb. 16). Folglich entfernt die Protease-Behandlung Oberflächen-präsentiertes Aga2p-OmcB und reduziert dadurch die Bindefähigkeit der Hefen an HEp-2 Zellen auf das Niveau der Negativkontrolle.

4.5. Identifizierung der N-terminalen Adhäsionsdomäne im *C. pneumoniae* OmcB Protein

Zur Identifizierung der eigentlichen Adhäsionsdomäne im OmcB Protein wurde das Protein zunächst in zwei Hälften unterteilt, OmcB-N (Aminosäuren 1-282) und OmcB-C (Aminosäuren 275-556) (Abb. 17). Beide

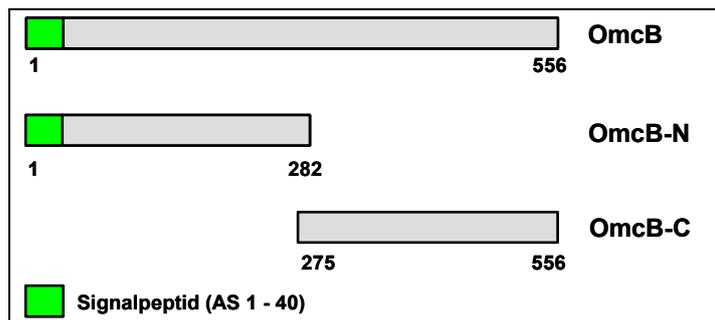


Abbildung 17: Schematische Darstellung der OmcB-Teilproteine OmcB-N und OmcB-C.

Proteinfragmente wurden im Hefe-System exprimiert, um ihre adhäsiven Eigenschaften zu analysieren.

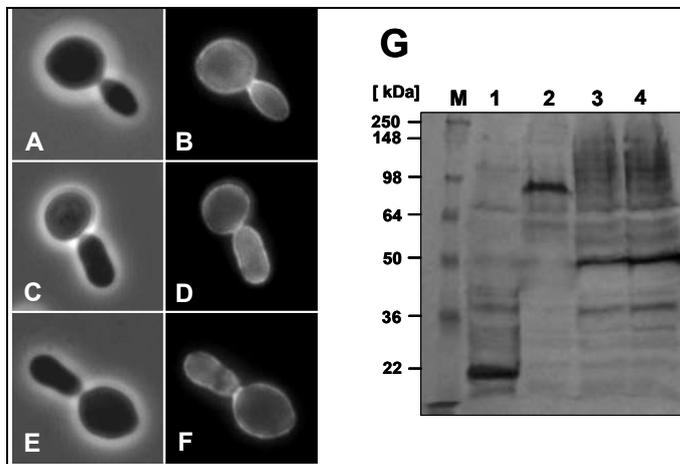


Abbildung 18: Detektion von Aga2p-OmcB-N und Aga2p-OmcB-C Fusionsproteinen auf der Hefezelloberfläche.

A, C, E) Phasenkontrastaufnahmen; B, D, F) Immunofluoreszenzaufnahmen (63-fache Objektiv-Vergrößerung). Aga2p (A, B), Aga2p-OmcB-N (C, D) und Aga2p-OmcB-C (E, F) wurden auf der Hefezelloberfläche detektiert. G) Westernblot-Analyse nach α -Mannosidase-Behandlung der Proteinextrakte. Detektion des Aga2p (Spur 1) sowie der Fusionsproteine Aga2p-OmcB (Spur 2), Aga2p-OmcB-N (Spur 3) und Aga2p-OmcB-C (Spur 4). M: Größenstandard

Die Überprüfung der korrekten Expression und Präsentation der Konstrukte erfolgte durch Westernblot-Analysen und durch Nachweis der Oberflächen-Präsentation mittels indirekter Immunofluoreszenz. Beide Fusionsproteine Aga2p-OmcB-N und Aga2p-OmcB-C wurden auf der Zelloberfläche der Hefen detektiert (Abb.18D, F). In der Westernblot-Analyse konnte sowohl für Aga2p-OmcB-N als auch für Aga2p-OmcB-C eine Proteinbande bei 50 kDa detektiert werden (Abb.18G, Spur 3 und 4) (theoretisches Molekulargewicht 46 kDa bzw. 44 kDa).

4.5.1. Der N-Terminus des OmcB Proteins vermittelt die Adhäsion der Hefen an eukaryotische HEp-2 Zellen

In Adhäsionstests mit HEp-2 Zellen wurden die adhäsiven Eigenschaften der beiden verkürzten OmcB Teilproteine mit denen des Volllängenproteins verglichen. Für Hefen mit dem N-terminalen OmcB Fragment auf ihrer Oberfläche konnte eine Adhäsion von 35 % an die humanen Zellen festgestellt werden. Dies entspricht beinahe der Adhäsionsstärke

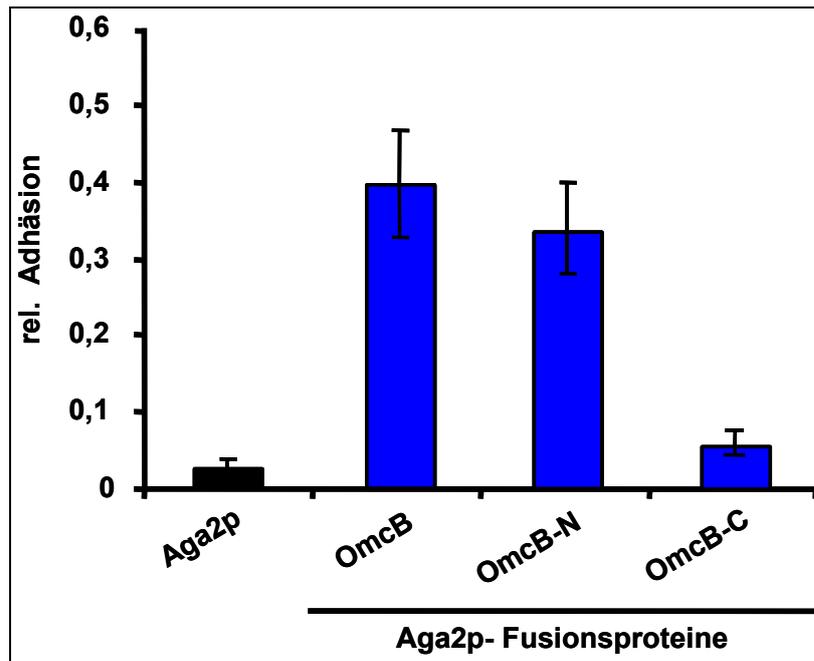


Abbildung 19: Vergleich der adhäsiven Eigenschaften von Aga2p-OmcB-N und Aga2p-OmcB-C exprimierenden Hefen.

Im Adhäsionstest wurden jeweils 1×10^5 HEp-2 Zellen und ein zehnfacher Überschuss an Aga2p, Aga2p-OmcB, Aga2p-OmcB-N und Aga2p-OmcB-C präsentierenden Hefezellen eingesetzt (n=4).

des Volllängenproteins (40%). Im Gegensatz dazu vermittelte der OmcB C-Terminus keine Bindung an HEp-2 Zellen, mit einer relative Adhäsion von 5 % liegt diese im Bereich der Negativkontrolle Aga2p (4%) (Abb. 19).

Die vergleichenden Analysen der Adhäsions-Eigenschaften von Aga2p-OmcB, Aga2p-OmcB-N und Aga2p-OmcB-C exprimierenden Hefen zeigten, dass Aga2p-OmcB und Aga2p-OmcB-N ein ähnliches adhäsives Verhalten aufweisen, während Aga2p-OmcB-C keine Adhäsion an humane Zellen vermitteln kann.

4.6. Die Adhäsion von Aga2p-OmcB ist abhängig von Glykosaminoglykanen auf der eukaryotischen Zelloberfläche

Für die Infektion humaner Zellen mit *C. pneumoniae* konnte gezeigt werden, dass Glykosaminoglykane (GAGs) auf der eukaryotischen Zelle essentiell für den Ablauf der Infektion sind (Wuppermann, Hegemann et al. 2001), (Beswick, Travelstead et al. 2003).

Es stellt sich daher die Frage, ob der GAG-abhängige Infektionsprozess OmcB vermittelt abläuft. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden im Folgenden mit Hilfe des Hefe-Systems verschiedene Experimente durchgeführt. Dabei wurde untersucht, ob die Aga2p-OmcB vermittelte Adhäsion sowohl durch Zugabe von exogenen Glykosaminoglykanen als auch durch enzymatische Entfernung der GAGs von der Wirtszelle beeinflusst werden kann. Des Weiteren wurden auch Adhäsionstests unter Verwendung GAG-defizienter CHO-Zellen durchgeführt.

4.6.1. Einfluss verschiedener exogener GAGs auf die Adhäsion von Aga2p-OmcB exprimierenden Hefen

In ersten Analysen wurde der Einfluss von GAGs auf die Bindung von Aga2p-OmcB exprimierenden Hefen an humane Zellen untersucht. Hierzu wurden vor der Durchführung des Adhäsionstests die Aga2p und Aga2p-OmcB Hefezellen mit verschiedenen exogenen GAGs oder nur mit PBS vorinkubiert.

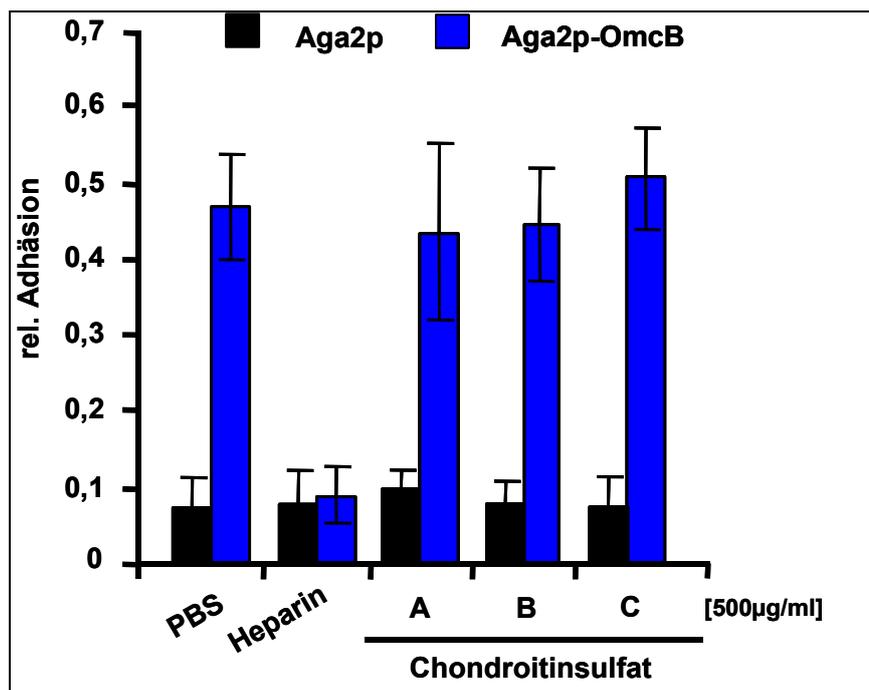


Abbildung 20: Einfluss verschiedener exogener GAGs auf die Adhäsion von Aga2p-OmcB exprimierenden Hefen.

Für die Hefeadhäsionstests wurden Aga2p und Aga2p-OmcB präsentierenden Hefezellen mit PBS, Heparin oder Chondroitinsulfat A, B, C vorinkubiert und anschließend zu den HEp-2 Zellen gegeben. (n=4)

Die anschließenden Adhäsionstests zeigten, dass für Aga2p exprimierende Hefen keine der eingesetzten GAG-Vorbehandlungen eine Änderung der relativen Adhäsion zur Folge hatte (relative Adhäsion ~ 8-10 %) (Abb. 20). Aga2p-OmcB exprimierende Hefen zeigten nach Vorbehandlung mit PBS-Puffer eine relative Adhäsion von 48 %, die auf 8 % zurückging, wenn die Zellen mit Heparin vorbehandelt wurden. Im Gegensatz dazu hatte

die Verwendung verschiedener Chondroitinsulfate keinen negativen Effekt auf die Adhäsion der Aga2p-OmcB Hefen. Die Vorbehandlung der Aga2p-OmcB exprimierenden Hefezellen mit Chondroitinsulfat A resultierte in einer relativen Adhäsion von 43 %, die Vorbehandlung mit Chondroitinsulfat B ergab eine relative Adhäsion von 45 % und bei Inkubation mit Chondroitinsulfat C zeigte sich 51 % relative Adhäsion. Als einziges der getesteten GAGs reduziert spezifisch Heparin die Adhäsion von Aga2p-OmcB präsentierenden Hefen an HEp-2 Zellen.

4.6.2. Die Aga2p-OmcB Adhäsion wird Dosis-abhängig durch Heparin reduziert

Als nächstes wurde die Konzentrations-abhängige Wirkung von Heparin auf die OmcB-Bindung untersucht. Dazu wurden Aga2p-OmcB exprimierende Hefen mit verschiedenen Heparin-

Konzentrationen

vorbehandelt, bevor sie in Adhäsionstests eingesetzt wurden.

Die Auswertung dieser Experimente ergab einen Konzentrations-abhängigen Einfluss von Heparin auf die Aga2p-OmcB-vermittelte Adhäsion (Abb. 21). Wurden die

Aga2p-OmcB

präsentierenden Zellen nur mit PBS vorinkubiert, so zeigten sie eine relative

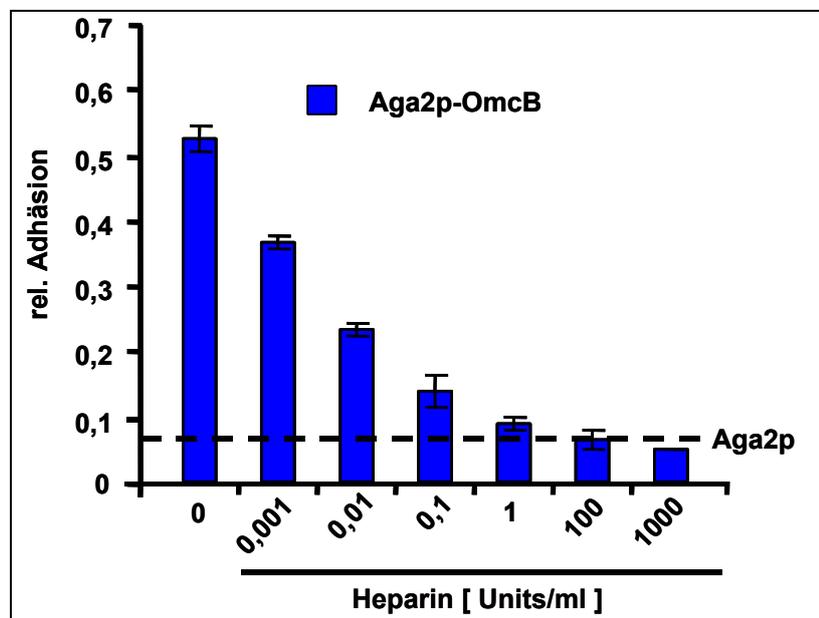


Abbildung 21: Die Reduktion der Aga2p-OmcB Adhäsion durch Heparin erfolgt Dosis-abhängig.

Quantifizierung der Hefeadhäsionstests nach Vorinkubation der verwendeten Hefezellen mit PBS oder verschiedenen Konzentrationen an Heparin (0,001-1000 Units entspricht 0,006-6000µg/ml). Die gestrichelte Linie zeigt die relative Adhäsion von Aga2p exprimierenden Hefen, nach Vorbehandlung der Zellen mit PBS oder 600µg/ml Heparin. (n=4)

Adhäsion von 52 % an die HEp-2 Zellen. Inkubation der Zellen mit 0,001 Unit Heparin (~0,006µg/ml) reduzierte die relative Adhäsion um 13 % auf 38 % (Abb. 21). Die Verwendung einer zehnfach höheren Heparin-Konzentration von 0,01 Unit (~0,06µg/ml) resultierte in einer weiteren, 14%igen Reduktion der Aga2p-OmcB-vermittelte Adhäsion. Der Einsatz von 1 Unit Heparin verringert die Aga2p-OmcB Adhäsion von 52 % auf 10 %. Die weitere Erhöhung der Heparin-Konzentration um den Faktor 1000, reduzierte die relative Adhäsion auf 5 % und damit auf Hintergrundniveau. Die Aufnahme der

Konzentrationskinetik zeigt, dass schon geringe Mengen Heparin einen inhibierenden Einfluss auf die Aga2p-OmcB Adhäsion ausüben.

4.6.3. Enzymatische Entfernung Heparansulfat-ähnlicher Strukturen von der HEp-2 Zelloberfläche reduziert die Adhäsion von Aga2p-OmcB Hefen

Die Vorinkubation der Aga2p-OmcB exprimierenden Hefezellen mit exogenem Heparin zeigte eine inhibierende Wirkung auf die Bindung der Hefen an die humanen Zellen.

Dabei scheint das zugegebene Heparin mit dem Aga2p-OmcB Fusionsprotein zu interagieren und verhindert so die Adhäsion.

Wenn Aga2p-OmcB exprimierende Hefen tatsächlich an Heparin-ähnliche Strukturen auf der HEp-2 Zelloberfläche binden, dann sollte eine enzymatische Abspaltung der GAG-Strukturen von den Zellen, die Adhäsion der Hefen reduzieren. Die Behandlung der Hefezellen mit Heparinase I sollte

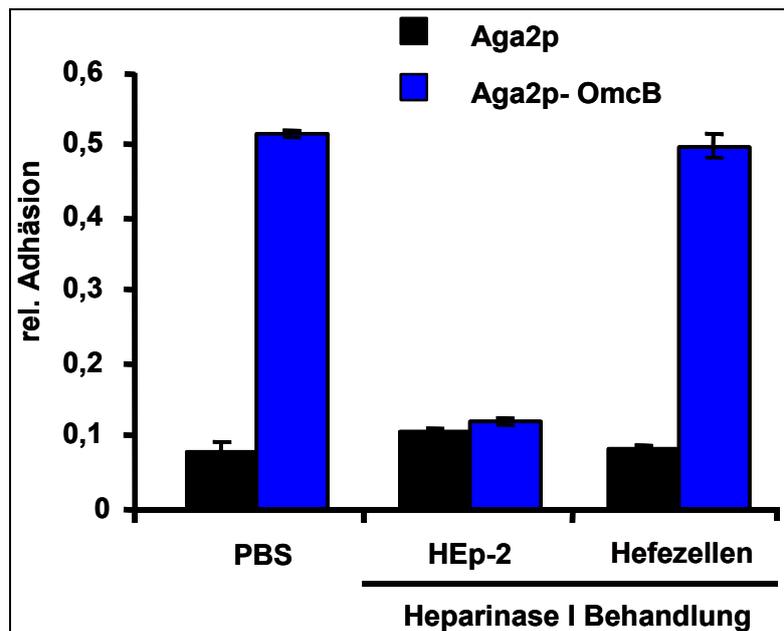


Abbildung 22: Enzymatische Entfernung Heparansulfat-ähnlicher Strukturen auf HEp-2 Zellen reduziert die Aga2p-OmcB Adhäsion.

Aga2p und Aga2p-OmcB präsentierende Hefezellen wurden ebenso wie die HEp-2 Zellen mit PBS oder mit Heparinase I vorbehandelt, bevor sie in die Adhäsionstests eingesetzt wurden. (n=4)

hingegen keinen Einfluss auf die Adhäsion haben. Wurden unbehandelte Hefezellen zu unbehandelten HEp-2 Zellen gegeben, zeigte sich für Aga2p exprimierende Hefen eine relative Adhäsion von 8 %, während Aga2p-OmcB präsentierende Hefezellen eine relative Adhäsion von 51 % vermittelten (Abb. 22). Die Vorbehandlung der Hefezellen mit der GAG-Lyase Heparinase I erbrachte keine Änderung der relativen Adhäsion für Aga2p oder Aga2p-OmcB exprimierende Hefen. Im Gegensatz dazu konnte eine deutliche Reduktion der relativen Adhäsion auf 11 % festgestellt werden, wurden unbehandelte Aga2p-OmcB Hefen zu enzymatisch vorbehandelten HEp-2 Zellen gegeben. Die Experimente zeigen somit, dass die Entfernung Heparin-ähnlicher Strukturen von der humanen Zelloberfläche die Adhäsion von Aga2p-OmcB Hefen vollständig hemmt. Hingegen hat die Heparinase I Behandlung der Hefezellen keinen negativen Einfluss auf die Adhäsion der Aga2p-OmcB exprimierenden Hefen.

4.6.4. Aga2p-OmcB exprimierende Hefen vermitteln keine Adhäsion an GAG-defiziente CHO-Zelllinien

Zur Absicherung der bisher erhaltenen Daten wurden im Folgenden GAG-defiziente CHO-Zelllinien auf Bindung durch Aga2p-OmcB exprimierende Hefen analysiert (Esko, Stewart et al. 1985), (Esko, Rostand et al. 1988).

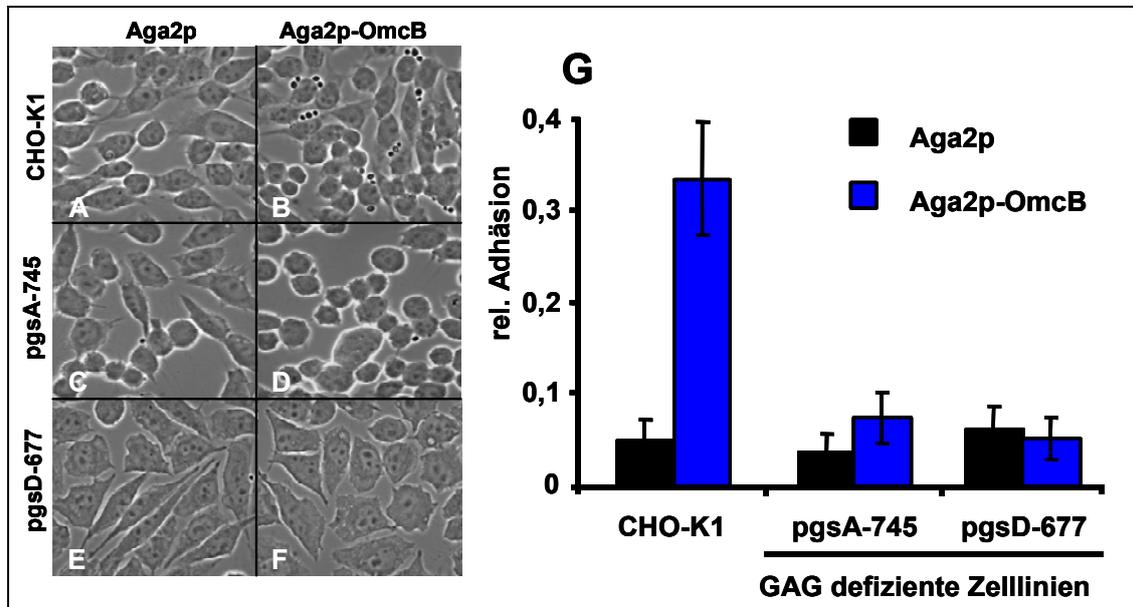


Abbildung 23: Aga2p-OmcB Hefen zeigen keine Adhäsion an GAG defiziente CHO-Zellen. A-F) Phasenkontrastaufnahmen der Adhäsionstests mit verschiedenen CHO Zelllinien: Wildtyp CHO-K1 (A, B), Mutante pgsA-745 (C, D) und Mutante pgsD-677 (E, F). Verwendet wurden Aga2p (A, C, E) sowie Aga2p-OmcB (B, D, F) exprimierende Hefezellen (63-fache Objektiv-Vergrößerung). G) Quantifizierung der Hefeadhäsionstests. (n=4)

Die Mutantenzelllinien weisen Defekte in den Schlüsselenzymen der Glykosaminoglykan-Biosynthese auf. pgsA-745 Zellen tragen eine Mutation in dem Enzym Xylosyltransferase und können keine Glykosaminoglykane mehr synthetisieren. Die Zelllinie pgsD-677 zeigt Defekte in den Enzymen *N*-Acetylglucosaminyl-transferase und Glucuronosyltransferase, wodurch kein Heparansulfat produziert werden kann. Gleichzeitig weisen diese Zellen eine dreifach erhöhte Syntheserate von Chondroitinsulfat auf (Esko, Stewart et al. 1985). Durch die mikroskopischen Phasenkontrastaufnahmen konnte dokumentiert werden, dass kaum Aga2p präsentierende Hefezellen an die CHO-Zellen gebunden haben (23A, C, E). Für die Bindung an die verwendeten CHO-Zellen konnte eine durchschnittlich relative Adhäsion von 5 % ermittelt werden. Im Gegensatz dazu adhärten Aga2p-OmcB präsentierende Hefen signifikant besser an die CHO-K1 Wildtypzellen und zeigen eine relative Adhäsion von 35 % (Abb. 23G). Der Einsatz beider Mutantenzelllinien reduzierte die relative Adhäsion von Aga2p-OmcB Hefen auf 8 % (pgsA-745 Zellen) bzw. 6 % (pgsD-677 Zellen). Diese Reduktion spiegelte sich in den mikroskopischen Aufnahmen wieder, da die mutierten Zelllinien kaum gebundene Hefezellen aufwiesen (Abb. 23D, F).

Der durch Mutation hervorgerufene Mangel an Oberflächen-lokalisiereten Heparansulfat-Strukturen in den defizienten Zelllinien, führt zu einer deutlichen Reduktion der Aga2p-OmcB-vermittelten Adhäsion der Hefezellen.

4.7. Die N-terminale Bindedomäne des OmcB Proteins vermittelt die GAG-abhängige Adhäsion

Bisher konnte für Aga2p-OmcB exprimierende Hefen nachgewiesen werden, dass sie an Heparin-ähnliche

Strukturen auf der humanen Zelloberfläche adhären. Adhäsionstests mit den verkürzten Varianten Aga2p-OmcB-N und Aga2p-OmcB-C haben ergeben, dass die Adhäsivität des Proteins über eine Domäne im N-Terminus vermittelt wird. Daten von Stephens et al. zeigten, dass im OmcB Protein von *C. trachomatis* LGV eine Heparinbindedomäne in den ersten 38 Aminosäuren nach dem Signalpeptid lokalisiert ist (Stephens, Koshiyama et al. 2001). Bioinformatische Analysen bestätigten auch für das *C. pneumoniae* OmcB das Vorhandensein einer solchen Domäne. Um zu überprüfen, ob die Heparinbindedomäne im N-Terminus des Proteins für die Adhäsionsfunktion

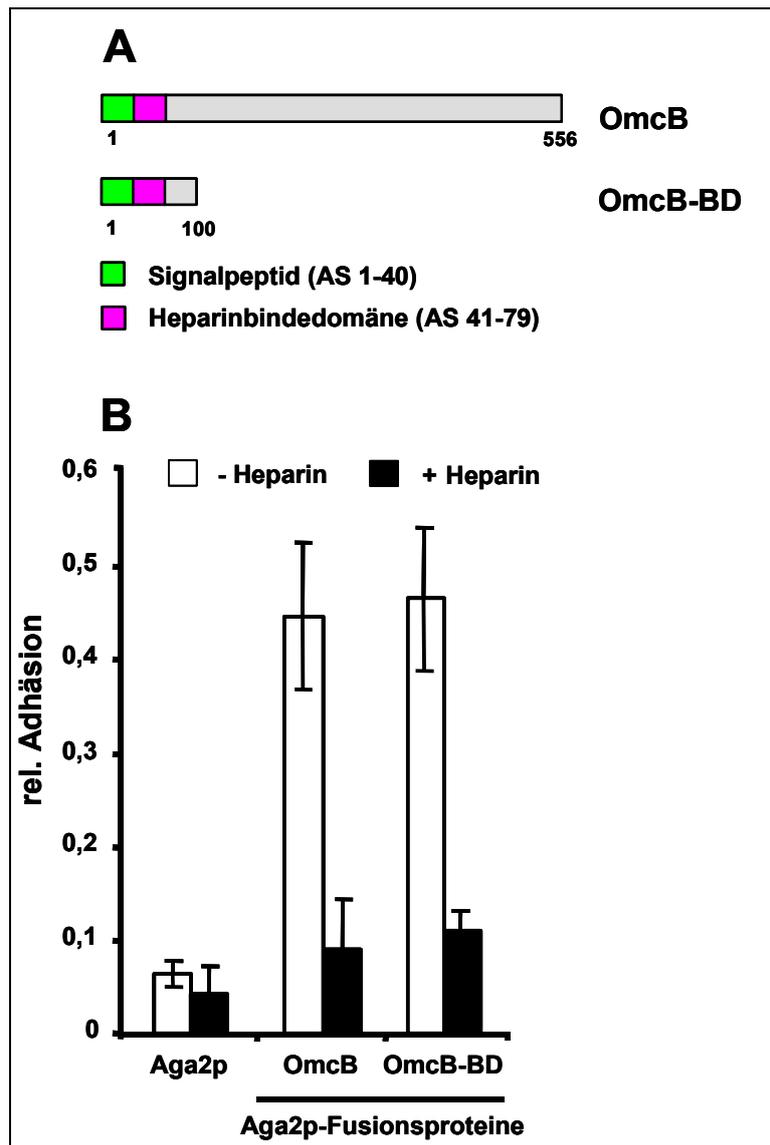


Abbildung 24: Aga2p-OmcB-BD exprimierende Hefen adhären GAG-abhängig an HEp-2 Zellen.

A) Schematische Darstellung der OmcB-BD Variante. Einteilung der Heparinbindedomäne nach Stephens et al. 2001. B) Adhäsionstests mit HEp-2 Zellen und Aga2p, Aga2p-OmcB sowie Aga2p-OmcB-BD präsentierenden Hefezellen, die zuvor mit PBS-Puffer oder Heparin vorinkubiert wurden. (n=4)

relevant ist, wurde eine stärker verkürzte Variante des OmcB Proteins im Hefe-System

exprimiert. Das OmcB-BD Fragment (AS 1-100) umfasst wie das Vollängenprotein das Signalpeptid (grün), sowie die von Stephens et al. postulierte Heparinbindedomäne (pink) und weitere 21 Aminosäuren (Abb. 24A).

Nach der Überprüfung der Expression und Präsentation des Aga2p-OmcB-BD Fragments im Hefe-System (Abb. 55, Anhang) wurden Adhäsionstests mit Aga2p, Aga2p-OmcB und Aga2p-OmcB-BD exprimierenden Hefen durchgeführt. Dabei wurden die Hefezellen erneut mit PBS-Puffer oder Heparin vorbehandelt um zu überprüfen, ob das verkürzte OmcB-BD Fragment Adhäsion vermittelt und ob diese wie beim Vollängenprotein durch Heparin aufgehoben werden kann.

Ohne Vorbehandlung vermittelten Aga2p-OmcB Hefen eine relative Adhäsion von 45 %, die durch Vorinkubation mit Heparin auf 9 % zurückging. Aga2p-OmcB-BD exprimierende Hefen zeigten im unbehandelten Zustand eine ebenso deutliche Adhäsion an die humanen Zellen wie die Aga2p-OmcB Hefen. Sie vermittelten eine relative Adhäsion von 47 %, die nach der Vorbehandlung mit Heparin auf 11 % reduziert werden konnte (Abb. 24B). Die dargestellten Ergebnisse bestätigen, dass die GAG-abhängige Adhäsion des OmcB Proteins über eine Protein-Domäne innerhalb der ersten 100 Aminosäuren vermittelt wird.

4.8. Die Deletion basischer Aminosäuren in der Bindedomäne des OmcB führt zum Verlust der Adhäsivität des Proteins

In bioinformatischen Analysen des OmcB Proteins konnte eine regelmäßige Verteilung von rund 60 basischen Aminosäuren über das gesamte Protein ermittelt werden. Für die 38 Aminosäuren umfassende Heparinbindedomäne (AS 41-79) zeigte sich in eine Akkumulation basischer Aminosäuren, die fast 30% der Domäne

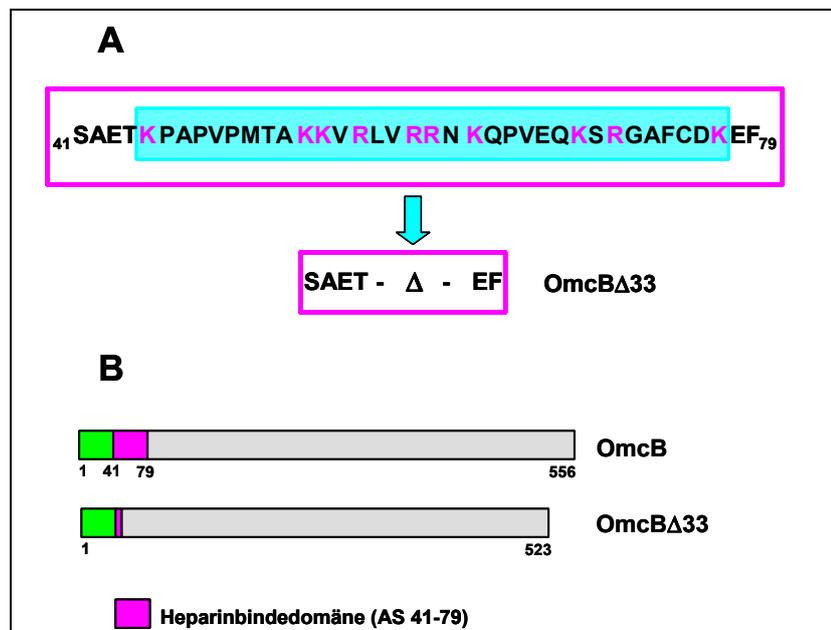


Abbildung 25: Generierung der OmcB Δ 33 Variante.

A) Schematische Darstellung der Deletion von 33 Aminosäuren in der Heparinbindedomäne des OmcB Proteins. B) Darstellung der generierten OmcB Δ 33 Variante.

ausmachen (10 von 38 Aminosäuren sind basisch) (Stephens, Koshiyama et al. 2001). Um zu untersuchen, in wie weit die Anhäufung der basischen Aminosäuren Einfluss auf die Bindungseigenschaften des OmcB Proteins nimmt, wurde eine Deletion von 33 Aminosäuren (AS 45-77) in der Heparinbindedomäne des OmcB Proteins vorgenommen, wobei alle basischen Aminosäuren der Domäne deletiert wurden (Abb. 25A).

In der Westernblot-Analyse konnten für Aga2p-OmcB (Abb. 26A, Spur 2) sowie für Aga2p-OmcB Δ 33 (Abb. 26A, Spur 3) Proteinbanden bei zirka 90 kDa nachgewiesen werden (theoretisches Molekulargewicht 72 kDa bzw. 69 kDa). Bei beiden Aga2p-OmcB Varianten traten zusätzliche Proteinbanden bei 50 kDa auf, die Degradationsprodukten entsprechen (Abb. 26A, Spur 2 und 3). In der Immunfluoreszenz konnten die Fusionsproteine Aga2p-OmcB und Aga2p-OmcB Δ 33 auf der Hefeoberfläche nachgewiesen werden (Abb. 26E, G).

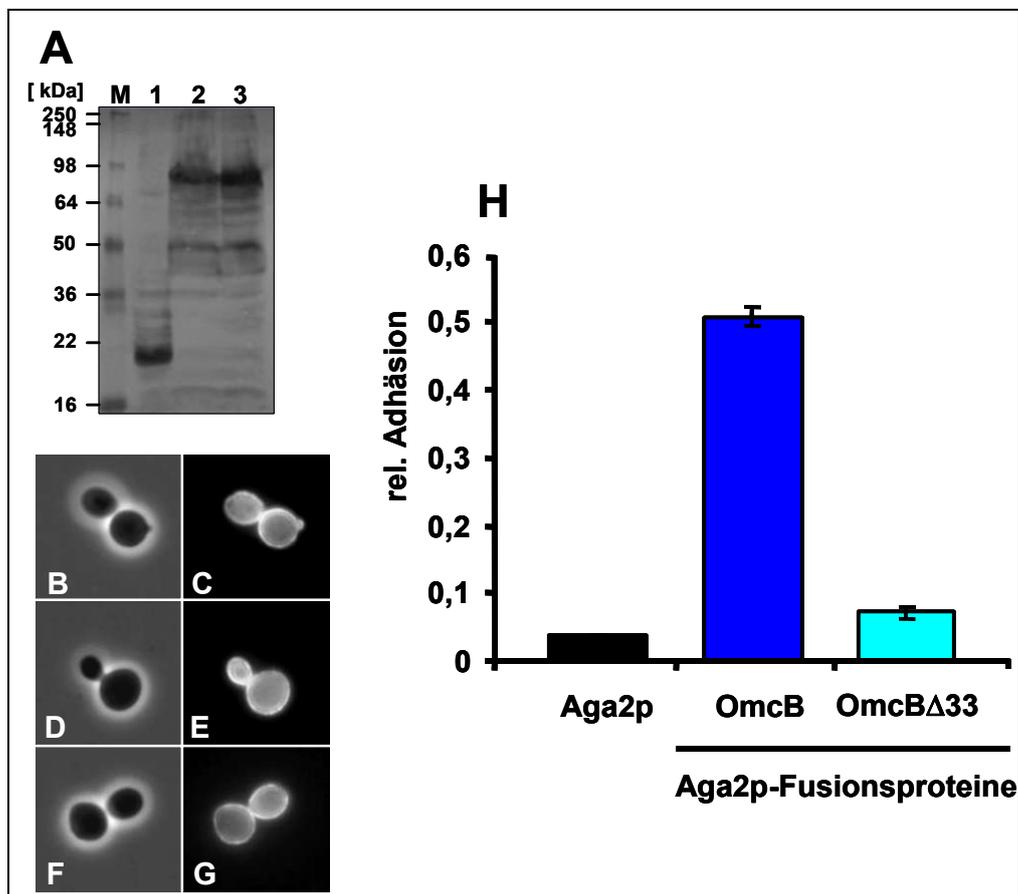


Abbildung 26: Aga2p-OmcB Δ 33 Hefen vermitteln keine Adhäsion an HEp-2 Zellen.

A) Westernblot-Analyse α -Mannosidase behandelte Proteinextrakte von Aga2p (Spur 1), Aga2p-OmcB (Spur 2) und Aga2p-OmcB Δ 33 exprimierenden Hefen (Spur 3). M: Größenstandard; B, D, F) Phasenkontrastaufnahmen; C, E, G) Immunfluoreszenzaufnahmen (63-fache Objektiv-Vergrößerung) von Aga2p (B, C); Aga2p-OmcB (D, E) und Aga2p-OmcB Δ 33 exprimierenden Hefen (F, G). H) Hefeadhäsionstests durchgeführt mit HEp-2 Zellen und Aga2p, Aga2p-OmcB und Aga2p-OmcB Δ 33 präsentierenden Hefezellen. (n=4)

Die Analyse der Adhäsivität beider Proteine zeigte deutliche Unterschiede. Während die Adhäsion der Aga2p-OmcB Hefen bei 50 % lag, zeigten Hefen, die das Aga2p-OmcB Δ 33 Fusionsprotein exprimierten, eine relative Adhäsion von nur 8 % (Abb. 26H). Folglich hat die Deletion der 33 Aminosäuren in der Heparinbindedomäne einen vollständigen Verlust der Adhäsivität des OmcB Proteins zur Folge und zeigt, dass die Aminosäuren innerhalb der Domäne essentiell für die Adhäsion des Proteins an eukaryotischen Zellen sind.

4.9. Identifizierung wichtiger basischer Aminosäuren des Heparinbindemotivs

Die Untersuchungen zum adhäsiven Verhalten der OmcB Varianten OmcB-BD und OmcB Δ 33 haben gezeigt, dass die Protein-Domäne (AS 41-79) die Adhäsion des Proteins an Heparin-ähnliche Strukturen auf der humanen Wirtszelloberfläche vermittelt. Im Folgenden sollte die Aminosäuresequenz der Heparinbindedomäne detaillierter analysiert werden, um festzustellen welche Aminosäuren wichtig für die Adhäsion des Proteins sind. Sequenzvergleiche des *C. pneumoniae* OmcB mit den OmcB Proteinen anderer

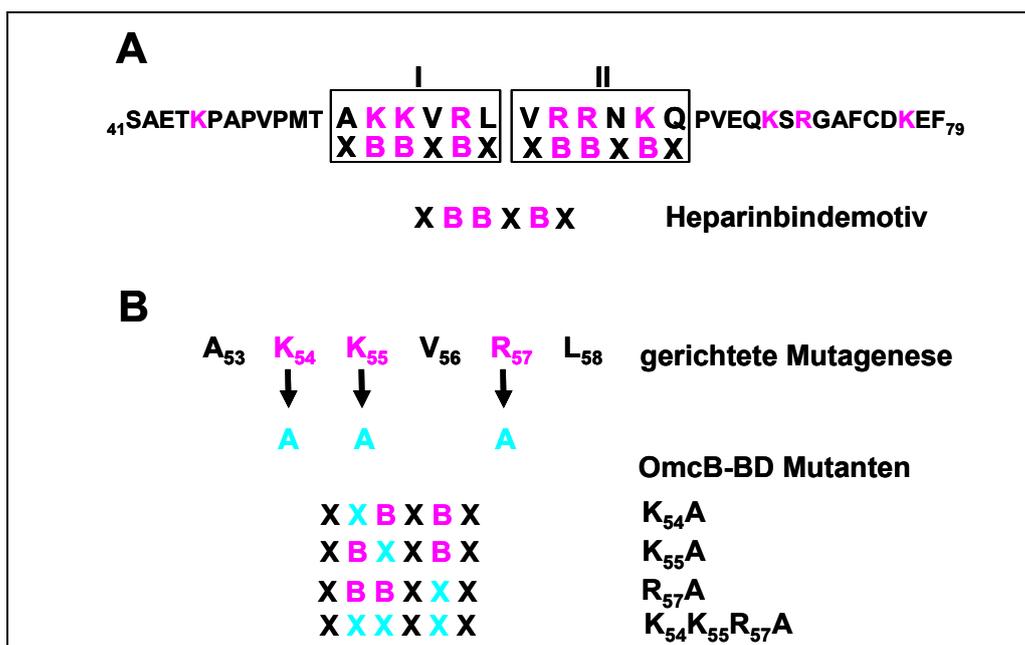


Abbildung 27: Schematische Darstellung der generierten OmcB-BD Mutanten.

A) Darstellung der Heparinbindedomäne und der darin enthaltenen Konsensus-Sequenzen I und II. B) Vorgehen bei der gerichteten Mutagenese im konservierten Heparinbindemotiv I.

Chlamydienpezies zeigten das Vorhandensein von zwei Konsensus-Sequenzen mit der Aminosäureabfolge X B B X B X (Abb. 27A) (Cardin and Weintraub 1989), (Hileman, Fromm et al. 1998). Diese Konsensus-Sequenz wurde in bioinformatischen Analysen verschiedenster Heparin-bindender Proteine ermittelt, wobei das X eine aliphatische Aminosäure repräsentiert, während das B für basische Aminosäuren wie Lysin, Argenin oder Histidin steht (Cardin and Weintraub 1989), (Hileman, Fromm et al. 1998). Die positiv

geladenen, basischen Aminosäuren des Motivs gehen elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Sulfatgruppen des Heparin ein. Das Motiv I ist konserviert in allen Chlamydienspezies, einzig bei *C. pneumoniae* ist eine Duplikation der Konsensus-Sequenz zu finden (Motiv II) (Stephens, Koshiyama et al. 2001). Um zu untersuchen, welche der basischen Aminosäuren des konservierten Heparinbindemotivs I wichtig für die Proteinfunktion sind, wurde eine gerichtete Mutagenese innerhalb dieses Motivs vorgenommen. Es wurden drei basische Aminosäuren an Position 54, 55 und 57 einzeln gegen Alanin ersetzt. Des weiteren wurde eine Dreifachmutante generiert, bei der alle drei basischen Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht wurden (Abb. 27B). Die vier verschiedenen Mutationen wurden im Aga2p-OmcB-BD Fragment eingeführt, da für diese Domäne die gleiche Funktion und Adhäsivität wie für das Vollängenprotein ermittelt werden konnte.

4.9.1. Die verschiedenen OmcB-BD Mutanten zeigen reduzierte adhäsive Eigenschaften

Mittels Westernblot-Analyse konnten die Proteinexpression der vier Aga2p-OmcB-BD Mutanten bei einer Laufhöhe von 36 kDa nachgewiesen werden (Abb. 28A, Spuren 3-6) (theoretisches Molekulargewicht 27 kDa). Die korrekte Oberflächen-Präsentation der verschiedenen mutierten Aga2p-OmcB-BD Proteine konnte über indirekte Immunofluoreszenz bestätigt werden (Abb. 28E, G, I, K). In Adhäsionstests mit HEP-2 Zellen wurde schließlich untersucht, welche Auswirkungen die Aminosäureaustausche auf

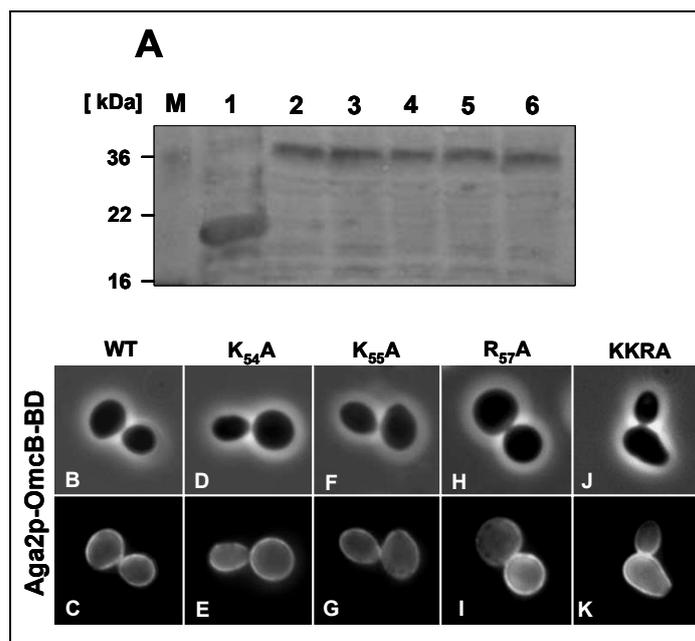


Abbildung 28: Expression verschiedener Aga2p-OmcB-BD Mutanten im Hefe-System.

A) Westernblot-Analyse α -Mannosidase behandelte Proteinextrakte von Aga2p (Spur 1), Aga2p-OmcB-BD (Spur 2), Aga2p-OmcB-BD_{K54A} (Spur 3), Aga2p-OmcB-BD_{K55A} (Spur 4), Aga2p-OmcB-BD_{R57A} (Spur 5) und Aga2p-OmcB-BD_{KKRA} (Spur 6) exprimierenden Hefen. M: Größenstandard; B, D, F, H, J) Phasenkontrastaufnahmen, C, E, G, I, K) Immunofluoreszenzaufnahmen (63-fache Objektiv-Vergrößerung) Aga2p-OmcB-BD (B, C), Aga2p-OmcB-BD_{K54A} (D, E), Aga2p-OmcB-BD_{K55A} (F, G), Aga2p-OmcB-BD_{R57A} (H, I) und Aga2p-OmcB_{KKRA} exprimierender Hefen (J, K).

die Adhäsivität des Proteins haben. Jeder vorgenommene Aminosäureaustausch übte einen reduzierenden Effekt auf die Adhäsivität des Proteins aus (Abb. 29). Der Austausch

der ersten basischen Aminosäure gegen Alanin in der Aga2p-OmcB-BD_{K54A} Mutante hatte die geringsten Auswirkungen auf die relative Adhäsion, sie lag bei 50 % gegenüber 54% für das Wildtypprotein. Für Hefezellen, die die Mutante Aga2p-OmcB-BD_{K55A} auf ihrer Oberfläche präsentierten, konnte eine relative Adhäsion von 40 % an die HEp-2 Zellen ermittelt werden, eine Reduktion der Adhäsion von 26 % verglichen mit dem Wildtyp. Eine 40 %ige Reduktion auf 32 % in der relativen Adhäsion ergab sich für Aga2p-OmcB-BD_{R57A} exprimierende Hefen. Dem gegenübergestellt zeigte sich für die Aga2p-OmcB-BD Mutante, bei der alle drei basischen Aminosäuren des Heparinbinde-Motiv I gegen Alanine ersetzt wurden, mit einer relative Adhäsion von 13 % die stärkste Reduktion. Der Dreifachaustausch wies einen vollständigen Verlust der Adhäsion auf und zeigte damit die gleiche Adhäsivität wie schon die Aga2p-OmcB Δ 33 Hefen. Demnach führt der Austausch der drei basischen Aminosäuren zu Alaninen zum Verlust der Adhäsionsfunktion des Proteins.

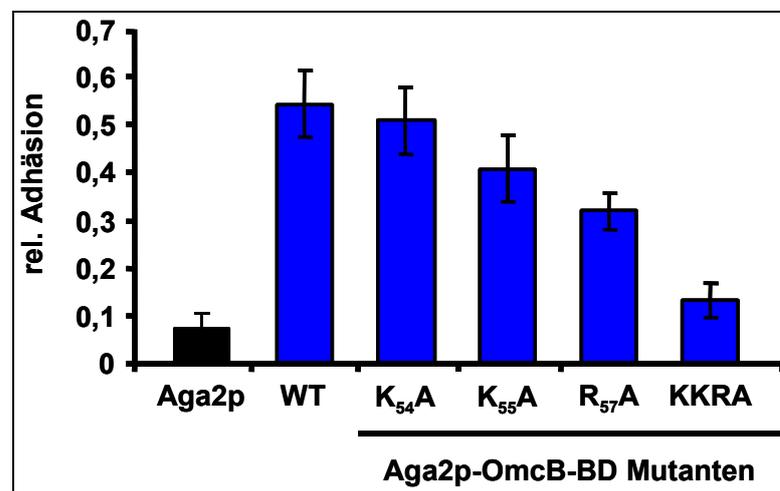


Abbildung 29: Aga2p-OmcB-BD Mutanten zeigen reduzierte adhäsive Eigenschaften.

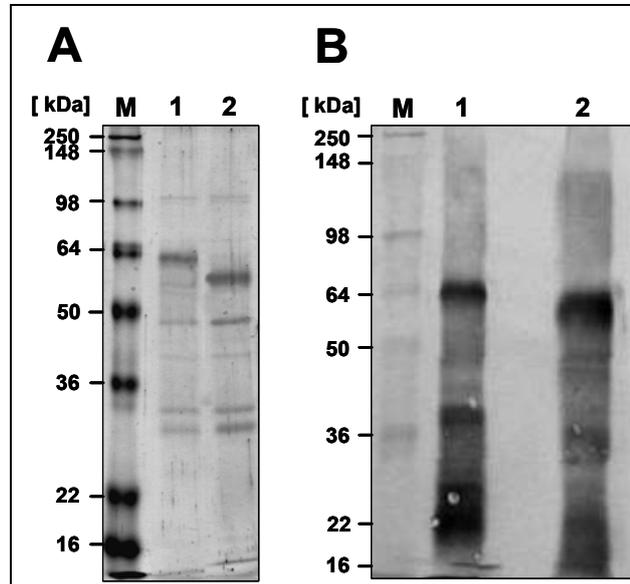
HEp-2 Zellen wurden mit Aga2p, Aga2p-OmcB-BD exprimierenden Hefezellen, sowie Hefezellen der vier verschiedenen Aga2p-OmcB-BD Mutanten inkubiert. (n=4)

4.10. Rekombinant hergestelltes OmcB_{6His} Protein zeigt Adhäsivität

Die Präsentation des Aga2p-OmcB Fusionsproteins auf der Hefeoberfläche hat gezeigt, dass es verglichen mit den entsprechenden Kontrollen eine starke Adhäsion an Humanzellen aufweist. Diese Adhäsivität sollte im weiteren auch für rekombinant hergestelltes OmcB Protein untersucht werden. Dazu wurde neben dem OmcB Vollängenprotein auch die OmcB Δ 33 Proteinvariante rekombinant in *E. coli* produziert und mittels NiNTA-Agarose affinitätschromatographisch aufgereinigt.

Die Reinheit der OmcB_{6His} und OmcBΔ33_{6His} Proteine wurde in Coomassie-gefärbten SDS-Gelen und Westernblot-Analysen überprüft (Abb. 30). Im Coomassie-gefärbten SDS-Gel konnte für das OmcB_{6His} eine Proteinbande unterhalb der 64 kDa Markerbande bei zirka 60 kDa detektiert werden (Abb.

30A, Spur 1) (theoretisches Molekulargewicht 53 kDa). Für OmcBΔ33_{6His} zeigte sich eine Proteinbande unterhalb der OmcB_{6His} Bande, bei zirka 58 kDa (Abb. 30A, Spur 2) (theoretisches Molekulargewicht 50 kDa). Die spezifischen Proteinbanden des OmcB_{6His} und des OmcBΔ33_{6His} konnten auch in der Westernblot-Analyse auf gleicher Laufhöhe wie im Coomassie-Gel detektiert werden



(Abb. 30B, Spur 1 und 2). Nach der Proteinreinigung traten zusätzlich schwache Proteinbanden auf, bei denen es sich um Verunreinigungen durch andere Proteine, sowie Degradationsfragmente des OmcB_{6His} und des OmcBΔ33_{6His} handelt (Abb. 30).

Abbildung 30: Aufreinigung von OmcB_{6His} und OmcBΔ33_{6His} aus *E. coli*.

A) Coomassie-gefärbtes 10%iges SDS-Gel B) Westernblot-Analyse eines 10 %igen SDS-Gel detektiert mit dem Anti-penta His Antikörper und dem AP-konjugierten Anti-Maus Antikörper; M: Größenstandard; Die Proteinextrakte von OmcB_{6His} (A, B Spur 1) oder OmcBΔ33_{6His} (A, B Spur 2) wurde nach affinitätschromatographischer Reinigung geladen.

Latexkugeln wurden wie unter Abschnitt 3.5.9. beschrieben, mit jeweils 100 µg/ml des rekombinanten Proteins beschichtet. Zur Bestimmung der Qualität der Beschichtung wurden jeweils 100 µl der beladenen Latexkugeln zu Proteinproben verarbeitet, um das heruntergelöste Protein mittels Westernblot-Analyse zu untersuchen (Siehe Abschnitt 3.5.9.2.). Für die OmcB_{6His} beschichteten Latexkugeln mit konnte bei zirka 60 kDa (Abb. 31A, Spur 2) eine Proteinbande detektiert werden, für OmcBΔ33_{6His} wurde eine Proteinbande gleicher Intensität bei zirka 58 kDa nachgewiesen (Abb. 31A, Spur 3).

Im Anschluss an die Überprüfung der Beschichtungsqualität wurden Bead-Assays wie unter Abschnitt 3.5.9.3. beschrieben, mit eukaryotischen HEP-2 Zellen durchgeführt. Dabei wurden pro eingesetzter HEP-2 Zelle 100 Protein-beschichtete Latexkugeln (MOI 100) verwendet. BSA beschichtete Latexkugeln zeigten mit einer relativen Adhäsion von 5 % an HEP-2 Zellen nur schwache adhäsive Eigenschaften (Abb. 31F). Wurden die Kugeln hingegen mit dem OmcB_{6His} Protein beschichtet, so resultierte dies in einer relativen Adhäsion von 73 %.

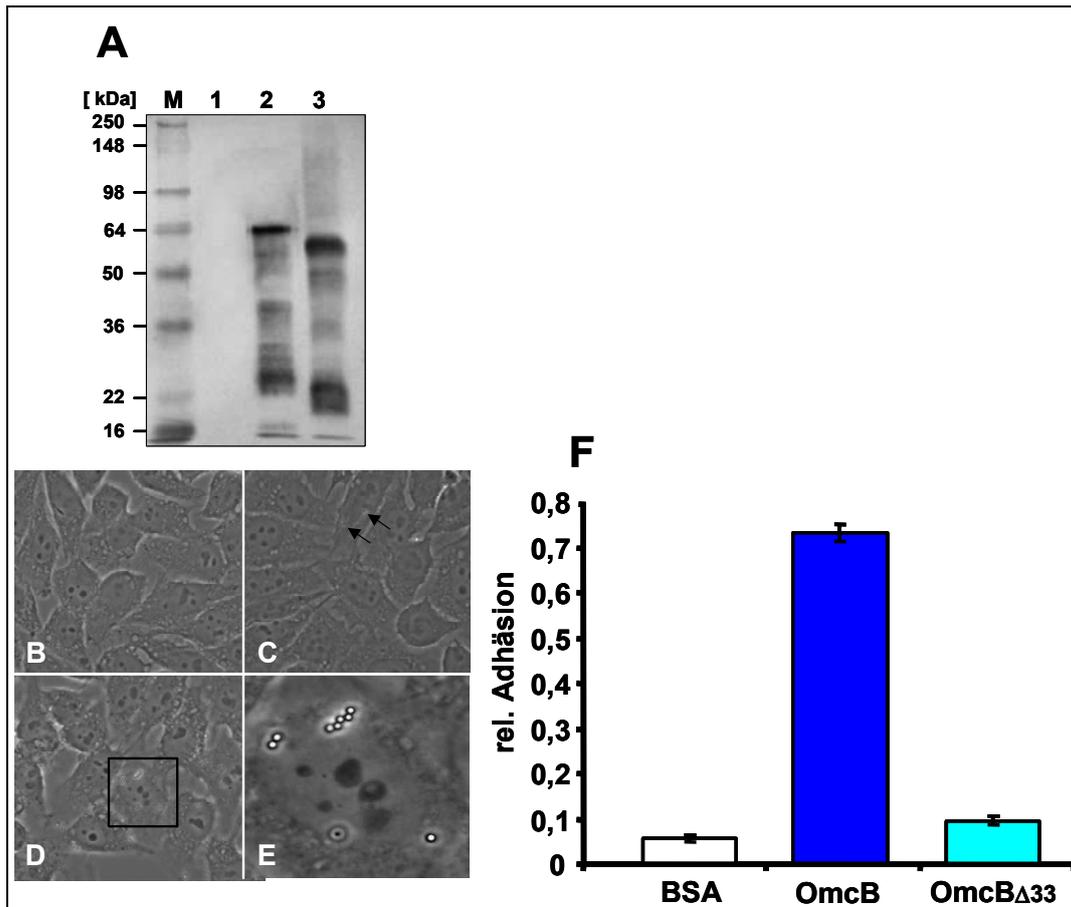


Abbildung 31: Adhäsion von OmcB_{6His} oder OmcB Δ 33_{6His} beschichteten Latexkugeln an eukaryotische Zellen.

A) Westernblot-Analyse zur Prüfung der Beschichtungsqualität der Latexkugeln; M: Größenstandard; Latexkugeln beschichtet mit BSA (Spur 1), OmcB_{6His} (Spur 2) und OmcB Δ 33_{6His} Protein (Spur 3). B-E) Phasenkontrastaufnahmen von Bindungstests mit HEp-2 Zellen und BSA (B), OmcB Δ 33_{6His} (C) und OmcB_{6His} (D) beschichtete Latexkugeln (63-fache Objektiv-Vergrößerung). In einer Ausschnittsvergrößerung (E) des in D gezeigten Bereiches, ist die Adhäsion der OmcB_{6His} beschichteten Latexkugeln gezeigt. F) Quantitative Auswertung der Adhäsionsexperimente durchgeführt mit 1×10^5 HEp-2 Zellen und einem 100-fachen Überschuss an Protein-beschichteten Latexkugeln. (n=4)

Die Verwendung des OmcB Δ 33_{6His} zur Beschichtung der Latexkugeln zeigte deutlich, dass dieses Protein keine signifikante Adhäsion an humane Zellen vermittelt, es konnte lediglich eine relative Adhäsion von 10 % festgestellt werden. Dies bedeutet rekombinant hergestelltes OmcB_{6His} Protein verfügt über signifikante adhäsive Eigenschaften, die durch Deletion von 33 Aminosäuren aus der Heparinbindedomäne des Proteins vollständig verloren gehen.

Um die relative Adhäsion des OmcB_{6His} Proteins genauer zu untersuchen, wurde eine Konzentrationskinetik aufgenommen. Hierbei wurden die Latexkugeln mit verschiedenen OmcB_{6His} Konzentrationen (12,5 μ g/ml bis 100 μ g/ml) beschichtet und ihre Adhäsivität in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration analysiert.

Die Westernblot-Analyse der Protein beladenen Latexkugeln zeigte für OmcB_{6His} ein spezifisches Signal bei zirka 60 kDa (Abb. 32A, Spuren 2-5). Die Intensität der Proteinbande nimmt dabei von links nach rechts mit steigender Proteinmenge zu. In

Bindungstests mit humanen HEp-2 Zellen wurde für BSA beladene Latexkugeln eine relative Adhäsion von 7 % ermittelt (Abb. 32B). Wurden 100 µg/ml OmcB_{6His} Protein zu Beschichtung der Kugeln eingesetzt, resultierte dies in einer relativen Adhäsion von 76 %. Die Halbierung der Proteinkonzentration auf 50 µg/ml reduzierte die relative Adhäsion auf 50 %. Eine weitere 50%ige Reduktion der OmcB_{6His} Proteinkonzentration (25 µg/ml), hatte eine relative Adhäsion von nur noch 32 % zur Folge. Der Einsatz von 12,5 µg/ml OmcB_{6His} Protein führte zu einer relativen Adhäsion von 14 % der Latexkugeln an die HEp-2 Zellen. Die Aufnahme dieser Konzentrationskinetik zeigt, dass schon geringe Mengen des OmcB_{6His} Proteins ausreichen, um Adhäsion an humane Zellen zu vermitteln. Die Stärke der Adhäsion ist abhängig von der Proteinmenge auf den Latexkugeln.

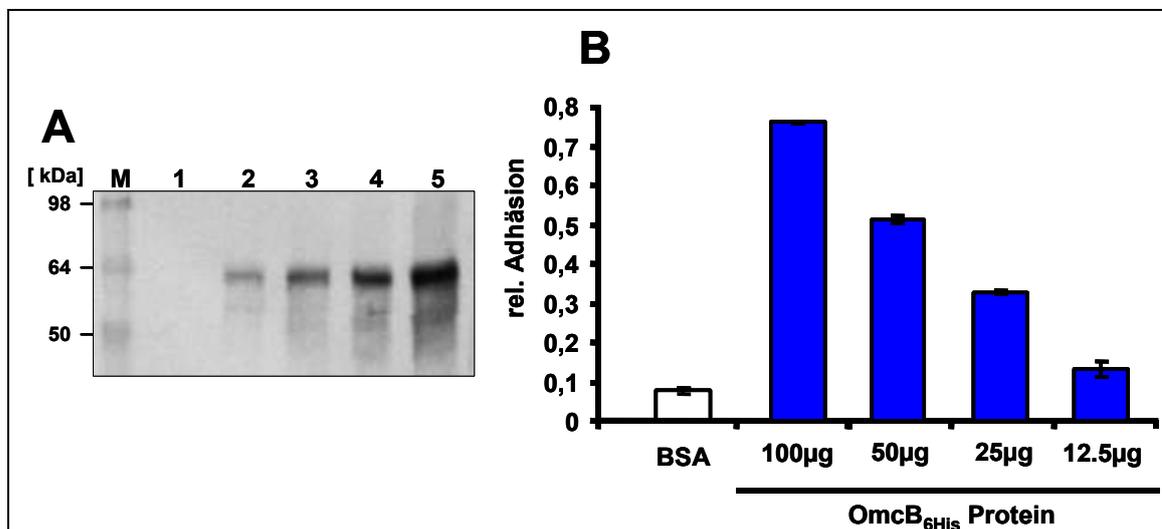
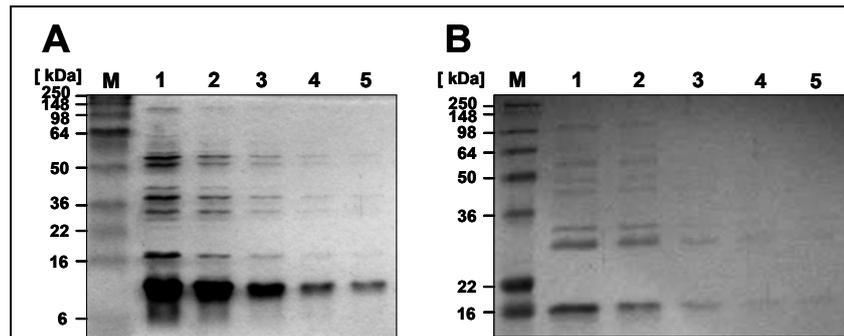


Abbildung 32: Einfluss der OmcB_{6His} Proteinkonzentration auf die Adhäsion.

A) Westernblot-Analyse zur Kontrolle der Beschichtungsqualität, detektiert mit dem Anti-penta His Antikörper und dem AP-konjugierten Anti-Maus Antikörper; M: Größenstandard; BSA (Spur 1) und OmcB_{6His} beschichtete Kugeln. Eingesetzte Proteinkonzentrationen: 12,5µg/ml (Spur 2), 25µg/ml (Spur 3), 50µg/ml (Spur 4), 100µg/ml (Spur 5). B) Quantitative Auswertung der Adhäsionsexperimente. (n=4)

Die Mutationsanalyse der basischen Aminosäuren im Heparinbinde-Motiv I des OmcB-BD Fragments hat gezeigt, dass die verschiedenen Aminosäureaustausche eine mehr oder weniger starke Reduktion der Adhäsion von Aga2p-OmcB-BD präsentierenden Hefen zur Folge hat (Abb. 29). Die Generierung der Dreifach-Mutante Aga2p-OmcB-BD_{KKRA} führte dabei zur deutlichsten Reduktion der Adhäsion. Es stellte sich daher die Frage, ob auch rekombinant hergestelltes OmcB-BD_{KKRA} im Vergleich zum Wildtyp-Kontrollprotein OmcB-BD eine reduzierte Adhäsivität aufweist.

Beide Proteine wurden in *E. coli* produziert und affinitätschromatographisch gereinigt (Siehe Abschnitt 3.5.2 und 3.5.3.). Im



Coomassie-gefärbten SDS-Gel konnte für OmcB-BD_{6His} eine Proteinbande auf einer Laufhöhe von

Abbildung 33: Aufreinigung von OmcB-BD_{6His} und OmcB-BD-KKRA_{6His} aus *E. coli*.

A, B) Coomassie-gefärbte 10%ige SDS-Gele; M: Größenstandard; Elutionsfraktionen (1-5) der affinitätschromatographischen Proteinreinigung von OmcB-BD_{6His} (A, Spuren 1-5) oder OmcB-BD-KKRA_{6His} (B, Spuren 1-5) aus *E. coli*.

zirka 11 kDa nachgewiesen werden (Abb. 33A, Spuren 1-5) (theoretisches Molekulargewicht 7 kDa). Die Proteinbande des OmcB-BD_{KKRA} konnte bei 16 kDa detektiert werden, die Intensität der Banden spiegelte dabei die geringere Proteinausbeuten wieder (Abb. 33B, Spur 1-5) (theoretisches Molekulargewicht 7 kDa). Für beide Proteine wurden in Westernblot-Analysen spezifische Proteinbanden auf gleicher Laufhöhe wie schon im Coomassie-gefärbten SDS-Gel detektiert (Daten nicht gezeigt). Nach der Reinigung beider OmcB-BD Varianten wurde die Adhäsion der Proteine in Bindungstests mit Proteinbeschichteten Latexkugeln untersucht. Die Kontrolle der Beschichtungsqualität ergab gleichmäßige Proteinsignale, für OmcB-BD_{KKRA} beschichteten Latexkugeln wurde bei zirka 6 kDa ein zusätzliches Degradationsprodukt des Proteins detektiert (Abb. 34 A).

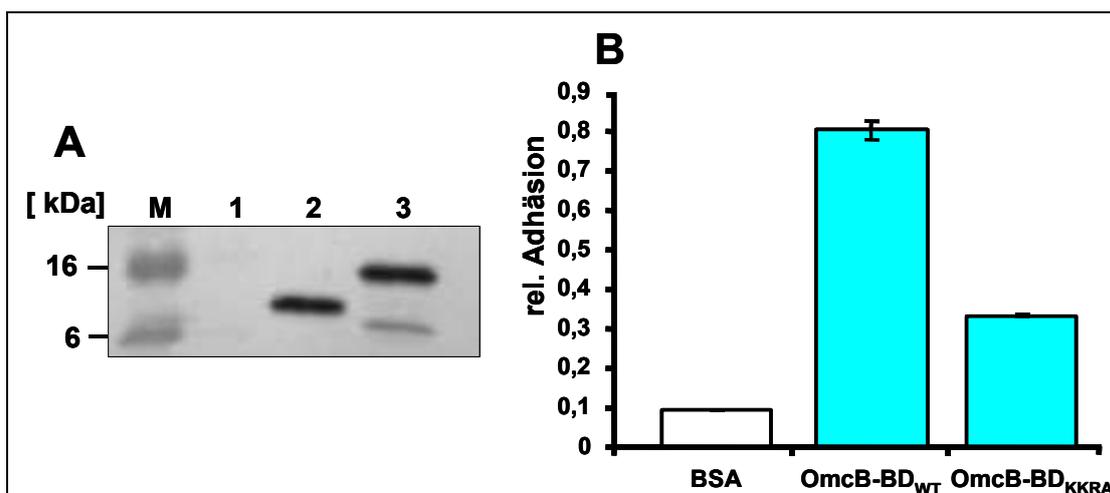


Abbildung 34: Die OmcB-BD_{KKRA} Mutante zeigt eine reduzierte Adhäsion im Vergleich zum Wildtyp.

A) Ausschnittsvergrößerung der Westernblot-Analyse zur Kontrolle der Beschichtungsqualität. M: Größenstandard; Proteinproben von BSA (Spur 1), OmcB-BD_{6His} (Spur 2) und OmcB-BD-KKRA_{6His} (Spur 3) beschichteten Kugeln wurden geladen. B) Quantitative Auswertung der Adhäsionsexperimente. (n=4)

Die Quantifizierung der Bindungstests zeigte für Latexkugeln, beschichtet mit BSA, eine relative Adhäsion von 10 % (Abb. 34 B). Latexkugeln, die mit dem OmcB-BD Wildtypprotein beladen wurden, zeigten eine relative Adhäsion von 80 % an die HEp-2 Zellen. Der Einsatz des OmcB-BD_{KKRA} Proteins resultierte in einer relativen Adhäsion von 32 %. Die Dreifach-Mutation im OmcB-BD_{KKRA} führt demnach zu einer 60%igen Reduktion der Adhäsivität des Proteins und bestätigt die im Hefe-System erhaltenen Daten.

4.11. Vorbehandlung der Humanzellen mit OmcB_{6His} Protein reduziert die *C. pneumoniae* Infektion

Die Daten aus dem Hefe-System und die Ergebnisse mit rekombinantem Protein weisen auf eine starke Adhäsivität des *C. pneumoniae* OmcB Proteins hin. Dies bedeutet, dass das OmcB im Infektionsprozess eine wichtige Rolle spielen könnte. Um den Einfluss des Proteins auf die Infektion zu untersuchen und die Daten über die Funktion des OmcB Proteins als Oberflächen-lokalisierter Adhäsion weiter zu unterstützen, wurden im Folgenden Neutralisations-Experimente mit dem rekombinant hergestellten OmcB_{6His} Protein durchgeführt. Dabei wurden humane Zellen mit dem rekombinanten Protein vorinkubiert, bevor sie mit Gradienten-gereinigten *C. pneumoniae* EBs infiziert wurden (Siehe Abschnitt 3.5.10.).

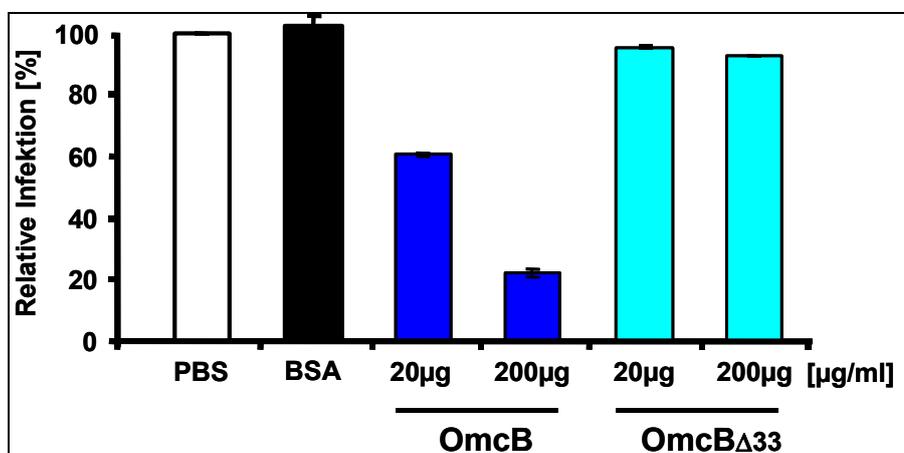


Abbildung 35: Reduktion der *C. pneumoniae* Infektion mittels OmcB_{6His} Protein.

Quantifizierung des Protein-Neutralisations-Experiments. HEp-2 Zellen wurden mit PBS, BSA (200µg/ml), rekombinant hergestelltem OmcB_{6His} (20µg/ml, 200µg/ml) oder OmcB Δ 33_{6His} (20µg/ml, 200µg/ml) Protein inkubiert, bevor sie mit gereinigten *C. pneumoniae* EBs (MOI 100) infiziert wurden. Nach 48h wurde die Infektion mit Methanol fixiert und die Zahl der gebildeten Einschlüsse, wurden unter Verwendung eines FITC-konjugierten Antikörpers, gerichtet gegen das chlamydiale LPS bestimmt. (n=4)

Im experimentellen Ansatz wurde der Einfluss des OmcB_{6His} Proteins auf die Infektion mit dem des OmcB Δ 33_{6His} Proteins verglichen. Die beiden Proteinen wurden jeweils in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (20 µg/ml und 200 µg/ml) in die Experimente eingesetzt, um einen möglichen Konzentrations-abhängigen Unterschied auf die Infektion

sichtbar zu machen. Die Anzahl der gebildeten Einschlüsse nach PBS Behandlung der Zellen wurde auf 100 % gesetzt (Abb. 35). Die Vorinkubation der humanen Zellen mit 200 µg/ml BSA führte nicht zu einer Infektionsreduktion. Im Gegensatz dazu reduziert der Einsatz von 20 µg/ml OmcB_{6His} Protein zur Vorbehandlung der HEp-2 Zellen die Infektion auf 60 %. Die relative Infektion konnte im Vergleich zur Kontrolle (PBS-Puffer) um weitere 80 % reduziert werden, wurde die eingesetzte OmcB_{6His} Proteinmenge auf 200 µg/ml erhöht. Vorbehandlung mit dem OmcB Δ 33_{6His} Protein führte zu einer relativen Infektion von 96 % (20 µg/ml) und 93 % (200 µg/ml). Mit Hilfe dieses Experiments konnte gezeigt werden, dass das rekombinant hergestellte OmcB_{6His} Protein einen inhibitorischen Effekt auf die *C. pneumoniae* Infektion ausübt. Dieser Effekt konnte auch durch die Verwendung des rekombinant hergestellten OmcB-BD bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu hat die Deletionsvariante OmcB Δ 33_{6His} keinen signifikanten Einfluss auf die Infektion. Nur funktionsfähiges OmcB Protein kann die Funktion des chlamydialen Proteins bei der Infektion inhibieren. Somit scheint OmcB als GAG-bindendes Adhäsion eine wichtige Rolle bei der *C. pneumoniae* Infektion zu spielen.

4.12. Vorbehandlung der *C. pneumoniae* EBs mit dem OmcB-Serum reduziert ebenfalls die Infektion

Durch die Vorbehandlung der Humanzellen mit dem rekombinanten OmcB Protein konnte die *C. pneumoniae* Infektion signifikant reduziert werden. Um die Funktion des OmcB im Infektionsprozess von *C. pneumoniae* weiter zu bestätigen, sollte als nächstes das Protein auf der chlamydialen Oberfläche spezifisch inhibiert werden. Mit einem OmcB spezifischen Antikörper sollte die Bindung des Proteins an die Heparin-ähnlichen Strukturen auf der Wirtszelle unterbunden werden.

Um diese Untersuchungen durchzuführen, wurde ein OmcB Antikörper als polyklonales Serum im Kaninchen hergestellt. Für die Immunisierung wurde das OmcB_{6His} Protein in *E. coli* produziert und affinitätschromatographisch gereinigt (Siehe Abschnitt 3.5.12.).

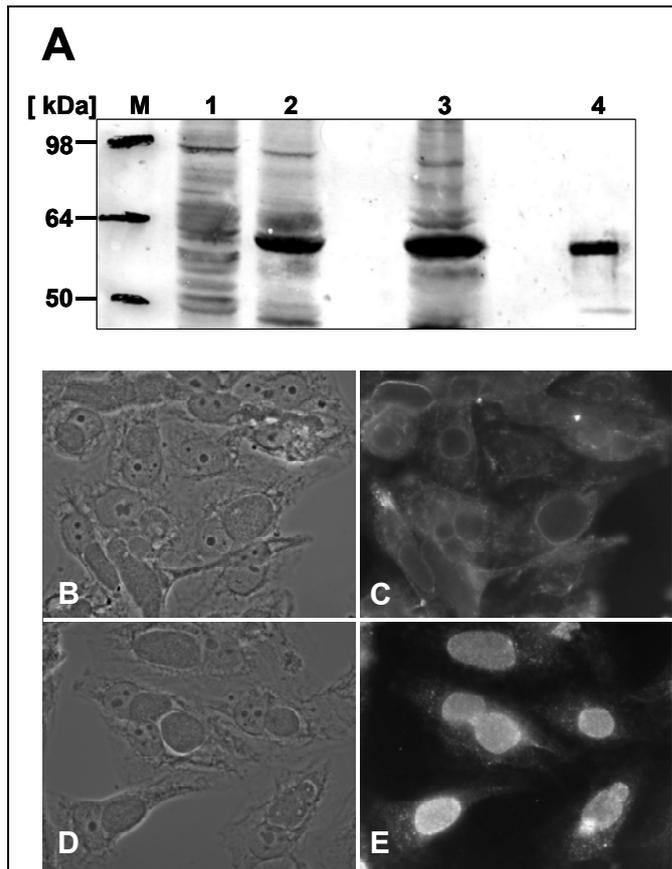


Abbildung 36: Nachweis der Spezifität des polyklonalen OmcB-Serums.

A) Westernblot-Analyse eines 10 %igen SDS-Gels detektiert mit dem voradsorbierten, polyklonalen OmcB-Serum (1:2000 verd.) und dem AP-konjugierten Anti-Kaninchen Antikörper (1:7500 verd.); M: Größenstandard; Proteinextrakte von nicht-infizierten HEp-2 Zellen (A, Spur 1), von *C. pneumoniae* infizierten HEp-2 Zellen (A, Spur 2), sowie Proteinextrakt aus gereinigten *C. pneumoniae* EBs (A, Spur 3) und gereinigtes OmcB_{6His} Protein (A, Spur 4); B-E) Phasenkontrast und Immunfluoreszenzaufnahmen von *C. pneumoniae* infizierten HEp-2 Zellen (63-fache Objektiv-Vergrößerung). Die Zellen wurden 48 h nach der Infektion mit Methanol fixiert. Zur Detektion wurde das Präimmunserum (B, C) (1:250 verd.) oder das auf HEp2-Zellen abgereicherte OmcB-Serum (D, E) (1:250 verd.) eingesetzt.

Die Spezifität des OmcB Immunserums wurde mittels Westernblot-Analyse und indirekter Immunfluoreszenz *C. pneumoniae* infizierter und nicht-infizierter HEp-2 Zellen überprüft (Abb. 36). Dazu wurde das OmcB-Serum zunächst auf HEp-2 Zellen bzw. HEp-2 Zellextrakten vorgereinigt. In der Westernblot-Analyse konnte mit dem OmcB-Immunserum ein unspezifisches Bandenmuster für den Proteinextrakt nicht-infizierter HEp-2 Zellen beobachtet werden (Abb. 36A, Spur 1). Dieses Bandenmuster basiert auf der Kreuzreaktion des polyklonalen OmcB-Serums mit Proteinen der eukaryotischen Zelle. Im Gegensatz dazu konnte in *C. pneumoniae* infizierten Zellen eine prominente Proteinbande bei 60 kDa, dem Molekulargewicht von OmcB entsprechend, nachgewiesen werden (Abb. 36A, Spur 2). Eine ebenso intensive 60 kDa Proteinbande ließ sich im Proteinextrakt Gradienten-

gereinigter Chlamydien nachweisen (Abb. 36A, Spur 3). Wie erwartet detektierte das OmcB-Serum auch das gereinigte OmcB_{6His} Protein bei 60 kDa (Abb. 36A, Spur 4). In allen Proben traten zusätzliche Hintergrundbanden auf, die auf der Kreuzreaktion mit humanen bzw. *E. coli* Proteinen beruhen.

Als nächstes wurde durch indirekte Immunfluoreszenz der Nachweis des OmcB Proteins in *C. pneumoniae* infizierten HEp-2 Zellen erbracht. Die Verwendung des OmcB-Präimmunserums zeigte, dass verschiedene Strukturen der HEp-2 Zellen angefärbt wurden, jedoch keine Anfärbung des chlamydialen Einschlusses erfolgte (Abb. 36C). Wurde hingegen das OmcB-Immunserum eingesetzt, so zeigte sich eine deutliche

Anfärbung der Chlamydien-gefüllten Einschlüsse (Abb. 36E). Die immunologischen Analysen zeigten, dass das OmcB-Immuneserum spezifisch mit dem chlamydialen OmcB Protein reagiert.

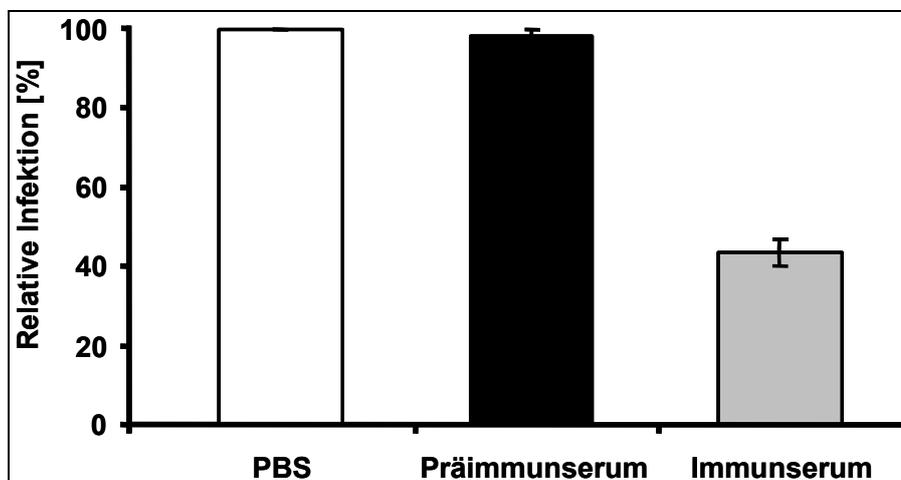


Abbildung 37: Reduktion der chlamydialen Infektion durch Einsatz des OmcB Serums.

Quantifizierung des Antikörper-Neutralisations-Experiments. Gereinigte *C. pneumoniae* EBs (MOI 100) wurden mit PBS, dem Präimmuneserum (1:250 verd.) oder dem auf HEp-2 Zellen abgereicherten OmcB Immuneserum (1:250 verd.) inkubiert, bevor sie zur Infektion von HEp-2 Zellen eingesetzt wurden. Die Infektion wurde nach 48h mit Methanol fixiert und die Zahl der gebildeten Einschlüsse wurde unter Verwendung des FITC-konjugierten Primär-Antikörpers (Pathfinder, 1:4 verd.) bestimmt. (n=4)

Im Neutralisations-Experiment wurden schließlich *C. pneumoniae* EBs entweder mit PBS, dem OmcB-Präimmuneserum oder dem Immuneserum inkubiert und dann zur Infektion von HEp-2 Zellen eingesetzt. Die Einschlussbildung nach PBS-Behandlung der *C. pneumoniae* EBs wurde auf 100% gesetzt (Abb. 37). Nach der Vorinkubation der Chlamydien mit dem Präimmuneserum konnte eine relative Infektiösität von 98 % festgestellt werden die zeigte, dass ein Serum per se keinen signifikanten Einfluss auf die Infektion ausübt. Wurden die gereinigten *C. pneumoniae* Partikel jedoch mit dem OmcB-Serum vorbehandelt, reduzierte sich die relative Infektiösität auf 42 % im Vergleich zur Kontrolle (Präimmuneserum).

Das Protein kann aufgrund der Antikörperbindung nicht mehr mit seinem Bindungspartner auf der humanen Zelle interagieren, was eine partielle Inhibierung der Infektion zur Folge hat. Damit zeigt das Experiment, dass OmcB der chlamydialen Zelloberfläche eine wichtige Rolle im Infektionsprozess spielt.

4.13. Das chlamydiale OmcB Protein vermittelt die Adhäsion von Chlamydien an Humanzellen

Die bisher durchgeführten Experimente belegen, dass das OmcB eine wichtige Funktion bei der *C. pneumoniae* Infektion inne hat. In beiden Neutralisations-Experimenten scheint der eingesetzte Inhibitor, der Antikörper oder das rekombinante Protein, die Funktion des

OmcB Proteins im Infektionsprozess zu inhibieren. Um experimentell die Frage zu klären, in wie weit das OmcB Protein direkt bei der Adhäsion von *C. pneumoniae* EBs an Humanzellen eine Rolle spielt, wurden ELISA-basierte Adhäsionsstudien durchgeführt (Siehe Abschnitt 3.5.11.). Mit dieser Methode wurde die Adhäsion der Chlamydien an die humane Wirtszelle gemessen und der Einfluss verschiedener Komponenten auf die Adhäsion untersucht.

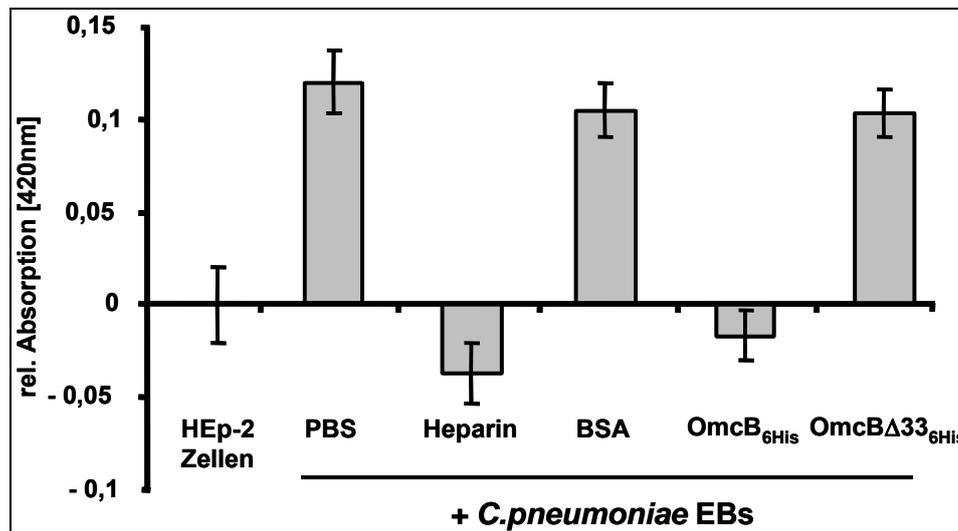


Abbildung 38: Der Einfluss von OmcB bei Adhäsion von *C. pneumoniae*.

Quantifizierung des ELISA-Experiments zur Messung der Adhäsion von *C. pneumoniae* EBs an humane Zellen. HEp-2 Zellen wurden 1h bei 37°C mit PBS, BSA (200µg/ml), OmcB_{6His} (200µg/ml) oder OmcBΔ33_{6His} (200µg/ml) Protein inkubiert. Anschließend wurden gereinigte *C. pneumoniae* EBs (MOI 100) zugesetzt und für eine weitere Stunde inkubiert. Heparin (~600µg/ml) wurde zusammen mit den EBs zu den Zellen gegeben. Die Detektion der gebundenen Chlamydien erfolgte unter Verwendung des *C. pneumoniae* spezifischen Primär-Antikörpers (Mab-Gemisch, 1:500 verd.) und des HRP-konjugierten Anti-Kaninchen Antikörpers (1:2000 verd.). Die Farbentwicklung wurde mittels der Turbo TMB Lösung durchgeführt und photometrisch bei 420nm gemessen. (n=6)

Für die Adhäsion von Chlamydien an PBS-behandelte HEp-2 Zellen (PBS) konnte eine relative Absorption von 0,125 (+/- 0,014) festgestellt werden (Abb. 38). Wurde Heparin zugesetzt, so konnte keine Adhäsion mehr beobachtet werden. Es wurde eine relative Absorption von -0,04 (+/- 0,014) gemessen, die bezogen auf die Standardabweichung im Bereich der Negativkontrolle (HEp-2 Zellen; 0, +/- 0,02) lag. Für BSA vorbehandelte Humanzellen wurde eine relative Absorption von 0,105 (+/- 0,015) ermittelt, die zeigt, dass dieses unspezifische Protein keinen negativen Effekt auf die Bindung der Chlamydien an die Wirtszelle hatte. Behandelte man die HEp-2 Zellen jedoch mit dem OmcB_{6His} Protein vor, so zeigte sich eine ebenso deutliche Reduktion der Adhäsion wie bei der Verwendung von Heparin. OmcB_{6His} vorbehandelte Zellen wiesen eine relative Absorption von -0,017 (+/- 0,013) auf. Wurden die humanen Zellen hingegen mit dem OmcBΔ33_{6His} Protein vorinkubiert, lag die beobachtete relative Absorption von 0,103 (+/- 0,013) im Bereich der BSA-Kontrolle.

Die Experimente bestätigen, dass es sich beim *C. pneumoniae* OmcB um das Adhäsion handelt, welches die Adhäsion der Bakterien an die eukaryotische Wirtszelle vermittelt. Dabei bindet es über die N-terminale Heparinbindedomäne an Heparansulfat-Strukturen der humanen Zelloberfläche. Durch Inhibierung der Interaktion zwischen OmcB und den GAG-Strukturen der Wirtszelle kann die Adhäsion der Chlamydien aufgehoben werden und als Folge daraus ergibt sich eine Reduktion der Infektion.

4.14. Die OmcB Proteine der chlamydialen Spezies *C. trachomatis* LGV und E sowie *C. psittaci* GPIC zeigen Adhäsion an humane Zellen

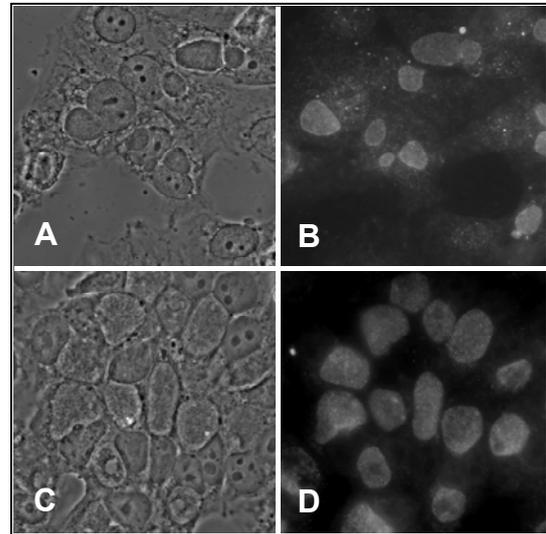
Für das *C. pneumoniae* OmcB konnte unter der Verwendung verschiedenster Modellsysteme gezeigt werden, dass es ein Oberflächen-lokalisiertes, chlamydiales Adhäsion ist, welches eine wichtige Funktion beim GAG-abhängigen Adhäsionsprozess ausübt. Das OmcB Protein weist eine starke Aminosäureidentität zwischen den einzelnen Spezies auf (Tabelle 1). Dies lässt vermuten, dass auch die Funktion des OmcB als chlamydiales Adhäsion bei den verschiedenen Chlamydienarten konserviert ist. Im Folgenden sollte daher die Frage geklärt werden, ob das homologe OmcB Protein anderer chlamydialer Spezies eine ebenso wichtige Funktion bei der Adhäsion ausübt. Wichtig war dabei insbesondere die Berücksichtigung der GAG-abhängigen oder unabhängigen Infektion der unterschiedlichen Spezies. Arbeiten anderer Gruppen hatten ergeben, dass die Infektion von *C. psittaci* GPIC Heparin-abhängig reduziert werden kann, während für die *C. trachomatis* Serovare LGV und E ein durchaus unterschiedliches Verhalten beschrieben wurde (Taraktchoglou, Pacey et al. 2001), (Gutierrez-Martin, Ojcius et al. 1997), (Davis and Wyrick 1997). Während das Serovar LGV Heparin-abhängig infiziert, konnte für Serovar E eine völlig unabhängige oder eine partielle Abhängigkeit von GAGs während der Infektion nachgewiesen werden (Taraktchoglou, Pacey et al. 2001), (Davis and Wyrick 1997). Daher sollte untersucht werden, in wie weit die Unterschiede in der GAG-abhängigen Infektion der verschiedenen Spezies an der Adhäsionsfunktion des OmcB Proteins festgemacht werden konnten. Hierzu wurden die adhäsiven Eigenschaften der OmcB Proteine der Spezies *C. trachomatis* Serovar LGV und E, sowie des *C. psittaci* Biovars GPIC untersucht.

Interessanterweise zeigen die OmcB Proteine von *C. trachomatis* Serovar LGV und E eine 98%ige Aminosäureidentität (Tabelle 1), obgleich der GAG-abhängige Infektionsverlauf der Serovare jedoch sehr unterschiedlich ist (Taraktchoglou, Pacey et al. 2001), (Davis and Wyrick 1997).

4.14.1. Lokalisierung der OmcB Proteine von *C. trachomatis* Serovar LGV und E in infizierten Zellen

Für die Funktion als Adhäsion ist die Frage der Zugänglichkeit eines Proteins auf der Zelloberfläche von entscheidender Bedeutung. Deshalb wurde zunächst die Lokalisierung des OmcB Proteins beider *C. trachomatis*

Serovare mittels indirekter Immunfluoreszenz in Einschlüssen infizierter Zellen studiert. Aufgrund der großen Homologie zwischen dem *C. pneumoniae* Protein und den beiden *C. trachomatis* Proteinen, wurde der *C. pneumoniae*-spezifische polyklonale OmcB-Antikörper zur Detektion eingesetzt. Beide *C. trachomatis* OmcB Proteine wiesen in den Lokalisationsstudien eine deutliche Kreuzreaktion mit dem verwendeten



Antikörper auf (Abb. 39). Die mikroskopischen Analysen zeigten, dass die Chlamydien-gefüllten Einschlüsse von HEp-2 Zellen infiziert mit *C. trachomatis* Serovar E (Abb. 39B) oder *C. trachomatis* Serovar LGV (Abb. 39D) angefärbt werden konnten. Die Art der angewandten Fixierung legt nahe, dass das OmcB Protein auf der Zelloberfläche der Chlamydien detektiert wurde.

Abbildung 39: Lokalisierung der OmcB Proteine der *C. trachomatis* Serovare LGV und E.

A,C) Phasenkontrastaufnahmen, B, D) Immunfluoreszenzaufnahmen von Formaldehyd-fixierten und permeabilisierten HEp-2 Zellen (63-fache Objektiv-Vergrößerung). Die HEp-2 Zellen wurden mit *C. trachomatis* Serovar E (A, B) oder Serovar LGV (C, D) infiziert und nach 48h bzw. 24h fixiert. Die Detektion des OmcB Proteins erfolgte unter Verwendung des polyklonalen *C. pneumoniae* OmcB-Serums und des Cy3-konjugierten Anti-Kaninchen Antikörpers.

4.14.2. Die verschiedenen OmcB Proteine zeigen unterschiedliche adhäsive Eigenschaften

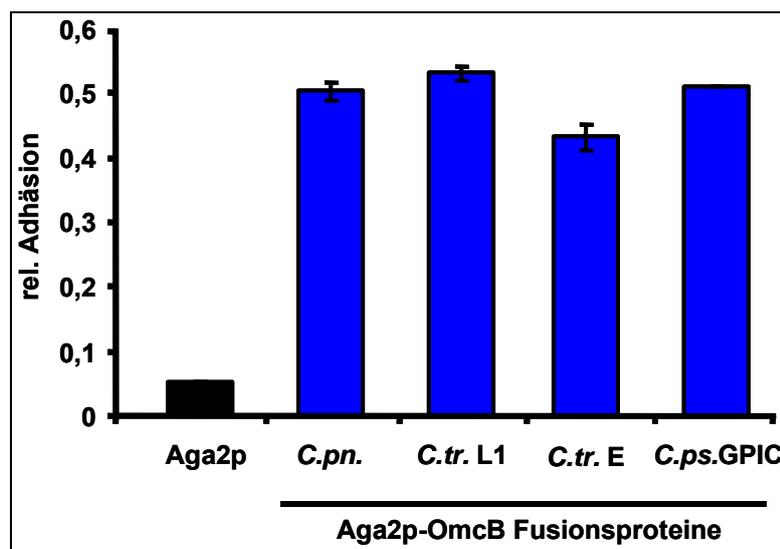
Für beide *C. trachomatis* OmcB Proteine konnte die Lokalisierung auf der chlamydialen Zelloberfläche gezeigt werden. In Ermangelung des Erregers konnten keine Lokalisationsstudien mit *C. psittaci* Biovar GPIC durchgeführt werden. In früheren biochemischen Analysen zum OmcB von *C. psittaci* GPIC konnte jedoch die Oberflächen-Lokalisierung eines N-terminalen Proteinfragments nachgewiesen (Ting, Hsia et al. 1995). Daher ist wahrscheinlich, dass auch dieses OmcB auf der Chlamydienoberfläche lokalisiert ist.

Um die adhäsiven Eigenschaften der verschiedenen OmcB Proteine zu analysieren, wurde in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Dr. A. Eley (Universität Sheffield,

England) und Dr. R. Rank (Universität Arkansas, USA) das *omcB* Gen aus genomischer DNA von *C. trachomatis* LGV und E bzw. von *C. psittaci* GPIC amplifiziert. Mittels homologer *in vivo* Rekombination wurden die verschiedenen *omcB* Gene in den Expressionsvektor pYD1 kloniert. Die generierten Fusionsproteine werden im Folgenden Aga2p-OmcB-L1 (*C. trachomatis* Serovar LGV), Aga2p-OmcB-E (*C. trachomatis* Serovar E) und Aga2p-OmcB-GPIC (*C. psittaci* Biovar GPIC) genannt.

Alle Fusionsproteine wurden in der Hefe exprimiert und zeigten eine Lokalisierung auf der Hefezelloberflächen (Abb. 56, Anhang). Im Adhäsionstest zeigten Hefen, die das *C. pneumoniae* OmcB auf

ihrer Oberfläche präsentierten eine relative Adhäsion von 50 % an die humanen Zellen (Abb. 40). Eine ähnlich starke Adhäsion von 53 % bzw. 51% wiesen Hefezellen auf, die das Aga2p-OmcB-L1 oder das Aga2p-OmcB-GPIC auf der Zelloberfläche tragen.



Die Expression des OmcB von *C. trachomatis* Serovar E im Hefe-

System resultierte in einer relativen Adhäsion von 42 %. Somit adhärierte das Aga2p-OmcB-E zirka 20 % schwächer, als die anderen getesteten OmcB Proteine.

In weiterführenden Experimenten zur Adhäsion von Aga2p-OmcB-L1 konnte gezeigt werden, dass die Unterteilung des Proteins in die verkürzten Varianten OmcB-L1-N und OmcB-L1-C die für die *C. pneumoniae* OmcB gewonnenen Daten bestätigt. Die OmcB-L1-N Variante vermittelte die gleiche Adhäsivität wie das OmcB-L1 Vollängenprotein (Abb. 57, Anhang). In den Adhäsionstests wurden auch Zelllinien untersucht, die bei einer natürlichen Infektion durch *C. trachomatis* LGV und E betroffen sind. Dabei handelt es sich um HeLa und Hec-1B Zellen, die aus Geweben des Urogenitaltrakts stammen. Beide Zelllinien zeigten eine signifikante Adhäsion der Aga2p-OmcB-L1 präsentierende Hefen (Abb. 58, Anhang).

Die durchgeführten Untersuchungen zur Adhäsivität verschiedener OmcB Proteine zeigten, dass das Protein anderer Spezies ebenfalls adhäsive Eigenschaften besitzt.

Abbildung 40: Die OmcB Proteine verschiedener Chlamydienpezies zeigen Adhäsion an Humanzellen.

Quantifizierung der Hefeadhäsionstests von Aga2p, Aga2p-OmcB(*C.pn.*), Aga2p-OmcB-L1, Aga2p-OmcB-E und Aga2p-OmcB-GPIC präsentierenden Hefezellen an HEp-2 Zellen. (n=4)

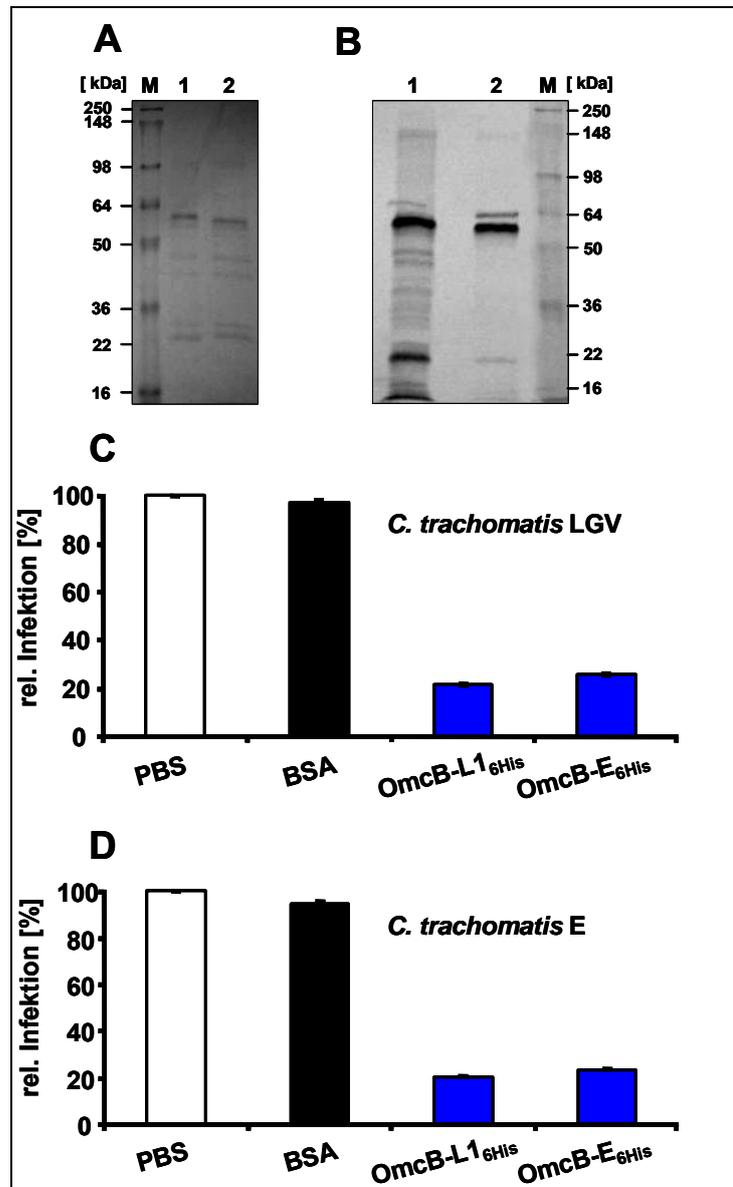
4.14.3. Die *C. trachomatis* OmcB_{6His} Proteine reduzieren die *C. trachomatis* LGV und E Infektion

Nachdem die adhäsive Eigenschaften der OmcB Proteine von *C. trachomatis* Serovar LGV und E im Hefe-System gezeigt werden konnten, stellte sich die Frage, ob das OmcB Protein bei beiden Serovaren am Infektionsprozess beteiligt ist. Daher wurden in Neutralisations-Experimenten die eukaryotischen HEP-2 Zellen mit rekombinant hergestelltem OmcB-L1_{6His} bzw. OmcB-E_{6His} Protein vorbehandelt, bevor sie mit den verschiedenen *C. trachomatis* Serovaren infiziert wurden (Siehe Abschnitt 3.5.10). Gleichzeitig sollte mit diesem Experiment geklärt werden, ob aufgrund der großen Homologie der beiden Proteine (98% Aminosäureidentität)

auch eine Spezies-übergreifende Funktion des Proteins feststellbar ist.

Für die Untersuchungen wurden beide Proteine in *E. coli* produziert und aufgereinigt. Sowohl im Coomassie-gefärbten SDS-Gel als auch in

der Westernblot-Analyse wurden für das OmcB-E_{6His} Protein eine Proteinbande bei zirka 60 kDa nachgewiesen (Abb. 41A, B Spur 1), für das OmcB-L1_{6His} Protein konnte eine Bande bei zirka 58 kDa detektiert werden (Abb. 41A, B Spur 2) (theoretisches



Molekulargewicht je 52 kDa). In beiden Proteinextrakten wurden schwache zusätzliche Proteinbanden detektiert, die auf Verunreinigungen oder Degradationsprodukte zurückzuführen sind (Abb. 41A, B).

In Neutralisations-Experimenten wurden HEp-2 Zellen mit OmcB-L1_{6His} oder dem OmcB-E_{6His} Protein vorbehandelt, bevor sie mit *C. trachomatis* Serovar LGV oder mit Serovar E infiziert wurden. Die Vorbehandlung der Zellen mit PBS diente als Kontrolle und die Zahl der gebildeten Einschlüsse wurde auf 100 % gesetzt (Abb. 41C, D). Die Infektivität von *C. trachomatis* Serovar LGV ließ sich durch Vorbehandlung der eukaryotischen Zellen mit dem Spezies-eigenen OmcB-L1_{6His} Protein auf 20 % reduzieren. Wurde das homologe OmcB-E_{6His} Protein zur Vorbehandlung der Zellen verwendet, reduzierte sich die relative Infektion auf 25 % (Abb. 41C). Im zweiten Experiment, bei dem *C. trachomatis* Serovar E zur Infektion eingesetzt wurde zeigte sich, dass die Vorinkubation der humanen Zellen mit dem OmcB-E_{6His} Protein eine relative Infektion von 24 % zur Folge hatte. Auch hier konnte durch den Einsatz des homologen OmcB-L1_{6His} Protein eine Reduktion der *C. trachomatis* E Infektion auf 20 % erzielt werden (Abb. 41D). Daraus lässt sich schließen, dass beide Proteine die gleichen zellulären GAG-Strukturen auf der Wirtszelloberfläche erkennen und, wie schon für das *C. pneumoniae* Protein gezeigt, im GAG-abhängigen Adhäsionsprozess involviert sind.

4.14.4. Die GAG-Abhängigkeit der OmcB-vermittelten Adhäsion weist Unterschiede zwischen den Spezies auf

Für die OmcB Proteine der Chlamydienarten *C. trachomatis* LGV und E sowie *C. psittaci* GPIC konnten wie schon für das *C. pneumoniae* OmcB signifikante adhäsive Eigenschaften ermittelt werden. Um aufzuklären, ob die GAG-Abhängigkeit der OmcB-vermittelten Adhäsion bei den verschiedenen OmcB Proteinen ebenfalls gleich ist oder ob Unterschiede feststellbar sind, wurde dieser Fragestellung im Folgenden nachgegangen. Hierzu wurden die verschiedenen OmcB exprimierenden Hefen mit Heparin (~600µg/ml) vorbehandelt und dann auf ihr Adhäsionsvermögen getestet. Für Aga2p exprimierende Hefen konnte dabei unabhängig von der Vorbehandlung eine relative Adhäsion von zirka 8 % festgestellt werden (Abb. 42). Die Präsentation der Fusionsproteine Aga2p-OmcB-L1 und Aga2p-OmcB-GPIC auf der Hefeoberfläche, führte zu einer durchschnittlichen Adhäsion von 50 % an die HEp-2 Zellen. Diese Adhäsion reduzierte sich nach Inkubation mit Heparin auf 9 %. Überraschender Weise zeigte sich für Aga2p-OmcB-E exprimierende Hefen eine relative Adhäsion von 41 %, die nach Vorinkubation mit Heparin mit 39 % nicht signifikant reduziert war.

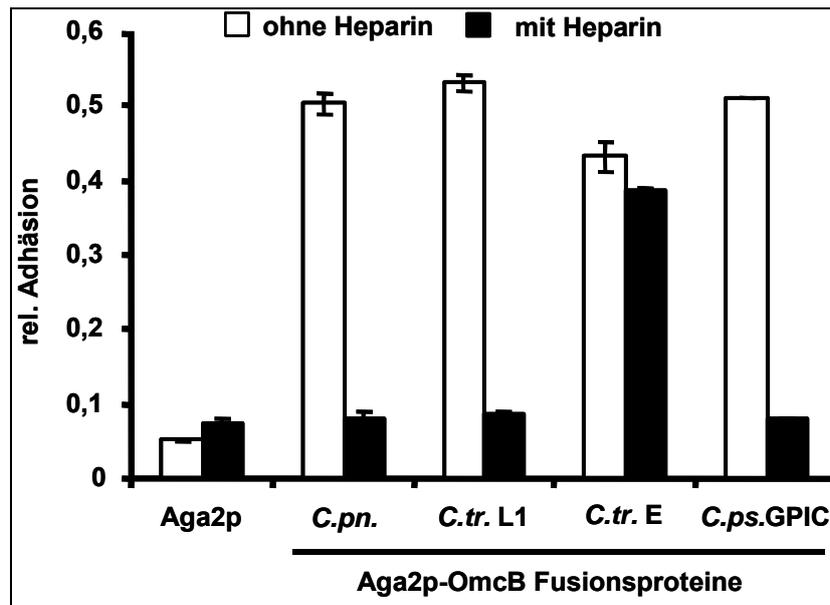


Abbildung 42: Die Adhäsion Aga2p-OmcB-E präsentierender Hefen kann nicht durch Heparin inhibiert werden.

Hefeadhäsionstests durchgeführt mit HEP-2 Zellen und Aga2p, Aga2p-OmcB(*C.pn.*), Aga2p-OmcB-L1, Aga2p-OmcB-E und Aga2p-OmcB-GPIC präsentierenden Hefezellen. Die verwendeten Hefezellen wurden mit PBS oder Heparin (~600µg/ml) inkubiert, bevor sie in die Adhäsionstests eingesetzt wurden. (n=4)

Diese Daten belegen für Aga2p-OmcB-L1 und Aga2p-OmcB-GPIC exprimierende Hefen ein Heparin-abhängiges Bindungsverhalten, während Aga2p-OmcB-E präsentierende Hefen hingegen Heparin-unabhängig an HEP-2 Zellen adhäreren.

Auf den Oberflächen der potentiellen Wirtszellen kommt Heparin nicht vor, sondern GAGs wie Heparansulfat oder Chondroitinsulfat. Um den Einfluss dieser natürlichen GAG-Strukturen auf die Adhäsion zu untersuchen, wurden Adhäsionstests mit verschiedenen GAG-defizienten CHO-Zelllinien durchgeführt. Für Aga2p-OmcB-L1 als auch für Aga2p-OmcB-E präsentierende Hefen konnte eine signifikante Adhäsion an die CHO-K1 Wildtypzellen ermittelt werden. Aber keines der OmcB Proteine zeigte Adhäsion an die GAG-defizienten Zellen (pgsA-745 und pgsD-677) (Abb. 43).

Beide Mutantenlinien synthetisieren kein Heparansulfat mehr und weder OmcB-L1 noch OmcB-E vermitteln Adhäsion an diese Zellen. Mit Heparin einem ähnlichen GAG konnte jedoch nur die Adhäsion von Aga2p-OmcB-L1 Hefen inhibiert werden, so dass man schließen kann, dass das OmcB-E spezifisch an eine Heparansulfat-ähnliche Struktur bindet. OmcB-L1 bindet hingegen wie das OmcB von *C. psittaci* GPIC und *C. pneumoniae* neben Heparansulfat-ähnlichen Strukturen auch an andere GAG-Strukturen wie Heparin.

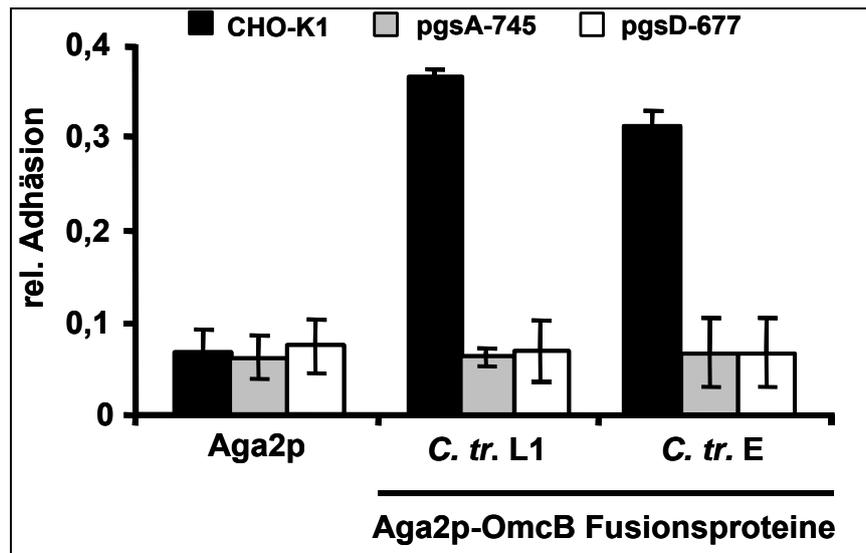


Abbildung 43: Aga2p-OmcB-L1 und Aga2p-OmcB-E exprimierende Hefen zeigen keine Adhäsion an GAG-defiziente CHO-Zellen.

Quantifizierung der Hefeadhäsionstests. CHO-Zellen wurden mit Aga2p, Aga2p-OmcB-L1 und Aga2p-OmcB-E präsentierenden Hefezellen inkubiert (CHO-K1 = Wildtypkontrolle, pgsA-745 = keine GAG-Biosynthese, pgsD-677 = keine Heparansulfat-Synthese). (n=4)

4.15. Die GAG-Spezifität der *C. trachomatis* OmcB Proteine ist auf eine Änderung in der Aminosäuresequenz zurückzuführen

Die beiden *C. trachomatis* OmcB Proteine wiesen in allen Experimenten ein gleiches Verhalten auf, jedoch zeigten sie einen großen Unterschied bei der Spezifität der GAG-Bindung. Es stellten sich daher folgende Fragen: Warum kann OmcB-E Heparansulfat-Strukturen erkennen, nicht aber Heparin? Gibt es Unterschiede zwischen OmcB-E und OmcB-L1, welche die Spezifität der beiden Proteine so grundlegend verändern?

Um diese Fragen zu beantworten wurde die Aminosäuresequenz und Sekundärstruktur der OmcB Proteine von Serovar LGV und E analysiert. Die beiden Proteine gleicher Länge zeigen eine 98%ige Identität in der Aminosäuresequenz mit insgesamt neun nicht übereinstimmenden Aminosäuren (Abb. 59, Anhang). In Ermangelung von Daten über die 3-D Struktur der Proteine, wurden berechnete Sekundärstrukturen verglichen. Hierbei konnte nur ein Unterschied zwischen den OmcB Proteinen von *C. trachomatis* Serovar LGV und Serovar E festgestellt werden: im N-terminalen Teil besitzt OmcB-E an Position 66 ein Leucin, während beim OmcB-L1 an dieser Position ein Prolin gefunden wird (Abb.44). In der Sekundärstruktur führt dies zu einer Änderung einer helikalen Struktur (*C. trachomatis* Serovar E) zu einer „coiled-coiled“ Region (*C. trachomatis* Serovar LGV). Diese helikale Struktur ist nur bei OmcB-E vorhanden und weder OmcB-L1 noch das *C. pneumoniae* Protein verfügen darüber. Es konnte also spekuliert werden, dass dieser Aminosäureaustausch mit der Änderung in der Sekundärstruktur für die unterschiedliche

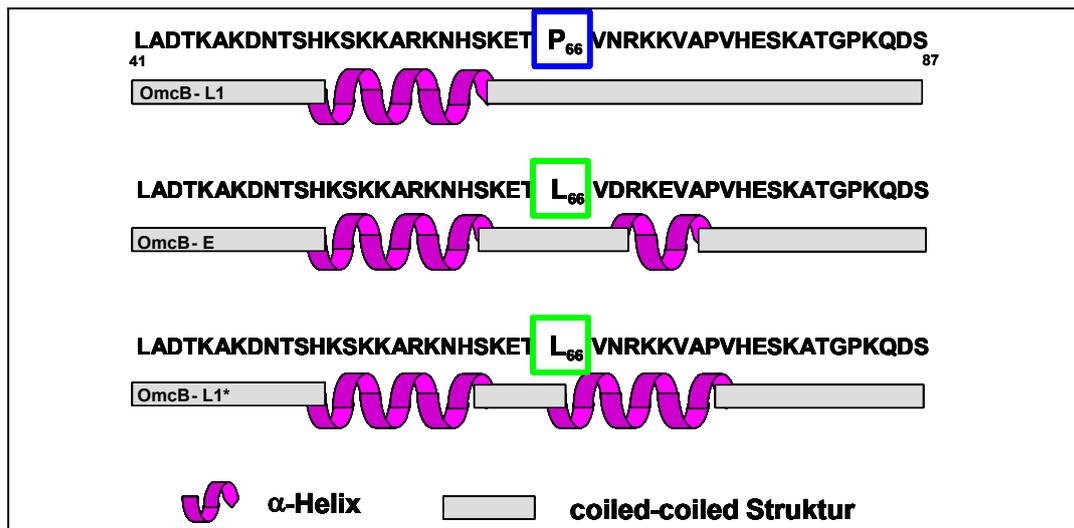


Abbildung 44: Sekundärstrukturanalyse von verschiedenen *C. trachomatis* OmcB Varianten.

Darstellung der Aminosäuresequenz und der berechneten Sekundärstruktur der Wildtypproteine OmcB-L1 und OmcB-E (AS 41-87) und des durch gerichtete Mutagenese generierten OmcB-L1*. Der Unterschied an Position 66 ist in allen Proteinsequenzen markiert.

GAG-Bindung verantwortlich sein könnte. Da keine anderen Unterschiede in der Proteinstruktur ausgemacht werden konnten, wurde im Folgenden eine Mutationsanalyse der Aminosäure an Position 66 im OmcB-L1 Protein durchgeführt (Abb. 44). Dadurch sollte überprüft werden, ob sich die Veränderung im OmcB-L1 eine Auswirkungen auf die Adhäsionsfunktion des Proteins hat.

Die generierte mutante Form des OmcB-L1 Proteins wurde im Hefe-System exprimiert und wird im Folgenden Aga2p-OmcB-L1* genannt. Nach Kontrolle der Präsentation des mutierten OmcB auf der

Hefezelloberfläche (Abb. 56, Anhang) wurde dessen Adhäsivität in Adhäsionstests

untersucht und mit der Adhäsivität von Aga2p-OmcB-L1 und Aga2p-OmcB-E exprimierenden Hefezellen verglichen.

Aga2p-OmcB-L1

exprimierende Hefezellen

zeigten eine relative Adhäsion von 52 %, während die Präsentation des Aga2p-OmcB-E eine

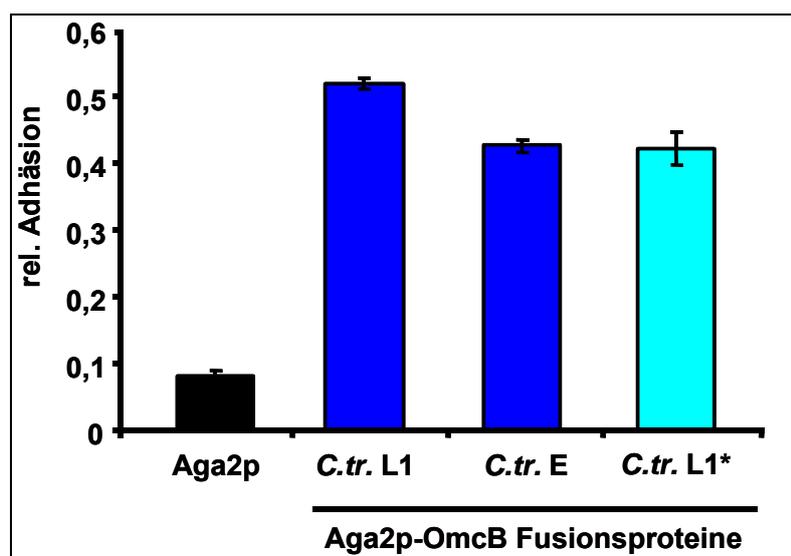


Abbildung 45: Untersuchung der Adhäsion von Aga2p-OmcB-L1* exprimierenden Hefezellen an HEp-2 Zellen.

Quantifizierung der Hefeadhäsionstests, mit HEp-2-Zellen und Aga2p, Aga2p-OmcB-L1, Aga2p-OmcB-E und Aga2p-OmcB-L1* präsentierenden Hefezellen. Aga2p-OmcB-L1* trägt die Prolin zu Leucin Mutation an Position 66 im OmcB-L1. (n=4)

relative Adhäsion von 43 % zur Folge hatte (Abb. 45). Aga2p-OmcB-L1* exprimierende Hefezellen zeigten eine relative Adhäsion von 42 % an die HEp-2 Zellen und wiesen im Vergleich mit dem Wildtypprotein OmcB-L1, eine um 18% reduzierte Adhäsion auf. Der Austausch der Aminosäure des Prolin₆₆ im Aga2p-OmcB-L1 zu einem Serovar E-spezifischen Leucin reduzierte dessen Adhäsivität. OmcB-L1* wies eine identische Adhäsion wie das OmcB-E Protein auf.

Um zu untersuchen, ob die Mutation im Aga2p-OmcB-L1* neben der Reduktion der relativen Adhäsion auch einen Einfluss auf die GAG-Abhängigkeit bei der Bindung an HEp-2 Zellen hat, wurde der Adhäsionstest in Gegenwart von exogenem Heparin wiederholt. Für Aga2p, Aga2p-OmcB-L1 und die Aga2p-OmcB-E exprimierenden Hefen wurde dabei ein ähnliches Bindungsverhalten wie in den zuvor durchgeführten Experimenten festgestellt (Abb. 46). Aga2p-OmcB-L1 exprimierende Hefezellen zeigten nach Vorbehandlung mit Heparin eine Reduktion der relative Adhäsion von 50 %

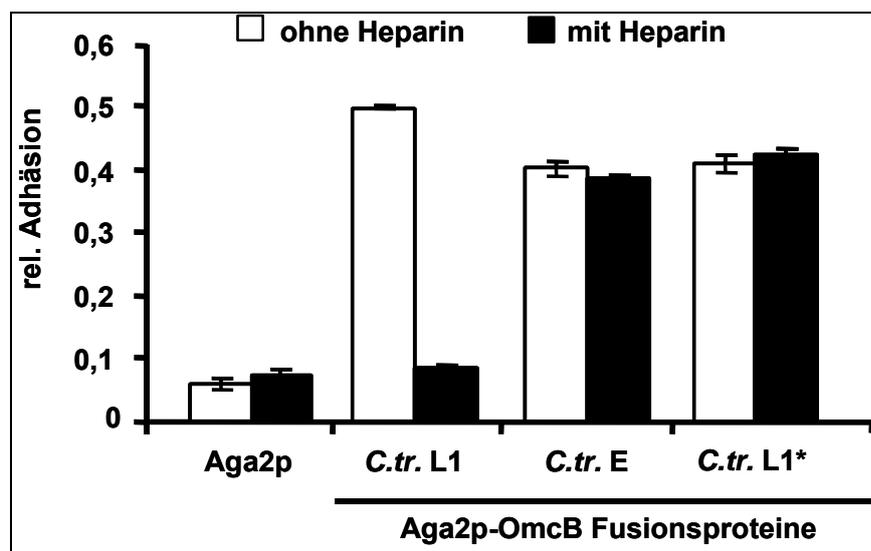


Abbildung 46: OmcB präsentierende Hefen zeigen Unterschiede bei der Heparin-Abhängigkeit der Adhäsion.

Hefeadhäsionstests durchgeführt mit HEp-2 Zellen und Aga2p, Aga2p-OmcB-L1, Aga2p-OmcB-E und Aga2p-OmcB-L1* präsentierenden Hefezellen. Die verwendeten Hefezellen wurden vor dem Einsatz in die Adhäsionstests mit PBS oder Heparin (~600µg/ml) vorinkubiert. (n=4)

(unbehandelt) auf 9 % (behandelt). Hefezellen die Aga2p-OmcB-E auf ihrer Oberfläche tragen, zeigten keine Reduktion der relativen Adhäsion nach Heparin-Behandlung (40 % bzw. 39 %). Interessanterweise zeigten Hefezellen, die das punktmutierte Aga2p-OmcB-L1* präsentierten keine Heparin-Abhängigkeit bei der Adhäsion mehr (41 % versus 42 % nach Heparin-Vorbehandlung). Selbst nach drastischer Erhöhung der Heparinkonzentration konnte keine Veränderung in der Adhäsion der Aga2p-OmcB-E und Aga2p-OmcB-L1* präsentierenden Hefen erzielt werden (Abb. 47).

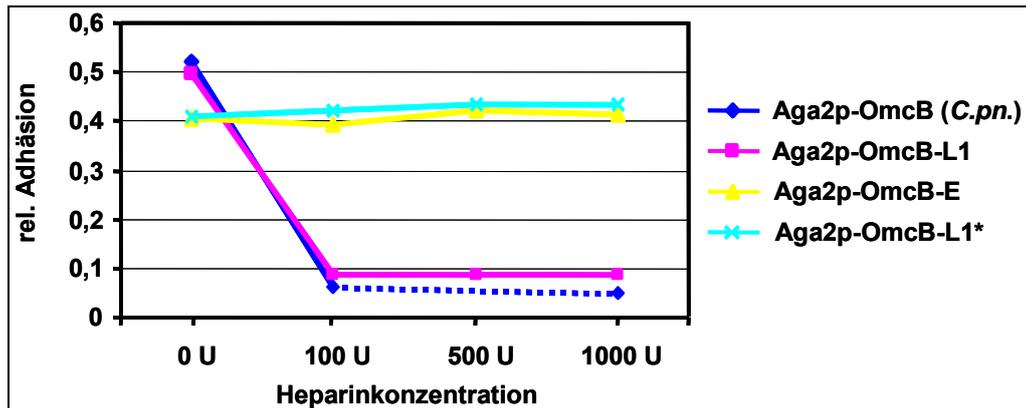


Abbildung 47: Die Adhäsion von Aga2p-OmcB-E und Aga2p-OmcB-L1* Hefen ist Heparin-unabhängig.

Aga2p-OmcB(*C.pn.*), Aga2p-OmcB-E, Aga2p-OmcB-L1 und Aga2p-OmcB-L1* präsentierende Hefezellen wurden vor dem Adhäsionstest mit verschiedenen Heparinkonzentrationen (0 Units-1000 Units entsprechen 0-6000 µg/ml) vorbehandelt. (n=4)

Dieses Ergebnis belegt, dass die Unterschiede in der GAG-Spezifität von OmcB-L1 und OmcB-E auf die Abweichungen in der Aminosäuresequenz zurückzuführen sind. Über die veränderte Aminosäuresequenz im OmcB-E Protein wird die Erkennung für spezifische GAG-Strukturen determiniert, während OmcB-L1 wie auch OmcB von *C. pneumoniae* oder *C. psittaci* GPIC ein wesentlich breiteres Spektrum an GAGs erkennt und bindet. Die Veränderungen innerhalb des OmcB Protein erklären somit auch die Unterschiede bei der GAG-Abhängigkeit einer *C. trachomatis* LGV bzw. GAG-Unabhängigkeit der *C. trachomatis* E Infektion.

5. Diskussion

Bei *C. pneumoniae* ist wie bei allen pathogenen Bakterien die Invasion in die humane Wirtszelle durch die aufeinander folgenden Prozesse der Adhäsion und der Internalisierung gekennzeichnet. Da hierüber nur wenig bekannt ist, sollte nach chlamydialen Adhäsinen gesucht werden. Zur Analyse des Adhäsionsvermögens chlamydialer Proteine wurde ein Oberflächen-Präsentationssystem basierend auf der Hefe *S. cerevisiae* etabliert. Hiermit konnte gezeigt werden, dass die *C. pneumoniae* Proteine GroEL-1 und OmcB signifikant an humane Zellen adhären. Für das OmcB Protein von *C. pneumoniae* konnte nachgewiesen werden, dass es für die Adhäsion der Chlamydien an die Wirtszelle verantwortlich ist. Die Adhäsion wird dabei über die Interaktion des Proteins mit Glykosaminoglykanen auf der humanen Zelloberfläche bewirkt. In weiterführenden Untersuchungen konnte auch für die OmcB Proteine von *C. trachomatis* LGV und E sowie *C. psittaci* GPIC adhäsive Eigenschaften nachgewiesen werden. Jedoch zeigten die OmcB Proteine der verschiedenen chlamydialen Spezies starke Unterschiede in der GAG-Abhängigkeit der OmcB-vermittelten Adhäsion, die bei *C. trachomatis* LGV und E auf Änderungen einer einzelnen Aminosäure innerhalb der Proteinsequenz zurückgeführt werden konnten.

5.1. Aufbau eines funktionellen Adhäsionstests mit Hefezellen und humanen HEp-2 Zellen

5.1.1. Die Präsentation des Invasin-AD Fragments führt zur Adhäsion von Hefen an humane Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Hefe-System erstmalig erfolgreich als ein Werkzeug zur Untersuchung von adhäsiven Eigenschaften bakterieller Proteine etabliert werden. Diese Analysen waren bisher nur unter Verwendung von sogenannten Phagen-Displays möglich oder durch Bindungstests mit Protein-beschichteten Latexkügelchen (Chiswell and McCafferty 1992), (Dersch and Isberg 1999), (Wuppermann 2001). Beide experimentellen Ansätze weisen jedoch Grenzen der Nutzung auf. Mit dem Phagen-Display können nur Peptide, aber keine ganzen Proteine präsentiert werden. Der Bindungstest mit Protein-beschichteten Latexkügelchen erfordert die aufwendige Reinigung der zu testenden Proteine. Im Hefe-System können hingegen Proteine verschiedenster Größe und Funktion in nativer Form präsentiert werden (Kondo and Ueda 2004). Dabei ist die Hefe genetisch einfach zu manipulieren, leicht zu kultivieren und erlaubt die oberflächliche Präsentation von 10^4 - 10^5 Molekülen pro Zelle (Shibasaki, Ueda et al. 2001), (Nakamura, Shibasaki et al. 2001).

Um das Hefe-Oberflächen-Präsentationssystem als funktionelles Testsystem bei der Charakterisierung adhäsiver Proteineigenschaften einzusetzen, wurde ein bekanntes bakterielles Adhäsins als Modellprotein ausgewählt. Für das Invasin Protein von *Y. pseudotuberculosis* wurde beschrieben, dass eine 200 Aminosäuren große Domäne (AD-Domäne) des Proteins für die Adhäsion und Internalisierung der Bakterien in die Wirtszelle verantwortlich ist (Dersch and Isberg 1999).

In Adhäsionstests führte die Präsentation des Invasin-AD Protein-Fragments auf der Hefezelloberfläche zu einer signifikanten Adhäsion der Hefezellen an humane HEp-2 Zellen. Im Vergleich zu einer relativen Adhäsion von durchschnittlich 7% der Negativkontrolle (Aga2p) zeigten die Aga2p-Invasin-AD exprimierenden Hefezellen eine relative Adhäsion von durchschnittlich 45% (Abb. 8, Ergebnisse).

Somit konnte mit dem Hefe-System die beschriebene Adhäsionsfunktion des Invasin-AD Protein-Fragments bestätigt werden. Es konnte jedoch nur die Adhäsion von Aga2p-Invasin-AD präsentierenden Hefezellen nachgewiesen werden. Im Infektionsprozess von *Yersinia* vermittelt die verwendete Invasin Domäne neben der Adhäsion an β_1 -Untereinheiten von Integrin-Rezeptoren auch die Internalisierung der Bakterien (Dersch and Isberg 1999). Dabei führt die Adhäsion des Invasins zu einer Zusammenlagerung (clustering) von Integrin-Rezeptoren auf der humanen Zelle (Boyle and Finlay 2003), (Cossart and Sansonetti 2004). Im Hefe-System gelang es nicht, eine Internalisierung der Hefen herbei zu führen, da keine Aufnahme der rund 5 μm großen Hefen in die HEp-2 Zellen beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Jedoch zeigte sich in diesen Experimenten eine Akkumulation der Invasin-AD Hefen auf den Oberflächen der HEp-2 Zellen. Dies könnte bedeuten, dass durch die Bindung der Invasin-AD präsentierenden Hefen an humane Integrin-Rezeptoren ebenfalls ein „clustering“ der Rezeptoren herbeigeführt wird. Ein ähnlicher Effekt wurde für Invasin-beschichtete Latexkügelchen beobachtet; hierbei wurden die zirka 1 μm großen Kügelchen auch in die humanen Zellen internalisiert (Dersch and Isberg 1999). Wahrscheinlich sind die Hefezellen zu groß, um von den HEp-2 Zellen aufgenommen zu werden.

Mittels des Hefe-Oberflächen-Präsentationssystems konnte die Adhäsionseigenschaft eines bakteriellen Adhäsins an humane Zellen nachgewiesen werden. Das System eignet sich somit zur funktionellen Analyse der adhäsiven Eigenschaften eines Proteins und erlaubt zusätzlich eine Quantifizierung dieser Adhäsion.

Durch weitere Modifikationen wurde das Hefe-System dahingehend verändert, die Adhäsion der Hefen an humane Zellen mittels der FACS-Methode (Fluorescent activated cell sorter) zu analysieren. Dazu wurden Hefezellen generiert, die zusätzlich zur Oberflächen-Präsentation heterologer Proteine, intrazellulär GFP exprimieren (Abb. 48). Mit Hilfe

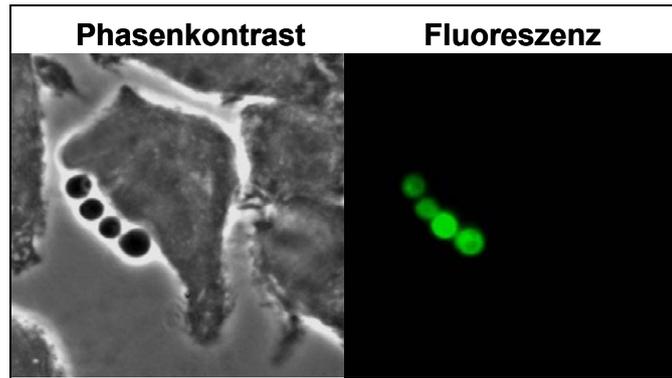


Abbildung 48: Adhäsion GFP exprimierender Hefezellen an HEp-2 Zellen.

Mikroskopie-Aufnahmen von Aga2p-Invasin-AD präsentierenden Hefezellen gebunden an HEp-2 Zellen (63-fache Objektiv-Vergrößerung).

dieser Hefen sollen zukünftig neue Adhäsionsproteine identifiziert werden.

5.2. Das *C. pneumoniae* GroEL-1 Protein vermittelt Adhäsion an HEp-2 Zellen

In den Untersuchungen zum Adhäsionsverhalten von Hefen, die das *C. pneumoniae* Momp oder GroEL-1 auf ihrer Oberfläche tragen, wurden unterschiedliche Eigenschaften für die beiden Proteine ermittelt. Für Aga2p-Momp exprimierende Hefen konnten keine adhäsiven Eigenschaften ermittelt werden, sie zeigten mit einer relative Adhäsion von 10% eine Adhäsivität wie die Negativkontrolle. Die Präsentation des GroEL-1 Proteins im Hefe-System führte zu einer signifikanten Adhäsion von 35% an HEp-2 Zellen. Im Vergleich mit den starken adhäsiven Eigenschaften des Invasin-AD Proteinfragments, konnte auch für GroEL-1 eine deutliche Adhäsivität festgestellt werden (Abb. 10, Ergebnisse).

Schon in vorangegangenen Bindungstests mit Latexkügelchen, beschichtet mit rekombinant hergestelltem Momp oder GroEL-1 Protein, konnte ein ähnliches Adhäsionsverhalten der Proteine beobachtet werden. Auch hier zeigten GroEL-1 beschichtete Latexkügelchen eine signifikante Adhäsion an Humanzellen, während das Momp Protein keine Adhäsivität aufwies (Wuppermann 2001). Die Daten aus dem Hefe-System bestätigen somit die Annahme, dass GroEL-1 im Gegensatz zum *C. pneumoniae* Momp Protein eine Adhäsionsfunktion besitzt.

Das GroEL-1 Protein liegt nicht assoziiert mit dem cOMC vor, ist jedoch ein deutlicher Bestandteil der chlamydialen Oberfläche (Wuppermann 2001), (Schmiel, Knight et al. 1991), (Raulston, Paul et al. 1998). Außerdem tritt es als ein immundominantes Antigen in Erscheinung und Antikörper gegen das Protein werden mit vielen chlamydialen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Sanchez-Campillo, Bini et al. 1999), (Jantos,

Krombach et al. 2000), (Xu, Schett et al. 2000), (Peeling, Bailey et al. 1998), (Domeika, Domeika et al. 1998). In verschiedenen Studien konnte für rekombinant hergestelltes GroEL-1 eine Aktivierung unterschiedlicher Zelllinien über TLR 2 und TLR 4 Rezeptoren nachgewiesen werden (Bulut, Faure et al. 2002), (Costa, Kirschning et al. 2002), (Da Costa, Wantia et al. 2004), (Krull, Maass et al. 2005). Daher stellt sich die Frage, ob bei der Infektion das Protein zur Aktivierung der Zielzelle beiträgt und auf diese Weise die Infektion begünstigt. Die adhäsiven Eigenschaften des *C. pneumoniae* GroEL-1 ließen sich daher so erklären, dass das Protein an einen Rezeptor auf der Wirtszelle bindet und die Chlamydien so mit der humanen Zellen interagieren. Welcher Art dieser Rezeptor ist und ob tatsächlich Rezeptoren der TLR-Familie beteiligt sind, ist jedoch noch ungeklärt und könnte abhängig vom Zelltyp und der Präsenz bestimmter Rezeptormoleküle sein.

Im Gegensatz zu GroEL-1 zeigte das *C. pneumoniae* Momp Protein keine Adhäsion an HEp-2 Zellen. In vorangegangenen Untersuchungen konnte für Momp von *C. trachomatis* (MoPn) gezeigt werden, dass rekombinant hergestelltes Protein an GAGs auf humanen Zellen bindet (Su, Watkins et al. 1990), (Su, Raymond et al. 1996). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass das Momp von *C. trachomatis* N-glykosyliert vorliegt und diese N-Glykosylierung wichtig für die Adhäsion und Internalisierung der Chlamydien ist (Kuo, Takahashi et al. 1996), (Kuo, Lee et al. 2004). Für *C. pneumoniae* wurde kein Nachweis zur Glykosylierung des Momp Proteins erbracht, jedoch verhinderte die Deglykosylierung der *C. pneumoniae* Zelloberfläche die Adhäsion und Internalisierung der Bakterien an die Wirtszelle (Kuo, Takahashi et al. 1996), (Kuo, Lee et al. 2004). Es ist fraglich, ob das rekombinant in *E. coli* hergestellte Momp Protein oder das im Hefe-System präsentierte Protein über die eventuell notwendige Glykosylierung verfügt. Bislang wurde nur für Momp aus *C. trachomatis* (MoPn) eine spezielle Adhäsionsfunktion, nämlich die Bindung des Proteins an Heparansulfat-Strukturen der Wirtszelle, nachgewiesen (Su, Raymond et al. 1996). Diskutiert wird aber auch, ob die Chlamydien über N-glykosylierte Proteine wie das *C. trachomatis* Momp potentiell an Mannose 6-Phosphat Rezeptoren binden können (Puolakkainen, Kuo et al. 2005). Wahrscheinlich besitzt Momp Spezies-spezifisch unterschiedliche Funktionen, die abhängig von der Variabilität der Proteinstruktur, der Modifikation durch Glykosylierung oder der Lokalisierung auf der Oberfläche sind (Findlay, McClafferty et al. 2005), (Kuo, Takahashi et al. 1996). In den Untersuchungen des *C. pneumoniae* Proteins im Hefe-System konnten keine adhäsiven Eigenschaften für das Momp Protein festgestellt werden.

5.3. Das *C. pneumoniae* OmcB Protein zeigt Adhäsion an Humanzellen

5.3.1. Lokalisierung des OmcB Proteins auf der chlamydialen Oberfläche

In den in dieser Arbeit durchgeführten Lokalisationsstudien konnte das *C. pneumoniae* OmcB Protein auf der chlamydialen Oberfläche nachgewiesen werden. Weitere detailliertere Analysen mit verschiedenen *C. trachomatis*-spezifischen Antikörpern zeigten, dass sowohl N-terminale als auch C-terminale Epitope zugänglich für die Detektion sind. Die Oberflächen-Lokalisierung des OmcB Proteins konnte auch auf nicht-fixierten chlamydialen Partikeln nachgewiesen werden. Dabei konnten ebenfalls spezifische Epitope des N- und C-Terminus detektiert werden.

In früheren Untersuchungen zur Lokalisierung des Proteins bei verschiedenen chlamydialen Spezies wurden sowohl biochemische als auch Immunofluoreszenz Verfahren zur Detektion eingesetzt (Everett and Hatch 1995), (Ting, Hsia et al. 1995), (Mygind, Christiansen et al. 1998), (Stephens, Koshiyama et al. 2001), (Montigiani, Falugi et al. 2002). Je nach angewandter Methode wurden für das selbe chlamydiale Serovar unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Lokalisierung erzielt. Während für *C. trachomatis* Serovar L2 in biochemischen Analysen die Oberflächen-Lokalisierung eines N-terminalen Protein-Fragments nachgewiesen wurde, gelang die Detektion des Proteins mittels Immunofluoreszenz erst nach Reduktion der Außenhülle (Mygind, Christiansen et al. 1998), (Stephens, Koshiyama et al. 2001). Ähnliches wurde bei Untersuchungen zum OmcB von *C. psittaci* gezeigt. Für Biovar 6BC konnte keine Sensitivität des OmcB Proteins gegenüber Trypsin festgestellt werden; demzufolge ist das Protein nicht Oberflächen-lokalisiert (Everett and Hatch 1995). Jedoch wurde bei Untersuchungen zum Biovar GPIC beobachtet, dass Trypsin einen N-terminalen Rest des Proteins degradiert (Ting, Hsia et al. 1995). Geschlossen wurde daraus, dass zumindest dieser Teil des Proteins Oberflächen-exponiert ist, so wie es in bioinformatischen Analysen für den stark hydrophilen N-Terminus vorhergesagt wurde (Mygind, Christiansen et al. 1998). Für das OmcB Protein von *C. pneumoniae* konnte sowohl in Westernblot-Analysen als auch mittels Immunofluoreszenz eine Oberflächen-Lokalisierung des Proteins gezeigt werden (Vandahl, Pedersen et al. 2002), (Montigiani, Falugi et al. 2002). Auch die Lokalisationsstudien dieser Arbeit bestätigen, dass das *C. pneumoniae* OmcB auf der chlamydialen Oberfläche lokalisiert ist. In Übereinstimmung zur Oberflächen-Lokalisierung wurde das Protein bei *C. pneumoniae* Infektionen als immundominantes Antigen ermittelt (Mygind, Christiansen et al. 1998), (Cunningham and Ward 2003), (Portig, Goodall et al. 2003). Die Immunodominanz des Proteins wurde ebenfalls bei *C. trachomatis* Infektionen festgestellt (Mygind, Christiansen et al. 1998),

(Portig, Goodall et al. 2003), (Sanchez-Campillo, Bini et al. 1999). Trotz der starken Immunogenität C-terminaler Epitope des *C. trachomatis* OmcB konnte keine Oberflächen-Lokalisierung des C-Terminus nachgewiesen werden (Mygind, Christiansen et al. 1998), (Goodall, Beacock-Sharp et al. 2001), (Gervassi, Grabstein et al. 2004).

Bisher gibt es keine Übereinstimmung zur Lokalisierung des OmcB Proteins verschiedener chlamydialer Spezies. Einzig für das OmcB von *C. pneumoniae* konnte eine Oberflächen-Lokalisierung gezeigt werden (Vandahl, Pedersen et al. 2002), (Montigiani, Falugi et al. 2002). Für OmcB von *C. trachomatis* L2 und *C. psittaci* GPIC gelang nur der Nachweis, dass der N-Terminus Oberflächen-exponiert vorliegt (Stephens, Koshiyama et al. 2001), (Ting, Hsia et al. 1995). Da das Protein jedoch stark konserviert ist zwischen den Spezies, ist es fraglich, ob die Unterschiede bezüglich der Lokalisierung tatsächlich vorhanden sind oder die verwendeten Methoden keine Vergleichbarkeit erlauben.

5.3.2. Aga2p-OmcB Hefen adhärieren signifikant an humane Zellen

Das *C. pneumoniae* OmcB konnte in den durchgeführten Lokalisationsstudien auf der chlamydialen Oberfläche nachgewiesen werden. Um die Relevanz des Proteins als chlamydiales Adhäsion zu untersuchen, wurden das Protein im Hefe-Oberflächen-Präsentationssystem exprimiert. In Adhäsionstests wurden die adhäsiven Eigenschaften Aga2p-OmcB exprimierender Hefen mit denen von Aga2p-Invasin-AD exprimierenden Zellen verglichen. Aga2p-OmcB Hefezellen zeigten dabei eine relative Adhäsion von 43% an humane Zellen (Abb. 14, Ergebnisse). Die vom OmcB-vermittelte Adhäsion ist somit nur unwesentlich geringer als die des Invasins. Die Adhäsion der Aga2p-OmcB Hefen an die humanen Zellen ist dabei einzig auf die Präsentation des OmcB Proteins zurückzuführen, denn durch eine proteolytische Entfernung des Aga2p-OmcB Fusionsproteins von der Hefezelloberfläche konnte eine 75%ige Reduktion der relativen Adhäsion erreicht werden. Die Protease-Behandlung der Aga2p-OmcB exprimierenden Hefen führte zu einer Reduktion der adhäsiven Eigenschaften dieser Zellen. Die Adhäsionsfunktion des OmcB wurde bisher nur für *C. psittaci* untersucht (Levy and Moulder), (Ting, Hsia et al. 1995). Dabei wurde nachgewiesen, dass die isolierten cOMCs von *C. psittaci* die Fähigkeit besitzen, an Mäuse Fibroblasten zu adhäreren (Levy and Moulder 1982). In weiterführenden Untersuchungen wurden die Hauptproteinbestandteile Momp und OmcB aus den cOMCs angereichert und gezeigt, dass nur OmcB an die verwendeten HeLa Zellen adhärerte (Ting, Hsia et al. 1995). Für das *C. pneumoniae* OmcB Protein konnte nach Präsentation des Proteins auf der Hefezelloberfläche eine signifikante Adhäsion von Aga2p-OmcB Hefen an humane HEP-2 Zellen festgestellt werden.

5.3.5. Die OmcB-vermittelte Adhäsion ist abhängig von Glykosaminoglykanen auf der humanen Zelloberfläche

Aga2p-OmcB exprimierende Hefen adhäreren signifikant an humane HEp-2 Zellen. Um zu analysieren wie die OmcB-vermittelte Adhäsion erfolgt, wurde zunächst der Einfluss von Glykosaminoglykanen auf die Bindung überprüft. In Adhäsionstests konnte durch die Vorbehandlung von Aga2p-OmcB exprimierenden Hefen mit verschiedenen exogenen GAGs gezeigt werden, dass spezifisch Heparin die Adhäsion der Hefen inhibiert. Die relative Adhäsion der Hefen wurde nach Heparin Inkubation um 84 % reduziert (Abb. 20, Ergebnisse), während die Verwendung verschiedener Chondroitinsulfate keinen signifikanten Einfluss auf die Aga2p-OmcB Adhäsion hatte. Durch die Aufnahme einer Heparin-Kinetik konnte außerdem gezeigt werden, dass Heparin die OmcB-vermittelte Adhäsion Konzentrations-abhängig inhibiert.

Die gleiche GAG-Abhängigkeit wurde schon zuvor für die Infektion humaner Zellen durch *C. pneumoniae* festgestellt (Wuppermann, Hegemann et al. 2001), (Beswick, Travelstead et al. 2003). Die Infektion konnte spezifisch durch die Zugabe von Heparin/Heparansulfat inhibiert werden (Wuppermann, Hegemann et al. 2001), (Beswick, Travelstead et al. 2003). Dabei wurde auch hier eine Konzentrations-Abhängigkeit der Heparin-vermittelten Infektionsreduktion nachgewiesen (Wuppermann, Hegemann et al. 2001). Vergleicht man die Konzentrations-Abhängigkeiten, zeigt sich jedoch, dass die Adhäsion der Aga2p-OmcB Hefen deutlich sensitiver auf vergleichbare Heparinmengen reagiert als die chlamydialen Partikel. Schon 0,6 µg/ml Heparin führen zu einer 57%igen Reduktion der OmcB Adhäsion (Abb. 21, Ergebnisse), während die gleiche Menge jedoch nur eine 32%ige Infektionsreduktion zur Folge hat (Wuppermann, Hegemann et al. 2001). Dennoch ist in beiden Fällen 1 Unit Heparin (~6 µg/ml) ausreichend, eine 90%ige Reduktion der Adhäsion bzw. Infektion hervorzurufen und damit in den Bereich der Saturierung zu gelangen. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass OmcB die Adhäsion der Chlamydien an die humane Zelle vermittelt und Heparin diese Bindung spezifisch inhibiert. Aber Chlamydien verfügen über weitere noch unbekannte Adhäsions-Mechanismen, die unabhängig vom GAG-Mechanismus funktionieren. Daher kann auch nur eine 90%ige Reduktion der *C. pneumoniae* Infektion festgestellt werden, wenn der GAG-abhängige Infektionsprozess gestört wird (Wuppermann, Hegemann et al. 2001), (Beswick, Travelstead et al. 2003). Bei den Aga2p-OmcB exprimierenden Hefen wird durch Heparin-Zugabe die Adhäsion, im Vergleich zur Negativkontrolle, vollständig inhibiert. Für das OmcB von *C. pneumoniae* kann damit gezeigt werden, dass es wie das OmcB von *C. trachomatis* ein Heparin-bindendes Protein ist (Stephens, Koshiyama et al. 2001).

Durch die gezielte enzymatische Entfernung Heparansulfat-ähnlicher Strukturen auf der humanen Zelloberfläche konnte die Adhäsion Aga2p-OmcB präsentierenden Hefen um 80% reduziert werden (Abb. 22, Ergebnisse). Wurden hingegen die Aga2p-OmcB Hefen mit dem Enzym Heparinase I behandelt, so hatte dies keinen Einfluss auf die Adhäsion der Hefen. Dies lässt vermuten, dass OmcB an Heparansulfat-ähnliche Strukturen auf der humanen Zelle bindet. Bestätigt wurden diese Vermutungen durch den Einsatz verschiedener GAG-defizienter CHO-Zelllinien. In Adhäsionstests mit diesen Zellen zeigten Aga2p-OmcB exprimierende Hefen nur Adhäsion an Wildtypzellen (CHO-K1), nicht aber an Zellen, die keine GAGs (pgsA-745) oder die kein Heparansulfat (pgsD-677) mehr synthetisieren können. Die für das *C. pneumoniae* OmcB Protein ermittelte GAG-Abhängigkeit konnte auch für die *C. pneumoniae* Infektion gezeigt werden. Die Heparinase I-Behandlung von humanen Zellen führt zu einer 90%igen Infektionsreduktion, während die enzymatische Behandlung von EBs keinen negativen Effekt auf die Infektion hatte (Beswick, Travelstead et al. 2003), (Wuppermann, Hegemann et al. 2001). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die GAG-defizienten CHO-Zellen ohne Heparansulfat auf der Oberfläche deutlich schlechter zu infizieren sind als Wildtypzellen (Beswick, Travelstead et al. 2003), (Wuppermann, Hegemann et al. 2001).

Die Ergebnisse aus den Analysen zur GAG-Abhängigkeit der Adhäsion von Aga2p-OmcB Hefen lassen vermuten, dass das Protein spezifisch an ein Heparansulfat-ähnliches Molekül auf der Oberfläche von Zellen bindet. Die Spezifität zeigt sich dadurch, dass andere GAGs wie Chondroitinsulfat keine Einfluss auf die Adhäsion ausüben. Die Zusammensetzung, Modifikation und Struktur von GAGs ist sehr heterogen, jedoch sind Moleküle wie Heparansulfat auf Zelloberflächen oder in der Extrazellulären Matrix besonders weit verbreitet (Esko and Selleck 2002), (Capila and Linhardt 2002), (Bernfield, Gotte et al. 1999). Viele pathogene Organismen besitzen Oberflächen-lokalisierte Adhäsine zur Bindung von Heparansulfat und der damit verbundenen Invasion in Zellen und Gewebe (Menozi, Pethe et al. 2002), (Rostand and Esko 1997), (Wadstrom and Ljungh 1999). Auch die *C. pneumoniae* Infektion verläuft abhängig von der Präsenz Heparansulfat-ähnlicher Moleküle auf der Zelloberfläche (Wuppermann, Hegemann et al. 2001). Zusammenfassend konnte für die Aga2p-OmcB Adhäsion an Humanzellen die gleiche GAG-Abhängigkeit festgestellt werden wie für die *C. pneumoniae* Infektion (Wuppermann, Hegemann et al. 2001), (Beswick, Travelstead et al. 2003).

5.3.4. Identifizierung der N-terminalen Adhäsionsdomäne

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Aga2p-OmcB präsentierende Hefen an GAG-Strukturen humaner Zellen adhären, sollte die Protein-Domäne identifiziert werden, die für die Adhäsion verantwortlich ist. In ersten Untersuchungen wurde eine willkürliche

Zweiteilung des Proteins vorgenommen und die adhäsiven Eigenschaften der einzelnen OmcB Domänen wurden analysiert. Dabei zeigte sich, dass der N-terminale Teil Aga2p-OmcB-N (AS 1-282), ein ähnliches Adhäsionsverhalten aufwies wie das Volllängenprotein. Für die C-terminale Variante Aga2p-OmcB-C (AS 275-556) konnten hingegen keine adhäsiven Eigenschaften ermittelt werden. Die für die Adhäsivität verantwortliche Protein-Domäne befindet sich demnach im N-Terminus des Proteins.

Bioinformatische Analysen der OmcB Proteinstruktur (Abb. 3, Einleitung) ergaben eine Unterteilung des Proteins in eine Oberflächen-lokalisierte, N-terminale Domäne mit hydrophilen Eigenschaften (Mygind, Christiansen et al. 1998). Für den stark hydrophoben C-terminalen Teil des Proteins ist hingegen eine Membran-Assoziierung wahrscheinlich (Mygind, Christiansen et al. 1998). Diese Befunde gehen einher mit der im N-Terminus lokalisierten Adhäsionsdomäne. Im *C. trachomatis* OmcB befindet sich in einer 20 Aminosäuren große Domäne im N-Terminus die Bindestelle, die für die Bindung des Proteins an Heparin verantwortlich ist (Stephens, Koshiyama et al. 2001). Die erneute Verkürzung des OmcB Proteins auf ein 100 Aminosäuren umfassendes N-terminales Fragment Aga2p-OmcB-BD (AS 1-100), zeigte in den Adhäsionstests eine relative Adhäsion von 47% (Abb. 24B, Ergebnisse). Die festgestellte relative Adhäsion des Volllängenproteins Aga2p-OmcB betrug 45%. Dies bedeutet, dass die ersten 100 Aminosäuren des *C. pneumoniae* OmcB die Protein-Domäne beinhalten, die für die Adhäsionsfunktion entscheidend ist. Bei allen generierten OmcB Varianten wurde schließlich untersucht, in wie weit die vermittelte Adhäsion an humane Zellen GAG-abhängig verläuft. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Vorinkubation von Aga2p-OmcB, Aga2p-OmcB-N und Aga2p-OmcB-BD Hefezellen mit Heparin eine vollständige Aufhebung der relativen Adhäsion zur Folge hatte. Die experimentellen Daten belegen, dass die Adhäsion des *C. pneumoniae* OmcB an GAG-Strukturen auf humanen Zellen über eine Heparinbindedomäne im N-Terminus des Proteins vermittelt wird.

In Übereinstimmung dazu konnte für das aus *C. psittaci* cOMCs isolierte OmcB gezeigt werden, dass es an humane Zellen adhärert. Wurden jedoch die potentiell Oberflächen-exponierten N-terminalen Protein-Fragmente durch Protease-Behandlung von den EBs entfernt, so führte dies zum vollständigen Verlust der Adhäsivität (Ting, Hsia et al. 1995).

5.3.5. Spezifische basische Aminosäuren der Adhäsionsdomäne des OmcB sind verantwortlich für die Adhäsionsfunktion

Um die Bindungseigenschaften der Heparinbindedomäne des OmcB Proteins genauer zu charakterisieren, wurde untersucht welche Aminosäuren innerhalb der Domäne verantwortlich für die Adhäsivität des Proteins sind.

Heparin-bindende Proteine besitzen häufig eine Akkumulation basischer Aminosäuren wie Lysine und Arginine, die mit den negativ geladenen Sulfatgruppen der

Glykosaminoglykan-Ketten interagieren können (Hileman, Fromm et al. 1998), (Capila and Linhardt 2002). Dabei treten die basischen Aminosäuren entweder in distinkten Konsensus-Sequenzen auf oder sind über das Protein verteilt und gelangen durch die Proteinfaltung in räumliche Nähe (Hileman, Fromm et al. 1998), (Cardin and Weintraub 1989).

Alle OmcB Proteine mit Ausnahmen vom OmcB aus Parachlamydidium UWE25 tragen in den Aminosäuren 40-100 eine stark basische Domäne. Beim *C. pneumoniae* OmcB Protein machen die basischen Aminosäuren zirka 30% der Domäne aus. Eingebunden in diese Akkumulation von basischen Aminosäuren befindet sich eine Konsensus-Sequenz

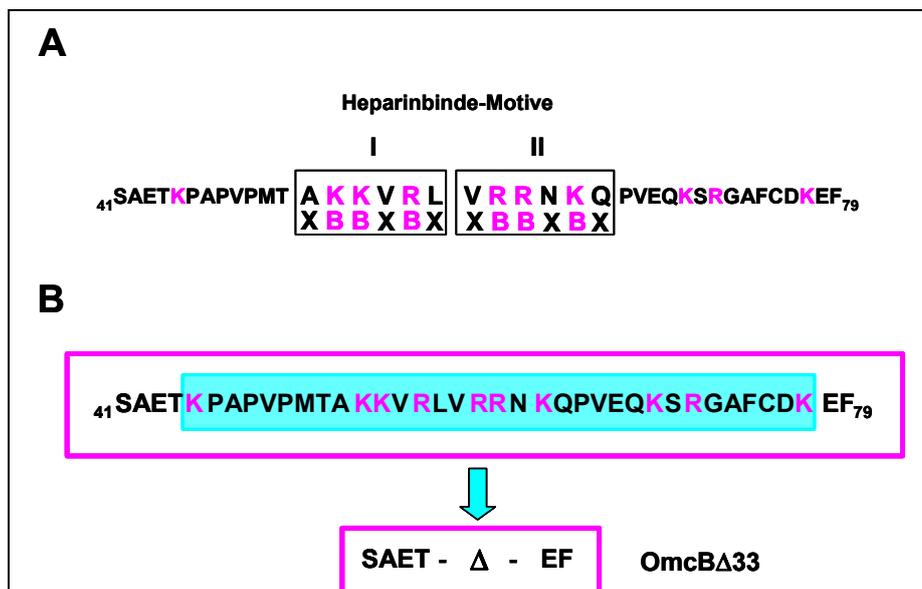


Abbildung 49: Verteilung der basischen Aminosäuren in der N-terminalen Heparinbindedomäne des *C. pneumoniae* OmcB Proteins.

A) Duplikation der Konsensus-Sequenz XBBXBX in der Heparinbindedomäne. B) Deletion von 33 Aminosäuren in der Heparinbindedomäne des *C. pneumoniae* OmcB Proteins.

mit der Aminosäureabfolge X B B X B X. Diese Sequenz aus basischen (B) und variablen unpolaren Aminosäuren (X) wurde auch bei bekannten Heparin-bindenden Proteinen wie Vitronectin, Thrombospondin ApoB100 oder dem Chemokin RANTES nachgewiesen (Hileman, Fromm et al. 1998), (Cardin and Weintraub 1989), (Proudfoot, Fritchley et al. 2001). Die Vergleiche der Aminosäuresequenz verschiedener OmcB Proteine zeigte, dass dieses Konsensus-Motiv stark konserviert ist. Das X B B X B X Motiv ist in allen OmcB Proteinen von zusätzlichen und basischen Aminosäuren umgeben, aber das *C. pneumoniae* Protein weist eine Besonderheit auf, denn als einziges verfügt über eine exakte Duplikation des Motivs (Abb. 49A).

In einer Deletionsanalyse wurde zunächst eine 33 Aminosäuren große Sequenz der Heparinbindedomäne aus dem OmcB entfernt. Diese Deletion umfasst beide Konsensus-Motive, sowie alle zusätzlich vorhandenen basischen Aminosäuren der

Heparinbindedomäne (AS 41-79) (Abb. 49B). Das so generierte Aga2p-OmcB Δ 33 Protein zeigte in den Hefeadhäsionstests keine Bindung an HEp-2 Zellen. Somit führt die Deletion des 33 Aminosäuren langen Abschnittes in der Heparinbindedomäne zum vollständigen Verlust der Adhäsionsfunktion des Proteins, das heißt dieser Abschnitt des Proteins und die darin befindlichen basischen Aminosäuren sind notwendig für die Adhäsionsfunktion des OmcB Proteins.

Um zu untersuchen, welche der basischen Aminosäuren aus dem deletierten Abschnitt der Heparinbindedomäne für die Bindung an GAGs der humanen Zelloberfläche wichtig sind, wurde eine gerichtete Mutagenese im Aga2p-OmcB-BD Fusionsprotein durchgeführt und basische Aminosäuren wurden durch unpolare Alanine ersetzt. Die Mutagenese wurde im Motiv I durchgeführt, da dieses aufgrund seiner Aminosäurekomposition konserviert in allen Chlamydien-Spezies vorliegt. Für die Mutanten mit Einzelaminosäureaustauschen der Lysine an Position 54 oder 55 konnte im Vergleich mit dem Wildtypprotein nur eine schwache Reduktion der Adhäsion ermittelt werden (Abb.29, Ergebnisse). Der Austausch des Arginins an Position 57 hatte eine deutlich stärkere Reduktion der relativen Adhäsion zur Folge. Die deutlichste Reduktion der Adhäsion zeigte jedoch die Mutante Aga2p-OmcB-BD_{KKRA}, bei der alle drei basischen Aminosäuren durch Alanine ersetzt wurden. Die Ergebnisse aus der Mutagenese deuten an, dass das Arginin an Position 57 eine wichtigere Funktion bei der Bindung von GAGs inne hat als die Lysine an Position 54 oder 55. Dies bestätigten Beobachtungen, dass die Entfernung von Argininen durchschnittlich eine stärkere Reduktion der Heparinbindung zur Folge hat als der Austausch von Lysinen zu Alaninen (Opie, Warrington et al. 2003), (Stenlund, Lindberg et al. 2002), (Proudfoot, Fritchley et al. 2001). Dies ist wahrscheinlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass Arginine stärkere Wasserstoffbrücken zu den Sulfationen der GAG-Strukturen ausbilden können als Lysine (Fromm, Hileman et al. 1995), (Hileman, Fromm et al. 1998). Nur die Entfernung aller drei basischen Aminosäuren des konservierten Motiv I hatte den vollständigen Verlust der Adhäsivität zur Folge, wie schon zuvor für die Aga2p-OmcB Δ 33 Hefen gezeigt und bestätigt somit die Relevanz des Motiv I für die GAG-Bindung.

Mutationsanalysen anderer Heparin-bindender Proteine wie dem Chemokin RANTES, welches ebenfalls über ein Konsensus-Motiv B B X B verfügt haben gezeigt, dass häufig alle basischen Aminosäuren der basischen Region zu Alaninen mutiert werden müssen, um eine deutliche Reduktion der Heparinbindung zu erzielen (Proudfoot, Fritchley et al. 2001). Bei einem weiteren Heparin-bindenden Protein, dem Hüllprotein des Adenovirus wurden kein Konsensus-Motiv sondern insgesamt 14 basische Aminosäuren verteilt über die Proteinsequenz festgestellt. In einer Mutationsanalyse wurden diese einzeln oder paarweise durch Alanine ersetzt und es zeigte sich, dass die Mutation von zwei

benachbarten Argininen ausreichend war die Heparinbindung des Proteins vollständig zu inhibieren (Opie, Warrington et al. 2003). Für die Bindung eines Proteins an Heparin sind im Allgemeinen zwei basische Aminosäuren mit einem Abstand von 20 Å ausreichend (Margalit, Fischer et al. 1993), (Hileman, Fromm et al. 1998). In Heparin-bindenden Proteinen, die ein Konsensus-Motiv besitzen, findet man für diese entweder α -helikale oder β -Faltblattstrukturen (Hileman, Fromm et al. 1998), (Capila and Linhardt 2002). Dabei werden die basischen Aminosäuren so präsentiert, dass ein optimaler Kontakt zwischen Protein und GAG hergestellt werden kann. Für die Bindung an spezifische GAG-Strukturen ist neben der Anordnung und dem Abstand der einzelnen basischen Aminosäuren auch die Verteilung der unpolaren Aminosäuren (X) entscheidend. Die unpolaren Aminosäuren tragen über verschiedene Wechselwirkungen wie zum Beispiel Wasserstoffbrücken mit zur Spezifität der GAG-Bindung bei (Hileman, Fromm et al. 1998), (Capila and Linhardt 2002). Noch wichtiger ist die räumliche Anordnung basischer Aminosäuren bei Proteinen wie Thrombin oder Antithrombin, die keine Konsensus-Sequenz besitzen und nur über die korrekte Proteinfaltung in der Lage sind GAGs zu binden (Li, Johnson et al. 2004), (Carter, Cama et al. 2005). Die Tertiärstruktur des Antithrombin ist essentiell für die spezifische Bindung eines einzigartigen Heparin-Pentasaccharids (Li, Johnson et al. 2004).

5.4. Rekombinant hergestelltes *C. pneumoniae* OmcB Protein bindet an humane Zellen

Um die mittels Hefe-System gewonnenen Daten zur Adhäsivität des *C. pneumoniae* OmcB zu verifizieren, wurden verschiedene OmcB Varianten rekombinant in *E. coli* hergestellt und aufgereinigt. Das gereinigte Protein wurde zur Beschichtung von Latexkügelchen eingesetzt, um so die Adhäsion von rekombinatem OmcB an humane HEP-2 Zellen zu bestimmen.

Zur Analyse der OmcB Proteinfunktion wurden neben dem Volllängenprotein die verschiedenen Varianten OmcB Δ 33, OmcB-BD und OmcB-BD_{KKRA} in *E. coli* produziert und affinitätschromatographisch aufgereinigt. In Bindungstests zeigten OmcB beschichtete Latexkügelchen eine signifikante Adhäsion von mehr als 70% an humane HEP-2 Zellen, während die OmcB Δ 33 Variante hingegen kein adhäsives Verhalten mehr aufwies. Damit weisen die beiden rekombinant hergestellten Proteine die gleichen adhäsiven Eigenschaften auf wie schon zuvor im Hefe-System ermittelt. Dies bedeutet zum einen eine Bestätigung des Hefe-Systems als ein Werkzeug zur Analyse der Adhäsionsfunktion von Proteinen. Zum anderen kann nun auch für rekombinant hergestelltes *C. pneumoniae* OmcB Protein festgestellt werden, dass es starke adhäsive Eigenschaften besitzt, welche abhängig vom Vorhandensein der Heparinbindedomäne sind.

Um zu überprüfen, ob die basischen Aminosäuren der Heparinbindedomäne für die Bindung des Proteins an GAGs auf der humanen Zelloberfläche benötigt werden, wurde die Adhäsivität der rekombinanten OmcB-Fragmente OmcB-BD und OmcB-BD_{KKRA} verglichen. Im Hefe-System zeigte die Dreifachmutante die stärkste Reduktion der Adhäsion und auch in den Bindungstests mit Protein-beschichteten Latexkügelchen zeigten OmcB-BD_{KKRA} beschichtete Kügelchen eine 60% schwächere Adhäsion an humane Zellen als die OmcB-BD beschichteten Kügelchen (80%) (Abb. 34B, Ergebnisse). Damit weist OmcB-BD die gleichen adhäsiven Eigenschaften auf wie das Vollängenprotein. Der Vergleich der Adhäsion des OmcB-BD und des Vollängenproteins zeigt eindeutig, dass die N-terminale Domäne des Proteins die Adhäsionsfunktion beinhaltet. Mittels der Untersuchungen konnte außerdem gezeigt werden, dass im Vergleich zum Wildtypprotein rekombinantes OmcB-BD_{KKRA} eine deutlich reduzierte Adhäsivität besitzt. Dies bedeutet, dass die drei basischen Aminosäuren der Konsensus-Sequenz I essentiell für die Adhäsionsfunktion des Proteins sind.

5.5. Das OmcB Protein ist das chlamydiale Adhäsion bei der *C. pneumoniae* Infektion

Um die Relevanz des Proteins als Adhäsion im Infektionsprozess nachzuweisen, wurden verschiedene experimentelle Strategien angewandt. Dabei sollte gezeigt werden, dass unterbindet man die OmcB-Funktion, das heißt die Adhäsion an GAG-Strukturen auf der Wirtszelloberfläche, so ist die Folge eine Reduktion der Infektion. Die Interaktion zwischen dem chlamydialen OmcB Protein und den humanen GAGs wurde zum einen durch Vorinkubation von *C. pneumoniae* EBs mit dem *C. pneumoniae*-spezifischen OmcB Antikörper und zum anderen durch Vorbehandlung der HEP-2 Zellen mit dem rekombinanten OmcB Protein verhindert. Der Antikörper bindet dabei an die Oberflächenlokalisierten Epitope, die für die Adhäsionsfunktion des Proteins wichtig sind und das rekombinante Protein besetzt die GAG-Struktur der Wirtszelloberfläche.

Im experimentellen Ansatz erbrachte die Vorbehandlung mit dem voradsorbierten OmcB Antikörper eine 60%ige Reduktion der Infektion, während das Präimmunserum keine Infektionsreduktion bewirkte (Abb. 37, Ergebnisse).

Schon für andere Außenmembranproteine, für die eine Funktion als chlamydiales Adhäsion diskutiert wird, konnte durch Zugabe spezifischer Antikörper die Infektion neutralisiert werden (Su, Watkins et al. 1990), (Wehrl, Brinkmann et al. 2004). Beim Momp Protein von *C. trachomatis* blockierten monoklonale Antikörper gegen die variablen Domänen II und IV die Adhäsion von EBs und reduzierten damit die Infektion (Su, Watkins et al. 1990), (Caldwell and Perry 1982). Eine Infektionsreduktion wurde ebenfalls beim Einsatz eines Antikörpers gegen das *C. trachomatis* PorB festgestellt, obwohl bislang keine

Adhäsionsfunktion für das Poren-bildende Protein nachgewiesen ist (Kubo and Stephens 2000).

Bei der *C. pneumoniae* Infektion konnte durch den Einsatz eines monoklonalen Momp Antikörpers ebenfalls eine Infektionsreduktion erreicht werden (Wolf, Fischer et al. 2001). Für das Oberflächen-lokalisierte Pmp21 Protein von *C. pneumoniae* konnten im Hefe-System adhäsive Eigenschaften nachgewiesen werden (Georgoudis 2004). Wurde ein Antikörper gerichtet gegen den N-Terminus des Proteins zur Vorinkubation der chlamydialen EBs verwendet, so konnte die *C. pneumoniae* Infektion um 95% reduziert werden (Wehrl, Brinkmann et al. 2004). Andererseits wurde aber auch beschrieben, dass ein Antikörper gegen das *C. pneumoniae* LPS die Infektion neutralisieren kann (Peterson, de la Maza et al. 1998).

Die beobachtete Antikörperwirkung kann auf zwei verschiedene Weisen erklärt werden: die Infektionsreduktion tritt auf, weil durch die spezifische Bindung des Antikörpers an ein Adhäsins, dessen Interaktion mit dem Liganden auf der Wirtszelle verhindert. Vorstellbar ist aber auch, dass die Bindung eines großen Antikörpermoleküls an Oberflächen-lokalisierte Epitope von Außenmembranproteinen die Funktion eines benachbarten Adhäsins sterisch behindert.

Daher sollte im Neutralisations-Experiment mit dem rekombinant hergestellten OmcB Protein, spezifisch die Bindung des chlamydialen Proteins an die eukaryotischen GAG-Strukturen unterbunden werden, so dass keine Adhäsion der Bakterien mehr stattfindet. Die Vorbehandlung der HEp-2 Zellen mit dem OmcB Protein reduzierte die Infektion um 80%, während für das OmcB Δ 33 Protein nur eine Reduktion von 7% beobachtet wurde (Abb. 35, Ergebnisse). Ohne die funktionelle Heparinbindedomäne ist keine Bindung des OmcB Proteins an GAGs möglich. Daher kann die Deletionsvariante OmcB Δ 33 die *C. pneumoniae* Infektion nicht reduzieren, weil das Protein keinen Einfluss auf die Adhäsion der Bakterien an die HEp-2 Zellen hat.

Beide Ansätze der Infektions-Inhibierung zeigten das gleiche Ergebnis: sowohl durch den OmcB Antikörper als auch durch das rekombinant hergestellte Protein wurde die Infektion inhibiert. Die Infektionsreduktion wird dabei auf die Blockierung der OmcB Funktion zurückgeführt, da in beiden Fällen die Interaktion zwischen dem Protein und den Glykosaminoglykanen der Wirtszelle verhindert wird.

Um direkt zu überprüfen, ob das OmcB Protein tatsächlich für die Adhäsion von *C. pneumoniae* an die humane Zelle verantwortlich ist, wurde mittels ELISA die Adhäsion chlamydialer EB-Partikel an HEp-2 Zellen gemessen. Die Adhäsion von *C. pneumoniae* an HEp-2 Zellen konnte durch Zugabe von exogenem Heparin oder rekombinantem OmcB vollständig aufgehoben werden. Der kompetitive Einfluss des Heparins auf die Adhäsion wurde schon in früheren Untersuchungen gezeigt und konnte somit in diesem Experiment bestätigt werden (Wuppermann, Hegemann et al. 2001). Wurden die humanen Zellen mit dem OmcB Protein vorinkubiert, konnte ebenfalls keine Adhäsion chlamydialer Partikel an die Zellen mehr festgestellt werden. Die Inkubation der HEp-2 Zellen mit dem OmcB Δ 33 Protein hatte hingegen keinen Einfluss auf die Adhäsion der Chlamydien. Alle experimentellen Daten zusammengenommen erlauben die Erstellung eines Modells über die OmcB-vermittelte Adhäsion von *C. pneumoniae* (Abb. 50). Die Chlamydien adhären über das Oberflächen-lokalisierte OmcB Protein an GAG-Strukturen auf der eukaryotischen Wirtszelle. Dabei wird die Interaktion zwischen Protein und GAGs durch bestimmte basische Aminosäuren in der N-terminalen Heparinbindedomäne des OmcB Proteins vermittelt.

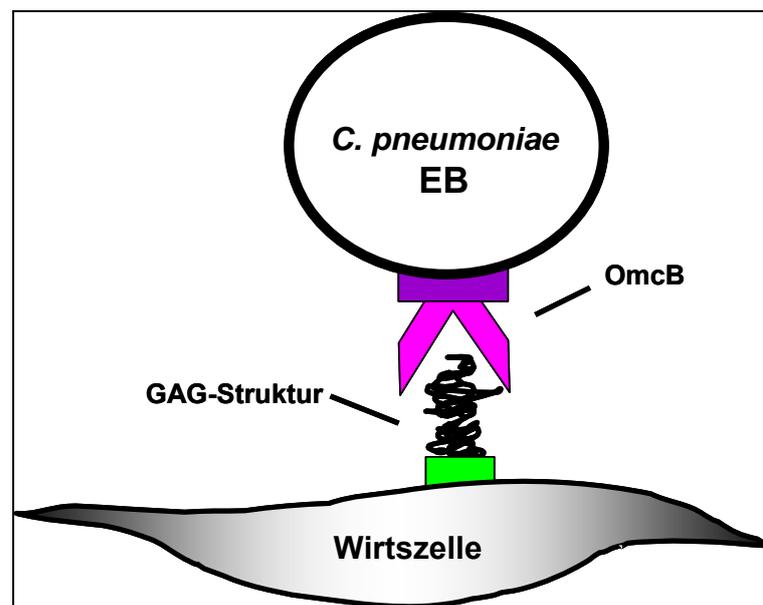


Abbildung 50: Schematische Darstellung der OmcB-vermittelten *C. pneumoniae* Adhäsion.

Im Falle einer chlamydialen Infektion stellt die OmcB-vermittelte Adhäsion wahrscheinlich den ersten, reversiblen Kontakt zwischen Bakterium und Wirtszelle dar. In einem zweiten irreversiblen Schritt findet dann die Bindung eines chlamydialen Liganden an seinen humanen Rezeptor statt, der den Prozess der Rezeptor-vermittelten Endozytose für die Internalisierung des Chlamydiums einleitet. Dies erfordert die Aktivierung verschiedener zellulärer Signalwege, die zum Beispiel auf das Aktinzytoskelett einwirken. Die offene Frage die am Ende bestehen bleibt ist die nach der GAG-Struktur, an die das OmcB

bindet. Um diese zu identifizieren könnten Methoden wie Oligosaccharid-Micro-Arrays, bei denen das Protein an hochreine, definierte Oligosaccharide binden kann, eingesetzt werden (Feizi and Chai 2004). Eine weitere Möglichkeit wäre eine neuartige massenspektrometrische Analyse, die bei OmcB-GAG Komplexen sowohl die genaue Struktur der Bindestelle, als auch die exakte Struktur des GAG-Moleküls ermitteln könnte (Yu, Sweeney et al. 2005).

5.6. Charakterisierung der Adhäsionsfunktion des OmcB Proteins verschiedener chlamydialer Spezies

5.6.1. Die OmcB Proteine anderer chlamydialer Spezies vermitteln ebenfalls Adhäsion an humane Zellen

In den Untersuchungen zum *C. pneumoniae* OmcB konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Protein um ein Oberflächen-lokalisiertes, GAG-bindendes Adhäsion handelt. Durch die Interaktion des OmcB Proteins mit GAG-Strukturen auf der eukaryotischen Wirtszelle stellt es die Bindung der Chlamydien an die humane Zelle her.

Es stellte sich daher die Frage, ob das OmcB Protein bei allen chlamydialen Erregern die gleiche Funktion inne hat. Vergleiche der DNA-Sequenz ergaben, dass das *omcB* Gen stark konserviert zwischen den Spezies ist und während der Evolution einem stabilisierenden Selektionsdruck unterlag. Diese deutet ebenfalls auf eine essentielle Funktion des Proteins hin, die bei allen Spezies gleich ist (Millman, Tavaré et al. 2001). In bioinformatischen Analysen der Proteinsequenz verschiedener Chlamydien-Spezies konnte außerdem eine große Aminosäureidentität zwischen den OmcB Proteinen festgestellt werden (Abb. 51). Im Vergleich zum *C. pneumoniae* OmcB weisen die verschiedenen Spezies eine Aminosäureidentität zwischen 70-85% auf (Tabelle 1, Einleitung). Einzig das OmcB des Parachlamydiums UWE25 zeigt nur eine 33%ige Identität und stellt damit wahrscheinlich eine evolutionäre Vorstufe dar (Horn, Fritsche et al. 1999). Innerhalb der *C. trachomatis* Serovare kann sogar eine Homologie von 98% zwischen den OmcB Proteinen festgestellt werden.

Dabei ist bei allen OmcB Proteinen die größte Konserviertheit im C-Terminus (AS 100-562) auszumachen (Abb. 51). Der N-Terminus (AS 40-100, ohne Signalpeptid) weist hingegen die größte Variabilität auf und besitzt eine Aminosäureidentität von nur 18-29% (Mygind, Christiansen et al. 1998). Hydrophobizitäts-Vorhersagen ergaben bei allen Spezies eine potentielle Oberflächen-Lokalisierung dieser Domäne. Außerdem findet man innerhalb der N-terminalen 60 Aminosäuren bei allen OmcB Proteinen, bis auf OmcB des

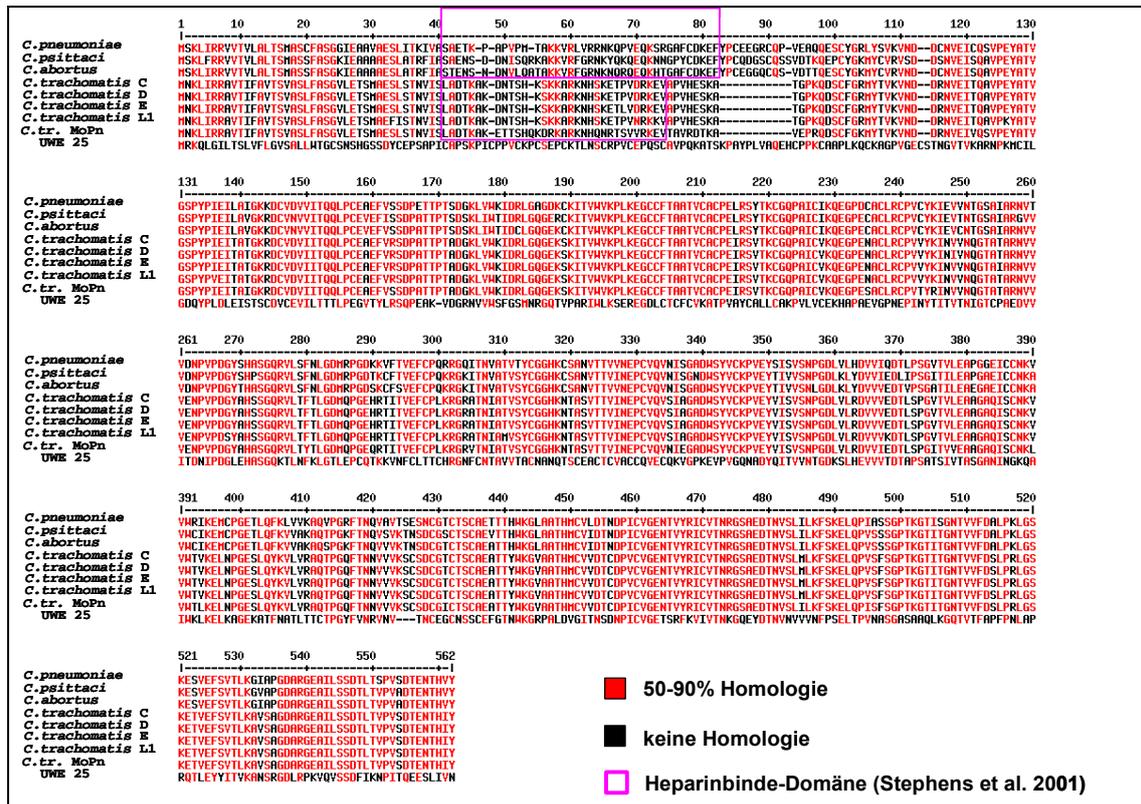


Abbildung 51: Alignment der OmcB Proteinsequenzen verschiedener chlamydialer Spezies.

Der N-Terminus (Aminosäure 1-100, Signalpeptid Aminosäure 1-40) verfügt über 19-28% Homologie zwischen den Spezies. Die Homologie der Proteine untereinander variiert von 33% (*C. pneumoniae* / Parachlamyidium UWE25) bis zu 98% (Vergleich verschiedener *C. trachomatis* Serovare).

Parachlamyidiums UWE25, eine Akkumulation basischer Aminosäuren und bei fast allen ist das Konsensus-Motiv X B B X B X exakt vorhanden (Abb. 62, Anhang). Beim *C. pneumoniae* OmcB wird über die basischen Aminosäuren der Heparinbindedomäne die Adhäsion des Proteins an humane Zellen vermittelt.

Um zu zeigen, dass die Adhäsionsfunktion des OmcB konserviert zwischen den einzelnen Serovaren und Spezies ist, wurden drei weitere OmcB Proteine auf ihre adhäsiven Eigenschaften untersucht. Ausgewählt wurden die OmcB Proteine der beiden *C. trachomatis* Serovare LGV und E, die eine 98%ige Aminosäureidentität zueinander aufweisen (Tabelle 1, Einleitung). Obwohl sich beide Erreger im Urogenitaltrakt manifestieren, ist der Infektionsverlauf der Serovare sehr unterschiedlich. Während Serovar E in den Epithelgeweben des Urogenitaltrakts verbleibt, dissimiiert

C. trachomatis Serovar LGV in das umgebende lymphatische System und verursacht systemische Erkrankungen (Wyrick, Choong et al. 1989), (Davis and Wyrick 1997). Als dritter Vertreter wurde das OmcB des Tier-pathogenen *C. psittaci* Biovars GPIC ausgewählt. Dieses Protein hat mit 84% mit die stärkste Homologie zum *C. pneumoniae* Protein (Tabelle 1, Einleitung).

Alle drei Proteine wurden im Hefe-System exprimiert und in Adhäsionstests auf ihre adhäsiven Eigenschaften überprüft. Im Vergleich zum *C. pneumoniae* OmcB zeigten Aga2p-OmcB-L1 und Aga2p-OmcB-GPIC exprimierende Hefen ebenfalls eine signifikante Adhäsion an die humanen HEp-2 Zellen (Abb. 52). Alle drei Proteine vermitteln eine durchschnittliche relative Adhäsion von 51%. Im Gegensatz dazu konnte für Aga2p-OmcB-E Hefen in den Adhäsionsstudien eine um 20% geringere relative Adhäsion als bei den Aga2p-OmcB-L1 präsentierenden Hefen festgestellt werden.

In Neutralisations-Experimenten konnte außerdem durch die Vorbehandlung der humanen Zellen mit rekombinant hergestelltem OmcB-L1 und OmcB-E Protein eine 80%ige Infektionsreduktion der *C. trachomatis* LGV bzw. E Infektion bewirkt werden (Abb. 41, Ergebnisse). Dabei konnte durch das OmcB-L1 Protein nicht nur die *C. trachomatis* LGV Infektion inhibiert werden, sondern auch die Infektion mit *C. trachomatis* E. Gleiches konnte auch für das OmcB-E Protein beobachtet werden.

Unter Berücksichtigung der Daten über das *C. pneumoniae* OmcB kann aus diesen experimentellen Ergebnissen über die OmcB Proteine der beiden *C. trachomatis* Serovare geschlossen werden, dass auch sie in den Adhäsions-Prozess involviert sind. Durch die Blockierung des Liganden auf der eukaryotischen Zelloberfläche verhindern sie Serovar-unpezifisch die Adhäsion der chlamydialen Partikel und somit die Infektion. Die große Homologie zwischen den *C. trachomatis* Proteinen (98% Aminosäureidentität) führt zu einer Serovar-übergreifend Infektionsreduktion. In Übereinstimmung mit dem inhibitorischen Effekt der beiden Proteine, d.h. der Interferenz zwischen chlamydialem OmcB und dem eukaryotischen Liganden muss angenommen werden, dass OmcB auf der Oberfläche der Chlamydien lokalisiert. Tatsächlich konnten in dieser Arbeit beide *C. trachomatis* Proteine auf der chlamydialen Oberfläche nachgewiesen werden. Sowohl OmcB-L1 als auch OmcB-E konnte in Einschlüssen infizierter Zellen detektiert werden.

Die publizierten Daten zur Oberflächen-Lokalisierung des OmcB von *C. trachomatis* Serovar LGV sind durchaus widersprüchlich. Während in Westernblot-Analysen kleiner N-terminaler Teil des Proteins als Oberflächen-exponiert nachgewiesen wurde, konnte in Immunofluoreszenz-Studien das Proteins erst nach Behandlung der chlamydialen Partikel mit der reduzierenden Chemikalie DTT zugänglich gemacht werden (Mygind, Christiansen et al. 1998), (Stephens, Koshiyama et al. 2001). Zur Lokalisierung des OmcB Proteins von *C. trachomatis* Serovar E wurde bisher nichts beschrieben.

Trotzdem lässt sich aufgrund der gewonnenen experimentellen Daten vermuten, dass OmcB bei allen chlamydialen Spezies ein Oberflächen-lokalisiertes Protein mit adhäsive Eigenschaften ist, welches die Funktion eines chlamydiales Adhäsins inne hat.

5.6.2. Die OmcB-vermittelte Adhäsion der einzelnen Chlamydien-Spezies weist eine unterschiedliche GAG-Spezifität auf

In den Untersuchungen zur OmcB Adhäsionsfunktion verhielten sich alle getesteten Proteine gleich. Es konnte aber ein geringer Unterschied in der Adhäsivität zwischen Aga2p-OmcB-L1 und Aga2p-OmcB-E exprimierenden Hefen an HEp-2 Zellen festgestellt werden.

Für das *C. pneumoniae* OmcB konnte gezeigt werden, dass das Protein an GAG-Strukturen auf der Oberfläche von humanen Zellen bindet. Damit ist es das Adhäsins, welches die GAG-abhängige Infektion von *C. pneumoniae* vermittelt (Wuppermann, Hegemann et al. 2001), (Beswick, Travelstead et al. 2003). Für den Infektionsprozess von *C. trachomatis* Serovar LGV und E sowie *C. psittaci* Biovar GPIC wurde die Relevanz von GAGs ebenfalls beschrieben (Zhang and Stephens 1992), (Chen and Stephens 1994), (Chen, Zhang et al. 1996), (Beswick, Travelstead et al. 2003), (Taraktchoglou, Pacey et al. 2001), (Gutierrez-Martin, Ojcius et al. 1997). Daher sollte auch für die OmcB Proteine der drei Spezies untersucht werden, in wie weit deren Bindung abhängig von GAGs ist.

In den durchgeführten Adhäsionstest konnte nach Vorbehandlung der Hefezellen mit Heparin für Aga2p-OmcB-L1 und Aga2p-OmcB-GPIC exprimierende Hefen eine 80%ige Reduktion der Adhäsion

festgestellt werden (Abb. 52). Die gleiche Heparin-abhängige Reduktion konnte zuvor schon für das *C. pneumoniae* OmcB gezeigt werden.

Besonders auffällig war jedoch das Ergebnis der Aga2p-OmcB-E präsentierenden Hefen, sie zeigten keine

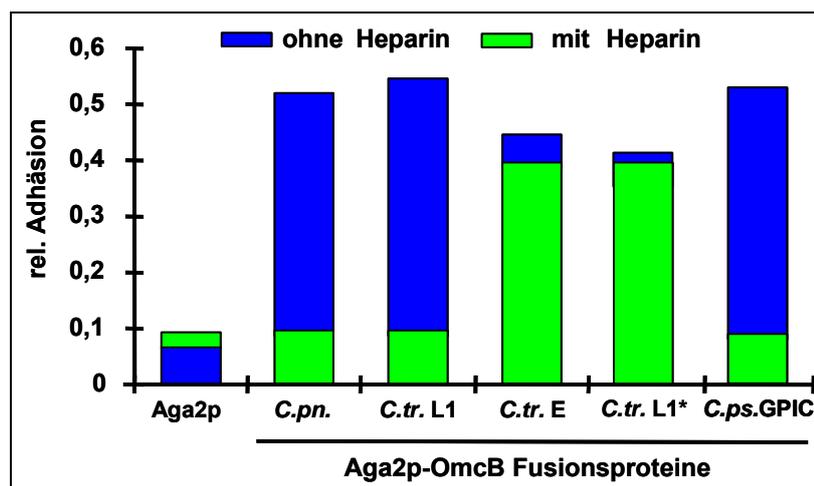


Abbildung 52: GAG-Abhängigkeit verschiedener OmcB Proteine.

signifikante Reduktion der Adhäsion nach Heparin-Behandlung. Die Heparin-Abhängigkeit der OmcB-vermittelten Adhäsion korreliert bei den untersuchten OmcB Proteinen mit der Heparin-Abhängigkeit der chlamydialen Infektion (Zhang and Stephens 1992), (Chen and

Stephens 1994), (Chen, Zhang et al. 1996), (Beswick, Travelstead et al. 2003), (Taraktchoglou, Pacey et al. 2001), (Gutierrez-Martin, Ojcius et al. 1997).

Um die Unterschiede der Heparin-Abhängigkeit der beiden *C. trachomatis* OmcB Proteine weiter zu überprüfen, wurden Adhäsionstests mit GAG-defizienten CHO-Zellen durchgeführt. Die verwendete Zelllinien können entweder keine GAGs synthetisieren (pgsA-745) oder kein Heparansulfat und stattdessen dreifach mehr Chondroitinsulfat produzieren (pgsD-677 Zellen) (Esko, Stewart et al. 1985). Sowohl Aga2p-OmcB-L1 als auch Aga2p-OmcB-E präsentierende Hefezellen zeigten Adhäsion an die Wildtypzellen, nicht aber an die mutanten pgsA-745 und pgsD-677 Zellen. Dies könnte bedeuten, dass beide *C. trachomatis* Proteine an ein Heparansulfat-ähnliches Molekül binden, welches auf den Zelloberflächen der mutierten CHO-Zellen nicht präsent ist.

Auch in Infektionsstudien mit verschiedenen CHO-Mutantenlinien zeigte *C. trachomatis* Serovar LGV bei pgsD-677 Zellen eine 60%ige Reduktion der Infektion, für pgsA-745 Zellen wurde eine 95%ige Reduktion ermittelt (Yabushita, Noguchi et al. 2002), (Carabeo and Hackstadt 2001). Im Gegensatz dazu waren pgsB-761 Zellen, die nur noch 5% Heparansulfat besitzen zu 100% infizierbar (Esko, Stewart et al. 1985), (Zhang and Stephens 1992). Für *C. trachomatis* Serovar E konnte bei keiner der verwendeten CHO-Zellen eine Infektionsreduktion festgestellt werden (Beswick, Travelstead et al. 2003). Wurden Zellen (pgsF-17) mit einem Defekt in der 2-O-Sulfatierung von Heparansulfat verwendet, so konnte kein negativer Effekt des veränderten Sulfatierungsgrads auf die Infektion von Serovar LGV festgestellt werden (Yabushita, Noguchi et al. 2002). Wurde jedoch durch die Behandlung von HeLa Zellen mit Natriumchlorat die Sulfatierung der GAGs vollständig inhibiert, trat eine Infektionsreduktion nur für die Serovar LGV Infektion auf. Die Infektion durch Serovar E wurde hingegen nur geringfügig reduziert (Fadel and Eley 2004).

Für die beiden *C. trachomatis* OmcB Proteine kann ein deutlicher Unterschied bei der GAG-Bindung festgestellt werden. Jedes OmcB Protein bindet wahrscheinlich spezifisch an ein bestimmtes Heparansulfat-ähnliches Molekül, welches über eine einzigartige Modifizierung verfügt. *C. trachomatis* LGV erkennt und bindet über sein OmcB anscheinend ein breiteres Spektrum an GAG-Molekülen, als es bei *C. trachomatis* E der Fall ist. Vermutlich trägt die Spezifität der OmcB Proteine mit zum unterschiedlichen Zelltropismus der Serovare LGV und E bei.

Für die invasiven, dissimulierenden *C. trachomatis* LGV Serovare ist die Infektion basolateraler Epithelien beschrieben. Die Erreger nutzen dabei wahrscheinlich die GAGs der Extrazellulären Matrix, um Zellen von der basolateralen Seite zu infizieren und auch, um in tiefere Gewebeschichten bis zum lymphatischen System vorzudringen (Davis and Wyrick 1997), (Davis, Raulston et al. 2002), (Carabeo and Hackstadt 2001).

C. trachomatis Serovar E verbleibt hingegen im Lumen des Urogenitaltrakts und infiziert Epithelzellen vorwiegend von der apikalen Seite, die wahrscheinlich über ein anderes Spektrum an GAG-Strukturen verfügt (Davis, Raulston et al. 2002), (Davis and Wyrick 1997). Außerdem nutzt jedes Serovar potentiell weitere Zell-spezifische Rezeptoren oder Adhäsionsmechanismen, die mit zum Gewebetropismus beitragen (Carabeo and Hackstadt 2001).

5.6.3. Die GAG-Spezifität der *C. trachomatis* OmcB Proteine wird durch die Unterschiede in der Proteinsequenz determiniert

Die Identifizierung des richtigen GAG-Liganden für die einzelnen OmcB Proteine ist aufgrund der großen Diversität der Moleküle sehr schwierig (Capila and Linhardt 2002), (Esko and Selleck 2002). Zusätzlich präsentiert jede Zelle und jedes Gewebe ein eigenes Repertoire an unterschiedlichen GAGs (Maccarana, Sakura et al. 1996), (Kato, Wang et al. 1994). Für verschiedene Heparin-bindende Proteine wurden in anspruchsvollen experimentellen Ansätzen die GAG-Strukturen identifiziert, die spezifisch für das jeweilige Protein ist (Feizi and Chai 2004), (Harmer, Ilag et al. 2004), (Yu, Sweeney et al. 2005). Dabei wurde zumeist die minimale Kettenlänge der Zuckeruntereinheiten sowie der Sulfatierungsgrad des GAGs ermittelt (Shaw, Johnson et al. 2004), (Yu, Sweeney et al. 2005), (Raman, Sasisekharan et al. 2005), (Vives, Imberty et al. 2005).

Da die unterschiedliche GAG-Abhängigkeit der beiden *C. trachomatis* OmcB Proteine nicht über die Identifizierung spezifischer GAGs untersucht werden konnte, wurde in den Proteinstrukturen nach Unterschieden und Gemeinsamkeiten gesucht. Diese Veränderungen könnten der Grund für das unterschiedliche Bindungsverhalten sein. In den Sequenzvergleichen konnte ein Aminosäureaustausch zwischen OmcB-L1 und OmcB-E (Siehe Abb. 44 Ergebnisse) an Position 66 identifiziert werden, der Auswirkungen auf die Sekundärstruktur des Proteins hat. Das Prolin in OmcB-L1 liegt in der Heparinbindedomäne mit drei Aminosäuren Abstand zum Konsensus-Motiv. In einer Mutationsanalyse wurde das Prolin₆₆ im OmcB-L1 gegen das Leucin ersetzt, wie es im OmcB-E vorhanden ist. Die Analysen der generierten OmcB-L1* Mutante zeigten, dass sowohl die Adhäsivität des Proteins verändert wurde als auch dessen Heparin-Abhängigkeit. Die OmcB-L1* Mutante verhielt sich in den Adhäsionstests nicht mehr wie das OmcB-L1 Wildtypprotein, sondern wie das OmcB-E Protein, denn sie zeigte eine um 20% reduzierte relative Adhäsion und adhärierte nach Heparin-Vorbehandlung unverändert an HEp-2 Zellen (Abb. 52). Selbst große Mengen Heparin (~6000µg/ml) zeigten keine Wirkung auf die Adhäsion von Aga2p-OmcB-E oder Aga2p-OmcB-L1* Hefen an humane Zellen (Abb. 46, Ergebnisse).

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass möglicherweise die Proteinfaltung des OmcB von Serovar E durch Abweichungen der Aminosäuresequenz anders ist als die des Serovar LGV. Daraus resultiert ein deutlicher Unterschied in der Bindung von verschiedenen GAG-Strukturen (Abb. 53). Während die OmcB Proteine von *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* LGV und *C. psittaci* GPIC auch an Heparin als Ersatz für ihr natürliches Substrat binden, gelingt dies beim OmcB von *C. trachomatis* E und der OmcB-L1* Mutante nicht. Sie benötigen anscheinend ein anderes spezifischeres GAG-Molekül.

Die Spezifität der Protein-GAG Interaktion weist oftmals große Unterschiede auf. Für Antithrombin z.B. ist die Erkennung eines Pentasaccharids beschrieben, welches mit einer 1000-fach größeren Affinität gebunden wird als andere Heparin-Strukturen (Casu, Oreste et al. 1981). Andererseits konnte jedoch auch gezeigt werden, dass das Chemokin RANTES mit seinem B B X B Motiv ein Disaccharid bindet, welches in neun verschiedenen Modifikationsformen vorliegen kann (Shaw, Johnson et al. 2004).

Auch auf der GAG-Seite muss die dynamische Konformation von Heparin und Heparansulfat-ähnlichen Molekülen an ihren Iduronsäure-Untereinheit berücksichtigt werden (Mulloy and Forster 2000). Bei der Bindung des FGF (fibroblast growth factor) an Heparansulfat wird die GAG-Struktur über die Flexibilität der Iduronsäure angepasst, bis eine optimale Interaktion erreicht ist (Raman, Sasisekharan et al. 2005).

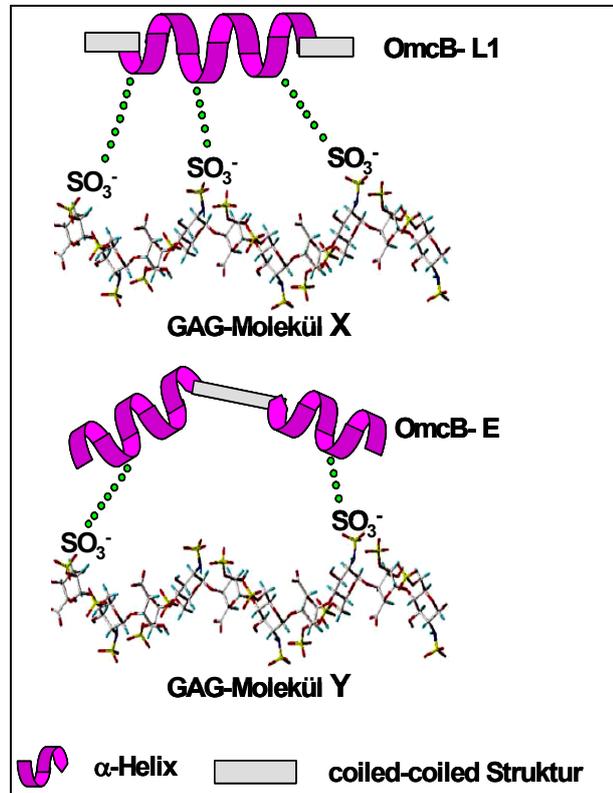


Abbildung 53: Unterschiede der Interaktion zwischen GAG-Molekülen und OmcB-L1 oder OmcB-E.

Heparansulfat-Molekül entnommen aus Capila und Linhardt, 2002.

Bei der Funktion des OmcB Proteins im chlamydialen Infektionsmechanismus stellt sich letztendlich die Frage, ob die Unterschiede in der Aminosäuresequenz und Sekundärstruktur der verschiedenen Proteine die Bindung bestimmter GAGs festlegen (Abb. 54). Bei dem ansonst so stark konservierten Protein könnten diese Unterschiede determinierend für den Zelltropismus der einzelnen Spezies sein. Während *C. pneumoniae* eine Vielzahl von Zelltypen infiziert, sind *C. trachomatis* LGV und E auf ein bestimmtes Gewebe zur primären Infektion beschränkt. Ausgehend von diesem Gewebe unterscheidet sich der weitere Infektionsverlauf in eine lokal-beschränkte Infektion (*C. trachomatis* E) oder eine durch Dissimination ins lymphatische System hervorgerufene systemische Infektion (*C. trachomatis* LGV). Bei der chlamydialen Infektion wird der Zelltropismus also entweder durch die Bindung des OmcB an

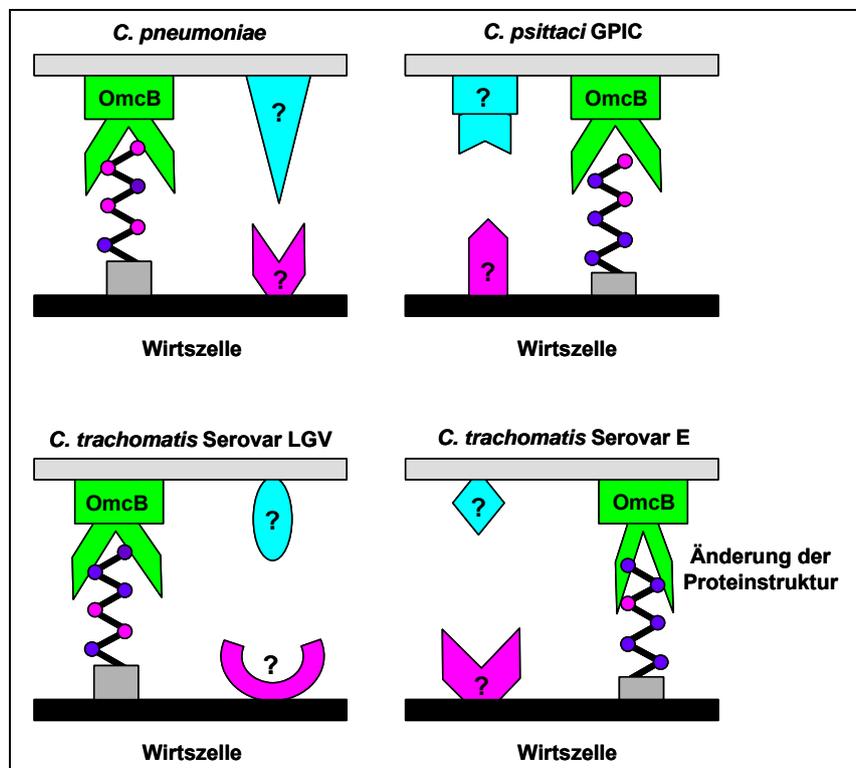


Abbildung 54: Model der OmcB-vermittelten Adhäsion an verschiedene GAGs.

Adhäsionsmechanismus der verschiedenen Spezies über OmcB an unterschiedliche GAG-Strukturen, sowie über eine Rezeptor (pink) -Ligand (blau) vermittelte Interaktion.

spezifische GAG-Strukturen auf den verschiedenen Zellen bestimmt oder durch die Bindung eines Zelltyp-spezifischen Rezeptors. Vielleicht ist sogar bei jeder chlamydialen Spezies die Präferenz für den GAG-abhängigen oder unabhängigen Adhäsionsmechanismus anders ausgeprägt.

7. Literaturverzeichnis

- Allen, J. E. and R. S. Stephens (1989). "Identification by sequence analysis of two-site posttranslational processing of the cysteine-rich outer membrane protein 2 of *Chlamydia trachomatis* serovar L2." J Bacteriol **171**(1): 285-91.
- Alvarez-Dominguez, C., J. A. Vazquez-Boland, et al. (1997). "Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition." Infect Immun **65**(1): 78-88.
- Baehr, W., Y. X. Zhang, et al. (1988). "Mapping antigenic domains expressed by *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(11): 4000-4.
- Balana, M. E., F. Niedergang, et al. (2005). "ARF6 GTPase controls bacterial invasion by actin remodelling." J Cell Sci **118**(Pt 10): 2201-10.
- Balin, B. J., H. C. Gerard, et al. (1998). "Identification and localization of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's brain." Med Microbiol Immunol (Berl) **187**(1): 23-42.
- Barbour, A. G., K. Amano, et al. (1982). "*Chlamydia trachomatis* has penicillin-binding proteins but not detectable muramic acid." J Bacteriol **151**(1): 420-8.
- Baron, M. J., G. R. Bolduc, et al. (2004). "Alpha C protein of group B *Streptococcus* binds host cell surface glycosaminoglycan and enters cells by an actin-dependent mechanism." J Biol Chem **279**(23): 24714-23.
- Barth, H., C. Schafer, et al. (2003). "Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate." J Biol Chem **278**(42): 41003-12.
- Becker, S., S. Theile, et al. (2005). "A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes." FEBS Lett **579**(5): 1177-82.
- Belland, R. J., G. Zhong, et al. (2003). "Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8478-83.
- Bernfield, M., M. Gotte, et al. (1999). "Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans." Annu Rev Biochem **68**: 729-77.
- Beswick, E. J., A. Travelstead, et al. (2003). "Comparative studies of glycosaminoglycan involvement in *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis* invasion of host cells." J Infect Dis **187**(8): 1291-300.
- Birkelund, S., A. G. Lundemose, et al. (1990). "The 75-kilodalton cytoplasmic *Chlamydia trachomatis* L2 polypeptide is a DnaK-like protein." Infect Immun **58**(7): 2098-104.
- Bobardt, M. D., P. Salmon, et al. (2004). "Contribution of proteoglycans to human immunodeficiency virus type 1 brain invasion." J Virol **78**(12): 6567-84.
- Boder, E. T., K. S. Midelfort, et al. (2000). "Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(20): 10701-5.
- Boder, E. T. and K. D. Wittrup (1997). "Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries." Nat Biotechnol **15**(6): 553-7.
- Bourin, M. C. and U. Lindahl (1993). "Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation." Biochem J **289** (Pt 2): 313-30.
- Boyle, E. C. and B. B. Finlay (2003). "Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence." Curr Opin Cell Biol **15**(5): 633-9.
- Brade, H., L. Brade, et al. (1987). "Chemical and serological investigations on the genus-specific lipopolysaccharide epitope of *Chlamydia*." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(8): 2508-12.
- Brumell, J. H. and S. Grinstein (2003). "Role of lipid-mediated signal transduction in bacterial internalization." Cell Microbiol **5**(5): 287-97.

- Brunham, R. C., D. J. Zhang, et al. (2000). "The potential for vaccine development against chlamydial infection and disease." *J Infect Dis* **181 Suppl 3**: S538-43.
- Bulut, Y., E. Faure, et al. (2002). "Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway." *J Immunol* **168**(3): 1435-40.
- Caldwell, H. D. and L. J. Perry (1982). "Neutralization of Chlamydia trachomatis infectivity with antibodies to the major outer membrane protein." *Infect Immun* **38**(2): 745-54.
- Campbell, L. A., O. B. ER, et al. (1995). "Detection of Chlamydia pneumoniae TWAR in human coronary atherectomy tissues." *J Infect Dis* **172**(2): 585-8.
- Campbell, L. A., C. C. Kuo, et al. (1990). "Structural and antigenic analysis of Chlamydia pneumoniae." *Infect Immun* **58**(1): 93-7.
- Capila, I. and R. J. Linhardt (2002). "Heparin-protein interactions." *Angew Chem Int Ed Engl* **41**(3): 391-412.
- Cappellaro, C., C. Baldermann, et al. (1994). "Mating type-specific cell-cell recognition of Saccharomyces cerevisiae: cell wall attachment and active sites of a- and alpha-agglutinin." *Embo J* **13**(20): 4737-44.
- Cappellaro, C., K. Hauser, et al. (1991). "Saccharomyces cerevisiae a- and alpha-agglutinin: characterization of their molecular interaction." *Embo J* **10**(13): 4081-8.
- Carabeo, R. A., S. S. Grieshaber, et al. (2002). "Chlamydia trachomatis induces remodeling of the actin cytoskeleton during attachment and entry into HeLa cells." *Infect Immun* **70**(7): 3793-803.
- Carabeo, R. A., S. S. Grieshaber, et al. (2004). "Requirement for the Rac GTPase in Chlamydia trachomatis invasion of non-phagocytic cells." *Traffic* **5**(6): 418-25.
- Carabeo, R. A. and T. Hackstadt (2001). "Isolation and characterization of a mutant Chinese hamster ovary cell line that is resistant to Chlamydia trachomatis infection at a novel step in the attachment process." *Infect Immun* **69**(9): 5899-904.
- Carabeo, R. A., D. J. Mead, et al. (2003). "Golgi-dependent transport of cholesterol to the Chlamydia trachomatis inclusion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(11): 6771-6.
- Cardin, A. D. and H. J. Weintraub (1989). "Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions." *Arteriosclerosis* **9**(1): 21-32.
- Carruthers, V. B., S. Hakansson, et al. (2000). "Toxoplasma gondii uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment." *Infect Immun* **68**(7): 4005-11.
- Carter, W. J., E. Cama, et al. (2005). "Crystal structure of thrombin bound to heparin." *J Biol Chem* **280**(4): 2745-9.
- Casu, B., P. Oreste, et al. (1981). "The structure of heparin oligosaccharide fragments with high anti-(factor Xa) activity containing the minimal antithrombin III-binding sequence. Chemical and ¹³C nuclear-magnetic-resonance studies." *Biochem J* **197**(3): 599-609.
- Cates, W., Jr. and J. N. Wasserheit (1991). "Genital chlamydial infections: epidemiology and reproductive sequelae." *Am J Obstet Gynecol* **164**(6 Pt 2): 1771-81.
- Cerrone, M. C., J. J. Ma, et al. (1991). "Cloning and sequence of the gene for heat shock protein 60 from Chlamydia trachomatis and immunological reactivity of the protein." *Infect Immun* **59**(1): 79-90.
- Chang, C. Y., J. Abdo, et al. (2005). "Development of peptide antagonists for the androgen receptor using combinatorial peptide phage display." *Mol Endocrinol* **19**(10): 2478-90.
- Chanton-Greutmann, H., R. Thoma, et al. (2002). "[Abortion in small ruminants in Switzerland: investigations during two lambing seasons (1996-1998) with special regard to chlamydial abortions]." *Schweiz Arch Tierheilkd* **144**(9): 483-92.
- Chen, J. C. and R. S. Stephens (1994). "Trachoma and LGV biovars of Chlamydia trachomatis share the same glycosaminoglycan-dependent mechanism for infection of eukaryotic cells." *Mol Microbiol* **11**(3): 501-7.
- Chen, J. C., J. P. Zhang, et al. (1996). "Structural requirements of heparin binding to Chlamydia trachomatis." *J Biol Chem* **271**(19): 11134-40.

- Chen, Y., T. Maguire, et al. (1997). "Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate." *Nat Med* **3**(8): 866-71.
- Chiswell, D. J. and J. McCafferty (1992). "Phage antibodies: will new 'coliclonal' antibodies replace monoclonal antibodies?" *Trends Biotechnol* **10**(3): 80-4.
- Ciervo, A., P. Visca, et al. (2002). "Antibodies to 60-kilodalton heat shock protein and outer membrane protein 2 of *Chlamydia pneumoniae* in patients with coronary heart disease." *Clin Diagn Lab Immunol* **9**(1): 66-74.
- Clausen, J. D., G. Christiansen, et al. (1997). "Chlamydia trachomatis utilizes the host cell microtubule network during early events of infection." *Mol Microbiol* **25**(3): 441-9.
- Clifton, D. R., C. A. Dooley, et al. (2005). "Tyrosine phosphorylation of the chlamydial effector protein Tarp is species specific and not required for recruitment of actin." *Infect Immun* **73**(7): 3860-8.
- Clifton, D. R., K. A. Fields, et al. (2004). "A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(27): 10166-71.
- Compton, T., D. M. Nowlin, et al. (1993). "Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate." *Virology* **193**(2): 834-41.
- Coomes, B. K. and J. B. Mahony (2002). "Identification of MEK- and phosphoinositide 3-kinase-dependent signalling as essential events during *Chlamydia pneumoniae* invasion of HEp2 cells." *Cell Microbiol* **4**(7): 447-60.
- Cossart, P. and P. J. Sansonetti (2004). "Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens." *Science* **304**(5668): 242-8.
- Costa, C. P., C. J. Kirschning, et al. (2002). "Role of chlamydial heat shock protein 60 in the stimulation of innate immune cells by *Chlamydia pneumoniae*." *Eur J Immunol* **32**(9): 2460-70.
- Culjak, A. (2001). Charakterisierung von Membranproteinen aus *Chlamydia pneumoniae*. *Institut für Mikrobiologie*. Düsseldorf, Heinrich-Heine Universität.
- Cunningham, A. F. and M. E. Ward (2003). "Characterization of human humoral responses to the major outer membrane protein and OMP2 of *Chlamydomydia pneumoniae*." *FEMS Microbiol Lett* **227**(1): 73-9.
- Da Costa, C. U., N. Wantia, et al. (2004). "Heat shock protein 60 from *Chlamydia pneumoniae* elicits an unusual set of inflammatory responses via Toll-like receptor 2 and 4 in vivo." *Eur J Immunol* **34**(10): 2874-84.
- Davis, C. H., J. E. Raulston, et al. (2002). "Protein disulfide isomerase, a component of the estrogen receptor complex, is associated with *Chlamydia trachomatis* serovar E attached to human endometrial epithelial cells." *Infect Immun* **70**(7): 3413-8.
- Davis, C. H. and P. B. Wyrick (1997). "Differences in the association of *Chlamydia trachomatis* serovar E and serovar L2 with epithelial cells in vitro may reflect biological differences in vivo." *Infect Immun* **65**(7): 2914-24.
- Dehio, C., E. Freissler, et al. (1998). "Ligation of cell surface heparan sulfate proteoglycans by antibody-coated beads stimulates phagocytic uptake into epithelial cells: a model for cellular invasion by *Neisseria gonorrhoeae*." *Exp Cell Res* **242**(2): 528-39.
- Derbigny, W. A., M. S. Kerr, et al. (2005). "Pattern Recognition Molecules Activated by *Chlamydia muridarum* Infection of Cloned Murine Oviduct Epithelial Cell Lines." *J Immunol* **175**(9): 6065-75.
- Dersch, P. and R. R. Isberg (1999). "A region of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasins protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self-association." *Embo J* **18**(5): 1199-213.
- Domeika, M., K. Domeika, et al. (1998). "Humoral immune response to conserved epitopes of *Chlamydia trachomatis* and human 60-kDa heat-shock protein in women with pelvic inflammatory disease." *J Infect Dis* **177**(3): 714-9.
- Dong, F., M. Pirbhai, et al. (2005). "Degradation of the proapoptotic proteins Bik, Puma, and Bim with Bcl-2 domain 3 homology in *Chlamydia trachomatis*-infected cells." *Infect Immun* **73**(3): 1861-4.

- Dong, F., J. Sharma, et al. (2004). "Intramolecular dimerization is required for the chlamydia-secreted protease CPAF to degrade host transcriptional factors." Infect Immun **72**(7): 3869-75.
- Dong, F., Y. Zhong, et al. (2005). "Production of a proteolytically active protein, chlamydial protease/proteasome-like activity factor, by five different Chlamydia species." Infect Immun **73**(3): 1868-72.
- Drevets, D. A., R. T. Sawyer, et al. (1995). "Listeria monocytogenes infects human endothelial cells by two distinct mechanisms." Infect Immun **63**(11): 4268-76.
- Dubel, S., F. Breitling, et al. (1993). "A family of vectors for surface display and production of antibodies." Gene **128**(1): 97-101.
- Eissenberg, L. G., P. B. Wyrick, et al. (1983). "Chlamydia psittaci elementary body envelopes: ingestion and inhibition of phagolysosome fusion." Infect Immun **40**(2): 741-51.
- Engel, J. (2004). "Tarp and Arp: How Chlamydia induces its own entry." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(27): 9947-8.
- Entian, K. D., T. Schuster, et al. (1999). "Functional analysis of 150 deletion mutants in Saccharomyces cerevisiae by a systematic approach." Mol Gen Genet **262**(4-5): 683-702.
- Erridge, C., A. Pridmore, et al. (2004). "Lipopolysaccharides of Bacteroides fragilis, Chlamydia trachomatis and Pseudomonas aeruginosa signal via toll-like receptor 2." J Med Microbiol **53**(Pt 8): 735-40.
- Esko, J. D., K. S. Rostand, et al. (1988). "Tumor formation dependent on proteoglycan biosynthesis." Science **241**(4869): 1092-6.
- Esko, J. D. and S. B. Selleck (2002). "Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate." Annu Rev Biochem **71**: 435-71.
- Esko, J. D., T. E. Stewart, et al. (1985). "Animal cell mutants defective in glycosaminoglycan biosynthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(10): 3197-201.
- Everett, K. D., R. M. Bush, et al. (1999). "Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms." Int J Syst Bacteriol **49 Pt 2**: 415-40.
- Everett, K. D. and T. P. Hatch (1995). "Architecture of the cell envelope of Chlamydia psittaci 6BC." J Bacteriol **177**(4): 877-82.
- Fadel, S. and A. Eley (2004). "Chlorate: a reversible inhibitor of proteoglycan sulphation in Chlamydia trachomatis-infected cells." J Med Microbiol **53**(Pt 2): 93-5.
- Feizi, T. and W. Chai (2004). "Oligosaccharide microarrays to decipher the glyco code." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(7): 582-8.
- Filmus, J. (2001). "Glypicans in growth control and cancer." Glycobiology **11**(3): 19R-23R.
- Findlay, H. E., H. McClafferty, et al. (2005). "Surface expression, single-channel analysis and membrane topology of recombinant Chlamydia trachomatis Major Outer Membrane Protein." BMC Microbiol **5**(1): 5.
- Fink, G. R., Hicks, J.B., Sherman, F. (1983). Methods in yeast genetics, laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Finlay, B. B. and P. Cossart (1997). "Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens [published erratum appears in Science 1997 Oct 17;278(5337):373] [see comments]." Science **276**(5313): 718-25.
- Fleckenstein, J. M., J. T. Holland, et al. (2002). "Interaction of an outer membrane protein of enterotoxigenic Escherichia coli with cell surface heparan sulfate proteoglycans." Infect Immun **70**(3): 1530-7.
- Francisco, J. A. and G. Georgiou (1994). "The expression of recombinant proteins on the external surface of Escherichia coli. Biotechnological applications." Ann N Y Acad Sci **745**: 372-82.
- Francisco, J. A., C. Stathopoulos, et al. (1993). "Specific adhesion and hydrolysis of cellulose by intact Escherichia coli expressing surface anchored cellulase or cellulose binding domains." Biotechnology (N Y) **11**(4): 491-5.

- Fromm, J. R., R. E. Hileman, et al. (1995). "Differences in the interaction of heparin with arginine and lysine and the importance of these basic amino acids in the binding of heparin to acidic fibroblast growth factor." Arch Biochem Biophys **323**(2): 279-87.
- Fryden, A., E. Kihlstrom, et al. (1989). "A clinical and epidemiological study of "ornithosis" caused by *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR)." Scand J Infect Dis **21**(6): 681-91.
- Fujita, Y., J. Ito, et al. (2004). "Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme." Appl Environ Microbiol **70**(2): 1207-12.
- Fukushi, H. and K. Hirai (1992). "Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants." Int J Syst Bacteriol **42**(2): 306-8.
- Gaydos, C. A., J. T. Summersgill, et al. (1996). "Replication of *Chlamydia pneumoniae* in vitro in human macrophages, endothelial cells, and aortic artery smooth muscle cells." Infect Immun **64**(5): 1614-20.
- Georgoudis, E. (2004). Identifizierung und Charakterisierung von Adhäsionsproteinen aus *Chlamydia pneumoniae*. Institut für Mikrobiologie. Düsseldorf, Heinrich-Heine Universität.
- Gerbase, A. C., J. T. Rowley, et al. (1998). "Global epidemiology of sexually transmitted diseases." Lancet **351** Suppl 3: 2-4.
- Gervassi, A. L., K. H. Grabstein, et al. (2004). "Human CD8+ T cells recognize the 60-kDa cysteine-rich outer membrane protein from *Chlamydia trachomatis*." J Immunol **173**(11): 6905-13.
- Gietz, R. D., R. H. Schiestl, et al. (1995). "Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure." Yeast **11**(4): 355-60.
- Goodall, J. C., H. Beacock-Sharp, et al. (2001). "Recognition of the 60 kilodalton cysteine-rich outer membrane protein OMP2 by CD4(+) T cells from humans infected with *Chlamydia trachomatis*." Clin Exp Immunol **126**(3): 488-93.
- Gouin, E., M. D. Welch, et al. (2005). "Actin-based motility of intracellular pathogens." Curr Opin Microbiol **8**(1): 35-45.
- Grayston, J. T., M. B. Aldous, et al. (1993). "Evidence that *Chlamydia pneumoniae* causes pneumonia and bronchitis." J Infect Dis **168**(5): 1231-5.
- Grayston, J. T., C. C. Kuo, et al. (1989). "*Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. Strain TWAR." Int. J. Syst. Bacteriol. **39**: 88-90.
- Grieshaber, S. S., N. A. Grieshaber, et al. (2003). "*Chlamydia trachomatis* uses host cell dynein to traffic to the microtubule-organizing center in a p50 dynamitin-independent process." J Cell Sci **116**(Pt 18): 3793-802.
- Grimwood, J., L. Olinger, et al. (2001). "Expression of *Chlamydia pneumoniae* polymorphic membrane protein family genes." Infect Immun **69**(4): 2383-9.
- Grimwood, J. and R. S. Stephens (1999). "Computational analysis of the polymorphic membrane protein superfamily of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*." Microb Comp Genomics **4**(3): 187-201.
- Guiney, D. G. and M. Lesnick (2005). "Targeting of the actin cytoskeleton during infection by *Salmonella* strains." Clin Immunol **114**(3): 248-55.
- Gutierrez-Martin, C. B., D. M. Ojcius, et al. (1997). "Heparin Mediated Inhibition of *Chlamydia Psittaci* Adherence to Hela Cells." Microbial Pathogenesis **22** (1): 47-57.
- Hacker, U., K. Nybakken, et al. (2005). "Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(7): 530-41.
- Hackstadt, t. (1999). Cell Biology. Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity. R. S. Stephens. Washington, D.C., ASM Press: 101-38.
- Hackstadt, T., M. A. Scidmore, et al. (1995). "Lipid metabolism in *Chlamydia trachomatis*-infected cells: directed trafficking of Golgi-derived sphingolipids to the chlamydial inclusion." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(11): 4877-81.
- Hahn, D. L., R. W. Dodge, et al. (1991). "Association of *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adult-onset asthma [see comments]." Jama **266**(2): 225-30.

- Handel, T. M., Z. Johnson, et al. (2005). "Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines." Annu Rev Biochem **74**: 385-410.
- Hannu, T., M. Puolakkainen, et al. (1999). "Chlamydia pneumoniae as a triggering infection in reactive arthritis." Rheumatology (Oxford) **38**(5): 411-4.
- Haranaga, S., H. Ikejima, et al. (2002). "Analysis of Chlamydia pneumoniae growth in cells by reverse transcription-PCR targeted to bacterial gene transcripts." Clin Diagn Lab Immunol **9**(2): 313-9.
- Harmer, N. J., L. L. Ilag, et al. (2004). "Towards a resolution of the stoichiometry of the fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor-heparin complex." J Mol Biol **339**(4): 821-34.
- Hatch, T. P. (1996). "Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in chlamydiae?" J Bacteriol **178**(1): 1-5.
- Hatch, T. P., I. Allan, et al. (1984). "Structural and polypeptide differences between envelopes of infective and reproductive life cycle forms of Chlamydia spp." J Bacteriol **157**(1): 13-20.
- Heine, H., S. Muller-Loennies, et al. (2003). "Endotoxic activity and chemical structure of lipopolysaccharides from Chlamydia trachomatis serotypes E and L2 and Chlamydophila psittaci 6BC." Eur J Biochem **270**(3): 440-50.
- Henderson, I. R. and A. C. Lam (2001). "Polymorphic proteins of Chlamydia spp.--autotransporters beyond the Proteobacteria." Trends Microbiol **9**(12): 573-8.
- Hileman, R. E., J. R. Fromm, et al. (1998). "Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins." Bioessays **20**(2): 156-67.
- Holden, D. W. (2002). "Trafficking of the Salmonella vacuole in macrophages." Traffic **3**(3): 161-9.
- Horn, M., T. R. Fritsche, et al. (1999). "Novel bacterial endosymbionts of Acanthamoeba spp. related to the Paramecium caudatum symbiont Caedibacter caryophilus." Environ Microbiol **1**(4): 357-67.
- Horner, P. J., D. Cain, et al. (1997). "Association of antibodies to Chlamydia trachomatis heat-shock protein 60 kD with chronic nongonococcal urethritis." Clin Infect Dis **24**(4): 653-60.
- Igietseme, J. U., C. M. Black, et al. (2002). "Chlamydia vaccines: strategies and status." BioDrugs **16**(1): 19-35.
- Jackson, T., F. M. Ellard, et al. (1996). "Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate." J Virol **70**(8): 5282-7.
- Jantos, C. A., S. Heck, et al. (1997). "Antigenic and molecular analyses of different Chlamydia pneumoniae strains." J. Clin. Microbiol. **35**: 620-623.
- Jantos, C. A., C. Krombach, et al. (2000). "Antibody response to the 60-kDa heat-shock protein of Chlamydia pneumoniae in patients with coronary artery disease." J Infect Dis **181**(5): 1700-5.
- Jose, J. and S. Handel (2003). "Monitoring the cellular surface display of recombinant proteins by cysteine labeling and flow cytometry." ChemBiochem **4**(5): 396-405.
- Jutras, I., L. Abrami, et al. (2003). "Entry of the lymphogranuloma venereum strain of Chlamydia trachomatis into host cells involves cholesterol-rich membrane domains." Infect Immun **71**(1): 260-6.
- Kalman, S., W. Mitchell, et al. (1999). "Comparative genomes of Chlamydia pneumoniae and C. trachomatis." Nat Genet **21**(4): 385-9.
- Kato, M., H. Maeda, et al. (2005). "Construction of a selective cleavage system for a protein displayed on the cell surface of yeast." Appl Microbiol Biotechnol: 1-5.
- Kato, M., H. Wang, et al. (1994). "Cell surface syndecan-1 on distinct cell types differs in fine structure and ligand binding of its heparan sulfate chains." J Biol Chem **269**(29): 18881-90.
- Kaul, R., A. Hoang, et al. (1997). "The chlamydial EUO gene encodes a histone H1-specific protease." J Bacteriol **179**(18): 5928-34.

- Kieke, M. C., B. K. Cho, et al. (1997). "Isolation of anti-T cell receptor scFv mutants by yeast surface display." Protein Eng **10**(11): 1303-10.
- Kikuta, L. C., M. Puolakkainen, et al. (1991). "Isolation and sequence analysis of the Chlamydia pneumoniae GroE operon." Infect Immun **59**(12): 4665-9.
- Klein, M., A. Kotz, et al. (2003). "Detection of Chlamydia pneumoniae-specific antibodies binding to the VD2 and VD3 regions of the major outer membrane protein." J Clin Microbiol **41**(5): 1957-62.
- Klemm, P. and L. Hedegaard (1990). "Fimbriae of Escherichia coli as carriers of heterologous antigenic sequences." Res Microbiol **141**(7-8): 1013-7.
- Kol, A., A. H. Lichtman, et al. (2000). "Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells." J Immunol **164**(1): 13-7.
- Kondo, A., H. Shigechi, et al. (2002). "High-level ethanol production from starch by a flocculent Saccharomyces cerevisiae strain displaying cell-surface glucoamylase." Appl Microbiol Biotechnol **58**(3): 291-6.
- Kondo, A. and M. Ueda (2004). "Yeast cell-surface display--applications of molecular display." Appl Microbiol Biotechnol **64**(1): 28-40.
- Krüll, M., A. C. Klucken, et al. (1999). "Signal Transduction Pathways Activated in Endothelial Cells Following Infection with Chlamydia pneumoniae." J Immunol **162**(8): 4834-4841.
- Krull, M., M. Maass, et al. (2005). "Chlamydia pneumoniae. Mechanisms of target cell infection and activation." Thromb Haemost **94**(2): 319-26.
- Kubo, A. and R. S. Stephens (2000). "Characterization and functional analysis of PorB, a Chlamydia porin and neutralizing target." Mol Microbiol **38**(4): 772-80.
- Kuo, C. C., A. M. Gown, et al. (1993). "Detection of Chlamydia pneumoniae in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain." Arterioscler Thromb **13**(10): 1501-4.
- Kuo, C. C., L. A. Jackson, et al. (1995). "Chlamydia pneumoniae (TWAR)." Clin Microbiol Rev **8**(4): 451-61.
- Kuo, C. C., A. Lee, et al. (2004). "Cleavage of the N-linked oligosaccharide from the surfaces of Chlamydia species affects attachment and infectivity of the organisms in human epithelial and endothelial cells." Infect Immun **72**(11): 6699-701.
- Kuo, C. C., A. Shor, et al. (1993). "Demonstration of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic lesions of coronary arteries." J Infect Dis **167**(4): 841-9.
- Kuo, C. C., N. Takahashi, et al. (1996). "An N Linked High Mannose Type Oligosaccharide, Expressed At the Major Outer Membrane Protein of Chlamydia Trachomatis, Mediates Attachment and Infectivity of the Microorganism to Hela Cells." Journal of Clinical Investigation **98** (12): 2813-2818.
- Lambden, P. R., J. S. Everson, et al. (1990). "Sulfur-rich proteins of Chlamydia trachomatis: developmentally regulated transcription of polycistronic mRNA from tandem promoters." Gene **87**(1): 105-12.
- Lang, H., M. Maki, et al. (2000). "Characterization of adhesive epitopes with the OmpS display system." Eur J Biochem **267**(1): 163-70.
- Lasa, I. and P. Cossart (1996). "Actin-based bacterial motility: towards a definition of the minimal requirements." Trends Cell Biol **6**(3): 109-14.
- Levy, N. J. and J. W. Moulder "Attachment of cell walls of Chlamydia psittaci to mouse fibroblasts (L cells)." Infect Immun **37**(3): 1059-65.
- Levy, N. J. and J. W. Moulder (1982). "Attachment of cell walls of Chlamydia psittaci to mouse fibroblasts (L cells)." Infect Immun **37**(3): 1059-65.
- Li, W., D. J. Johnson, et al. (2004). "Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin." Nat Struct Mol Biol **11**(9): 857-62.
- Li, Y., J. Kilpatrick, et al. (2000). "Sheep monoclonal antibody fragments generated using a phage display system." J Immunol Methods **236**(1-2): 133-46.
- Lidholt, K., J. L. Weinke, et al. (1992). "A single mutation affects both N-acetylglucosaminyltransferase and glucuronosyltransferase activities in a Chinese

- hamster ovary cell mutant defective in heparan sulfate biosynthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(6): 2267-71.
- Linhardt, R. J. and T. Toida (2004). "Role of glycosaminoglycans in cellular communication." Acc Chem Res **37**(7): 431-8.
- Love, D. C., J. D. Esko, et al. (1993). "A heparin-binding activity on Leishmania amastigotes which mediates adhesion to cellular proteoglycans." J Cell Biol **123**(3): 759-66.
- Maass, M., C. Bartels, et al. (1998). "Endovascular presence of viable Chlamydia pneumoniae is a common phenomenon in coronary artery disease." J Am Coll Cardiol **31**(4): 827-32.
- Maccarana, M., Y. Sakura, et al. (1996). "Domain structure of heparan sulfates from bovine organs." J Biol Chem **271**(30): 17804-10.
- Margalit, H., N. Fischer, et al. (1993). "Comparative analysis of structurally defined heparin binding sequences reveals a distinct spatial distribution of basic residues." J Biol Chem **268**(26): 19228-31.
- Matsumoto, T., H. Fukuda, et al. (2002). "Construction of yeast strains with high cell surface lipase activity by using novel display systems based on the Flo1p flocculation functional domain." Appl Environ Microbiol **68**(9): 4517-22.
- Maurer, J., J. Jose, et al. (1997). "Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from Escherichia coli." J Bacteriol **179**(3): 794-804.
- McCafferty, J., A. D. Griffiths, et al. (1990). "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains." Nature **348**(6301): 552-4.
- McClarty, G. (1994). "Chlamydiae and the biochemistry of intracellular parasitism." Trends Microbiol **2**(5): 157-64.
- McColl, K. A., R. W. Martin, et al. (1984). "Chlamydia infection and infertility in the female koala (Phascolarctos cinereus)." Vet Rec **115**(25-26): 655.
- Menzio, F. D., K. Pethe, et al. (2002). "Enhanced bacterial virulence through exploitation of host glycosaminoglycans." Mol Microbiol **43**(6): 1379-86.
- Miao, E. A., M. Brittnacher, et al. (2003). "Salmonella effectors translocated across the vacuolar membrane interact with the actin cytoskeleton." Mol Microbiol **48**(2): 401-15.
- Millman, K. L., S. Tavares, et al. (2001). "Recombination in the ompA gene but not the omcB gene of Chlamydia contributes to serovar-specific differences in tissue tropism, immune surveillance, and persistence of the organism." J Bacteriol **183**(20): 5997-6008.
- Miyashita, N., Y. Kanamoto, et al. (1993). "The morphology of Chlamydia pneumoniae." J Med Microbiol **38**(6): 418-25.
- Montigiani, S., F. Falugi, et al. (2002). "Genomic approach for analysis of surface proteins in Chlamydia pneumoniae." Infect Immun **70**(1): 368-79.
- Moulder, J. W. (1991). "Interaction of chlamydiae and host cells in vitro." Microbiol Rev **55**(1): 143-90.
- Moulder, J. W., T. P. Hatch, et al. (1984). Chlamydia. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. N. R. Krieg and J. G. Holt. Baltimore/London, Williams and Wilkins. **1**: 729-739.
- Mulloy, B. and M. J. Forster (2000). "Conformation and dynamics of heparin and heparan sulfate." Glycobiology **10**(11): 1147-56.
- Mygind, P., G. Christiansen, et al. (1998). "Topological analysis of Chlamydia trachomatis L2 outer membrane protein 2." J Bacteriol **180**(21): 5784-7.
- Mygind, P., G. Christiansen, et al. (1998). "Analysis of the humoral immune response to Chlamydia outer membrane protein 2." Clin Diagn Lab Immunol **5**(3): 313-8.
- Nakamura, Y., S. Shibasaki, et al. (2001). "Development of novel whole-cell immunoadsorbents by yeast surface display of the IgG-binding domain." Appl Microbiol Biotechnol **57**(4): 500-5.
- Newton, S. M., M. Kotb, et al. (1991). "Expression and immunogenicity of a streptococcal M protein epitope inserted in Salmonella flagellin." Infect Immun **59**(6): 2158-65.

- Neyts, J., R. Snoeck, et al. (1992). "Sulfated polymers inhibit the interaction of human cytomegalovirus with cell surface heparan sulfate." Virology **189**(1): 48-58.
- Ngeh, J., V. Anand, et al. (2002). "Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis -- what we know and what we don't." Clin Microbiol Infect **8**(1): 2-13.
- Nhieu, G. T., J. Enninga, et al. (2005). "Tyrosine kinase signaling and type III effectors orchestrating Shigella invasion." Curr Opin Microbiol **8**(1): 16-20.
- Niessner, A., C. Kaun, et al. (2003). "Polymorphic membrane protein (PMP) 20 and PMP 21 of Chlamydia pneumoniae induce proinflammatory mediators in human endothelial cells in vitro by activation of the nuclear factor-kappaB pathway." J Infect Dis **188**(1): 108-13.
- Nurminen, M., M. Leinonen, et al. (1983). "The genus-specific antigen of Chlamydia: resemblance to the lipopolysaccharide of enteric bacteria." Science **220**(4603): 1279-81.
- Opie, S. R., K. H. Warrington, Jr., et al. (2003). "Identification of amino acid residues in the capsid proteins of adeno-associated virus type 2 that contribute to heparan sulfate proteoglycan binding." J Virol **77**(12): 6995-7006.
- Ortega-Barria, E. and M. E. Pereira (1992). "Entry of Trypanosoma cruzi into eukaryotic cells." Infect Agents Dis **1**(3): 136-45.
- Ossewaarde, J. M., A. de Vries, et al. (1996). "Application of a Mycoplasma group-specific PCR for monitoring decontamination of Mycoplasma-infected Chlamydia sp. strains." Appl Environ Microbiol **62**(2): 328-31.
- Peeling, R. W., R. L. Bailey, et al. (1998). "Antibody response to the 60-kDa chlamydial heat-shock protein is associated with scarring trachoma." J Infect Dis **177**(1): 256-9.
- Peeling, R. W. and R. C. Brunham (1996). "Chlamydiae as pathogens: new species and new issues." Emerg Infect Dis **2**(4): 307-19.
- Peterson, E. M., L. M. de la Maza, et al. (1998). "Characterization of a neutralizing monoclonal antibody directed at the lipopolysaccharide of Chlamydia pneumoniae." Infect Immun **66**(8): 3848-55.
- Portig, I., J. C. Goodall, et al. (2003). "Characterization of the humoral immune response to Chlamydia outer membrane protein 2 in chlamydial infection." Clin Diagn Lab Immunol **10**(1): 103-7.
- Pospischil, A., R. Thoma, et al. (2002). "Abortion in woman caused by caprine Chlamydophila abortus (Chlamydia psittaci serovar 1)." Swiss Med Wkly **132**(5-6): 64-6.
- Prebeck, S., C. Kirschning, et al. (2001). "Predominant role of toll-like receptor 2 versus 4 in Chlamydia pneumoniae-induced activation of dendritic cells." J Immunol **167**(6): 3316-23.
- Proudfoot, A. E., S. Fritchley, et al. (2001). "The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity." J Biol Chem **276**(14): 10620-6.
- Puolakkainen, M., C. C. Kuo, et al. (2005). "Chlamydia pneumoniae uses the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor for infection of endothelial cells." Infect Immun **73**(8): 4620-5.
- Rajalingam, K., H. Al-Younes, et al. (2001). "Epithelial cells infected with Chlamydophila pneumoniae (Chlamydia pneumoniae) are resistant to apoptosis." Infect Immun **69**(12): 7880-8.
- Raman, R., V. Sasisekharan, et al. (2005). "Structural insights into biological roles of protein-glycosaminoglycan interactions." Chem Biol **12**(3): 267-77.
- Ramirez, J. A. and C. p. a. s. group (1996). "Isolation of Chlamydia pneumoniae from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis." Annals of Internal Medicine **125** (12): 979-982.
- Rasmussen-Lathrop, S. J., K. Koshiyama, et al. (2000). "Chlamydia-dependent biosynthesis of a heparan sulphate-like compound in eukaryotic cells." Cell Microbiol **2**(2): 137-44.

- Rathore, D., T. F. McCutchan, et al. (2001). "Direct measurement of the interactions of glycosaminoglycans and a heparin decasaccharide with the malaria circumsporozoite protein." *Biochemistry* **40**(38): 11518-24.
- Raulston, J. E. (1995). "Chlamydial envelope components and pathogen-host cell interactions." *Mol Microbiol* **15**(4): 607-16.
- Raulston, J. E., T. R. Paul, et al. (1998). "Localization of Chlamydia trachomatis heat shock proteins 60 and 70 during infection of a human endometrial epithelial cell line in vitro." *Infect Immun* **66**(5): 2323-9.
- Rockey, D. D., J. Lenart, et al. (2000). "Genome sequencing and our understanding of chlamydiae." *Infect Immun* **68**(10): 5473-9.
- Rockey, D. D., M. A. Scidmore, et al. (2002). "Proteins in the chlamydial inclusion membrane." *Microbes Infect* **4**(3): 333-40.
- Rostand, K. S. and J. D. Esko (1997). "Microbial adherence to and invasion through proteoglycans." *Infect Immun* **65**(1): 1-8.
- Rzomp, K. A., L. D. Scholtes, et al. (2003). "Rab GTPases are recruited to chlamydial inclusions in both a species-dependent and species-independent manner." *Infect Immun* **71**(10): 5855-70.
- Saikku, P., M. Leinonen, et al. (1988). "Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction." *Lancet* **2**(8618): 983-6.
- Sambrook, J., T. Maniatis, et al. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor laboratory.
- Samuelson, P., M. Hansson, et al. (1995). "Cell surface display of recombinant proteins on Staphylococcus carnosus." *J Bacteriol* **177**(6): 1470-6.
- San Antonio, J. D., J. Slover, et al. (1993). "Specificity in the interactions of extracellular matrix proteins with subpopulations of the glycosaminoglycan heparin." *Biochemistry* **32**(18): 4746-55.
- Sanchez-Campillo, M., L. Bini, et al. (1999). "Identification of immunoreactive proteins of Chlamydia trachomatis by Western blot analysis of a two-dimensional electrophoresis map with patient sera." *Electrophoresis* **20**(11): 2269-79.
- Sasu, S., D. LaVerda, et al. (2001). "Chlamydia pneumoniae and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation." *Circ Res* **89**(3): 244-50.
- Sato, N., T. Matsumoto, et al. (2002). "Long anchor using Flo1 protein enhances reactivity of cell surface-displayed glucoamylase to polymer substrates." *Appl Microbiol Biotechnol* **60**(4): 469-74.
- Schachter, J. and A. O. Osoba (1983). "Lymphogranuloma venereum." *Br Med Bull* **39**(2): 151-4.
- Schmiel, D. H., S. T. Knight, et al. (1991). "Recombinant Escherichia coli clones expressing Chlamydia trachomatis gene products attach to human endometrial epithelial cells." *Infect Immun* **59**(11): 4001-12.
- Schramm, N. and P. B. Wyrick (1995). "Cytoskeletal requirements in Chlamydia trachomatis infection of host cells." *Infect Immun* **63**(1): 324-32.
- Scidmore, M. A., D. D. Rockey, et al. (1996). "Vesicular interactions of the Chlamydia trachomatis inclusion are determined by chlamydial early protein synthesis rather than route of entry." *Infect Immun* **64**(12): 5366-72.
- Selbach, M. and S. Backert (2005). "Cortactin: an Achilles' heel of the actin cytoskeleton targeted by pathogens." *Trends Microbiol* **13**(4): 181-9.
- Shaw, E. I., C. A. Dooley, et al. (2000). "Three temporal classes of gene expression during the Chlamydia trachomatis developmental cycle." *Mol Microbiol* **37**(4): 913-25.
- Shaw, J. P., Z. Johnson, et al. (2004). "The X-ray structure of RANTES: heparin-derived disaccharides allows the rational design of chemokine inhibitors." *Structure (Camb)* **12**(11): 2081-93.

- Shen, Z. M., L. Wang, et al. (2001). "Delineation of functional regions within the subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion molecule a-agglutinin." J Biol Chem **276**(19): 15768-75.
- Shibasaki, S., M. Ueda, et al. (2001). "Quantitative evaluation of the enhanced green fluorescent protein displayed on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae* by fluorometric and confocal laser scanning microscopic analyses." Appl Microbiol Biotechnol **55**(4): 471-5.
- Shirai, M., H. Hirakawa, et al. (2000). "Comparison of outer membrane protein genes omp and pmp in the whole genome sequences of *Chlamydia pneumoniae* isolates from Japan and the United States." J Infect Dis **181 Suppl 3**: S524-7.
- Shusta, E. V., P. D. Holler, et al. (2000). "Directed evolution of a stable scaffold for T-cell receptor engineering." Nat Biotechnol **18**(7): 754-9.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." Nature **387**(6633): 569-72.
- Smith, K. A., K. K. Bradley, et al. (2005). "Compendium of measures to control *Chlamydia psittaci* (formerly *Chlamydia psittaci*) infection among humans (psittacosis) and pet birds, 2005." J Am Vet Med Assoc **226**(4): 532-9.
- Spear, P. G., M. T. Shieh, et al. (1992). "Heparan sulfate glycosaminoglycans as primary cell surface receptors for herpes simplex virus." Adv Exp Med Biol **313**: 341-53.
- Sriram, S., A. Ljunggren-Rose, et al. (2005). "Detection of chlamydial bodies and antigens in the central nervous system of patients with multiple sclerosis." J Infect Dis **192**(7): 1219-28.
- Stamm, W. E. and K. K. Holmes (1990). *Chlamydia trachomatis* infections of the adult. Sexually transmitted diseases. K. K. Holmes, P. A. Mardh, P. F. Sparling and P. J. Wiesner. New York, McGraw-Hill.
- Stenlund, P., M. J. Lindberg, et al. (2002). "Structural requirements for high-affinity heparin binding: alanine scanning analysis of charged residues in the C-terminal domain of human extracellular superoxide dismutase." Biochemistry **41**(9): 3168-75.
- Stephens, R. S., S. Kalman, et al. (1998). "Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *chlamydia trachomatis*." Science **282**(5389): 754-9.
- Stephens, R. S., K. Koshiyama, et al. (2001). "Heparin-binding outer membrane protein of *chlamydiae*." Mol Microbiol **40**(3): 691-9.
- Sternberg, N. and R. H. Hoess (1995). "Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1609-13.
- Stuart, E. S., W. C. Webley, et al. (2003). "Lipid rafts, caveolae, caveolin-1, and entry by *Chlamydiae* into host cells." Exp Cell Res **287**(1): 67-78.
- Su, H., L. Raymond, et al. (1996). "A Recombinant *Chlamydia Trachomatis* Major Outer Membrane Protein Binds to Heparan Sulfate Receptors On Epithelial Cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93** (20): 11143-11148.
- Su, H., N. G. Watkins, et al. (1990). "*Chlamydia trachomatis*-host cell interactions: role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesin." Infect Immun **58**(4): 1017-25.
- Subtil, A., B. Wyplosz, et al. (2004). "Analysis of *Chlamydia caviae* entry sites and involvement of Cdc42 and Rac activity." J Cell Sci **117**(Pt 17): 3923-33.
- Tabbara, K. F. (2001). "Trachoma: a review." J Chemother **13 Suppl 1**: 18-22.
- Taraktchoglou, M., A. A. Pacey, et al. (2001). "Infectivity of *Chlamydia trachomatis* serovar LGV but not E is dependent on host cell heparan sulfate." Infect Immun **69**(2): 968-76.
- Ting, L. M., R. C. Hsia, et al. (1995). "Interaction of outer envelope proteins of *Chlamydia psittaci* GPIC with the HeLa cell surface." Infect Immun **63**(9): 3600-8.
- Todd, W. J. and H. D. Caldwell (1985). "The interaction of *Chlamydia trachomatis* with host cells: ultrastructural studies of the mechanism of release of a biovar II strain from HeLa 229 cells." J Infect Dis **151**(6): 1037-44.

- Ueda, M. and A. Tanaka (2000). "Cell surface engineering of yeast: construction of arming yeast with biocatalyst." J Biosci Bioeng **90**(2): 125-36.
- van Putten, J. P., T. D. Duensing, et al. (1998). "Entry of OpaA+ gonococci into HEp-2 cells requires concerted action of glycosaminoglycans, fibronectin and integrin receptors." Mol Microbiol **29**(1): 369-79.
- Vandahl, B. B., A. S. Pedersen, et al. (2002). "The expression, processing and localization of polymorphic membrane proteins in Chlamydia pneumoniae strain CWL029." BMC Microbiol **2**(1): 36.
- Vazquez-Torres, A. and F. C. Fang (2000). "Cellular routes of invasion by enteropathogens." Curr Opin Microbiol **3**(1): 54-9.
- Virok, D. P., D. E. Nelson, et al. (2005). "Chlamydial infection induces pathobiotypic-specific protein tyrosine phosphorylation in epithelial cells." Infect Immun **73**(4): 1939-46.
- Vives, R. R., A. Imberty, et al. (2005). "Heparan sulfate targets the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 coreceptor binding site." J Biol Chem **280**(22): 21353-7.
- Wadle, A., A. Mischo, et al. (2005). "Serological identification of breast cancer-related antigens from a Saccharomyces cerevisiae surface display library." Int J Cancer **117**(1): 104-13.
- Wadstrom, T. and A. Ljungh (1999). "Glycosaminoglycan-binding microbial proteins in tissue adhesion and invasion: key events in microbial pathogenicity." J Med Microbiol **48**(3): 223-33.
- Walker, D. H., G. A. Valbuena, et al. (2003). "Pathogenic mechanisms of diseases caused by Rickettsia." Ann N Y Acad Sci **990**: 1-11.
- Watson, M. W., P. R. Lambden, et al. (1994). "Immunoreactivity of the 60 kDa cysteine-rich proteins of Chlamydia trachomatis, Chlamydia psittaci and Chlamydia pneumoniae expressed in Escherichia coli." Microbiology **140**(Pt 8): 2003-11.
- Webley, W. C., L. C. Norkin, et al. (2004). "Caveolin-2 associates with intracellular chlamydial inclusions independently of caveolin-1." BMC Infect Dis **4**(1): 23.
- Wehrl, W., V. Brinkmann, et al. (2004). "From the inside out--processing of the Chlamydial autotransporter PmpD and its role in bacterial adhesion and activation of human host cells." Mol Microbiol **51**(2): 319-34.
- Weiler, J. M., R. E. Edens, et al. (1992). "Heparin and modified heparin inhibit complement activation in vivo." J Immunol **148**(10): 3210-5.
- Whitcher, J. P., M. Srinivasan, et al. (2001). "Corneal blindness: a global perspective." Bull World Health Organ **79**(3): 214-21.
- Wolf, K., E. Fischer, et al. (2000). "Ultrastructural analysis of developmental events in Chlamydia pneumoniae-infected cells." Infect Immun **68**(4): 2379-85.
- Wolf, K., E. Fischer, et al. (2001). "Chlamydia pneumoniae major outer membrane protein is a surface-exposed antigen that elicits antibodies primarily directed against conformation-dependent determinants." Infect Immun **69**(5): 3082-91.
- Wong, Y. K., P. J. Gallagher, et al. (1999). "Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis." Heart **81**(3): 232-8.
- Wuppermann, F. N. (2001). Untersuchungen zum Adhäsionsmechanismus von Chlamydia pneumoniae. Naturwissenschaftlichen Fakultät. Giessen, Justus-Liebig-Universität.
- Wuppermann, F. N. (2001). Untersuchungen zum Adhäsionsmechanismus von Chlamydia pneumoniae. Naturwissenschaftliche Fakultät (Fachbereich Biologie). Giessen, Justus-Liebig-Universität.
- Wuppermann, F. N., J. H. Hegemann, et al. (2001). "Heparan Sulfate-like Glycosaminoglycan Is a Cellular Receptor for Chlamydia pneumoniae." J Infect Dis **184**(2): 181-7.
- Wyllie, S., R. H. Ashley, et al. (1998). "The major outer membrane protein of Chlamydia psittaci functions as a porin-like ion channel." Infect Immun **66**(11): 5202-7.
- Wyllie, S., D. Longbottom, et al. (1999). "Single channel analysis of recombinant major outer membrane protein porins from Chlamydia psittaci and Chlamydia pneumoniae." FEBS Lett **445**(1): 192-6.

- Wyrick, P. B., J. Choong, et al. (1989). "Entry of genital Chlamydia trachomatis into polarized human epithelial cells." Infect Immun **57**(8): 2378-89.
- Xu, Q., G. Schett, et al. (2000). "Serum soluble heat shock protein 60 is elevated in subjects with atherosclerosis in a general population." Circulation **102**(1): 14-20.
- Yabushita, H., Y. Noguchi, et al. (2002). "Effects of chemically modified heparin on Chlamydia trachomatis serovar L2 infection of eukaryotic cells in culture." Glycobiology **12**(5): 345-51.
- Yu, Y., M. D. Sweeney, et al. (2005). "Chemokine-glycosaminoglycan binding: specificity for CCR2 ligand binding to highly sulfated oligosaccharides using FTICR mass spectrometry." J Biol Chem **280**(37): 32200-8.
- Zhang, J. P. and R. S. Stephens (1992). "Mechanism of C. trachomatis attachment to eukaryotic host cells." Cell **69**(5): 861-9.
- Zhong, G., P. Fan, et al. (2001). "Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors." J Exp Med **193**(8): 935-42.

8. Anhang

8.1. Zusätzliche Abbildungen zum Ergebnisteil

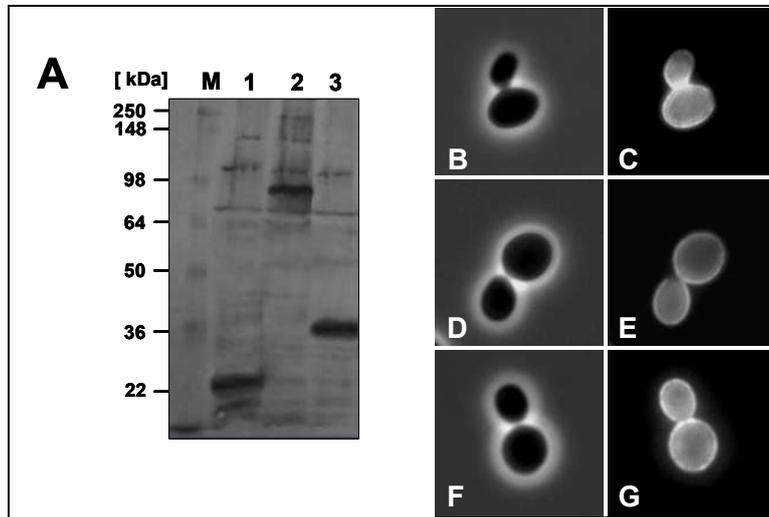


Abbildung 55: Expressions und Präsentationskontrolle des Aga2p-OmcB-BD.

A) Westernblot-Analyse detektiert mit dem Anti-penta His Antikörper und dem AP-konjugierten Anti-Maus Antikörper; M: Größenstandard; Die Proteinextrakte von Aga2p (Spur 1); Aga2p-OmcB (Spur 2) und Aga2p-OmcB-BD (Spur 3) exprimierenden Hefezellen wurden mit α -Mannosidase behandelt; B, D, F) Phasenkontrastaufnahmen; C, E, G) Immunfluoreszenzaufnahmen (63-fache Objektiv-Vergrößerung). Durch Verwendung des Anti-Xpress Antikörpers und des Cy3 konjugierten Anti-Maus Antikörpers wurden Aga2p (B,C), und Aga2p-OmcB (D, E) und Aga2p-OmcB-BD (F, G) auf der Hefezelloberfläche detektiert.

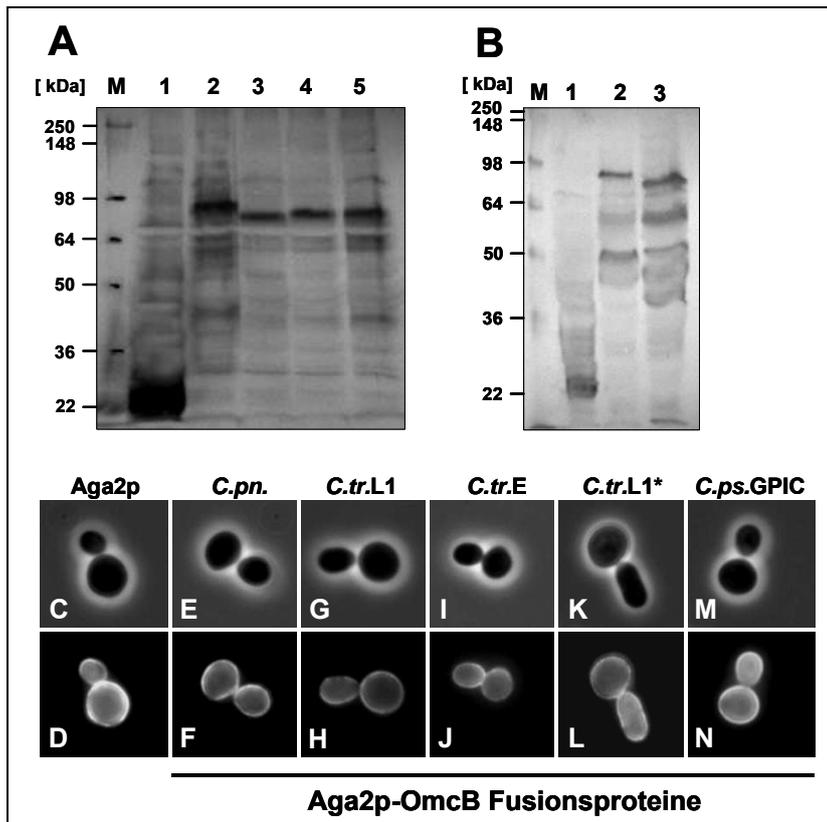


Abbildung 56: Expressionskontrolle verschiedener Aga2p-OmcB Fusionsprotein.

A, B) Westernblot-Analysen M: Größenstandard; Die Proteinextrakte von Aga2p (A, B; Spur 1); Aga2p-OmcB(*C.pn.*) (A, B; Spur 2) sowie von Aga2p-OmcB-L1 (A, Spur3), Aga2p-OmcB-E (A, Spur 4), Aga2p-OmcB-L1* (A, Spur 5) und Aga2p-OmcB-GPIC (B, Spur 3) exprimierenden Hefezellen wurden mit α -Mannosidase behandelt; C, E, G, I, K, M) Phasenkontrastaufnahmen; D, F, H, J, L, N) Immunofluoreszenzaufnahmen (63-fache Objektiv-Vergrößerung). Oberflächen-Präsentation verschiedener Aga2p-OmcB Fusionsproteine.

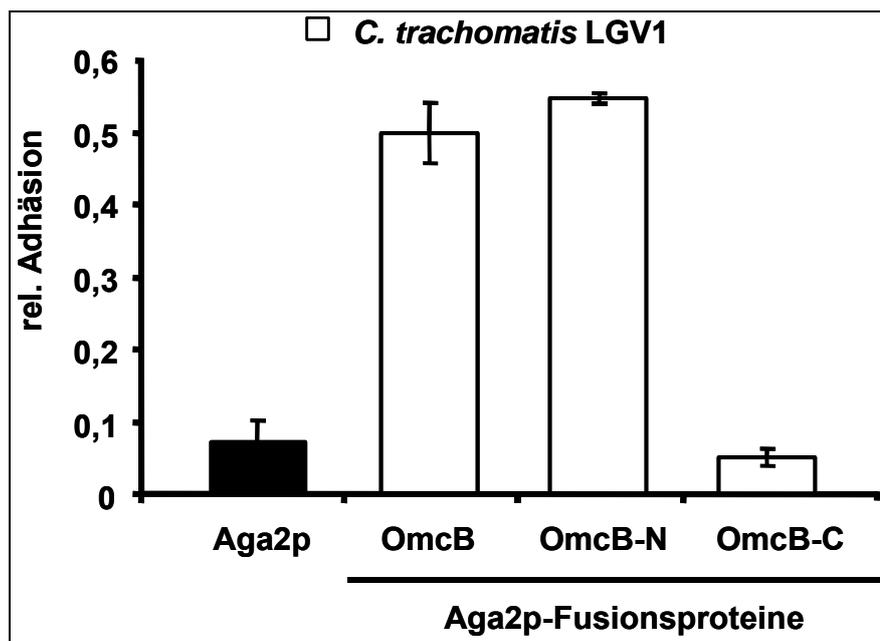


Abbildung 57: Die OmcB-L1-N Variante adhärert an humane Zellen.

Quantifizierung der Hefeadhäsionstests, durchgeführt mit HEp-2 Zellen und einem zehnfachen Überschuss an Aga2p, Aga2p-OmcBL1, Aga2p-OmcBL1-N und Aga2p-OmcBL1-C präsentierenden Hefezellen. (n=4)

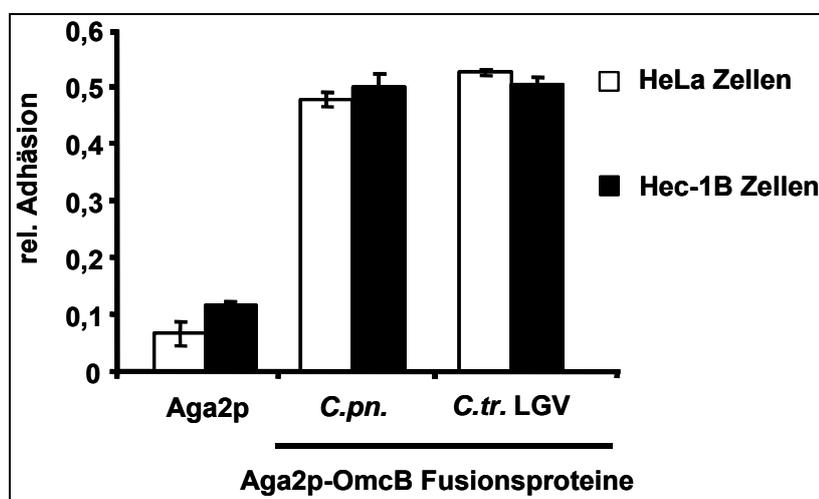


Abbildung 58: Die verschiedenen Aga2p-OmcB Fusionsproteine adhäreren an weitere humane Zelllinien.

Quantifizierung der Hefeadhäsionstests mit HeLa Zellen und Hec-1B Zellen. Es wurde ein zehnfacher Überschuss an Aga2p, Aga2p-OmcB(*C.pn.*) und Aga2p-OmcB-L1 präsentierenden Hefezellen eingesetzt. (n=4)

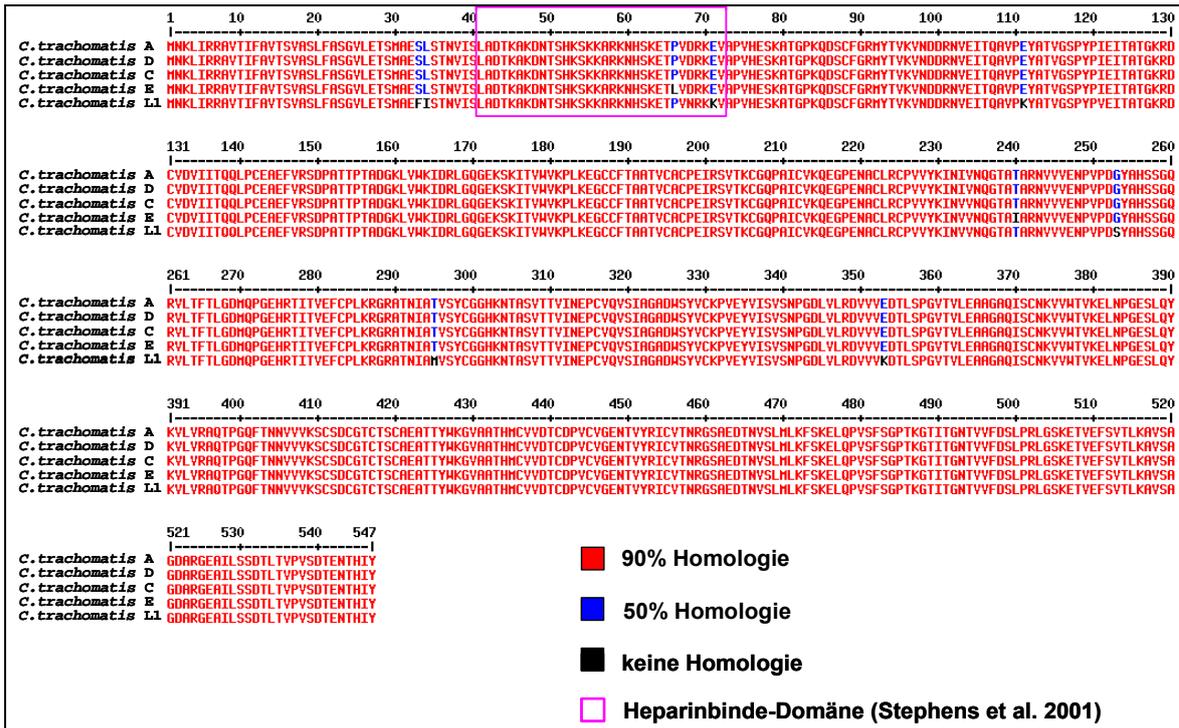


Abbildung 59: Alignment der OmcB Proteinsequenz verschiedener *C. trachomatis* Serovare.

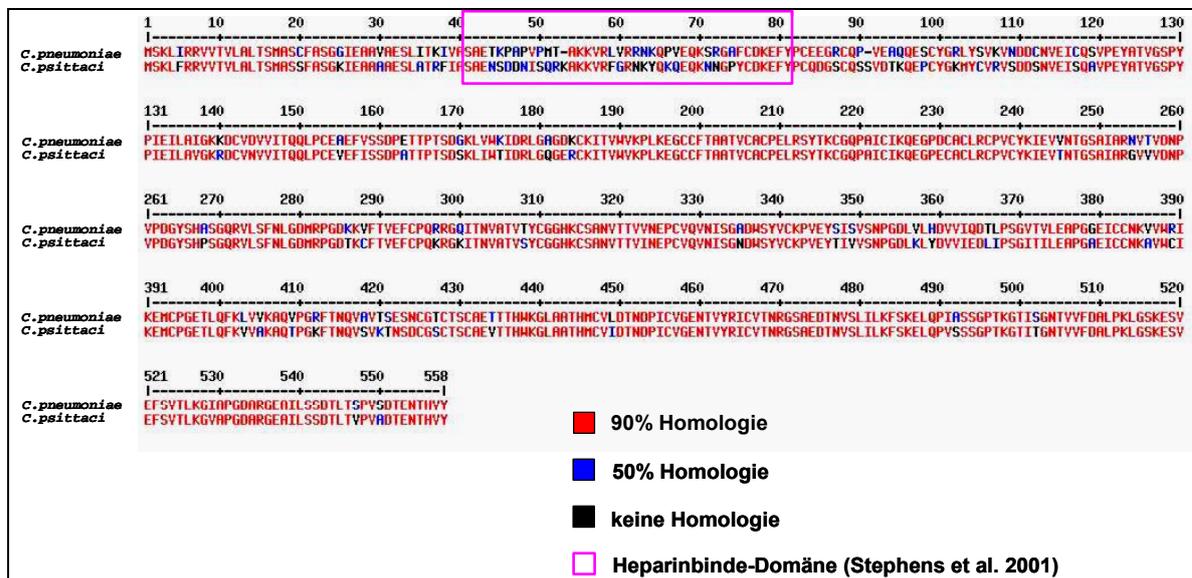


Abbildung 60: Alignment der OmcB Proteinsequenzen von *C. pneumoniae* und *C. psittaci* GPIC.

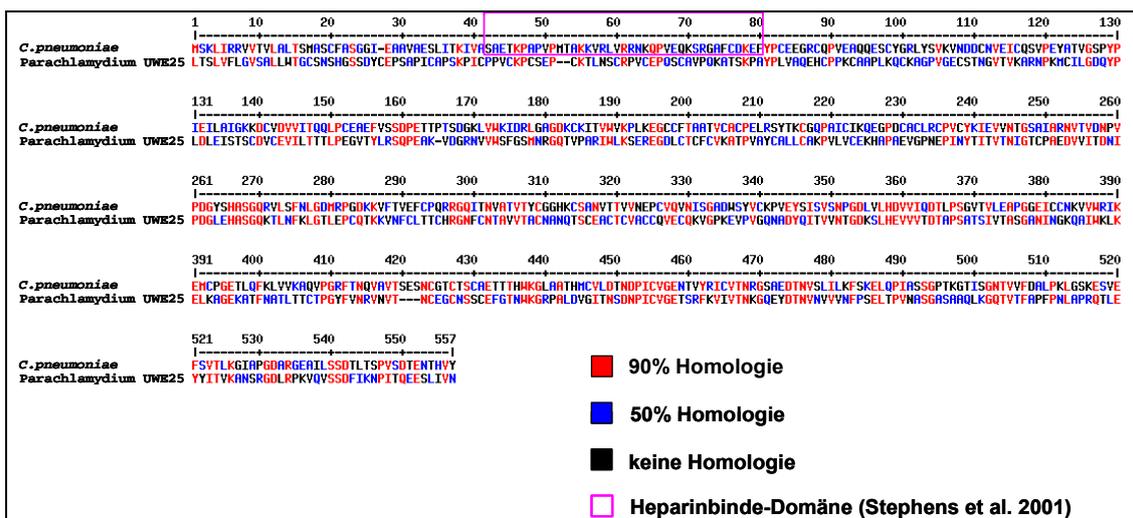


Abbildung 61: Alignment der OmcB Protein-Sequenz von *C. pneumoniae* und dem Parachlamyidium UWE25.

Die OmcB Protein-Sequenzen weisen eine 33%ige Aminosäureidentität zu einander auf. Innerhalb der OmcB-Sequenz von UWE25 ist keine Heparinbinde-Domäne vorhanden.

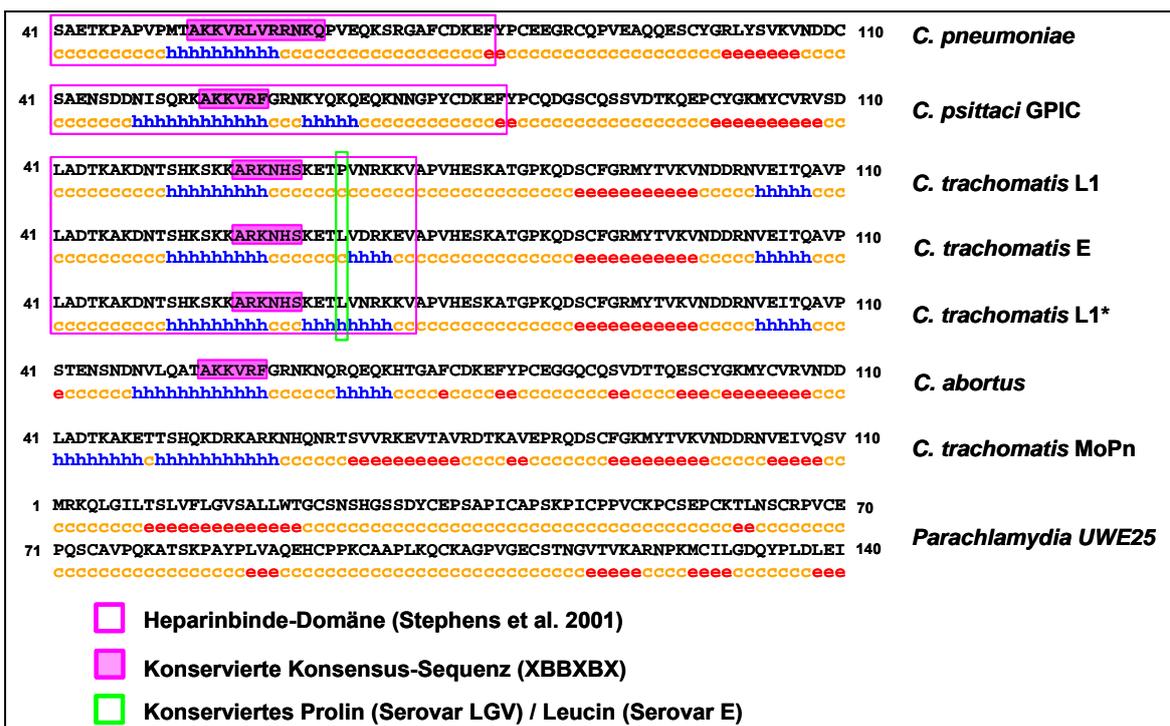


Abbildung 62: Sekundärstrukturanalyse verschiedener OmcB Proteinsequenzen.

In der N-terminalen OmcB Protein-Sequenz vom Umweltchlamydium (UWE25) ist keine Heparinbinde-Domäne mit α -helikaler Sekundärstruktur vorhanden wie bei allen anderen chlamydialen Spezies.

8.2. Rohdaten zu den Diagrammen im Ergebnisteil

8.2.1. Hefeadhäsionstests

Bei allen Hefeadhäsionstests wurden aus vier unabhängigen Experimenten jeweils 1000 HEp-2 Zellen gezählt und die daran gebundenen Hefen ermittelt. Dargestellt ist der Quotient von gebundenen Hefen pro 1000 Zellen. In den Statistiken ist der Quotient als relative Adhäsion (% Bindung) dargestellt.

Daten zu Abb. 8

	EBY100	Aga2p	Invasin-AD	
MOI 1	0,011285739	0,013707071	0,129584019	Mittelwert
	0,014697986	0,013576737	0,043485937	Stabwn
MOI 5	0,020098323	0,021348613	0,24025386	Mittelwert
	0,017841785	0,013951411	0,042434504	Stabwn
MOI 10	0,032157248	0,027357501	0,381134772	Mittelwert
	0,021328396	0,014907811	0,079634077	Stabwn
MOI 25	0,080339673	0,064591523	0,614767294	Mittelwert
	0,020615453	0,018291763	0,035467457	Stabwn

Daten zu Abb. 10

Aga2p	Invasin-AD	GroEL-1	MOMP	
0,07273208	0,49177784	0,35573822	0,10530313	Mittelwert
0,02987652	0,00620794	0,05467289	0,03088928	Stabwn

Daten zu Abb. 14

Aga2p	Invasin-AD	OmcB	
0,02710582	0,4855699	0,39647461	
0,06312679	0,49798577	0,44710203	
0,04511631	0,49177784	0,42178832	Mittelwert
0,01801049	0,00620794	0,02531371	Stabwn

Daten zu Abb. 16

Aga2p ohne	Aga2p P.K	Aga2p Tryp.	OmcB ohne	OmcB P.K	OmcB Tryp.	
0,11103531	0,08529296	0,07662768	0,50414585	0,11425135	0,14270014	Mittelwert
0,03933095	0,03251345	0,03860907	0,06778108	0,06666065	0,05502784	Stabwn

Daten zu Abb. 19

Aga2p	OmcB	OmcB-N	OmcB-C	
0,02710582	0,39647461	0,333272	0,05499175	Mittelwert
0,01180964	0,06902831	0,05308431	0,01708021	Stabwn

Daten zu Abb. 20

Aga2p					
Kontrolle	Heparin	CA	CB	CC	
0,07545442	0,08072713	0,0994248	0,07816967	0,07407788	Mittelwert
0,03760563	0,04296125	0,02567257	0,03044695	0,03889925	Stabwn
OmcB					
Kontrolle	Heparin	CA	CB	CC	
0,46684934	0,0901392	0,43516029	0,44437734	0,50662395	Mittelwert
0,0687912	0,03705081	0,1167896	0,07457339	0,06705272	Stabwn

Daten zu Abb. 21

Aga2p						
0 U	100 U					
0,04288181	0,04410821	Mittelwert				
0,00141362	0,00186359	stabwn				
OmcB						
0 U	0,001 U	0,01 U	0,1 U	1 U	100 U	1000 U
0,52337355	0,36503864	0,23198325	0,13630988	0,08937757	0,06229174	0,05099515
0,02130402	0,01170226	0,00816061	0,02498721	0,01081961	0,01493318	0,000255

Daten zu Abb. 22

ohne Heparinase		HEp-2 mit Heparinase		Hefe+ Heparinase		
Aga2p	OmcB	Aga2p	OmcB	Aga2p	OmcB	
0,07967879	0,51615316	0,10666384	0,12055531	0,08367652	0,49971295	Mittelwert
0,01150959	0,00630956	0,00618655	0,00654063	0,00607327	0,01509412	stabwn

Daten zu Abb. 23

CHO-K1		pgsD		pgsA		
Aga2p	OmcB	Aga2p	OmcB	Aga2p	OmcB	
0,04948257	0,33730169	0,06268745	0,05238862	0,03745444	0,07562824	Mittelwert
0,02274463	0,06135399	0,02217791	0,02285729	0,02132927	0,02806536	Stabwn

Daten zu Abb. 24

Aga2p		OmcB		OmcB-BD	
ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit
0,04098263	0,06312679	0,44710203	0,11041007	0,46584085	0,16608544
0,03021296	0,01400845	0,07881645	0,02074831	0,07664913	0,03432302

Daten zu Abb. 26

Aga2p	OmcB	delta33	
0,03798433	0,56453936	0,07195666	Mittelwert
0,00113111	0,01255841	0,00956686	Stabwn

Daten zu Abb. 29

Aga2p	BD WT	K54A	K55A	R57A	KKRA	
0,05333935	0,5001931	0,45150576	0,39214312	0,36546324	0,14543516	Mittelwert
0,03291094	0,06812319	0,05209586	0,07416237	0,05530745	0,05962231	Stabwn

Daten zu Abb. 40

Aga2p	OmcB	OmcB-L1	OmcB-E	GPIC	
0,0516912	0,50348027	0,5311995	0,43207879	0,51092808	Mittelwert
0,00177487	0,01349123	0,01007263	0,01932895	3,5713E-05	Stabwn

Daten zu Abb. 42

Mittelwert	Aga2p	OmcB	OmcB-L1	OmcB-E	OmcB-L1*	GPIC
ohne Heparin	0,0516912	0,50348027	0,5311995	0,43207879	0,40843428	0,51092808
mit Heparin	0,07383328	0,07936568	0,08583596	0,38507873	0,42094325	0,08116647
Stabwn						
ohne Heparin	0,00177487	0,01349123	0,01007263	0,01932895	0,01361261	3,5713E-05
mit Heparin	0,006256	0,01069247	0,00356455	0,00411785	0,01149964	0,00070243

Daten zu Abb. 43

CHO-K1			
Aga2p	OmcB-L1	OmcB-E	
0,06504939	0,36331907	0,31157832	Mittelwert
0,02609793	0,01040316	0,01663516	Stabwn

pgsA			
Aga2p	OmcB-L1	OmcB-E	
0,06181667	0,06215346	0,06712749	Mittelwert
0,02257372	0,01030764	0,03684076	Stabwn

pgsD			
Aga2p	OmcB-L1	OmcB-E	
0,07370949	0,06942621	0,06722403	Mittelwert
0,02934464	0,03371077	0,03674422	Stabwn

Daten zu Abb. 45

Aga2p	OmcB-L1	OmcB-E	OmcB-L1*	
0,081359	0,52000464	0,42613034	0,42228717	Mittelwert
0,00728932	0,00814097	0,00885919	0,02477231	Stabwn

Daten zu Abb. 46

ohne Heparin				
Aga2p	OmcB-L1	OmcB-E	OmcB-L1*	
0,05235184	0,4957101	0,39196641	0,39482167	
0,07204339	0,50121502	0,41599907	0,42204689	
0,06219761	0,49846256	0,40398274	0,40843428	Mittelwert
0,00984578	0,00275246	0,01201633	0,01361261	Stabwn

mit Heparin				
Aga2p	OmcB-L1	OmcB-E	OmcB-L1*	
0,06314081	0,08227141	0,38919658	0,40944361	
0,08452574	0,0894005	0,38096087	0,43244289	
0,07383328	0,08583596	0,38507873	0,42094325	Mittelwert
0,01069247	0,00356455	0,00411785	0,01149964	Stabwn

8.2.2. Bindungstests mit Protein-beschichteten Latexkugeln

Bei allen Bindungstests mit Latexkugeln wurden aus vier unabhängigen Experimenten jeweils 1000 HEP-2 Zellen gezählt und die daran gebundenen Latexkugeln ermittelt. Dargestellt ist der Quotient von gebundenen Kugeln pro 1000 Zellen. In den Statistiken ist der Quotient als relative Adhäsion (% Bindung) dargestellt.

Daten zu Abb. 31

BSA	OmcB	delta 33	
0,04734915	0,71493552	0,08511508	
0,06447412	0,75081228	0,10698304	
0,05591164	0,7328739	0,09604906	Mittelwert
0,00856249	0,01793838	0,01093398	Stabwn

Daten zu Abb. 32

BSA	OmcB				
	100µg	50µg	25µg	12.5µg	
0,07073807	0,76420282	0,50551495	0,33338947	0,15215767	
0,0840756	0,75716766	0,52181078	0,32079433	0,11311515	
0,07740684	0,76068524	0,51366287	0,3270919	0,13263641	Mittelwert
0,00666876	0,00351758	0,00814791	0,00629757	0,01952126	Stabwn

Daten zu Abb. 34

BSA	BDwt	KKRA	
0,09586377	0,82884567	0,3299032	
0,09499204	0,77895076	0,33791775	
0,0954279	0,80389821	0,33391047	Mittelwert
0,00043586	0,02494745	0,00400728	Stabwn

8.2.3. Neutralisations-Experimente

Bei allen Experimenten wurden die Einschusszahlen aus vier unabhängigen Experimenten ermittelt. Die Einschusszahlen bei den Kontrollexperimenten (PBS) sind auf 100% festgelegt worden. Die relative Infektion ergibt sich aus den ermittelten Einschusszahlen in Bezug zur Kontrolle.

8.2.3.1. Neutralisation der *C. pneumoniae* Infektion mit OmcB-Serum

Daten zu Abb. 37

PBS	Prä-Immune	OmcB-Serum	
100	99,437299	39,7909968	
100	96,4303421	46,6534457	
100	97,9338206	43,2222212	% Infektion
0	1,50347847	3,43122446	Stabwn

8.2.3.2. Neutralisation der *C. pneumoniae* Infektion mit rekombinantem OmcB Protein

Daten zu Abb. 35

PBS	BSA	OmcB		delta33		
	200µg	20µg	200µg	20µg	200µg	
100		59,7890574	20,7317073	95,6822676	92,5840475	
100		61,4262561	23,5008104	95,2458131	92,7066451	
100	102,109426	60,6076567	22,1162588	95,4640404	92,6453463	
0	3,36189848	0,81859936	1,38455153	0,21822728	0,0612988	
PBS						
	BSA	OmcB		delta33		
	200µg	20µg	200µg	20µg	200µg	
100	102,109426	60,6076567	22,1162588	95,4640404	92,6453463	%Infektion
0	3,36189848	0,81859936	1,38455153	0,21822728	0,0612988	Stabwn

8.2.3.3. Neutralisation der *C. trachomatis* Infektion mit rekombinantem OmcB Protein

Daten zu Abb. 41C

PBS	BSA	OmcB-L1	OmcB-E	
18,55	18,2	4,15	4,8	
18	17,85	4	4,75	
18,6	17,85	4	4,6	
18,7	18,05	3,9	4,8	
18,4625	17,9875	4,0125	4,7375	
0,27243118	0,14737283	0,08926786	0,08196798	
PBS	BSA	OmcB-L1	OmcB-E	
100	97,4272173	21,7332431	25,6601219	% Infektion
0,27243118	0,7982279	0,48350903	0,44397011	Stabwn

Daten zu Abb. 41D

PBS	BSA	OmcB-L1	OmcB-E	
36	34,25	7,15	8,6	
36,25	34,3	7,3	8,5	
35,45	33,55	7,4	8,4	
35,25	32,95	7,5	8,45	
35,7375	33,7625	7,3375	8,4875	
0,40369388	0,55494932	0,12930101	0,073951	
PBS	BSA	OmcB-L1	OmcB-E	
100	94,4735922	20,5316544	23,7495628	% Infektion
0,40369388	1,55284875	0,36180764	0,20692829	Stabwn

8.2.4. ELISA

Bei den ELISA-Experimenten wurden die Extinktion bei 420nm von 6 unabhängigen Proben gemessen. Die Angabe der relativen Absorption erfolgte durch Subtraktion der Extinktion der Kontrolle (HEp-2 Zellen) von der Extinktion der verschiedenen Proben.

Daten zu Abb. 38

HEp-2	HEp-2 + Cpn	Heparin	BSA	OmcB	delta 33	
0,35	0,43	0,28	0,41	0,3	0,4	
0,31	0,46	0,29	0,39	0,31	0,41	
0,33	0,45	0,3	0,4	0,31	0,39	
0,28	0,39	0,24	0,45	0,25	0,42	
0,3	0,42	0,25	0,43	0,3	0,41	
0,29	0,43	0,28	0,41	0,29	0,45	
0,31	0,43	0,27333333	0,415	0,29333333	0,41333333	Mittelwert
0,02203893	0,02070197	0,01976047	0,01832251	0,01902379	0,01745743	Stabwn
relative Absorption						
HEp-2	HEp-2 + Cpn	Heparin	BSA	OmcB	delta 33	
0	0,12	-0,03666667	0,105	-0,01666667	0,10333333	Mittelwert
0,02	0,01666667	0,01666667	0,015	0,01333333	0,01333333	Stabwn

8.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklungszyklus der Chlamydien	16
Abbildung 2: Modell der chlamydialen Adhäsion an die humane Zelle	17
Abbildung 3: Schematische Darstellung des <i>C. pneumoniae</i> OmcB Proteins	24
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Hefe-Oberflächen-Präsentationssystems (Yeast Surface Display)	32
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Aga2p-Kassette	71
Abbildung 6: Expression von Aga2p und Aga2p-Invasin-AD im Hefe-System	72
Abbildung 7: Oberflächen-Präsentation von Aga2p Fusionsproteinen	72
Abbildung 8: Einstellen der experimentellen Parameter eines Adhäsionstests mit humanen HEp-2 Zellen	74
Abbildung 9: Expression der Aga2p-GroEL-1 und Aga2p-Momp Fusionsproteine im Hefe-System	75
Abbildung 10: Aga2p-GroEL-1 exprimierende Hefen zeigen anders als Aga2p-Momp Hefen Bindung an humane Zellen	76
Abbildung 11: Lokalisierung des OmcB Proteins in differentiell fixierten, <i>C. pneumoniae</i> infizierten HEp-2 Zellen	78
Abbildung 12: Detektion von OmcB im chlamydialen Einschluss und auf der Oberfläche chlamydialer Partikel	79
Abbildung 13: Nachweis des Aga2p-OmcB Fusionsproteins	80
Abbildung 14: Adhäsionstests von Aga2p-OmcB exprimierenden Hefen	81
Abbildung 15: Nachweis der proteolytischen Entfernung Oberflächen-lokalisierter Aga2p-OmcB Proteine	81
Abbildung 16: Proteolytische Entfernung des Aga2p-OmcB von der Hefezelloberfläche reduziert die Adhäsion	82
Abbildung 17: Schematische Darstellung der OmcB-Teilproteine OmcB-N und OmcB-C	83
Abbildung 18: Detektion von Aga2p-OmcB-N und Aga2p-OmcB-C Fusionsproteinen auf der Hefezelloberfläche	83
Abbildung 19: Vergleich der adhäsiven Eigenschaften von Aga2p-OmcB-N und Aga2p-OmcB-C exprimierenden Hefen	84
Abbildung 20: Einfluss verschiedener exogener GAGs auf die Adhäsion von Aga2p-OmcB exprimierenden Hefen	85
Abbildung 21: Die Reduktion der Aga2p-OmcB Adhäsion durch Heparin erfolgt Dosis-abhängig	86
Abbildung 22: Enzymatische Entfernung Heparansulfat-ähnlicher Strukturen auf HEp-2 Zellen reduziert die Aga2p-OmcB Adhäsion	87
Abbildung 23: Aga2p-OmcB Hefen zeigen keine Adhäsion an GAG defiziente CHO-Zellen	88
Abbildung 24: Aga2p-OmcB-BD exprimierende Hefen adhäreren GAG-abhängig an HEp-2 Zellen	89
Abbildung 25: Generierung der OmcB Δ 33 Variante	90
Abbildung 26: Aga2p-OmcB Δ 33 Hefen vermitteln keine Adhäsion an HEp-2 Zellen	91
Abbildung 27: Schematische Darstellung der generierten OmcB-BD Mutanten	92
Abbildung 28: Expression verschiedener Aga2p-OmcB-BD Mutanten im Hefe-System	93
Abbildung 29: Aga2p-OmcB-BD Mutanten zeigen reduzierte adhäsive Eigenschaften	94
Abbildung 30: Aufreinigung von OmcB _{6His} und OmcB Δ 33 _{6His} aus <i>E. coli</i>	95
Abbildung 31: Adhäsion von OmcB _{6His} oder OmcB Δ 33 _{6His} beschichteten Latexkügelchen an eukaryotische Zellen	96
Abbildung 32: Einfluss der OmcB _{6His} Proteinkonzentration auf die Adhäsion	97
Abbildung 33: Aufreinigung von OmcB-BD _{6His} und OmcB-BD-KKRA _{6His} aus <i>E.coli</i>	98
Abbildung 34: Die OmcB-BD _{KKRA} Mutante zeigt eine reduzierte Adhäsion im Vergleich zum Wildtyp	98
Abbildung 35: Reduktion der <i>C. pneumoniae</i> Infektion mittels OmcB _{6His} Protein	99
Abbildung 36: Nachweis der Spezifität des polyklonalen OmcB-Serums	101
Abbildung 37: Reduktion der chlamydialen Infektion durch Einsatz des OmcB Serums	102
Abbildung 38: Der Einfluss von OmcB bei Adhäsion von <i>C. pneumoniae</i>	103
Abbildung 39: Lokalisierung der OmcB Proteine der <i>C. trachomatis</i> Serovare LGV und E	105
Abbildung 40: Die OmcB Proteine verschiedener Chlamydienspezies zeigen Adhäsion an Humanzellen	106
Abbildung 41: Neutralisation der <i>C. trachomatis</i> Infektion durch verschiedene <i>C. trachomatis</i> OmcB _{6His} Proteine	107
Abbildung 42: Die Adhäsion Aga2p-OmcB-E präsentierender Hefen kann nicht durch Heparin inhibiert werden	109
Abbildung 43: Aga2p-OmcB-L1 und Aga2p-OmcB-E exprimierende Hefen zeigen keine Adhäsion an GAG-defiziente CHO-Zellen	110
Abbildung 44: Sekundärstrukturanalyse von verschiedenen <i>C. trachomatis</i> OmcB Varianten	111

Abbildung 45: Untersuchung der Adhäsion von Aga2p-OmcB-L1* exprimierenden Hefezellen an HEp-2 Zellen	111
Abbildung 46: OmcB präsentierende Hefen zeigen Unterschiede bei der Heparin-Abhängigkeit der Adhäsion	112
Abbildung 47: Die Adhäsion von Aga2p-OmcB-E und Aga2p-OmcB-L1* Hefen ist Heparin-unabhängig	113
Abbildung 48: Adhäsion GFP exprimierender Hefezellen an HEp-2 Zellen	116
Abbildung 49: Verteilung der basischen Aminosäuren in der N-terminalen Heparinbindedomäne des <i>C. pneumoniae</i> OmcB Proteins	123
Abbildung 50: Schematische Darstellung der OmcB-vermittelten <i>C. pneumoniae</i> Adhäsion	128
Abbildung 51: Alignment der OmcB Proteinsequenzen verschiedener chlamydialer Spezies	130
Abbildung 52: GAG-Abhängigkeit verschiedener OmcB Proteine	132
Abbildung 53: Unterschiede der Interaktion zwischen GAG-Molekülen und OmcB-L1 oder OmcB-E	135
Abbildung 54: Model der OmcB-vermittelten Adhäsion an verschiedene GAGs	136
Abbildung 55: Expressions und Präsentationskontrolle des Aga2p-OmcB-BD	150
Abbildung 56: Expressionskontrolle verschiedener Aga2p-OmcB Fusionsprotein	151
Abbildung 57: Die OmcB-L1-N Variante adhärirt an humane Zellen	152
Abbildung 58: Die verschiedenen Aga2p-OmcB Fusionsproteine adhäririeren an weitere humane Zelllinien	152
Abbildung 59: Alignment der OmcB Proteinsequenz verschiedener <i>C. trachomatis</i> Serovare	153
Abbildung 60: Alignment der OmcB Proteinsequenzen von <i>C. pneumoniae</i> und <i>C. psittaci</i> GPIC	153
Abbildung 61: Alignment der OmcB Proteinsequenz von <i>C. pneumoniae</i> und dem Parachlamydidium UWE25	154
Abbildung 62: Sekundärstrukturanalyse verschiedener OmcB Proteinsequenzen	154

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. J.H. Hegemann für die Überlassung des Themas bedanken. In vielen Gesprächen über Ergebnisse, experimentelle Ansätze und Probleme hat er mich mit immer neuen Ideen und einer ständigen Diskussionsbereitschaft zum wissenschaftlichen Arbeiten angeleitet.

Ein großes Dankeschön gilt auch Herrn Prof. Dr. R. Wagner für die bereitwillige Übernahme des Koreferats.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. „Freddy“ Wuppermann für die Einführung in die Welt der Chlamydien und die immerwährende Bereitschaft sich mal eine Sekunde Zeit zu nehmen, um über das eine oder andere Ergebnis, Problem oder Sonstiges nachzudenken. Weiter möchte ich mich bei all meinen Laborkollegen aus der Chlamydientruppe (Eleni, Phillip und Rafat), der Hefeabteilung (Gabi, Toni und Irina) und dem Sekretariat (Steffi) für die Unterstützung, Aufmunterungen und das immer gute Arbeitsklima bedanken. Besonders die immer lustigen Gespräche mit meiner Tischnachbarin Eleni, die manchmal auch ohne Worte verstanden wurden, haben den Laboralltag sehr erleichtert.

Neben den Kellerkindern geht ein weiteres Dankeschön auch an die „Pombes oder Spalter“ Anne, Christoph, Visnja, Jennifer und die Even mit denen so manches Seminar gut überstanden wurde.

Allen anderen Mitarbeitern im Institut danke ich für die lustigen Unternehmungen neben der Arbeit und den unvergesslichen Mensagängen im Rudel.

Besonders bedanken möchte ich mich außerdem bei Dr. Melanie van den Boom, deren Freundschaft und Unterstützung mich schon seit der Ersti-Einführung durch das Studium, die Diplomarbeit und die Promotion begleitet hat. Bei so manchem Mittagessen in der Mensa oder dem einen oder anderen Cocktail im Scottis, haben wir uns gegenseitig immer wieder aufgemuntert. Vielen Dank dafür!

Ein großes Dankeschön gilt natürlich meiner Familie, besonders meinen Eltern, die mich während der ganzen Zeit des Studiums und meiner Promotion unterstützt, aufgemuntert und immer wieder angespornt haben. Danke das Ihr immer an mich geglaubt 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.

Katja Mölleken