

Identifizierung und Charakterisierung neuer Adhäsiene bei *Chlamydia trachomatis*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Sonja Stallmann

aus Gelsenkirchen

Düsseldorf, März 2015

aus dem Institut für Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Johannes H. Hegemann
Korreferent: Prof. Dr. Rolf Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Mai 2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis	vi
Zusammenfassung	viii
Summary	x
1 EINLEITUNG	1
1.1 Taxonomische Einteilung der Chlamydien	1
1.2 Pathogene Bedeutung von Chlamydien	2
1.2.1 <i>Chlamydia trachomatis</i>	2
1.2.2 <i>Chlamydia pneumoniae</i>	4
1.3 Die besondere Biologie der Chlamydien	4
1.3.1 Der Entwicklungszyklus	5
1.3.2 Der chlamydiale Außenmembrankomplex (cOMC)	8
1.4 Endozytose	9
1.4.1 Clathrin-abhängige Endozytose	10
1.4.2 Clathrin-unabhängige Endozytose	11
1.5 Adhäsion und Internalisierung von Pathogenen	13
1.5.1 Zipper-Mechanismus	13
1.5.2 Trigger-Mechanismus	15
1.5.3 Integrine und ihre Bedeutung für Pathogene	16
1.5.4 Adhäsion und Internalisierung von Chlamydien	18
1.5.4.1 Die chlamydiale Adhäsion – GAGs und die chlamydiale Seite	19
1.5.4.2 Die chlamydiale Adhäsion – Die humane Seite	21
1.5.4.3 Die chlamydiale Internalisierung	23
1.6 Zielsetzung	25
2 MATERIALIEN	26
2.1 Gebrauchsmaterialien	26
2.2 Geräte und Maschinen	26
2.3 Chemikalien	27
2.4 Lösungen und Puffer	29
2.5 Enzyme	31
2.6 Antikörper	31
2.6.1 Primäre Antikörper	31
2.6.2 Sekundäre Antikörper	32
2.7 Fluoreszenzfarbstoffe	32
2.8 Kits	32
2.9 DNA- und Proteingrößenstandards	33

2.10	Oligonukleotide	33
2.10.1	Oligonukleotide für die Klonierung	33
2.10.2	Oligonukleotide zur Sequenzierung.....	35
2.11	Plasmide	36
2.12	Zellen und Zelllinien	37
2.12.1	Prokaryotische Zellen und Zelllinien	37
2.12.2	Eukaryotische Zellen und Zelllinien.....	38
2.13	Medien und Medienzusätze	39
2.13.1	Medien für <i>E. coli</i>	39
2.13.2	Medien für <i>S. cerevisiae</i>	39
2.13.3	Zell- und Chlamydienkulturmedium	41
3	METHODEN	42
3.1	Kultivierung humaner Zellen	42
3.1.1	Passagieren adhärenter Zellen durch Trypsinbehandlung.....	42
3.1.2	Einfrieren eukaryotischer Zellen.....	43
3.2	Chlamydienkultur	43
3.2.1	Passagieren von Chlamydien in 25 cm ² Zellkulturflaschen.....	43
3.2.2	Herstellung eines chlamydialen Pools	44
3.2.3	Sedimentation und Einfrieren von Chlamydien.....	44
3.2.4	Reinigung von Chlamydien mittels Gastrografin-Gradient.....	45
3.2.5	Bestimmung der Infektiosität von chlamydialen Suspensionen	45
3.2.6	Kurzzeitinfektion von Chlamydien.....	46
3.3	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
3.3.1	Hefe-zwei-Hybrid-System	46
3.3.2	Nachweis der Proteinexpression.....	47
3.3.3	Serieller Verdünnungs-Tropftest.....	48
3.4	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	48
3.4.1	Herstellung von elektrokompetenten <i>E. coli</i> s.....	48
3.5	Molekularbiologische Methoden	49
3.5.1	Generierung chlamydialer genomischer DNA	49
3.5.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	49
3.5.2.1	Amplifikation von Gensequenzen.....	50
3.5.2.2	PCR auf Hefezellen.....	51
3.5.3	Auftrennung von DNA-Molekülen durch Agarose-Gelelektrophorese.....	51
3.5.4	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	51
3.5.5	Transformation und homologe Rekombination in <i>S. cerevisiae</i>	52
3.5.6	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	53
3.5.7	Transformation von <i>E. coli</i>	53
3.5.7.1	Ein-Minuten Transformation.....	53
3.5.7.2	Transformation durch Elektroporation	54
3.5.8	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	54

3.5.8.1	Plasmid Minipräparation.....	54
3.5.8.2	Plasmid Midipräparation.....	55
3.5.9	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	55
3.5.10	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung.....	55
3.5.11	Sequenzierung von DNA.....	55
3.6	Biochemische Methoden.....	56
3.6.1	Induktion der Genexpression in <i>E. coli</i>	56
3.6.2	Affinitätschromatographische Aufarbeitung von Proteinen.....	56
3.6.2.1	Reinigung von His-Fusionsproteinen unter denaturierenden Bedingungen.....	56
3.6.2.2	Reinigung von GST-Fusionsproteinen unter nativen Bedingungen.....	57
3.6.3	Proteinmengenbestimmung mittels Bradford-Reagenz.....	58
3.6.4	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE.....	59
3.6.4.1	Probenaufbereitung für die SDS-PAGE.....	59
3.6.4.2	Herstellung von Trenn- und Sammelgel.....	59
3.6.4.3	SDS-Gelelektrophorese.....	60
3.6.4.4	Färbung von Proteingelen mit Coomassie-Brillant-Blau.....	60
3.6.5	Westernblot und Immundetektion.....	60
3.6.5.1	Proteintransfer auf eine PVDF-Membran.....	60
3.6.5.2	Immundetektion von Proteinen.....	61
3.6.6	Beschichtung und Beschichtungskontrolle von Latexkugeln.....	61
3.6.6.1	Proteinbeschichtung von Latexkugeln.....	62
3.6.6.2	Überprüfung der Beschichtungsqualität.....	62
3.6.7	Markierung von Proteinen mit Biotin.....	62
3.6.8	Interaktionsstudien.....	63
3.6.8.1	Protein-Protein-Interaktionsstudien mittels Far-Western.....	63
3.6.8.2	Rezeptor-Pulldown Experimente mit biotinyliertem Protein.....	64
3.6.9	Löslichkeitstest chlamydialer Proteine mit Detergenzien.....	65
3.6.10	Generierung polyklonaler Antikörper.....	66
3.6.10.1	Produktion polyklonaler Antikörper.....	66
3.6.10.2	Antigenreinigung polyklonaler Antikörper.....	66
3.6.10.3	Abreicherung polyklonaler Antikörper.....	67
3.6.10.3.1	Abreicherung gegen fixierte Humanzellen.....	67
3.6.10.3.2	Abreicherung gegen geblottete Zellen.....	68
3.6.11	Markierung von Antikörpern mit FITC.....	68
3.7	Zellbiologische Methoden.....	69
3.7.1	Adhäsionsexperimente.....	69
3.7.1.1	Adhäsionsanalyse mit proteinbeschichteten Latexkugeln.....	69
3.7.1.2	Adhäsionsanalyse mit löslichen Protein.....	69
3.7.1.3	Adhäsionsanalyse mit CFSE-markierten chlamydialen EBs.....	70
3.7.2	Neutralisationsexperimente.....	71
3.7.2.1	Neutralisation der chlamydialen Infektion mit rekombinanten Protein.....	71
3.7.2.2	Neutralisation der chlamydialen Infektion mit Antiserum.....	71

3.7.3	Internalisierung proteinbeschichteter Latexkügelchen.....	72
3.7.4	Transfektion von HEp-2 Zellen mit TurboFect.....	73
3.8	Mikroskopie.....	73
3.8.1	Fixierung humaner Zellen	73
3.8.2	Permeabilisierung PFA-fixierter Zellen	74
3.8.3	Immunfluoreszenz.....	74
3.8.4	Lebendfärbung von Chlamydien.....	75
4	ERGEBNISSE.....	76
4.1	Identifizierung neuer potentieller <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar E Adhäsiine	76
4.1.1	Auswahl der zu testenden <i>C. trachomatis</i> Proteine.....	76
4.1.2	Generierung rekombinanter Ctad-Proteine	78
4.1.3	Die Ctad-Proteine vermitteln unterschiedliche Adhäsivitäten an HEp-2 Zellen.....	80
4.1.4	Alle Ctad Proteinen verringern die chlamydiale Infektion	82
4.2	Weiterführende Analysen der fünf besten Ctad-Kandidaten	84
4.2.1	Lösliches Cad1, Ctad2, Ctad4 und Ctad9 Protein bindet an humane HEp-2 Zellen.....	84
4.2.2	Nur Ctad4 reduziert die Adhäsion von EBs signifikant	86
4.2.3	Patientenseren erkennen vier der fünf Ctad-Proteine	88
4.2.4	Die hypothetischen Ctad-Proteine werden während der Infektion exprimiert	89
4.3	Charakterisierung von Ctad8.....	91
4.3.1	Ctad8 lokalisiert an der Inklusionsmembran	91
4.4	Charakterisierung von Ctad2.....	95
4.4.1	Ctad2 lokalisiert auf RBs und könnte sekretiert werden.....	95
4.4.2	Die Sekretion von Ctad2 ist uneindeutig.....	97
4.5	Charakterisierung von Ctad4.....	99
4.5.1	Ctad4 wird nur spät im Infektionszyklus exprimiert	99
4.5.2	Transfiziertes Ctad4 lokalisiert an Vesikeln im Zytoplasma	101
4.6	Charakterisierung von Ctad9.....	104
4.6.1	Ctad9 lokalisiert spät in der Infektion auf EBs	104
4.6.2	Ctad9 könnte oberflächenlokalisiert auf EBs vorliegen.....	106
4.6.3	Ctad9 wird früh in der Infektion sekretiert	107
4.6.4	Ctad9-GFP lokalisierte an endozytotischen Vesikeln	108
4.7	Charakterisierung von Ctad1	110
4.7.1	Ctad1 ist ein oberflächenexponiert chlamydiales Protein.....	110
4.7.1.1	Ctad1 und Momp kolokalisieren spät in der Infektion.....	110
4.7.1.2	Ctad1 ist oberflächenlokalisiert und früh in der Infektion verfügbar	112
4.7.2	Analyse der Bindeeigenschaften von Ctad1	114
4.7.3	Sowohl rekombinantes Ctad1 Protein als auch der Ctad1 Antikörper wirken neutralisierend auf die Infektion.....	116
4.7.4	Identifikation des humanen Interaktionspartners von Ctad1	118
4.7.4.1	Pulldown Experiment zur Identifikation eines Interaktionspartners.....	118
4.7.4.2	Ctad1 interagiert im Hefe-zwei-Hybrid-System nicht mit EGFR aber mit Integrin- β 1.....	119

4.7.4.3	Ctad1 und Integrin- β 1 interagieren im Far-Westernblot Experiment.....	121
4.7.4.4	Früh in der Infektion assoziiert Integrin- β 1 an gebundenen EBs.....	123
4.7.5	Ctad1-beschichtete Latexkügelchen werden internalisiert.....	125
4.7.6	Integrin- β 1 besitzt eine Funktion in der chlamydialen Infektion.....	127
4.7.6.1	Das Fehlen von Integrin- β 1 in Humanzellen beeinflusst die Adhäsion von Ctad1 und die chlamydiale Infektion.....	127
4.7.6.2	Ctad1 vermittelt eine Signalgebung in die Zelle.....	129
4.7.7	Domänenanalyse von Ctad1	130
4.7.7.1	Ermittlung einer Bindedomäne von Ctad1.....	130
4.7.7.2	Der N-Terminus vermittelt die Bindung zu Integrin- β 1.....	132
4.7.7.3	Test auf Selbstinteraktion von Ctad1.....	134
4.7.8	rCtad1 neutralisiert die Infektion anderer chlamydialer Serovaren.....	136
5	DISKUSSION.....	139
5.1	Ctad1 – ein neues chlamydiales Adhäsins.....	140
5.1.1	Ctad1 erfüllt alle Charakteristika eines Adhäsins	140
5.1.1.1	Ctad1 vermittelt Bindung an Humanzellen	140
5.1.1.2	Rekombinantes Ctad1 Protein und der spezifische Antikörper reduzieren die Infektion	141
5.1.2	Ctad1 ist ein oberflächenexprimiertes Adhäsins.....	141
5.1.3	Ctad1 und Integrin- β 1 – eine neues Interaktionspaar.....	144
5.1.3.1	Die Ctad1-Integrin- β 1 Interaktion.....	144
5.1.3.2	Integrin- β 1 besitzt eine Funktion in der chlamydialen Infektion.....	148
5.1.3.3	Die wechselseitige Beeinflussung zwischen Integrinen und weiteren Rezeptoren.....	151
5.1.4	Ist die Interaktion zwischen Ctad1 und Integrin auch bei anderen Spezies von Bedeutung?	153
5.1.5	Erweitertes Modell der <i>C. trachomatis</i> Adhäsion.....	155
5.2	Besitzt Ctad9 weitere Funktionen als für TepP beschrieben?.....	157
5.3	Ctad2 – Ein potentieller neuer Effektor?.....	160
5.4	Ctad4 – Noch ein neuer Effektor oder nur ein Haushaltsgen?	163
5.5	Ctad8 – Ein Inklusionsmembranprotein.....	165
5.6	Modell der potentiellen Ctad-Funktionen.....	167
	Anhang.....	I
	Literaturverzeichnis	VI
	Abbildungsverzeichnis.....	XIX
	Tabellenverzeichnis.....	XX
	Danksagung	XXI
	Eidesstattliche Erklärung.....	XXII

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung der Chemikalien siehe Chemikalienliste (s. Kapitel 2.3)

%	Prozent	FKS	fötales Kälberserum
°C	Grad Celsius	g	Gramm
μF	Mikrofarad	GFP	grün fluoreszierendes Protein
μg	Mikrogramm	GST	Glutathion-S-Transferase
μl	Mikroliter	h	Stunde
μM	Mikromolar	IUF	Infection forming Unit
∞	Unendlich	kb	Kilobasen
∅	Durchmesser	kDa	Kilodalton
Abb.	Abbildung	kV	Kilovolt
AP	alkalische Phosphatase	l	Liter
AS	Aminosäure	LGV	Lymphogranuloma venereum
bp	Basenpaar	LPS	Lipopolysaccharid
BSA	Rinderserumalbumin	M	Molar
bzw.	beziehungsweise	mA	Milliamper
cm	Zentimeter	Mb	Megabasen
cm ²	Quadratcentimeter	mg	Milligramm
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	min	Minute
cOMC	chlamydialer äußerer Membrankomplex	ml	Milliliter
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser	mm	Millimeter
d.h.	das heißt	mM	Millimolar
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MOI	multiplicity of infection
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat	(thero.) MW	theoretisches Molekulargewicht
EB	Elementarkörperchen	ng	Nanogramm
elek.	elektronisch	nm	Nanometer
ER	Östrogenrezeptor	nt	Nukleotide
ERK1/2	extracellulär-signal regulierte Kinase	OD	optische Dichte
<i>et al.</i>	et alii (und andere)	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
FACS	Fluoreszenz Activated Cell Sorter	pH	-log ₁₀ [H ⁺]
		pi	post infection

pmol	Picomol
PS	Proteinstandard
RB	Retikularkörperchen
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese
sog.	sogenannt
spp.	<i>species pluralis</i>
SH3-Domäne	Scr Homologie 3 Domäne
T3SS	Typ-3-Sekretionssystem
U	Unit = $\mu\text{mol}/\text{min}$
u.a.	unter anderem
ü/N	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen je Gesamtvolumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
WHO	World Health Organisation
x g	einfache Erdbeschleunigung = $9,80665 \text{ m/s}^2$
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Zusammenfassung

Chlamydien sind gramnegative, obligat intrazelluläre Bakterien. Zu den bedeutendsten humanpathogenen Spezies zählen *Chlamydia trachomatis* und *C. pneumoniae*. *C. trachomatis* ist der weltweit häufigste bakterielle Erreger sexuell übertragbarer Krankheiten und ruft Infektionen des Urogenitaltrakts hervor, welche unbehandelt zur Infertilität bei Frauen führen kann. Andere Serovare dieses Pathogens können durch die Infektion des Auges die Bildung eines Trachoms verursachen, was noch immer die Hauptursache vermeidbarer Blindheit ist. *C. pneumoniae* führt zu akuten Infektionen der oberen und unteren Atemwege und weist eine altersabhängige Durchseuchung der Bevölkerung von bis zu 70 % auf.

Die erfolgreiche Etablierung einer Infektion erfordert die Adhäsion und nachfolgende Internalisierung des Bakteriums in die Wirtszelle. Initial erfolgt eine wahrscheinlich reversible Bindung von chlamydialem OmcB an polymere Zuckerstrukturen (Glykosaminoglykane) der Wirtszelloberfläche. Die folgende irreversible Bindung spezifischer chlamydialer Adhäsine, u.a. alle Mitglieder der polymorphen Membranprotein (Pmp) Familie, an humane Rezeptoren induziert die Aufnahme des Bakteriums. Nach simultaner Blockade des OmcB- und Pmp-vermittelten Adhäsionsweges bei *C. pneumoniae* konnte noch immer eine erhebliche Restinfektion beobachtet werden. Chlamydien scheinen demzufolge, wie andere Pathogene, multiple Adhäsionsstrategien entwickelt zu haben. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit neue Adhäsine für *C. trachomatis* E, dem am weitest verbreiteten Serovar in Deutschland, identifiziert und charakterisiert werden.

Eine genomweite Suche nach geeigneten Kandidaten wurde anhand von bioinformatischen und literaturbasierten Kriterien durchgeführt. Die ausgewählten Kandidaten wurden in Ctad1 bis 12 umbenannt (*C. trachomatis* Adhäsine). Mit rekombinantem Protein erfolgte eingehend die Charakterisierung des Adhäsionsverhaltens und des Einflusses auf die chlamydiale Infektion. Fünf Proteine erfüllten diese Eigenschaften und wurden hinsichtlich ihrer genauen Funktion untersucht. Dazu wurden u.a. Ctad-spezifische Antikörper zur Analyse ihrer Lokalisation während der chlamydialen Infektion generiert.

Die Lokalisations- und Funktionsanalysen zeigten, dass Ctad2 und Ctad9 potentielle Effektorproteine darstellen, während es sich bei Ctad4 wahrscheinlich um ein Haushaltsprotein und bei Ctad8 um ein Inklusionsmembranprotein handelt.

Für Ctad1 konnte eine essentielle Funktion als chlamydiales Adhäsine im Infektionsprozess aufgezeigt werden. Ctad1 lokalisierte auf der Oberfläche von Bakterien, von der es durch Pufferbehandlung teilweise entfernt werden konnte. Rekombinantes Ctad1 (rCtad1) Protein vermittelte über zwei SH3-Domänen in seinem N-Terminus die konzentrationsabhängige Bin-

derung an Humanzellen. Die Bindung korreliert mit der konzentrationsabhängigen Neutralisation der Infektion, die auf die Reduktion der Adhäsion infektiöser, chlamydialer Partikel zurückzuführen war. Ferner induzierte Ctad1 seine eigene Internalisierung in Humanzellen und kann daher auch als Invasin bezeichnet werden.

Als humaner Interaktionspartner von Ctad1 konnte im Hefe-zwei-Hybrid-System die β 1-Untereinheit des Integrin-Rezeptors ermittelt und mittels Far-Westernblot Analyse verifiziert werden. Eine 50 %ige Reduktion der *C. trachomatis* E Infektion auf Integrin- β 1-negativen Zellen bestätigte eine essentielle Funktion des Rezeptors *in vivo*. Die Infektionsreduktion korrelierte mit einer signifikant reduzierten Adhäsion rCtad1-beschichteter Kügelchen an Zellen dieser Zelllinie. Mikroskopisch konnte in der frühen Infektion sowohl bei Zellen der HEP-2 Zelllinie als auch bei primären Eileiterepithelzellen eine Assoziation von Integrin- β 1 an adhärierten EBs nachgewiesen werden. Die Bindung von *C. trachomatis* E und rCtad1 induzierte eine Signaltransduktion in die Humanzelle, die zur Aktivierung von ERK1/2 führte.

Interessanterweise neutralisierte rCtad1 Protein auch die Infektion von *C. trachomatis* L2 und *C. pneumoniae*, was auf eine generelle Funktion des konservierten Proteins in der frühen chlamydialen Infektion hindeutet.

Zusammenfassend konnte mit Ctad1 ein neues Adhäsion und Invasin von *C. trachomatis* Sero-
var E beschrieben und als humaner Interaktionspartner die β 1-Untereinheit des Integrin-Rezeptors identifiziert werden. Die Blockade der Ctad1 – Integrin- β 1 Interaktion mit Inhibitoren könnte neue Therapiemöglichkeiten eröffnen, um einer *C. trachomatis* Infektion entgegenzuwirken.

Summary

Chlamydia are Gram-negative, obligate intracellular bacteria. The most significant human pathogenic species are *Chlamydia trachomatis* and *C. pneumoniae*. *C. trachomatis* is the worldwide leading cause of sexually transmitted diseases and induces infections of the urogenital tract, which when untreated lead to infertility in women. Other serovars of this pathogen infect the eyes causing trachoma, which is still the main cause of preventable blindness. *C. pneumoniae* leads to acute infection of the upper and lower respiratory tract with an age-related antibody prevalence of up to 70 %.

The successful establishment of an infection requires adhesion and subsequent internalization of the bacteria into the host cell. Initially the reversible binding of chlamydial OmcB to polymeric sugar structures (glycosaminoglycan) on the host cell surface takes place. The following irreversible binding of specific chlamydial adhesins, *inter alia* all members of the polymorphic membrane protein (Pmp) family, to human receptors induce uptake of the bacteria. After simultaneous blocking of the OmcB and Pmp mediated adhesion by *C. pneumoniae*, a considerable infection could still be observed. Thus, it seems that *Chlamydia* like other pathogens have developed multiple adhesion strategies. Therefore, the aim of this thesis was the identification and characterization of new adhesins from *C. trachomatis* Serovar E, being the leading chlamydial pathogen in Germany.

A genome-wide screen for candidates was performed with the help of bioinformatics and literature-based criteria. The selected candidates have been renamed Ctad1 to Ctad12 (*C. trachomatis* adhesin). Using recombinant protein a first characterization of the adhesive properties and impact on the chlamydial infection was carried out. Five proteins satisfied these properties and their functions have been further studied. In addition, Ctad-specific antibodies were generated for analyzing their localization during chlamydial infection.

The localization and functional analyzes revealed that Ctad2 and Ctad9 represent potential effector proteins, while Ctad4 can be regarded a housekeeping protein and Ctad8 an inclusion membrane protein.

For Ctad1 an essential function as chlamydial adhesin in the infection process could be demonstrated. Ctad1 localized on the bacteria surface, from where it could be partially removed by buffer treatment. Recombinant Ctad1 (rCtad1) protein mediated dose-dependent adhesion to human cells by two SH3 domains in its N-terminus. The binding correlated with the dose-dependent neutralization of infection, which results from a reduced adhesion of the infectious, chlamydial particle. Furthermore, Ctad1 induced its own internalization into human cells and can therefore be referred to as invasin.

As human interaction partner of Ctad1 the β 1-subunit of the integrin-receptor could be identified by yeast-two-hybrid and this was verified by far-western analyzes. A 50 % reduction in *C. trachomatis* E infection of integrin- β 1-negative cells confirmed an essential function of the receptor *in vivo*. The reduced infection correlated with a significantly reduced adhesion of rCtad1-coated beads to cells of this cell line. Early in infection using HEp-2 cells or human primary fallopian tube epithelia cells an association of integrin- β 1 with attached EB could be detected microscopically. Binding of *C. trachomatis* E and rCtad1 induced a signal transduction in human cells, which led to the activation of ERK1/2.

Interestingly, recombinant Ctad1 protein also neutralized a *C. trachomatis* L2 and a *C. pneumoniae* infection, pointing to a general function of the conserved protein in early chlamydia infection.

In summary, Ctad1 could be described as a new adhesin and invasin of *C. trachomatis* serovar E with the β 1-subunit of the integrin-receptor being identified as its human interaction partner. Interfering with the Ctad1 – integrin- β 1 interaction using small inhibitors might provide new therapeutic possibilities to counteract a *C. trachomatis* infection.

1 Einleitung

1.1 Taxonomische Einteilung der Chlamydien

Bereits 1880 und 1907 wurden die später als *Chlamydia psittaci* respektive *C. trachomatis* bekannten Spezies erstmals beschrieben (Ritter 1880, Halberstädter 1907, Harris und Williams 1985). Es dauerte jedoch noch bis ins Jahr 1942, bis eine Verwandtschaft dieser beiden Krankheitserreger erkannt wurde (Rake und Jones 1942). Nochmals 24 Jahre später erfolgte die Richtigstellung der Chlamydienklassifizierung als Bakterien, die zuvor zu den Viren zählten (Moulder 1966). Schlussendlich wurden die gramnegativen Chlamydien aufgrund ihres einzigartigen biphasischen Entwicklungszyklus und der besonderen Struktur des Außenmembrankomplexes (cOMC) 1971 in die eigenständige Ordnung *Chlamydiales* eingeordnet, die lediglich die Familie *Chlamydiaceae*, mit der einen Gattung *Chlamydia* umfasste, mit den Spezies *C. trachomatis* und *C. psittaci* (Storz und Page 1971). 1989 wurde *C. pneumoniae* als dritte eigenständige Spezies eingeführt, der später noch weitere folgten (Abbildung 1.1).

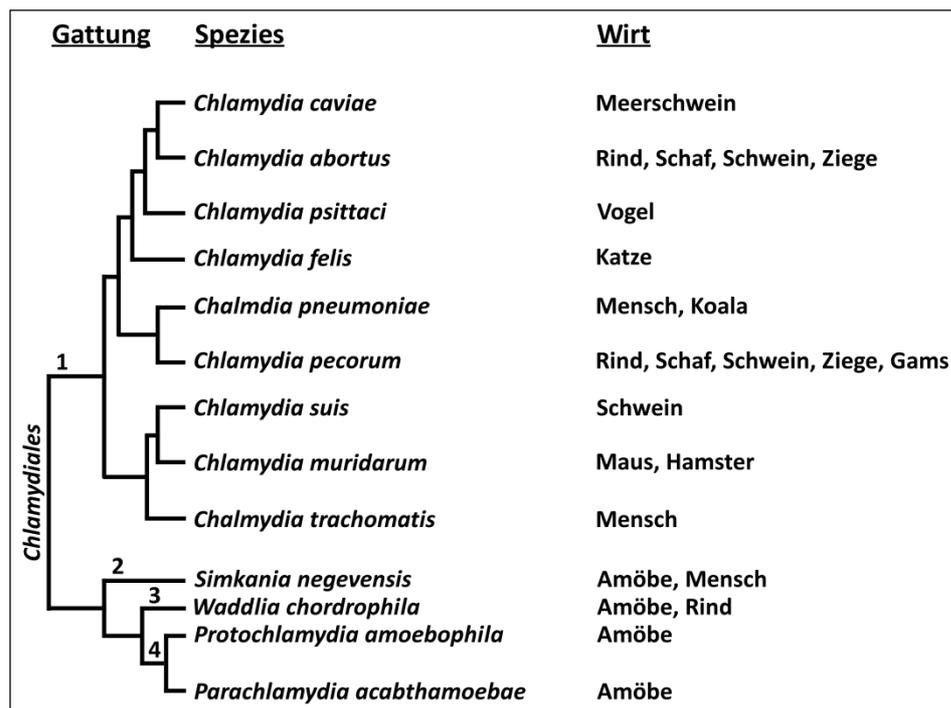


Abbildung 1.1: Taxonomie der Ordnung *Chlamydiales*.

Darstellung der chlamydialen Verwandtschaftsverhältnisse angelehnt an (Horn 2008, Collingro, Tischler *et al.* 2011). Familie: *Chlamydiaceae* (1), *Simkaniaceae* (2), *Waddliaceae* (3), *Parachlamydiaceae* (4). Die Abstände entsprechen nicht den phylogenetischen Gegebenheiten.

Durch Vergleichsanalysen von 16 S und 23 S rRNA konnten nicht nur weitere Spezies der Gattung *Chlamydia*, sondern auch die Familien *Parachlamydiaceae*, *Waddliaceae* und *Simkaniaceae* der Ordnung *Chlamydiales* zugewiesen werden, deren Vertreter ein Vielzahl von Wirtsorganismen

men befallen (s. Kapitel 1.2 und Abbildung 1.1) (Grayston, Kuo *et al.* 1989, Everett, Bush *et al.* 1999, Rurangirwa, Dilbeck *et al.* 1999). Die aufgrund weiterer bioinformatischer Analysen vorgeschlagene Aufspaltung der Gattung *Chlamydia* in *Chlamydia* und *Chlamydophila*, wurde von der wissenschaftlichen Gemeinschaft überwiegend nicht akzeptiert (Everett, Bush *et al.* 1999, Schachter, Stephens *et al.* 2001). 2009 erfolgte daher die Rückkehr zur uniformen Verwendung des Gattungsnamen *Chlamydia*, da neuere phylogenetische Untersuchungen die enge evolutionäre Verwandtschaft aller neun Spezies belegten (Stephens, Myers *et al.* 2009). Heutzutage umfasst die Ordnung *Chlamydiales* neben den bereits erwähnten vier Familien noch vier weitere Familien: *Clavochlamydiaceae*, *Criblamydiaceae*, *Piscichlamydiaceae* und *Rhabdochlamydiaceae* (Horn 2008).

1.2 Pathogene Bedeutung von Chlamydien

Die Vertreter der Familie *Chlamydiaceae* treten weltweit als tier- bzw. humanpathogene Erreger mit bedeutender gesundheitlicher und/oder wirtschaftlicher Relevanz auf. Wirte tierpathogener Chlamydien sind sowohl Haus- und Nagetiere (*C. caviae*, *C. felis*, *C. muridarum*) als auch Nutztiere wie Schweine, Ziegen, Schafe, Kühe oder Vögel (*C. abortus*, *C. pecorum*, *C. psittaci*, *C. suis*) (Abbildung 1.1). Eine Infektion führt zur Entzündung des Epithelgewebes des Auges, des respiratorischen Trakts, des Magen-Darm- oder Urogenitaltrakts, wobei letzteres zu Aborten und sogar Infertilität der Tiere führen kann, welches einen erheblichen wirtschaftlichen Schaden impliziert (Longbottom und Coulter 2003). Darüber hinaus können gelegentlich Infektionsübertragungen von *C. psittaci* bzw. *C. abortus* auf den Menschen erfolgen (Zoonose). So kann eine *C. abortus* Infektion bei Frauen zu Früh-, Fehl- oder Totgeburten führen. Weitaus häufiger erfolgt jedoch eine Infektion mit *C. psittaci* durch das Einatmen von Aerosolen aus getrocknetem Kot oder Sekreten infizierter Vögel. Dies äußert sich in grippeähnlichen Symptomen, kann jedoch in schweren Fällen und bei Nichtbehandlung auch zum Tode führen. Ein zoonotisches Potential der übrigen tierpathogenen Chlamydien wird nicht ausgeschlossen und zurzeit diskutiert (Rohde, Straube *et al.* 2010, Wheelhouse und Longbottom 2012). Mit geschätzten 600 Millionen infizierten Menschen weltweit gehören *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* zu den verbreitetsten humanpathogenen Krankheitserregern, die im Folgenden detaillierter beschrieben werden (Ojcius, Darville *et al.* 2005).

1.2.1 *Chlamydia trachomatis*

Die Spezies *C. trachomatis* umfasst mehrere Serovare, die in die zwei für den Menschen bedeutsamen Biovare - Infektion des Auges (Trachom) bzw. des Urogenitaltrakts - unterteilt werden,

die weltweit von enormer gesundheitlicher Bedeutung sind (Bebear und de Barbeyrac 2009). Die Serovare A - C führen zu Entzündungen des menschlichen Auges (Trachom), welches bei Nichtbehandlung zur Erblindung führen kann. Eine andauernde oder oftmals wiederkehrende Entzündung der Schleimhäute resultiert dabei in einer chronischen Entzündung des Augenspiels, wodurch das Lid vernarbt. Dies führt zu Trichiasis dem Scheuern der Wimpern über die Hornhaut, welches diese zerkratzt und zu eingeschränkter Sicht oder später zur Erblindung führt. Das Trachom gilt als endemisch in 50 Ländern; betroffen sind vorrangig Menschen in Afrika und entwicklungsschwachen Ländern mit geringen hygienischen und medizinischen Standards (Hu, Harding-Esch *et al.* 2010). Nach Schätzungen der WHO waren 2002 weltweit 1,3 Millionen Menschen von einer *C. trachomatis* vermittelten Erblindung betroffen. Somit ist dieser Erreger noch immer die Hauptursache vermeidbarer Blindheit. Dank intensiver Bekämpfung dieser Erkrankung sind die Zahlen zurzeit rückläufig, da die WHO sich zur Aufgabe gestellt hat durch das Trachom vermittelte Blindheit bis zum Jahr 2020 auszurotten (WHO, (Hu, Harding-Esch *et al.* 2010)).

Mit weltweit 106 Millionen Neuinfektion pro Jahr sind die *C. trachomatis* Serovare D – K gegenwärtig die verbreitetsten sexuell übertragbaren, bakteriellen Erreger. Wobei allein in den Jahren 2005 - 2008 die Prävalenz um 4,1 % zunahm (WHO 2012). Durch den bei Männern zu etwa 50 % und bei Frauen zu etwa 80 % asymptomatischen Krankheitsverlauf liegt die Dunkelziffer wahrscheinlich weit höher (Detels, Green *et al.* 2011). So schätzt die deutsche STD-Gesellschaft (Sexuell übertragbarer Krankheiten) die Zahl der Neuinfektionen pro Jahr auf etwa 300.000 allein in Deutschland.

Eine *C. trachomatis* Serovar D - K Infektion kann bei Frauen zu Erkrankungen des Urogenitaltrakts führen, wie der Entzündungen des Gebärmuttereinganges/-halses (Cervicitis / Endometritis) oder der Eileiter (Salpingitis). Bei fehlender Behandlung können chronische Unterleibsinfektionen auftreten, die durch Vernarbung des Gewebes zu Bauchhöhlen- oder Eileiterschwangerschaften oder gar zur Infertilität führen können. So können etwa zwei Drittel aller tubaren Sterilitäten bei Frauen auf eine *C. trachomatis* Infektion zurückgeführt werden (Bebear und de Barbeyrac 2009). Bei Männern kann eine entzündliche Infektion der Schleimhäute der Harnröhre (Urethritis) auftreten, die in seltenen Fällen eine Entzündung der Nebenhoden oder der Prostata nach sich zieht (Bebear und de Barbeyrac 2009).

Die Serovare werden basierend auf der Ausbreitung der Erreger im Organismus unterteilt. Die Serovare D - K infizieren und verharren im Gewebe des Urogenitaltrakts. Im Gegensatz dazu nutzen die deutlich invasiveren Serovare L1 - L3 (LGV) das Epithelgewebe nur als Eintrittspforte, um in tieferliegende Gewebeschichten vorzudringen. Dort befallen sie die Lymphknoten und rufen Erkrankungen des lymphatischen Systems hervor (Lymphadenopathie)

(Bebear und de Barbeyrac 2009). Das Vorkommen von LGV in Industrieländern ist jedoch gering. Die höchste Prävalenz urogenitaler Infektionen wird durch die nah verwandten Sero-vare E und F verursacht (Morre, Rozendaal *et al.* 2000, Lysen, Osterlund *et al.* 2004, Bebear und de Barbeyrac 2009, Yang, Zheng *et al.* 2010, Harris, Clarke *et al.* 2012).

1.2.2 *Chlamydia pneumoniae*

C. pneumoniae ist einer der verbreiteten Erreger von chronischen und akuten respiratorischen Erkrankungen. Die Ansteckung erfolgt über Tröpfcheninfektion, wobei sowohl die oberen als auch die unteren Atemwege befallen werden können. 70 % aller durch *C. pneumoniae* verursachten Erkrankungen verlaufen asymptomatisch bzw. mit mildem Krankheitsverlauf. Eine Minderheit der Infektionen ruft schwerwiegendere Erkrankungen wie: Entzündungen der Nasennebenhöhlen (Sinusitis), des Rachenraums (Pharyngitis) und der Bronchien (Bronchitis) hervor. Am häufigsten ist mit 6 - 20 %, abhängig von Region und Detektionsmethode, jedoch eine ambulant erworbene Lungenentzündung (Pneumonie) (Kuo, Jackson *et al.* 1995, Hammerschlag 1999, Hahn, Azenabor *et al.* 2002). Durch seroepidemiologische Untersuchungen konnte eine ausgeprägte Durchseuchung aller Altersschichten der Bevölkerung ermittelt werden. Der Grad der Antigenprävalenz liegt bei 50 % bei bis zu 20-Jährigen und steigt mit zunehmendem Alter auf 70 – 80 % (Kuo, Jackson *et al.* 1995).

Darüber hinaus wird eine *C. pneumoniae* Infektion häufig mit systemischen Erkrankungen wie Alzheimer, Apoplexien, Asthma, Multiples Sklerose, reaktiver Arthritis und Arteriosklerose assoziiert. Bislang ist allerdings ungeklärt, ob die Bakterieninfektion den initialen Auslöser dieser Erkrankungen darstellt oder ob eine postinflammatorische Besiedlung des geschädigten Gewebes ausschlaggebend ist (Blasi, Tarsia *et al.* 2009).

1.3 Die besondere Biologie der Chlamydien

Die Chlamydien wurden aufgrund ihrer einzigartigen Biologie in eine eigenständige Ordnung eingeteilt. Zu den Besonderheiten der Chlamydien zählen der einzigartige biphasische Lebenszyklus (s. Kapitel 1.3.1) und der Außenmembrankomplex, welche sie von anderen obligat intrazellulären Bakterien unterscheidet (Storz und Page 1971). Gekennzeichnet ist der chlamydiale Entwicklungszyklus durch zwei morphologisch und funktional unterschiedliche Formen. Das infektiöse aber metabolisch inaktive Elementarkörperchen (EB: *elementary body*) bildet die extrazelluläre Form, während die metabolisch aktiven, jedoch nicht infektiösen Retikularkörperchen (RB: *reticular body*) ausschließlich intrazellulär vorkommen (Higashi 1965). Die ca. 0,3 µm großen EBs sind durch den rigiden Außenmembrankomplex gekennzeichnet (s. Kapi-

tel 1.3.2), der supramolekulare Strukturen aufweist, bei denen es sich um das Typ-3-Sekretionssystem (T3SS) handeln könnte. Während der Differenzierung der EBs zu den RBs wird die Rigidität des Außenmembrankomplexes gelockert, wobei die Partikel eine Größe von etwa 1 μm erlangen und die Anzahl der supramolekularen Strukturen zu nimmt (Matsumoto 1973, Matsumoto 1982, Nichols, Setzer *et al.* 1985, Abdelrahman und Belland 2005). Das chlamydiale Genom ist durch die Anpassung an die intrazelluläre Lebensweise stark reduziert (Collingro, Tischler *et al.* 2011). So weist das *C. trachomatis* Serovar D Genom gerade einmal $1,04 \times 10^6$ bp auf, die 894 ORFs (*open reading frames*) umfassen. Das *C. pneumoniae* Genom ist um etwa 20 % größer und besitzt 214 zusätzliche proteinkodierende Sequenzen, die in *C. trachomatis* nicht existieren (Stephens, Kalman *et al.* 1998, Kalman, Mitchell *et al.* 1999). Das bakterielle Genom liegt im EB durch Bindung bakterieller histonähnlicher Proteine stark kondensiert vor. Bei der Transition zum RB erfolgt die Dekondensation des chlamydialen Chromosoms, wodurch die Fähigkeit zur Genexpression ermöglicht wird (Grieshaber, Fischer *et al.* 2004).

Aufgrund dieser besonderen Begebenheiten ist eine gezielte routinemäßige genetische Manipulation des chlamydialen Genoms zur Funktionsanalyse ausgewählter Gene nicht möglich, obwohl erste Erfolge auf dem Feld der stabilen Transformation von Chlamydien erzielt werden konnten (Wang, Kahane *et al.* 2011).

1.3.1 Der Entwicklungszyklus

Alle chlamydialen Spezies durchlaufen einen grundlegend gleichen Entwicklungszyklus, wobei die benötigte Zeit bis zur Vollendung des Zyklus variiert. So benötigen beispielsweise die okularen Serovare von *C. trachomatis* 48 - 60 h bis zur Freisetzung infektiöser EBs, während die genitalen Serovare lediglich 30 - 48 h benötigen (Miyairi, Mahdi *et al.* 2006). Bei *C. pneumoniae* hingegen erfolgt die Freisetzung der EBs durch Zellyse erst nach 84 h (Wolf, Fischer *et al.* 2000). Die im Folgenden aufgeführten Zeitspannen sind charakteristisch für die genitalen Serovare von *C. trachomatis* (Miyairi, Mahdi *et al.* 2006).

Der chlamydiale Entwicklungszyklus beginnt mit der Adhäsion des infektiösen, metabolisch inaktiven EBs an die Wirtszelle, wobei ein zweiphasiger Interaktionsprozess postuliert wird (Abbildung 1.2). Die erste reversible Bindung beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen, die die räumliche Nähe erzeugt, die Adhäsion und humaner Rezeptor benötigen, um im zweiten irreversiblen Schritt miteinander zu interagieren und die Aufnahme des Bakteriums einzuleiten (s. Kapitel 1.5.4) (Campbell und Kuo 2006, Moelleken und Hegemann 2012). Nach 0 - 2 h erfolgt die Internalisierung des EBs durch Endozytose. Im Folgenden liegen die EBs im membranumschlossenen Einschlusskörper (Inklusion) im Zytoplasma vor, welcher während

des gesamten Replikationszyklus nicht verlassen wird. 2 - 8 h nach der Infektion (*pi: post infection*) beginnt die Differenzierung des EBs zu den metabolisch aktiven, nicht infektiösen RBs. Dabei wird die rigide Außenmembran durch Reduktion der Disulfidbrücken zwischen den cysteinreichen Proteinen Momp, OmcA und OmcB aufgelockert und die DNA dekondensiert, wodurch die Genexpression ermöglicht wird. Frühe Gene kodieren für Proteine, die u.a. an der Versorgung des Einschusses mit Nährstoffen und an der Modifikation der Einschlussmembran (Inc-Proteine) beteiligt sind und so zur Etablierung der Infektion beitragen. (Abdelrahman und Belland 2005). In diesem Etablierungsprozess erfolgt die Dynein-abhängige Migration der Inklusion entlang der Mikrotubuli in Zellkernnähe (Clausen, Christiansen *et al.* 1997, Grieshaber, Grieshaber *et al.* 2003).

In der replikativen Phase 11 - 20 hpi vermehren sich die RBs durch binäre Teilung. Für die effiziente Vermehrung und zur Expansion der Inklusionsmembran benötigen die Chlamydien Nährstoffe wie Aminosäuren, Eisenionen, Nukleotide, ATP und Lipide, die aus der Wirtszelle akquiriert werden (Saka und Valdivia 2010). Um die Versorgung mit Lipiden zu gewährleisten, induzieren Chlamydien die Fragmentierung des Golgi-Apparats und die Bildung von Golgi-Ministapeln, die die Inklusion umgeben (Heuer, Rejman Lipinski *et al.* 2009). Dieser Vorgang erleichtert die Rekrutierung von exozytotischen Vesikeln, die Sphingolipide und Cholesterin enthalten (Hackstadt, Rockey *et al.* 1996, Carabeo, Mead *et al.* 2003). Die Lipide werden durch die Fusion der Vesikel mit der Inklusionsmembran aufgenommen und können in die Einschlussmembran und die Zellwand der Bakterien eingebaut werden (Robertson, Gu *et al.* 2009). Des Weiteren wurde die Rekrutierung von MVBs (*multivesikular bodies*) und Lipidtröpfchen (LDs: *lipid droplets*) an bzw. in die Inklusion beschrieben, die einen alternativen Weg der Nährstoff- und Lipidversorgung darstellen. MVBs sind endozytotische Organellen, die an der Degradation bzw. am Recycling von Lipiden und Proteinen beteiligt sind, während LDs eukaryotische Organellen zur Lipidlagerung bilden. Eine Beteiligung der Inc-Proteine und weiterer in der Inklusionsmembran integrierter Proteine bei der Vesikelrekrutierung wird vermutet, wobei sie durch die Interaktion zu Rab GTPasen und SNARE Proteinen die Rekrutierung vermitteln (Saka und Valdivia 2010).

Um die Etablierung der replikativen Nische zu gewährleisten, manipulieren Chlamydien durch die Sekretion von Effektorproteinen zelluläre Prozesse, die inhibierend auf die Immunantwort und apoptotische Signalwege der Wirtszelle wirken. So wird beispielsweise die Aktivierung von NF κ B durch das chlamydiale Protein ChlADub1 unterbunden und damit verbunden die Aktivierung der Expression einer Reihe von Genen für die angeborene Immunantwort (Bastidas, Elwell *et al.* 2013).

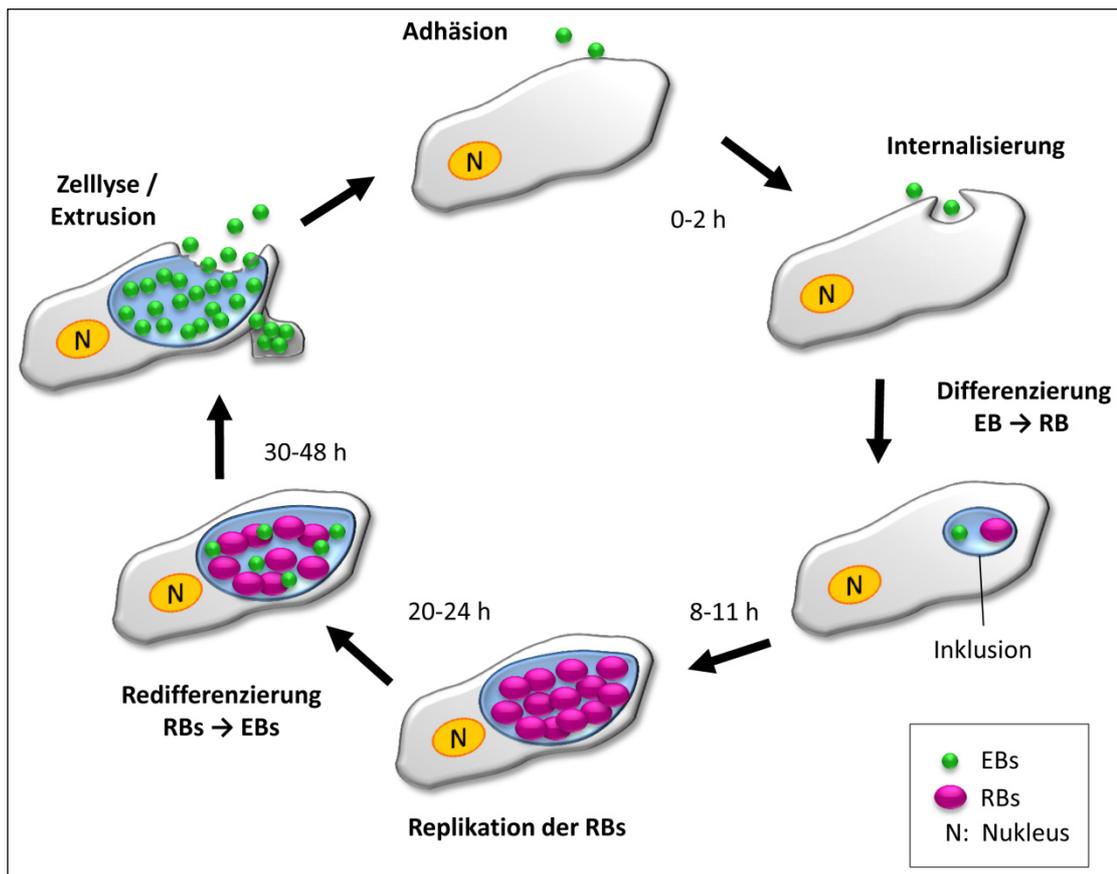


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des chlamydialen Entwicklungszyklus.

Die Zeitangaben beziehen sich auf die genitalen *C. trachomatis* Serovare nach (Miyairi, Mahdi *et al.* 2006).

Nach 20 - 24 h beginnt die asynchrone Redifferenzierung der RBs zu infektiösen EBs. Welches Signal diesen Prozess einleitet ist ungeklärt. Spekuliert wird über eine Signalwirkung induziert durch Nährstoffmangel, Bildung von Histon-Proteinen und dem Lösen der Sekretionsnadeln des T3SS von der Inklusionsmembran als Auslöser (Wyrick 2000, Wilson, Whittum-Hudson *et al.* 2009).

Unter Nährstoffmangel oder Antibiotika-Einfluss verändern RBs ihre Morphologie, nehmen an Größe zu und verlieren die Fähigkeit zur Teilung und Redifferenzierung. Diese persistente Form wird als AB (*aberrant body*) bezeichnet und stellt eine Art Überdauerungsform dar, welche komplett reversibel ist und mit chronischen Infektionen assoziiert wird (Hogan, Mathews *et al.* 2004). Die Redifferenzierung ist gekennzeichnet durch die Expression später Gene (20 - 48 hpi), zu denen die DNA kondensierenden bakteriellen Histone *bctAB* und Komponenten des äußeren Membrankomplexes wie *omcAB* zählen (Belland, Zhong *et al.* 2003). Für das CT694 Protein, ein Genprodukte dieser Phase, konnte die Einlagerung in den EB und eine Funktion in der frühen Phase des nächsten Infektionszyklus ermittelt werden (Hower, Wolf *et al.* 2009).

Final erfolgt die Freisetzung der EBs durch Protease-vermittelte Zellyse oder Extrusion. Bei der Extrusion erfolgt die Abschnürung eines Teils der Inklusion unter Beteiligung von Aktin und Myosin, ohne die Integrität der Zelle zu beeinflussen (Hybiske und Stephens 2007).

1.3.2 Der chlamydiale Außenmembrankomplex (cOMC)

Das herausstechende Charakteristikum der Chlamydien ist neben dem biphasischen Lebenszyklus die besondere Beschaffenheit des Außenmembrankomplexes (cOMC: *chlamydia outer membran complex*). Der grundlegende Aufbau des cOMCs gliedert sich in innere und äußere Membran, die durch den periplasmatischen Raum getrennt werden, wie es dem Aufbau gramnegativer Bakterien entspricht. Hierbei ist die äußere Membran mit genusspezifischen Lipopolysacchariden (LPS) besetzt. Ungewöhnlich für gramnegative Bakterien ist jedoch bei Chlamydien das Fehlen einer nachweisbaren Mureinschicht (Barbour, Amano *et al.* 1982, Hatch 1996). Paradoxerweise besitzen Chlamydien Gene für die Peptidoglykansynthese und reagieren mit aberrantem Wachstum auf die Behandlung mit Penicillin, welches als „chlamydiale Anomalie“ bezeichnet wird (McCoy und Maurelli 2006). Außerdem konnte die Bildung von mRNAs der Peptidoglykansynthesegene während der replikativen Phase der Chlamydien beobachtet und *in vitro* eine Funktion für einige dieser Gene bestätigt werden (Nicholson, Olinger *et al.* 2003, McCoy und Maurelli 2006, Henrichfreise, Schiefer *et al.* 2009). Jüngst konnte mit Hilfe einer neuen Markierungstechnik, mikroskopisch das Vorhandensein von Peptidoglykan in RBs bestätigt werden (Liechti, Kuru *et al.* 2014). Allerdings wird für Komponenten des Peptidoglykansyntheseweges eher eine Funktion bei der Zellteilung und in der Modulation der Immunantwort diskutiert als eine Struktur und Stabilität gebende Funktion (McCoy und Maurelli 2006, Gaballah, Kloekner *et al.* 2011, Jacquier, Frandi *et al.* 2014, Klockner, Otten *et al.* 2014). Die Stabilität des cOMCs wird durch die starke Quervernetzung ihrer cysteinreichen Hauptkomponenten Momp (*major outer membrane protein*, 60 %), OmcA (*outer membrane complex protein A*) und OmcB (*outer membrane complex protein B*) über Disulfidbrücken gewährleistet (Hatch 1996).

Neben den Hauptkomponenten des cOMCs konnten weitere Proteine auf der EB-Oberfläche identifiziert werden, wobei eine kovalente Assoziation nicht unbedingt notwendig ist. So konnten Mitglieder der heterogenen Pmp Familie (*polymorphic membrane proteins*) (Mygind, Christiansen *et al.* 2000, Tanzer und Hatch 2001), das Porinprotein PorB (Kubo und Stephens 2000), Komponenten des T3SS (Liu, Afrane *et al.* 2010) oder eigentlich zytoplasmatische Proteine wie GroEL1 (Wuppermann, Molleken *et al.* 2008) detektiert werden. Für einige dieser Komponenten konnte bereits eine Funktion in der Adhäsion und der Internalisierung der Chlamydien nachgewiesen werden (s. Kapitel 1.5.4).

1.4 Endozytose

Durch die Prozesse der Endo- und Exozytose stehen eukaryotische Zellen mit ihrer Umgebung in Kontakt. Sie reagieren auf Änderungen in ihrer Umwelt oder auf intrazelluläre Signale. Durch Endozytose werden extrazelluläre Substanzen, wie Nährstoffe, Ionen oder Oberflächenmoleküle der Plasmamembran, wie Rezeptoren, in die Zelle aufgenommen. Wohingegen durch Exozytose Lipide und Proteine zur Plasmamembran transportiert und Schadstoffe abgegeben werden können. Das Zusammenspiel beider Prozesse kontrolliert die Zusammensetzung der Plasmamembran und erhält die Zellhomöostase. Endozytose kann über zwei grundlegende Prozesse erfolgen: der Clathrin-vermittelten Endozytose (CME: *clathrin mediated endocytosis*) und der Clathrin-unabhängigen Endozytose (CIE: *clathrin independent endocytosis*) (Abbildung 1.3).

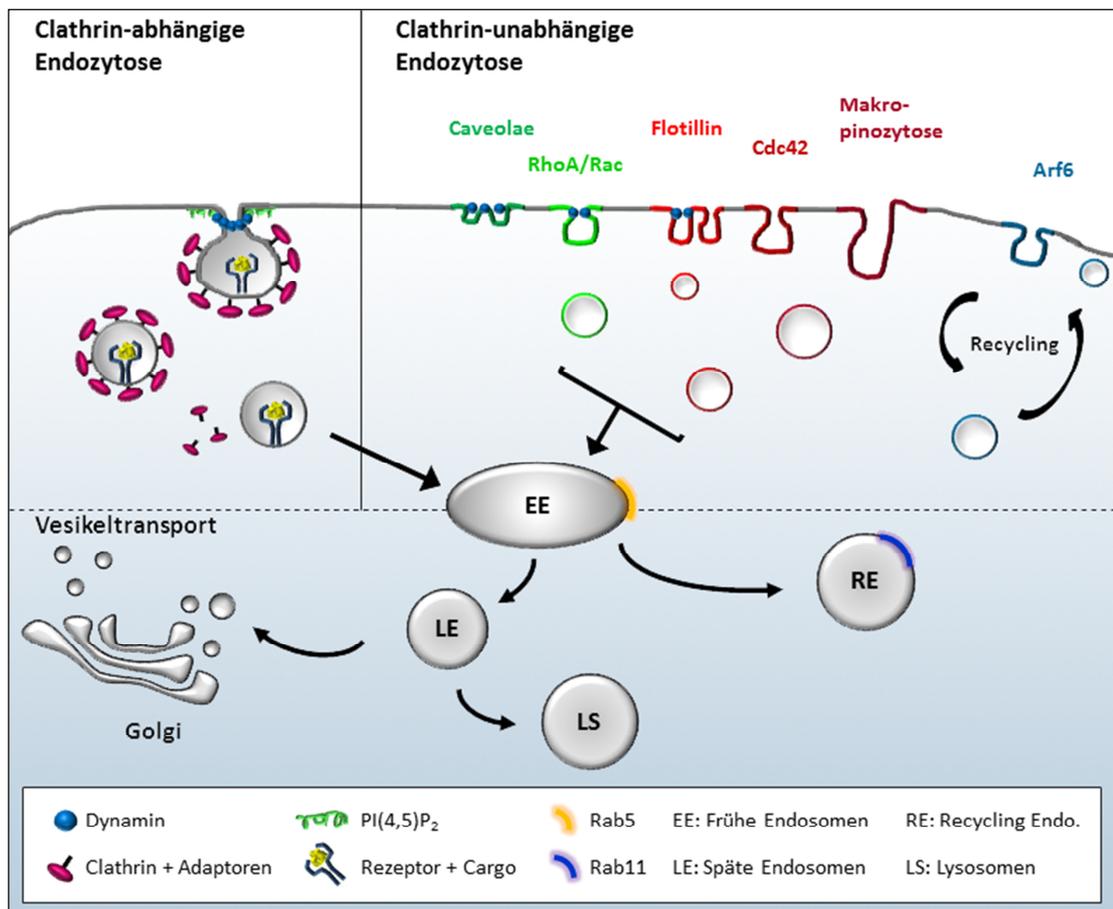


Abbildung 1.3: Zusammenfassung der Endozytosemechanismen der eukaryotischen Zelle mit anschließendem intrazellulären Vesikeltransport.

Nach der Aufnahme der Moleküle werden diese ihrem Bestimmungsort zugeführt. Dabei erfolgt der Transport zum Zielorganell durch Reifung vom frühen Endosom (EE) zum späten Endosom und weiter über das trans-Golgi Netzwerk. Alternativ kann die Degradation im Lysosomen oder das Recyceln von Rezeptoren erfolgen (Abbildung 1.3). Rezeptoren können

direkt nach der Bildung des EEs durch den Rücktransport zur Plasmamembran in Recycling Endosomen (RE) der Degradation entgehen. Koordiniert wird der gesamte zelluläre Vesikeltransport durch die Familie der Rab GTPasen. So sind beispielsweise EEs angereichert mit Rab5, während REs durch Rab11 und Rab35 gekennzeichnet werden (Stenmark 2009). Die Bestimmung des Zielorts eines internalisierten Cargos ist abhängig von der Art der Aufnahme. So kodieren bei CME oftmals kurze Aminosäuresequenzen im zytoplasmatischen Teil des Transmembranproteins bereits den späteren Zielort des Liganden. Im Gegensatz dazu konnten entsprechende Signale bei der CIE noch nicht eindeutig identifiziert werden (Maldonado-Baez, Williamson *et al.* 2013).

1.4.1 Clathrin-abhängige Endozytose

Die Clathrin-abhängige Endozytose (CME) oder auch rezeptorvermittelte Endozytose genannt, ist gekennzeichnet durch die Bildung eines Clathrin ummantelten Vesikels (CCV: *clathrin-coated vesicles*), welcher der Internalisierung von Nährstoffen, Antigenen, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren dient, aber auch von Pathogenen genutzt wird (Le Roy und Wrana 2005). Der generelle Mechanismus der CME ist aufgeklärt, aber es werden immer neue akzessorische Proteine und Adapterproteine identifiziert (Doherty und McMahon 2009).

Eingeleitet wird die Internalisierung durch die Deformation der Membran durch die Bindung von Adapterproteinen an Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PI(4,5)P₂) und/oder an den zytoplasmatischen Teil des Rezeptors. Zu den PI(4,5)P₂-bindenden Adaptoren zählen Proteine mit EHTH- (*espin-N-terminal homology*), ANTH- (*AP180 N-terminal homology*) oder BAR-Domänen (Legendre-Guillemain, Wasiak *et al.* 2004, Blood und Voth 2006). Simultan erfolgt die Rekrutierung von trimeren Clathrin-Molekülen und akzessorischen Proteinen aus dem Zytoplasma, die die Krümmung der Membran stabilisieren und eine Clathrin-ummantelte Vertiefung (*clathrin-coated pit*) formen. Nach der erfolgreichen Assemblierung erfolgt die Abschnürung des CCVs von der Membran durch Dynamin-vermittelte GTP-Hydrolyse. Hierbei wird Dynamin durch SNX9 (*sorting nexin 9*) zum „Nacken“ des Vesikels, der Abschnürstelle, rekrutiert und legt sich wie eine Manschette um selbigen (Soulet, Yarar *et al.* 2005, McMahon und Boucrot 2011). Final wird der Clathrin-Käfig des CCVs durch das Mitwirken von Hsc70, Auxilin und durch Dephosphorylierung der Adapterproteine entfernt und die aufgenommenen Substanzen werden dem intrazellulären Vesikeltransport zugeführt (McMahon und Boucrot 2011, Popova, Deyev *et al.* 2013).

Eine zentrale Funktion in der Assemblierung des Clathrin-Gerüsts spielt das Adapterprotein-2 (AP-2), das sowohl die direkte Bindung zu Clathrin, als auch über Lipidbindestellen zum PI(4,5)P₂ und zu den cargospezifischen akzessorischen Adapterproteinen vermittelt. AP-2 ist

ein Proteinkomplex, der von verschiedenen Rezeptoren, wie u.a. dem Transferrin-Rezeptor (TfR) oder G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, in der CME genutzt wird. Hier bindet AP-2 Dileucin- oder Tyrosin-basierte Motive im zytoplasmatischen Teil des aktivierten Rezeptors (Sorkin 2004, Le Roy und Wrana 2005, Popova, Deyev *et al.* 2013). Im Gegensatz dazu nutzt die EGFR-vermittelte CME das Adapterprotein Epsin und die damit verbundenen Proteine EPS15 (*EGFR-pathway substate-15*) und EPS15R (*EPS15-related protein*) (Le Roy und Wrana 2005). Die unterschiedliche Nutzung von gleichen und individuellen Adaptoren bzw. akzessorischen Proteinen führt zur kontrollierten Internalisierung, und damit verbunden möglicherweise zur Bildung unterschiedlicher Subtypen von CCVs (McMahon und Boucrot 2011). Zum Teil wird bereits bei der Bildung des Vesikels durch bestimmte Motive im zytoplasmatischen Teil des Rezeptors oder durch Phosphorylierung bzw. Ubiquitinierung der intrazelluläre Weg des Vesikels vorgezeichnet (Sorkin 2004, Le Roy und Wrana 2005).

Die Rekrutierung von Aktin zum sich schließenden Vesikel ist nicht essentiell. Die Abschnürung von großen Vesikeln kann aber durch die Aktin-abhängige Aufbringung größerer Zugkräfte unterstützt werden. Die Aktinrekrutierung erfolgt dabei unter Beteiligung des Arp2/3-Komplexes, Cortactin und N-WASP (McMahon und Boucrot 2011).

1.4.2 Clathrin-unabhängige Endozytose

Die Clathrin-unabhängige Endozytose (CIE) wurde durch Experimente zur CME entdeckt, da die Depletion von Schlüsselkomponenten nicht zum Erlöschen der Endozytose führte. Die CIE ist im Gegensatz zur CME nur ansatzweise verstanden und die ablaufenden Mechanismen meist ungeklärt. Die CIE trägt wie die CME zur Signalregulation (Internalisierung von Rezeptoren), zum Zellwachstum (Nährstoffe- und Ionenaufnahme), aber auch zum Erhalt der Zellpolarität und Beweglichkeit bei, durch das stetige rezyklieren von Rezeptoren und Proteinen mit Zelladhäsionsfunktion (Syndecane und E-Cadherine) (Maldonado-Baez, Williamson *et al.* 2013). Die beteiligten Rezeptoren können zum Teil beide Endozytosewege nutzen. Die CIE vermittelt eher die kontinuierliche Internalisierung, während CME durch gezielte Aktivierung erfolgt (Maldonado-Baez, Williamson *et al.* 2013). Allerdings wird beispielsweise der EGFR bei geringer EGF Konzentration über die CME internalisiert, während bei hoher EGF Konzentration die CIE aktiviert wird (Sigismund, Argenzio *et al.* 2008).

Die CIE unterscheidet mehrere Aufnahmemechanismen, die durch das Erfordernis verschiedenen Komponenten, wie Cholesterin (Lipid Rafts), Dynamin oder GTPasen gekennzeichnet sind (Abbildung 1.3). Lipid Rafts (LR) sind hochdynamische Mikrodomänen in der Plasmamembran, die einen hohen Cholesterin- und Spingolipidanteil besitzen. In LRs lokalisieren eine Reihe von Rezeptoren und Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Proteinen

(GPI-Protein), wodurch sie eine Plattform der Signaltransduktion darstellen (Simons und Toomre 2000).

Caveolae-Domänen in der Plasmamembran wurden als erster CIE-Prozess beschrieben (Kirkham und Parton 2005). Caveolin-1 bildet durch die Bindung an Cholesterol das Gerüst dieser Domänen und wird von Cavin auf der zytoplasmatischen Seite stabilisiert. Erste Annahmen, dass Caveolae von der Oberfläche endozytiert werden, konnten aufgrund ihrer starren Struktur widerlegt werden. Daher wird aktuell nur die Endocytose von Caveolin-1 präferiert, wobei vielleicht eine Art Kanal in flachen Endothelzellen erzeugt wird, der zum transendothelialen Transport beiträgt (Howes, Mayor *et al.* 2010, Sandvig, Pust *et al.* 2011). Distinkt von Caveolin, aber ebenfalls mit Lipid Rafts verknüpft, besitzen Flotillin-1 und -2 eine Funktion in der CIE. Flotilline vermitteln die Internalisierung ohne Beteiligung der GTPasen Rac oder Cdc42, werden hauptsächlich über die Tyrosinkinase Fyn reguliert und können sowohl Dynamin-abhängig als auch -unabhängig wirken. Die Internalisierung von Proteoglykanen erfordert beide Flotilline und erfolgt Dynamin-abhängig, während die Aufnahme von GPI-Proteinen oder dem Cholera Toxin B durch Flotillin-1 Dynamin-unabhängig verläuft (Sandvig, Pust *et al.* 2011). Neben diesen beiden Mechanismen sind RhoA/Rac-, Cdc42- und Arf6-vermittelte Endozytosen, sowie die Makropinozytose, weitere Vertreter der CIE (Abbildung 1.3). Hierbei werden einige beteiligte Komponenten in mehreren Signalwegen genutzt und wirken zum Teil inhibierend (Sandvig, Pust *et al.* 2011).

Die über die kleine GTPasen RhoA und Rac-vermittelte Endozytose verläuft ebenfalls Cholesterol- und Dynamin-abhängig. Über diesen Weg wird beispielsweise unter der Beteiligung der Kinasen PAK1 und PAK2 der Interleucin-2 Rezeptor (IL2R) internalisiert (Grassart, Dujancourt *et al.* 2008). Die Cdc42-vermittelte Internalisierung von GPI-Proteinen erfolgt Cholesterol-abhängig unter der Beteiligung von Arf1, welches über weitere Proteine die Aktinpolymerisation kontrolliert. Die internalisierten Proteine werden dem GEEC (*GPI-anchored early endosomes compartment*) zugeführt (Howes, Mayor *et al.* 2010, Maldonado-Baez, Williamson *et al.* 2013). Der Arf6-assoziierte Mechanismus stellt eher einen Recyclingprozess als eine klassische Endozytose dar. Arf6 leitet das Recycling von u.a. MHCII und Integrinen ein (Maldonado-Baez, Williamson *et al.* 2013), wobei Arf6 wie Arf1 die Aktinpolymerisation kontrolliert und daher überwiegend Dynamin-unabhängig agiert (Howes, Mayor *et al.* 2010). Bei der Makropinozytose werden größere Vesikel zum Teil unter der Bildung von Membrankräuselungen (*membrane ruffling*) aufgenommen. An diesem Mechanismus sind eine Reihe der bereits beschriebenen GTPasen und Kinasen beteiligt, wie Rac1, Pak1, Cdc42, Arf6 und SNX9. Die Abschnürung erfolgt auch hier meist Dynamin-unabhängig (Sandvig, Pust *et al.* 2011).

Nach der erfolgreichen Internalisierung werden die aufgenommenen Substanzen dem Vesikeltransportsystem zugeführt und können mit frühen Endosomen verschmelzen (Howes, Mayor *et al.* 2010).

1.5 Adhäsion und Internalisierung von Pathogenen

Viele Pathogene adhären an Humanzellen verschiedener Gewebetypen, wobei eine Reihe von Oberflächenmolekülen genutzt werden um den Kontakt zur Zelle zu gewährleisten und nicht aus dem Gewebe entfernt zu werden. Invasive Pathogene induzieren nach der Adhäsion ihre Internalisierung in die Wirtszelle. Einige Pathogene, wie z.B. *Mycobacterium* spp. oder *Legionella* spp., nutzen dafür den Weg der natürlichen Aufnahme durch phagozytotische Zellen, wie Makrophagen, und haben Strategien entwickelt um sich in diesen Zellen zu vermehren. Alternativ induzieren Pathogene aktiv ihre Aufnahme in nicht phagozytotische Zellen. Dabei werden verschiedene Strategien verfolgt, die entweder nach dem Trigger- oder Zipper-Mechanismus erfolgen (Alonso und Garcia-del Portillo 2004, Cossart und Sansonetti 2004). Beim Zipper-Mechanismus bindet ein bakterielles Adhäsion direkt oder über ein Brückenmolekül an einen humanen Rezeptor, was die Signaltransition auslöst, die zur lokalen Aktinpolymerisation führt und die Aufnahme des Bakteriums vermittelt (s. Kapitel 1.5.1). Im Gegensatz dazu werden beim Trigger-Mechanismus Effektorproteine in die Wirtszelle sekretiert, die regulatorisch auf Schlüsselproteine der Zelle wirken. Dies erzeugt eine Änderung der Signalgebung, die zur massiven Aktinpolymerisation und Membranausstülpung führt, welche die Internalisierung des Bakteriums zur Folge hat (s. Kapitel 1.5.2).

Nach der Aufnahme in die Zelle liegen die Bakterien in einem membranumschlossenen Phagosomen vor. Dieser kann durch Lyse der Membran verlassen werden, um die Replikation im nährstoffreichen Zytosol durchzuführen. Diese Strategie wird u.a. von *Listeria*, *Shigella* und *Rickettsia* verfolgt. Andere Pathogene verbleiben im phagosomalen Einschluss vermitteln jedoch die Abkehr vom endozytotischen Weg um der Degradation im Lysosomen zu entgehen und eine replikative Nische zu etablieren (Alonso und Garcia-del Portillo 2004, Cossart und Sansonetti 2004).

1.5.1 Zipper-Mechanismus

Zu den am besten untersuchten bakteriellen Pathogenen, die den Zipper-Mechanismus verwenden um in Humanzellen zu internalisieren, zählen *Yersinia pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* und *Listeria monocytogenes*, die im Folgenden genauer vorgestellt werden (Pizarro-Cerda und Cossart 2006).

Das Oberflächenprotein Invasin der Yersinien bindet die $\beta 1$ -Untereinheit des Integrin Rezeptors und vermittelt die effiziente Internalisierung des Bakteriums (Isberg, Voorhis *et al.* 1987, Isberg und Leong 1990). Die Integrin-Bindedomäne lokalisiert C-terminal im Invasin Protein und ähnelt strukturell der Bindedomäne des natürlichen Integrin-Liganden Fibronectin. Die Bindedomäne des Invasin Proteins ist optimiert und vermittelt im Vergleich zu Fibronectin eine deutlich höhere Affinität zum Rezeptor (Leong, Fournier *et al.* 1990, Hamburger, Brown *et al.* 1999). Die Bindung von Invasin an den Rezeptor leitet die Signaltransduktion in die Wirtszelle ein. Da Integrine nur über einen kurzen, zytoplasmatischen Teil verfügen, der keine enzymatische Aktivität besitzt, erfolgt die Signalgebung über assoziierte Kinasen, wie FAK (*focal adhesion kinase*) oder Mitglieder der Src-Kinase Familie (Alrutz und Isberg 1998, Bruce-Stackal, Weidow *et al.* 2002), die anschließend zur Aktivierung der kleinen GTPasen Rac1 und Arf6 führt. Hierbei vermittelt die Rac1-abhängige Aktivierung des Arp2/3-Komplexes die Aktinpolymerisierung. Dieser Prozess wird durch die Arf6-abhängige Rekrutierung und Aktivierung der Phosphoinositol-4-Phosphat-5-Kinase (PIP₅ Kinase) unterstützt, welche die Bildung von PI(4,5)P₂ an der bakteriellen Bindestelle katalysiert und die Aufnahme des Bakteriums einleitet (Alrutz, Srivastava *et al.* 2001, Wong und Isberg 2003).

Dieser Adhäsions- und Internalisierungsprozess wird nur für die initiale Etablierung der Infektion und die damit verbundene Translokation der Bakterien durch die Epithelschicht in den extrazellulären Spalt benötigt, wo sie anschließend proliferieren. Dort adhären die Bakterien hauptsächlich über ein zweites Adhäsin, YopA, an die Wirtszelle, indem YopA durch die Bildung von Fibronectin und Collagen den Kontakt zum Integrin-Rezeptor erzeugt. In diesem Infektionsstadium sekretieren die Bakterien Proteine in die Wirtszelle, um ihre Aufnahme aktiv zu unterdrücken (Scibelli, Roperto *et al.* 2007).

L. monocytogenes exprimiert die beiden Adhäsine InlA und InlB (Internalin). InlA bindet an E-Cadherin und leitet so die Rekrutierung von β -Catenin ein, welches anschließend α -Catenin rekrutiert (Lecuit, Hurme *et al.* 2000). Gleichzeitig bindet InlB den Met-Tyrosinkinase-Rezeptor (*hepanocyte growth receptor*), was zur Aktivierung der Adapterproteine Gab1, Cbl und Shc und zur Rekrutierung der PI3K zur Plasmamembran führt (Ireton, Payrastra *et al.* 1996, Shen, Naujokas *et al.* 2000). Beide Signalwege leiten die Reorganisation des Aktinzytoskeletts ein, welches die Aufnahme des Bakteriums zur Folge hat. Dabei verläuft der InlA-vermittelte Signalweg über Rac1, Cortactin und Arp2/3, während im InlB-induzierten Signalweg die Polymerisierung über PI3K, Rac1, WAVE und Arp2/3 erfolgt (Pizarro-Cerda und Cossart 2006).

1.5.2 Trigger-Mechanismus

Beim Trigger-Mechanismus werden Effektorproteine des Bakteriums mittels eines Typ-3-Sekretionssystems (T3SS) in die Wirtszelle sekretiert. Die zu Beginn sekretierten Proteine bilden dabei die Translokationspore, die in der Plasmamembran der Wirtszelle verankert wird (Alonso und Garcia-del Portillo 2004). Bekannte Beispiele für effektorvermittelte Aufnahme von Pathogenen stellen Vertreter der Spezies *Salmonella* und *Shigella* dar (Alonso und Garcia-del Portillo 2004, Pizarro-Cerda und Cossart 2006). *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium und *Shigella flexneri* erhielten durch horizontalen Gentransfer ähnliche Gene, die ihnen die Invasion von Humanzellen ermöglichen (Parsot 2005).

Die Proteine SipB und SipC bilden bei *S. enterica* die Translokationspore und vermitteln die Sekretion der Effektorproteine, die z.T. Funktionen von wirtseigenen Proteinen perfekt nachahmen. SopB besitzt eine Phosphoinositol-Phosphatase Aktivität, welche die Dephosphorylierung von PI(4,5)P₂ an der Membran katalysiert. Dadurch wird der Kontakt zwischen Membran und kortikalem Aktinzytoskelett aufgehoben. Zusätzlich wirken SopE und SopE2 wie humane GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) und vermitteln die Aktivierung von kleinen GTPasen, wie Cdc42 und Rac1, welches die Extrusion der Membran einleitet. Stabilisiert wird dieser Prozess durch SipC-vermittelte massive Aktinpolymerisation und Bündelung (Hardt, Chen *et al.* 1998, Hayward und Koronakis 1999, Terebiznik, Vieira *et al.* 2002). Nach der Aufnahme der Bakterien erfolgt die Sekretion von Effektoren, die eine schnelle Depolymerisation der Aktinfilamente einleiten und die GTPasen deaktivieren (Pizarro-Cerda und Cossart 2006). Die Aufnahme von *S. flexneri* erfolgt nach einem ähnlichen Prinzip, wobei jedoch auch Unterschiede bestehen. Bei *S. flexneri* ist die Translokationspore aus den Proteinen IpaB und IpaC aufgebaut. Sie wird jedoch erst nach einem Kontakt zu den Rezeptoren Integrin-β1 und CD44 (Hyaluronrezeptor) in die Wirtsmembran inseriert. Dies führt potentiell zur Rekrutierung weiterer Signalmoleküle an die Bindestelle. Wie bei *S. enterica* wird die Aktinnukleation von IpaC vermittelt und durch VirA-aktiviertes Rac1 indirekt über WAVE2 unterstützt. Außerdem wird neben Rac1 die Aktivität weiterer kleiner GTPasen, wie Rho und Cdc42, für die effiziente Aufnahme benötigt. IpaD trägt wie SopB zur Dephosphorylierung des lokalen PI(4,5)P₂ Levels um die bakterielle Bindestelle bei und erleichtert so die Bildung von Membranextrusionen, die zur Internalisierung des Bakteriums führen. Anschließend werden ebenfalls Effektoren sekretiert um die Aufnahme zu terminieren (zusammengefasst aus (Alonso und Garcia-del Portillo 2004, Pizarro-Cerda und Cossart 2006).

1.5.3 Integrine und ihre Bedeutung für Pathogene

Integrine sind hochkonservierte Transmembranrezeptoren, die in allen Gewebetypen mit der Ausnahme von Erythrozyten exprimiert werden. Sie vermitteln Verbindungen zwischen Zellen und Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM), sowie spezifische Zell-Zell Kontakte, und tragen so zur Integrität des Gewebes bei. Integrine sind glykosylierte, heterodimere Rezeptoren, die aus einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut sind. Bis heute sind 24 Mitglieder der Integrin-Familie beschrieben, die sich aus 18 α - und 8 β -Untereinheiten zusammensetzen. Die Diversität der Integrine kann durch alternatives Spleißen und posttranslationale Modifikation (Glykosylierung) weiter gesteigert werden. Die Zusammensetzung aus α - und β -Untereinheit bestimmt die Ligandenspezifität, wobei einige ECM Komponenten durch mehrere Integrine gebunden werden. Zu den ECM Komponenten zählen Laminin, Kollagen, Fibronectin und Vitronectin, wobei die Bindung der beiden letzteren über ein RGD-Motiv (Arg-Gly-Asp) erfolgt. Die Ligandenbindedomäne wird aus beiden Untereinheiten gebildet und lokalisiert in der extrazellulären Kopfdomäne des Integrin-Rezeptors, dessen Ligandenaffinität abhängig von der Konformation des Rezeptors ist. Eine gebogene Konformation vermittelt eine geringe Affinität, wohingegen die offene, gestreckte Konformation eine hohe Affinität vermittelt. Der Konformationswechsel kann sowohl durch extra- als auch intrazelluläre Signale gesteuert werden.

Integrine können bidirektional Signale empfangen und weiterleiten. Der zytoplasmatische Teil beider Untereinheiten ist kurz und verfügt über keine direkte enzymatische Aktivität. Daher müssen Integrine Adapterproteine rekrutieren um eine Signaltransduktion zu ermöglichen. Zu diesen Signalmolekülen zählen (i) zytoskelettassoziierte Proteine (α -Actinin, Talin, Filamin), die direkt den C-Terminus des Rezeptors binden, und (ii) Kinasen (ILK (*integrin-linked kinase*), FAK) für die Aktivierung von akzessorischen Proteinen. Die Bindung eines Liganden führt zur Aktivierung und Gruppierung weiterer Integrin-Rezeptoren (Erhöhung der Affinität), sowie zur Einleitung der Signaltransduktion. Adapterproteine wie FAK, Vinculin, Talin und α -Actinin werden rekrutiert, Src Kinasen phosphoryliert und dadurch kleine Rho GTPasen aktiviert. Final erfolgt die lokale Aktinpolymerisation, welches die Integrine mit dem Zytoskelett verknüpft. Diese adhäsiven Strukturen werden fokale Adhäsine genannt. Durch die ECM-Zytoskelett Verknüpfung können Scherkräfte vom Gewebe abgeleitet werden. Neben der Organisation des Zytoskeletts spielen Integrine eine wichtige Rolle in Signalwegen, die regulatorisch auf die Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Zellmigration wirken. Eine Reihe dieser Prozesse wird durch die Interaktion mit anderen Rezeptoren (z.B. EGFR, PDGFR β , FGFR, Interleukin-Rezeptor) reguliert. Durch einige der bereits oben aufgeführten, aktivier-

ten, akzessorischen Proteine können Integrine die Aktivierung des JNK und ERK Signalwegs einleiten (zusammengefasst aus (van der Flier und Sonnenberg 2001, Streuli und Akhtar 2009). Integrine werden von einer Vielzahl von Pathogenen als Rezeptor für die Kolonialisierung des Gewebes oder als Eintrittspforte in die Humanzelle genutzt. Unter diesen Pathogenen sind sowohl Bakterien, wie beispielsweise *Yersinia* (siehe Kapitel 1.5.1), *Helicobacter pylori* oder *Staphylococcus aureus*, als auch Viren, wie das Adenovirus, HIV oder das Papillomavirus (van der Flier und Sonnenberg 2001, Scibelli, Roperto *et al.* 2007, Hauck, Borisova *et al.* 2012). Die Bindung an den Integrin Rezeptor kann dabei (i) direkt durch einen Virulenzfaktor (CagA *H. pylori*), (ii) indirekt über eine ECM Komponente, wie Fibronectin, erfolgen (FnBP *S. aureus*) oder (iii) beide Wege kombinieren (Invasin, YopA *Yersinia*). Die Bindung erfolgt hierbei meistens über die $\beta 1$ -Untereinheit des Rezeptors (Hauck, Borisova *et al.* 2012).

H. pylori nutzt Integrin als Ankerprotein zur erfolgreichen Insertion des Typ-4-Sekretionsystems (T4SS) in die Plasmamembran, um das Magenschleimhautepithel zu besiedeln. Erst nach erfolgreicher Bindung des $\alpha 5 \beta 1$ Integrin-Rezeptors durch CagA erfolgt seine Sekretion in die Wirtszelle. Eine Beteiligung von CagL in diesem initialen Prozess wurde infrage gestellt, da eine Deletion des Gens bzw. des RGD-Motivs *in vivo* zu widersprüchlichem Sekretionsverhalten von CagA führte (Kwok, Zabler *et al.* 2007, Jimenez-Soto, Kutter *et al.* 2009). Da CagA und CagY, das ebenfalls an Integrin binden kann, auf dem T4SS Pilus lokalisieren, wird folgendes Modell der Integrin-vermittelten Sekretion vorgeschlagen: Die auf dem Pilus lokalisierten Proteine CagA, CagY und CagL binden die $\beta 1$ -Untereinheit des Integrin-Rezeptors. Dies führt zur Gruppierung der Rezeptoren, was vermutlich eine Konformationsänderung in die gebogene Form auslöst, wodurch die Integration des T4SS in die Plasmamembran und die Sekretion von CagA in die Wirtszelle ermöglicht wird (Jimenez-Soto, Kutter *et al.* 2009).

Im Gegensatz zu *H. pylori* bindet *S. aureus* nicht direkt an den Integrin-Rezeptor. *S. aureus* besitzt zwei Fibronectinbindepoteine (FnBP-A und -B), die über die ECM Komponente Fibronectin die Interaktion zum Rezeptor herstellen. Allerdings exprimieren nicht alle Stämme beide Proteine funktionell, aber nur die Stämme, die beide funktionellen Proteine exprimieren, zählen zu den invasiven Arten (Peacock, Day *et al.* 2000). Durch die Aktivierung des Rezeptors wird eine Signalkaskade eingeleitet, die Komponenten der normalen fokalen AdhäsionsMaschinerie nutzen. So konnte die Aktivierung von FAK und Src Kinasen, sowie die Rekrutierung von Tensin, Vinculin, Cortaktin und Arp2/3 zur Bindestelle beobachtet werden. Folgend wird durch Aktinpolymerisation die Internalisierung des Bakteriums eingeleitet, wobei über eine Beteiligung des Aktin-Myosin Netzwerks zur Erhöhung der Zugkraft spekuliert wird (zusammengefasst aus (Hauck, Agerer *et al.* 2006).

1.5.4 Adhäsion und Internalisierung von Chlamydien

Die Adhäsion ist bei Chlamydien, wie bei anderen Pathogenen, der initiale Schritt der Kontaktaufnahme zwischen Bakterium und Wirt. Er ist essentiell für die erfolgreiche Etablierung der Infektion und beruht, wie in den vergangenen Jahren gezeigt werden konnte, auf einem multifaktoriellen Prozess, dessen genauer Ablauf jedoch immer noch nicht detailliert verstanden ist (Campbell und Kuo 2006, Moelleken und Hegemann 2012).

Die initial reversible Kontaktaufnahme der Chlamydien zur Wirtszelle erfolgt über Glykosaminoglykan-vermittelte elektrostatische Wechselwirkungen, gefolgt von der irreversiblen, spezifischen Liganden-Rezeptor-Bindung. Die eingeleitete Signaltransition führt, wahrscheinlich zusammen mit der Sekretion von Effektorproteinen, zur aktininduzierte Aufnahme der Bakterien (Abbildung 1.4). Hierbei vermittelt die Nutzung verschiedener Wirtszellrezeptoren vermutlich die serovar- bzw. speziesspezifische Ausprägung der Pathologie (Carabeo und Hackstadt 2001, Fudyk, Olinger *et al.* 2002, Moelleken und Hegemann 2012).

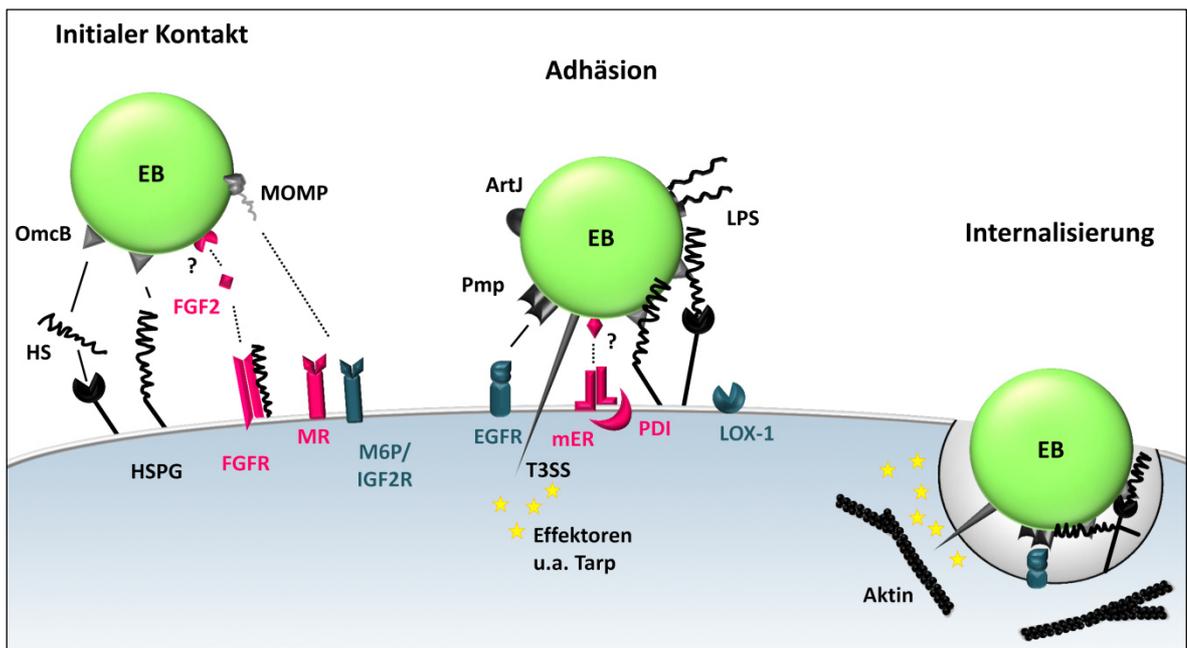


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Adhäsion und Internalisierung von EBs.

Zusammenfassung der beteiligten Proteine der frühen chlamydialen Infektion. In schwarz und grau dargestellte Komponenten besitzen eine Funktion sowohl in einer *C. trachomatis* als auch in einer *C. pneumoniae* Infektion, während pinke Proteine *C. trachomatis*- und türkisene Proteine *C. pneumoniae*-spezifisch sind. Durchgezogene Linien stellen bewiesene Interaktionen dar, während gestrichelte vermutet werden. HS: Heparansulfat, HSPG: Heparansulfat Proteoglykane, T3SS: Typ-3-Sekretionssystem, alle weiteren Abkürzungen werden im Fließtext erklärt.

1.5.4.1 Die chlamydiale Adhäsion – GAGs und die chlamydiale Seite

Zahlreiche Studien bestätigten eine Beteiligung von Glykosaminoglykan (GAGs), im speziellen der Heparansulfate, im initialen Infektionsprozess vieler aber nicht aller chlamydialer Spezies (Zhang und Stephens 1992, Su, Raymond *et al.* 1996, Davis und Wyrick 1997). Das Entfernen der Heparansulfate von EB-Oberflächen oder Humanzellen, bzw. die Vorbehandlung von EBs mit Heparansulfat oder seinem Analogon Heparin, verringert die chlamydiale Adhäsion und Infektion signifikant (Zhang und Stephens 1992, Davis und Wyrick 1997, Wuppermann, Hegemann *et al.* 2001, Beswick, Travelstead *et al.* 2003). Lediglich für *C. trachomatis* Serovar E konnte in diesen Experimenten keine Beeinflussung der Infektion bestimmt werden (Davis und Wyrick 1997, Taraktchoglou, Pacey *et al.* 2001, Beswick, Travelstead *et al.* 2003). Daher wurde für *C. trachomatis* ein trimolekularer Mechanismus der GAG-abhängigen Bindung postuliert, wobei Heparansulfate als Brückenmoleküle zwischen chlamydialem Adhäsion und humanem Rezeptor fungieren (Zhang und Stephens 1992).

Neben dem trimolekularen Mechanismus wiesen einige Studien sowohl bei *C. pneumoniae* als auch bei *C. trachomatis* auf eine direkte GAG-Bindung durch eine chlamydiales Adhäsion hin (Taraktchoglou, Pacey *et al.* 2001, Wuppermann, Hegemann *et al.* 2001, Yabushita, Noguchi *et al.* 2002). In der Tat konnte das cysteinreiche 60 kDa Membrankomplexprotein OmcB als Interaktionspartner der Heparin-ähnlichen GAGs identifiziert werden. Hierbei vermitteln basische Aminosäuren (B) im N-Terminus des Proteins die Bindung zu den GAGs, die bei *C. trachomatis* in einem bzw. bei *C. pneumoniae* in zwei XBBXBH Heparin-Bindemotiven organisiert sind (Stephens, Koshiyama *et al.* 2001, Fadel und Eley 2007, Moelleken und Hegemann 2008, Fechtner, Stallmann *et al.* 2013). Auffallend ist jedoch auch hier die Besonderheit für *C. trachomatis* E. Das OmcB von Serovar E bindet, wie die Bakterien, Heparin-unabhängig an Humanzellen, obwohl es sich auf Sequenzebene in nur 13 Aminosäuren vom OmcB des Heparin-abhängigen LGV Serovars unterscheidet. Diese unterschiedliche Abhängigkeit der Serovare basiert auf lediglich drei Aminosäuren Unterschied, in der sogenannten variablen Region, C-terminal des Heparin-Bindemotivs (Moelleken und Hegemann 2008, Fechtner, Stallmann *et al.* 2013).

Für Momp, dem Hauptbestandteil des cOMCs wurde ebenfalls eine Bindung an GAGs bei *C. muridarum* (ehemals *C. trachomatis* MoPn) beschrieben, welche später jedoch als unspezifisch eingestuft wurde (Su, Raymond *et al.* 1996, Stephens, Koshiyama *et al.* 2001). Allerdings geht von der N-verknüpften Mannose-Glykolysierung des Momp verschiedener chlamydialer Spezies eine Adhäsion an Humanzellen aus (Swanson und Kuo 1991, Swanson und Kuo 1994, Kuo, Takahashi *et al.* 1996). Anhand von Neutralisationsexperimenten mit verschiedenen Mannose-Oligosacchariden wurde als möglicher humaner Interaktionspartner der Mannose-

Rezeptor (MR) für *C. trachomatis* E bzw. der M6P/IGF2-Rezeptor (Mannose-6-Phosphat / *insulin-like growth factor*) für *C. pneumoniae* postuliert (Puolakkainen, Kuo *et al.* 2005, Puolakkainen, Lee *et al.* 2008).

Neben OmcB konnte für die heterogenen Pmp-Familie eine essentielle Funktion in der chlamydialen Infektion aufgezeigt werden (Wehrl, Brinkmann *et al.* 2004, Mölleken, Schmidt *et al.* 2010, Becker und Hegemann 2014). Die Pmp-Familie umfasst in *C. trachomatis* neun Mitglieder und in *C. pneumoniae* 21, die in sechs Subtypen unterteilt werden (Grimwood und Stephens 1999). Sie sind durch einen für Autotransporter charakteristischen Aufbau aus Signalsequenz, Passagierdomäne und β -Barrel Domäne gekennzeichnet, der die Oberflächenpräsentation des Proteins vermittelt (Henderson und Lam 2001, Wehrl, Brinkmann *et al.* 2004, Mölleken, Schmidt *et al.* 2010). Neben der Drei-Domänen-Struktur ist eine starke Häufung der Motive FxxN und GGA(I, L, V), die alternierend im Protein auftreten, charakteristisch, da die sonstige Sequenzidentität gering ausfällt (Grimwood und Stephens 1999). In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass verschiedene Pmps sowohl bei *C. pneumoniae* als auch *C. trachomatis* E die Bindung an Humanzellen vermitteln, bzw. dass eine Antikörper- oder Proteinvorbehandlung die chlamydiale Infektion reduziert (Wehrl, Brinkmann *et al.* 2004, Mölleken, Schmidt *et al.* 2010, Becker und Hegemann 2014). Hierbei sind die charakteristischen FxxN und GGA(I, L, V) Motive essentiell für die Adhäsion (Mölleken, Schmidt *et al.* 2010). Neben der Funktion als Adhäsion konnte für Pmp21 von *C. pneumoniae* auch invasive Eigenschaften bestimmt werden (Mölleken, Becker *et al.* 2013). Aufgrund der Oberflächenlokalisation und ihrer Variation wurde den Pmps schon früh eine potentielle Funktion in der Umgehung des Immunsystems angedacht (Grimwood und Stephens 1999). Tatsächlich konnte später die differenzielle Expression verschiedener Pmps nachgewiesen werden (Tan, Hsia *et al.* 2010).

Außerdem konnte jüngst für Pmp21 von *C. pneumoniae* der erste direkte humane Interaktionspartner eines chlamydialen Proteins in Form des EGF-Rezeptors (*epidermal growth factor receptor*) identifiziert werden. Dabei vermittelt Pmp21 die Aktivierung des Rezeptors und die Rekrutierung der Signalmoleküle Grb2 und c-Cbl (Mölleken, Becker *et al.* 2013). Eine Interaktion des *C. trachomatis* E Orthologs PmpD mit dem EGFR bestätigt sich nicht, woraus geschlossen werden kann das Pmp21 und PmpD unterschiedliche Internalisierungsprozesse ansprechen (Becker 2013). Dennoch konnte mit rekombinanten PmpD die *C. trachomatis* E Infektion partiell neutralisiert werden, welche eine essentielle Funktion des Proteins bei der erfolgreichen Infektionsetablierung belegt (Becker und Hegemann 2014). Eine neue Studie mit einer durch Mutagenese erzeugten *pmpD* Nullmutante unterstützt eine essentielle Funktion in der Adhäsion auch für *C. trachomatis* D (Kari, Southern *et al.* 2014).

Die Koneutralisation beider Adhäsionswege, OmcB - GAG und Pmp21 – EGFR, reduzierte die *C. pneumoniae* Infektion stärker als die jeweiligen einzelnen Neutralisationen mit rekombinantem Protein. Eine Restinfektion von etwa 40 % blieb jedoch bestehen und deutet auf das Vorhandensein weiterer essentieller Adhäsine hin (Becker und Hegemann 2014).

Auf chlamydialer Seite konnte für weitere mit dem cOMC assoziierte Proteine und dem LPS eine Funktion in Adhäsionsprozess ermittelt werden, ihre humanen Interaktionspartner sind jedoch unbekannt.

Das Chaperon GroEL1 von *C. pneumoniae* konnte auf der EB-Oberfläche nachgewiesen werden und rekombinantes Protein adhärirt an Humanzellen und reduziert die Infektion, nicht jedoch die Adhäsion von EBs (Wuppermann, Molleken *et al.* 2008).

Auch das Arginin-Bindeprotein ArtJ von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* D lokalisiert auf der Oberfläche von EBs und bindet als rekombinantes Protein an Humanzellen. Zusätzlich reduziert der *C. pneumoniae*-spezifische ArtJ Antikörper partiell die Infektion beider Spezies, während der gegen *C. trachomatis* ArtJ gerichtete Antikörper keine neutralisierende Wirkung zeigte (Finco, Bonci *et al.* 2005, Soriani, Petit *et al.* 2010).

Als weiteres Adhäsion wurde chlamydiales LPS in Betracht gezogen, da chlamydiales LPS, LPS-Inhibitoren und LPS Antikörper die Infektion von *C. trachomatis* E und L1 sowie *C. pneumoniae* reduzierten (Peterson, de la Maza *et al.* 1998, Fadel und Eley 2008).

1.5.4.2 Die chlamydiale Adhäsion – Die humane Seite

Auf Seite der humanen Wirtszelle konnte neben dem EGFR bei *C. pneumoniae* (s. Kapitel 1.5.4.1) eine Funktion des Wachstumsfaktors FGF2 und des Östrogenrezeptors in der *C. trachomatis* E Infektion bzw. vom Apolipoprotein E4 und dem LOX-1 Rezeptor in der *C. pneumoniae* Infektion identifiziert werden.

Als wichtiges Protein der *C. pneumoniae* Adhäsion fungiert das Apolipoprotein E4, welches die Adhäsion der EBs verbessert. Der beteiligte Ligand auf chlamydialer Seite ist jedoch unbekannt; spekuliert wird über eine Bindung der Momp Glykane (Gerard, Fomicheva *et al.* 2008). Des Weiteren konnte das Erfordernis des LOX-1 Rezeptors (*lectin-like ox-LDL receptor*) speziesspezifisch für die *C. pneumoniae* Adhäsion beschrieben werden. Hierbei wirken verschiedene LOX-1 Liganden und der spezifische LOX-1 Antikörper inhibierend auf die Infektion, wobei die Antikörperneutralisation mit der Reduktion der EB Adhäsion einhergeht. Zusätzlich konnte eine Kolo-kalisation vom LOX-1 Rezeptor an gebundenen EBs detektiert werden. Der chlamydiale Interaktionspartner ist auch hier unbekannt, erneut wird über eine mögliche Interaktion zu den Glykanen des Momp Proteins spekuliert (Campbell, Puolakkainen *et al.* 2012).

FGF2 (*fibroblast growth factor*) steigert die Bindung von EBs der Spezies *C. muridarum* und *C. trachomatis* E an Humanzellen Heparin-abhängig. Überraschenderweise konnte gebundenes FGF2 auf der chlamydialen Oberfläche detektiert werden. Die Bindung an Chlamydien erfolgte wahrscheinlich über einen direkten Interaktionspartner, da eine Interaktion über Heparansulfate ausgeschlossen werden konnte. Daher wird ein trimolekulares Interaktionsmodell postuliert, bei dem FGF2 als Brückenmolekül zwischen chlamydialem Oberflächenprotein und dem FGF-Rezeptor und/oder Heparansulfat-Peptidoglykanen agiert. In der Infektion wird die chlamydiale Oberfläche wahrscheinlich während der Freisetzung der EBs mit FGF2 beladen, umso die Etablierung der folgenden Infektion zu stimulieren (Kim, Jiang *et al.* 2011). Auffallend ist jedoch, dass die Depletion von endogenem FGF2 keinen negativen Effekt auf die *C. trachomatis* Bindung ausübt. Außerdem konnte, im Vergleich zu *C. muridarum*, weniger gebundenes FGF2 auf der EB-Oberfläche detektiert wurde. Dies wurde von den Autoren mit dem Fehlen einer funktionalen Heparin-Bindedomäne im OmcB erklärt (Kim, Jiang *et al.* 2011), kann aber auch auf eine geringere Bedeutung dieses Prozesses in der *C. trachomatis* E Adhäsion an Humanzellen hindeuten.

Eine Beteiligung der PDI (Protein-Disulfid-Isomerase), einer Komponente des Östrogen-Rezeptors, an der chlamydiale Adhäsion konnte erstmals durch Immunpräzipitation mit einem EB-spezifischen Antikörper gezeigt werden. Zudem reduziert der Einsatz von PDI-spezifischem Antikörper bzw. Inhibitoren der katalytischen Aktivität in Neutralisationsexperimenten die *C. trachomatis* E Infektion (Davis, Raulston *et al.* 2002). Eine detailliertere Beschreibung der PDI Funktion erfolgte an CHO6 Zellen, die durch ihre Infektionsresistenz auffielen, hervorgerufen durch einen Defekt in der PDI Prozessierung (Conant und Stephens 2007). So konnte die Reduktion der Infektion auf die blockierte katalytische Aktivität zurückgeführt werden, wobei die PDI die Reduktion der Disulfidbrücken der Proteine des cOMCs katalysieren könnte und so vielleicht die Zugänglichkeit von Adhäsinen verbessert und damit verbunden die Internalisierung fördert (Davis, Raulston *et al.* 2002, Abromaitis und Stephens 2009). Darüber hinaus reduziert die Verwendung von CHO6 Zellen und die Depletion der PDI mit siRNA die Bindung von *C. trachomatis* L2 und *C. psittaci* EBs. Die Bindung konnte interessanterweise durch Transfektion einer katalytischdefizienten PDI-Variante wiederhergestellt werden. Daher wird neben der katalytischen Funktion in der EB Aufnahme auch über eine strukturelle Funktion in der EB Bindung diskutiert. Die Bindung erfolgt jedoch nicht über direkten Kontakt zum EB. Daher wird die EB Bindung durch einen assoziierten Rezeptor favorisiert, der durch die PDI stabilisiert wird (Abromaitis und Stephens 2009). Jüngst konnte als potentieller Kandidat der membranständige Östrogen-Rezeptor (mER) identifiziert werden. Die Neutralisation des mERs mit spezifischen Antikörpern bzw. dem Antagonisten

Tamoxifen wirkt sich negativ auf die *C. trachomatis* E Infektion polarisierter endometrialer Zellen aus. Östrogen hingegen stimuliert die Infektion, was auf einen hormonellen Einfluss bei der Verbreitung und erfolgreiche Etablierung der Infektion hindeutet (Hall, Schell *et al.* 2011). Über eine Beteiligung der Tyrosin-Kinase PDGFR in der *C. trachomatis* Infektion kann nur spekuliert werden. Diesbezüglich erhobene mit Daten *C. trachomatis* L2 wurden kürzlich revidiert, da sie fälschlicherweise unter Verwendung von *C. muridarum* generiert worden waren (Elwell, Ceesay *et al.* 2013). In einem RNA-Interferenz (RNAi) Screen in *Drosophila melanogaster* S2 Zellen konnte der PDGF-Rezeptor (*platelet derived growth factor*) als essentiell für die chlamydiale Infektion bestimmt werden. Eine detaillierte Analyse zeigte, dass PDGFR aktiviert und zur EB Bindestelle rekrutiert wird. Eine Reduktion des zellulären PDGFR Levels durch RNAi oder die Verwendung eines neutralisierenden Antikörpers verringerten die EB Bindung, aber nicht die Aufnahme. Begleitet wird die Aktivierung des Rezeptors von der Rekrutierung und Aktivierung von Wirtsproteinen wie Aktinnukleatoren, die die Aufnahme stimulieren (Elwell, Ceesay *et al.* 2008). Eine direkte Bindung des Rezeptors durch die Chlamydien konnte auch hier nicht gezeigt werden. Neben der direkten Bindung durch ein unbekanntes chlamydiales Protein wäre auch eine indirekte Bindung über den natürlichen Liganden PDGF möglich. Hierbei könnte PDGF, ähnlich wie FGF2, als Brückenmolekül fungieren oder über Komplexierung mit Heparansulfaten (HS), denn PDGF ist ebenfalls in der Lage HS zu binden, die Interaktion zum PDGFR β vermitteln (García-Olivas, Hoebeke *et al.* 2003, Elwell, Ceesay *et al.* 2008).

Zusammenfassend konnte bislang für *C. trachomatis* nur ein Interaktionsweg identifiziert werden, bei dem das beteiligte chlamydiale Adhäsion (OmcB) und der humane Interaktionspartner (GAGs) bekannt sind. Ansonsten konnten lediglich Proteine beschrieben werden, die auf einer der beiden Seiten erforderlich sind. Die Charakterisierung eines spezifischen Interaktionspaars, das auf die initiale reversible Interaktion folgt, wie bei *C. pneumoniae* Pmp21 und EGFR, blieb für *C. trachomatis* bislang erfolglos.

1.5.4.3 Die chlamydiale Internalisierung

Nach der erfolgreichen Adhäsion der EBs an die Wirtszelle erfolgt die Aufnahme der Bakterien, welche durch die Sekretion von Effektorproteinen unterstützt wird. Durch die Signaltransition der aktivierten Rezeptoren und sekretierten Effektoren werden Adapterproteine rekrutiert, die zur lokalen Aktinpolymerisation, folgend zur Ausstülpung der Membran und anschließend zur Aufnahme der EBs führen. Der grundlegende Ablauf ist auch hier nur ansatzweise aufgeklärt.

Eine Beteiligung von Lipid Rafts (LR) an der Adhäsion wird kontrovers diskutiert. Lipid Rafts sind Mikrodomänen der Zytoplasmamembran, die reich an Cholesterol und Glykosphingolipiden sind und zahlreiche Rezeptoren und Signalmoleküle beherbergen (Brown und London 1998, Simons und Toomre 2000). Die LR-abhängige Endozytose bei Chlamydien erfolgt speziesspezifisch. So konnte für *C. pneumoniae* in verschiedenen Studien durch chemische Interruption der Lipid Rafts, mittels Nystatin, Filipin oder Methyl- β -cyclodextrin, die Aufnahme der EBs reduziert werden (Stuart, Webley *et al.* 2003, Fechtner 2012, Korhonen, Puolakkainen *et al.* 2012). Im Gegensatz dazu wurde die Aufnahme von *C. trachomatis* L2, A, B und C durch chemische Behandlung oder RNAi Depletion des LR Strukturproteins Caveolin-1 nicht beeinflusst, letzteres wurde allerdings nur bei Serovar L2 gezeigt (Stuart, Webley *et al.* 2003, Gabel, Elwell *et al.* 2004, Hybiske und Stephens 2007, Korhonen, Puolakkainen *et al.* 2012). Widersprüchliche Daten existieren zur LR-abhängigen Endozytose von *C. trachomatis* Serovar E (Stuart, Webley *et al.* 2003, Gabel, Elwell *et al.* 2004), obwohl eine Internalisierung von Serovar E über Lipid Rafts naheliegend wäre, da der mER hauptsächlich in diesen Domänen lokalisiert (Levin 2002).

Der genaue Mechanismus der Internalisierung ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Wahrscheinlich ist jedoch, dass durch die eingeleitete Signaltransduktion der aktivierten Rezeptoren (EGFR, PDGFR) und der sekretierten Effektoren redundante und sich gegenseitig verstärkende Signalkaskaden aktiviert werden, die zur Aufnahme führen. In diesem Prozess stellt die lokale Reorganisation des Aktinzytoskeletts einen essentiellen Schritt dar. Die Aufnahme, nicht jedoch die Adhäsion, wird durch Depolymerisation von Aktin mit Cytochalasin D signifikant verringert (Carabeo, Grieshaber *et al.* 2002, Coombes und Mahony 2002). Des Weiteren ist die Beteiligung von Mitgliedern der Rho GTPase Familie zur Gestaltung der Aktinpolymerisation während der chlamydialen Aufnahme essentiell. So werden Rac und Cdc42 während der *C. caviae* Infektion aktiviert, während ausschließlich Rac bei *C. trachomatis* L2 aktiviert wird (Carabeo, Grieshaber *et al.* 2004, Subtil, Wyplosz *et al.* 2004). Bei *C. trachomatis* L2 leitet die Aktivierung von Rac die Rekrutierung der Aktinnukleatoren WAVE2 und Abi-1 durch direkte Interaktion ein. Dies führt zur Rekrutierung des Arp2/3-Komplexes an die EB Bindestelle und nachfolgend zur aktininduzierten Aufnahme (Carabeo, Dooley *et al.* 2007).

Das am besten untersuchte chlamydiale Effektorprotein Tarp (*translocated actin recruiting phosphoprotein*) spielt eine zentrale Rolle in diesem Internalisierungsprozess. Tarp wird unmittelbar nach der Adhäsion der EBs in die Wirtszelle sekretiert und speziesspezifisch tyrosinphosphoryliert. Die Phosphorylierung erfolgt bei *C. trachomatis* L2 über die zellulären Src-Kinasen und Abl-Kinase (Clifton, Fields *et al.* 2004, Elwell, Ceesay *et al.* 2008, Jewett, Dooley *et al.* 2008). Tarp akkumuliert an der Innenseite der Zytoplasmamembran des chlamydialen Adhäsionsorts,

wo es die Aktinmodulierung auf zwei Wegen vermittelt. Der C-Terminus vermittelt Phosphorylierungs-unabhängig die Aktin Polymerisation durch direkte Nukleation von Aktin (Jewett, Fischer *et al.* 2006). Der N-Terminus vermittelt Phosphotyrosin-abhängig die Aktivierung von GEFs, wie Sos1 und Vav2, die zusammen mit der transienten Aktivierung der PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) die Aktivierung von Rac einleitet (Lane, Mutchler *et al.* 2008).

Vor kurzem konnte ein weiteres sekretiertes Effektorprotein - CT694 - identifiziert werden, das vermutlich zur Aktinremodellierung beiträgt. CT694 liegt nach der Sekretion über seinen N-Terminus verankert an der Wirtsmembran vor (Bullock, Hower *et al.* 2012). Der C-Terminus interagiert mit dem Strukturprotein AHNAK, das u.a. die Fähigkeit besitzt mit Aktin zu komplexieren, und trägt so vielleicht ebenfalls zur Aktinremodellierung bei (Hower, Wolf *et al.* 2009). Durch die Aktinbündelung erfolgt final die Aufnahme des EBs in die Wirtszelle. So kombinieren Chlamydien Trigger- und Zipper-Mechanismen um erfolgreich in Humanzellen zu internalisieren.

1.6 Zielsetzung

Aufgrund der Beobachtung, dass eine *C. pneumoniae* Infektion durch Konneutralisation mit OmcB und Pmp21 zwar signifikant reduziert, aber nicht vollständig unterdrückt werden kann (Becker und Hegemann 2014), wurde auf die *C. trachomatis* Infektion übertragen angenommen, dass noch weitere essentielle Adhäsine existieren müssen. Daher war die Identifizierung neuer potentieller Adhäsine bei *Chlamydia trachomatis* Serovar E Ziel dieser Arbeit, wofür anhand geeigneter Kriterien zuerst eine genomweite Kandidatenauswahl getroffen werden sollte. Anschließend sollten diese Kandidaten mit rekombinant erzeugtem Protein auf ihre adhäsiven und infektionsneutralisierenden Eigenschaften (Charakteristika eines Adhäsins) hin überprüft werden. Bei allen Untersuchungen musste dabei auf heterologe Testsysteme zurückgegriffen werden, da eine genetische Manipulation von Chlamydien zu diesem Zeitpunkt nicht möglich war. Von den verheißungsvollen Kandidaten sollten später Antikörper generiert werden, um die Lokalisation der Proteine in der chlamydialen Infektion zu bestimmen. Alle identifizierten Adhäsine sollten im Folgenden funktionell charakterisiert und möglichst ihr humaner Interaktionspartner ermittelt werden.

2 Materialien

2.1 Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsartikel	Hersteller
Chromatographiepapier für Westernblots	VWR
Deckgläschen für die Zellkultur (ø 12 mm)	Roth
Dialyseklammern	Pierce
Dialyseschlauch 12-15 kDa Ausschluss	Serva
Elektroporationsküvetten	BioRad
Falcon (15 / 50 ml), steril	Sarstedt
FACS-Röhrchen	Sarstedt
Glasperlen (ø ~0,5 mm)	Braun
Kryo-Röhrchen (1,8 ml)	Nunc, Sarstedt
Küvetten	Sarstedt
Latexkügelchen (ø 1 µm, grün oder blau carboxyl.)	Polyscience
Objektträger	Diagonal
PVDF-Membran für Westernblots (Immobilon-P)	Millipore
Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Protein-Säulen	Thermo
Reaktionsgefäße (1,5 ml / 2 ml)	Eppendorf /Sarstedt
Spin-Säulen	Pierce
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckmann
Zellkulturflaschen (Polystyrol 25 cm ²), steril	Nunc
Zellkulturflaschen (Polystyrol 75 cm ²), steril	Nunc
Zellkulturplatte (24-Well, 96-Well)	Nunc
Zellkultur-Zentrifugationsröhrchen (12 ml)	Greiner
Zellschaber (23 cm), steril	Nunc
Zentrifugationsröhrchen, Glas	Korex

2.2 Geräte und Maschinen

Geräte / Maschinen	Hersteller
Binokular Axiovert 25C	Zeiss
Bio Photometer Plus	Eppendorf
Blotapparatur Fastblot B34	Biometra
Brutschrank HEPA Class 100	Thermo Electron Corp.
Elektroporationsapparatur Gen Pulser	BioRad
FACSAria	BD
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 50 + 12 Bit CCD Kamera	Zeiss Hamamatsu
Geldokumentationssystem	BioRad
Homogenisator precelly s24	Bertin Technologies
Inkubator Multitron	Infors HAT
Inkubator Memmert BE Modell 600	Heraeus
Konfokalmikroskop C2 Eclipse Ti-E mit A1R Konfokal La- serscanner	Nikon
Konfokalmikroskop LSM 510 Meta	Zeiss
Magnetrührer	IKA
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
NanoDrop 2000c Spectrophotometer	Peqlab
PCR Thermocycler C1000	BioRad
pH-Meter WTW Series pH 720	inoLab
Pipetten Pipetman	Gilson

Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Power Supply	GE Healthcare
Proteingelsystem SE-260	Hoefer
Schüttler Unitron	Infors
Sicherheitswerkbank Herasafe	Heraeus
Speed-Vac Vacuum-Konzentrator	Savant
Thermoblock	Labnet
Ultraschallstab Sonoplus HD2200	Bandelin
Ultraschallwasserbad RK102H	Bandelin
Ultrazentrifuge Optima Max E, Rotor MLS50	Beckmann
UV-Tisch	Biometra
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Zählkammer (Faktor 78.000)	Thoma
Zentrifuge Avanti J-25, Rotoren JLA10.500, JA25-50	Beckmann Coulter
Zentrifuge Beckmann J2-21, Rotoren JA10, JA20	Beckmann Coulter
Zentrifuge Biofuge Pico, Rotor #3324	Heraeus
Zentrifuge Biofuge Primo R, Rotor #7593	Heraeus
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich Zentrifugen

2.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT)	Sigma
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)	Sigma
Acrylamid (Rodiphorese 30)	Roth
Adenin	Sigma
Agar	Difco
Agarose	Lonza
Alanin	Merck
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck
Ammoniumsulfat (NH ₄) ₂ SO ₄	Grüssing
Ampicillin	Sigma
Arginin	Merck
Asparagin	Merck
Asparaginsäure	Merck
Biofreeze	Biochrom
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Grüssing
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva
Bradford-Reagenz	BioRad
Bromphenolblau	Serva
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Riedel-de-Haën
Casein Pepton	BD
Chloramphenicol	Merck
Cell Dissociation Solution	Sigma
Coomassie Brilliant Blau G250	Serva
Cycloheximid	Sigma
Cystein	AmpliChem
D(+)-Glucose Monohydrat	Roth
Desoxynucleosid-5'-Triphosphate (dNTPs)	Fermentas
Dimethylformamid (DMF)	Normapur
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Normapur
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) Gluta Max	
Zellkulturmedium	Life Technologie
DSP (Dithiobis[succinimidylpropionat])	Thermo

DTSSP (3,3'-Dithiobis[sulfosuccinimidylpropionat])	Thermo
Dithiothreitol (DTT)	AmpliChem
EGF (<i>epidermal growth factor</i>) rekombinant	Sigma
Essigsäure (CH ₃ COOH)	Roth
Ethanol (96%) (EtOH)	J. T. Baker
Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) (EtBr)	Roth
Ethylendiamintetraacetat (Na ₂ -EDTA)	AmpliChem
EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin	Thermo
Ficoll	Serva
fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom
Fungizone (Amphotericin B)	Life Technologie
Gastrografin	Schering
Gentamycin	Life Technologie
Glutamin	AmpliChem
Glutaminsäure	AmpliChem
Glutathion-Agarose	Thermo
Glycerin	Roth
Glycin	Fluka
Guanidin-HCl	Serva
Hank's Salzlösung (HBSS)	Life Technologie
Harnstoff	Roth
Hefe Nitrogen Basis (YNB)	Difco
Hefeextrakt	Difco
Hepes	Sigma
Histidin	Sigma
Imidazol	AmpliChem
Immersionsöl Immersol 518F	Zeiss
Immersionsöl Typ A	Nikon
Inositol	AmpliChem
Isoleucin	Roth
Isopropanol	Normapur
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Fermentas
Kaliumacetat (KAc)	Grüssing
Kaliumchlorid (KCl)	Normapur
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Grüssing
Kanamycin	Fluka
Lachssperma-DNA (Carrier-DNA)	Sigma
Leucin	Merck
Lithiumacetat (LiAc)	Roth
Lysin	Sigma
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Grüssing
Methanol (MeOH)	Riedel-de-Haën
Methionin	AmpliChem
Milchpulver	Roth
N-Lauroylsarcosine (Sarkosyl)	Sigma
Natriumacetat (NaAc)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Normapur
Natriumdeoxycholat	Sigma
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Riedel-de-Haën
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	AmpliChem
Natriumdodecylsulphat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Normapur
NHS-Fluorescein	Thermo
NHS-Sepharose	GE Healthcare
Nicht-essentielle Aminosäuren (MEM)	Life Technologie
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma

NP-40	Sigma
Ölsäure	Sigma
Para-Aminobenzoessäure	Fluka
Para-Formaldehyd (PFA)	Fluka
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth
Phenylalanin	Merck
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Polyethylenglycol 3350 (PEG)	Sigma
Prolin	AmpliChem
Proteaseinhibitor (EDTA-frei)	Roche
Reduziertes L-Glutathion	Sigma
RPMI Medium	Life Technologie
Saccharose	Roth
Salzsäure (HCl)	Roth
Serin	AmpliChem
Streptavidin-Agarose	Thermo
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
Tetrazyklin	Sigma
Threonin	Roth
Triethanolamin	Merck
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	VWR
Triton X-100	Sigma
Trypton Pepton	Difco
Tryptophan	AmpliChem
TurboFect	Thermo
Tween 20	Roth
Tyrosin	AmpliChem
Uracil	Sigma
Valin	AmpliChem
Vitaminlösung (MEM)	Liefe Technologie
Vectashield (Anti-fade, mounting fluid)	Linaris
X-alpha-Gal	Takara
Xylen-Cyanol FF	Serva

2.4 Lösungen und Puffer

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
4 x Sammelpuffer (für Protein-Gele)	0,5 M Tris/HCl pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
4 x Trenngelpuffer (für Protein-Gele)	1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS
Blockierungslösung Westernblot	3 % (w/v) Milchpulver 0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS oder TBS
Coomassie-Brillant-Blau-Färbelösung	0,008 % (w/v) CBB-G-250 35 mM HCl in ddH ₂ O
Detektionspuffer Westernblot	0,1 M Tris/HCl pH 9,5 0,1 M NaCl 50 mM MgCl ₂
Dialyse-Puffer (für Ctad2)	1x PBS, pH7,4 1% Glycerin 1 mM EDTA

DNA-Ladepuffer	0,1 % (w/v) Bromphenolblau 0,1 % (w/v) Xylen-Cyanol FF 15 % (w/v) Ficoll 10 mM Tris/HCl 10 mM EDTA
Kopplungspuffer (Latexkügelchen)	0,2 M NaHCO ₃ 0,5M NaCl pH 8,6
Laufpuffer (SDS-PAGE)	0,05 M Tris/HCl pH 8,3 0,2 M Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Lebendzell-Mikroskopie-Puffer (Horton und Ehlers 2003)	120 mM NaCl 3 mM KCl 2 mM CaCl ₂ 2 mM MgCl ₂ 10 mM Glukose 10 mM HEPES pH 7,35
PBS (Phosphate Buffered Saline)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
Phospho-Lysis-Puffer	1 % NP-40 1 % Triton X-100 20 mM Tris/HCl pH 7,5 140 mM NaCl 2 mM EDTA 1 mM Na ₂ VO ₄
PEG (Polyethylenglykol)	50 % (w/v) PEG
PFA (Para-Formaldehyd) Stocklösung	3 % (w/v) PFA in PBS
Protein-Ladepuffer (4-fach)	50 mM Tris/HCl pH 6,9 2 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 5 % (v/v) Glycerin
Puffer B (Proteinreinigung)	8 M Harnstoff 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris/HCl pH 8,0
Puffer C (Proteinreinigung)	8 M Harnstoff 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris / HCl pH 6,3
Puffer P1 (Plasmid-Präparation)	50 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0 100 µg RNaseA (A/ml)
Puffer P2 (Plasmid-Präparation)	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
Puffer P3 (Plasmid-Präparation)	2,55 M KAc pH 5,5
SPG-Puffer (Saccharose-Phosphat-Glutaminsäure-Puffer)	75,0 g Saccharose 0,52 g KH ₂ PO ₄ 1,53 g Na ₂ HPO ₄ 0,72 g Glutaminsäure auf 1000 ml mit ddH ₂ O auffüllen, pH 7,5
TBE-Puffer	89 mM Tris/HCl 89 mM Borsäure 2 mM EDTA

TBS (Tris Buffered Saline)	140 mM NaCl 2,5 mM KCl 3,5 mM Tris/HCl, pH 7,4
Transferpuffer (Westernblot)	25 mM Tris 150 mM Glycin 10 % MeOH 0,05 % SDS
Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung	5 % (v/v) 10 x Trypsin/EDTA 95 % (v/v) Hank's-Lösung (HBSS)

2.5 Enzyme

Enzym	Hersteller
Lysozym	Sigma
Platinum <i>Pfx</i> DNA-Polymerase	Invitrogen
Proteinase K	Roche
Restriktionsenzyme (<i>AccI</i> , <i>AvaI</i> , <i>ClaI</i> , <i>HincII</i> , <i>HindIII</i> , <i>NdeI</i> , <i>NotI</i> , <i>ScaI</i> , <i>SmaI</i> , <i>Tth111I</i>)	Thermo
RNAse A	Qiagen
<i>Taq</i> -Polymerase	Eigene Herstellung (Fr. Volfson)
Trypsin/EDTA	Life Technologie

2.6 Antikörper

2.6.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezifität	Ursprung	Verdünnung	Referenz
Anti-Aktin	humanes β Aktin	Maus	WB 1:3000	Sigma
Anti-C10orf118	Humanes Golgi Protein	Kaninchen	IF 1:150	Sigma
Anti-cMyc	cMyc-Tag	Maus	WB 1:400	Roche
Anti-Ctad1*	CT017-His ₁₀ Volllänge	Kaninchen	IF 1:10; IF 1:25** WB 1:500**	diese Arbeit
Anti-Ctad2*	CT142-His ₁₀ Volllänge	Kaninchen	IF 1:1 WB: 1:200**	diese Arbeit
Anti-Ctad4*	CT503-His ₁₀ Volllänge	Kaninchen	IF pur WB 1:100**	diese Arbeit
Anti-Ctad8*	CT868-His ₁₀ beginn nach TM	Kaninchen	IF 1:3 IF FITC-Ctad8 pur WB 1:200**	diese Arbeit
Anti-Ctad9*	CT875-His ₁₀ Volllänge	Kaninchen	IF 1:5 IF FITC-Ctad9 1:2 WB 1:200**	diese Arbeit
Anti-DnaK	<i>Ctr</i> DnaK	Kaninchen	WB 1:500	Birkelund
Anti-EFTu*	<i>Cpn</i> EFTu	Ziege	WB 1:300 IF 1:3	diese Arbeit
Anti-GroEL1	<i>Cpn</i> GroEL1	Kaninchen	IF 1:50 WB 1:500	Wuppermann
Anti-GST	GST-Tag	Kaninchen	WB1:1000 IF 1:50	Santa Cruz
Anti-His	Penta His-Tag	Maus	WB1:2500 IF 1:20	Qiagen
Anti-IncA	<i>Ctr</i> IncA	Kaninchen	IF 1:30	Heuer

Anti-Integrin- β 1	humanes Integrin- β 1 ecto Domäne	Ziege	WB1:100 IF 1:10	Santa Cruz
Anti-MEK-1	humanes MEK1	Maus	WB 1:200	Santa Cruz
Anti-Momp	<i>Ctr</i> Momp	Maus	WB 1:500 IF 1:100	Santa Cruz
Pathfinder	chlamydiales LPS	Maus	IF 1:6 <i>Cpn</i> IF 1:8 <i>Ctr</i>	BioRad
Anti-phospho ERK	humanes phospho. ERK	Maus	WB 1:200	Cell Signaling
Anti-Pmp70	humanes Peroxisomen-Protein Pmp70	Maus	IF 1:150	Sigma
Anti-S1	<i>Ctr</i> S1 ribosomales Protein	Maus	WB 1:500	Birkelund

* Antikörper wurden antigengereinigt (3.6.10.2), ** Antigen abgereichertes Antiserum (3.6.10.3). IF: Immunfluoreszenz WB: Westernblot

2.6.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezifität	Ursprung	Verdünnung	Hersteller
Alexa-488-Anti-Maus	Maus	Ziege	IF 1:200	Life Technologie
Alexa-594-Anti-Maus	Maus	Ziege / Esel	IF 1:200	Life Technologie
Alexa-488-Anti-Kaninchen	Kaninchen	Ziege	IF 1:200	Life Technologie
Alexa-594-Anti-Kaninchen	Kaninchen	Ziege	IF 1:200	Life Technologie
Alexa-649-Anti-Kaninchen	Kaninchen	Esel	IF 1:200	Life Technologie
Alexa-488-Anti-Ziege	Ziege	Esel	IF 1:200	Life Technologie
Anti-Human-AP	Human	Ziege	WB 1:7500	Promega
Anti-Kaninchen-AP	Kaninchen	Ziege	WB 1:7500	Promega
Anti-Maus-AP	Maus	Ziege	WB 1:7500	Promega
Anti-Ziege-AP	Ziege	Maus	WB 1:1000	Santa Cruz
Anti-Streptavidin-AP	Biotin	Kaninchen	WB 1:1000	Sigma
Anti-Cy5-Kaninchen	Kaninchen	Ziege	IF 1:100	Life Technologie

IF: Immunfluoreszenz, WB: Westernblot

2.7 Fluoreszenzfarbstoffe

Färbemittel	Verdünnung	Hersteller
Bodipy 493/503	1:1000	Life Technologie
DAPI	1 μ g/ml	Sigma
Alexa594-Wheat-Germ-Agglutinin (WAG)	1:100	Life Technologie

2.8 Kits

Kit	Hersteller
Dye-Removal-Columns	Thermo
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen

2.9 DNA- und Proteingrößenstandards

Größenstandard (Hersteller)	Fragment-/ Protein-Größen
1 kb DNA-Ladder Mix (Thermo)	10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.200, 1.000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 [bp]
PageRuler™ Prestained (Thermo)	170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17, 11 [kDa]
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo)	250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10 [kDa]

2.10 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers.net synthetisiert, lyophilisiert geliefert und durch Lösen in entsprechenden Volumina an ddH₂O auf eine Konzentration von 50 pmol/μl eingestellt. Die angegebenen Nummern der Oligonukleotide beziehen sich auf die laborinterne Sammlung. Bei Oligonukleotiden, die mit GATC gekennzeichnet sind, handelt es sich um Standardprimer der Firma GATC.

2.10.1 Oligonukleotide für die Klonierung

Nr.	Name	Sequenz (5' → 3')
C-1523	CT0849E_for	ACAATTTACACAGAATCTTAAAGAGAGAAATTAACATG TCAGCACCAACCTCACA
C-1524	CT0849E_rev	CAGGAGTTCAATGGTGATGGTGATGATGGTGGTGATGGTG AGACAGGGGTTTATTTAATTG
C-1541	EFTu_pFT25_for	ACAATTTACACAGAATCTTAAAGAGAGAAATTAACATG TCAAAAGAAACTTTTCA
C-1542	EFTu_pFT25_rev	CAGGAGTTCAATGGTGATGGTGATGATGGTGGTGATGGTG AGCATTGATCTTTGAAATCG
C-1831	pFT25_CT017_for	ACAATTTACACAGAATCTTAAAGAGAGAAATTAACATG CTCATTTTGGCCCTTC
C-1832	pFT25_CT017_rev	CAGGAGTTCAATGGTGATGGTGAGAGAGGTGTGCCCTTC TTTTACTGACA
C-1833	pFT25_CT503_for	ACAATTTACACAGAATCTTAAAGAGAGAAATTAACATG TGGCTTTGGTCTTTAGT
C-1834	pFT25_CT503_rev	CAGGAGTTCAATGGTGATGGTGATGATGGTGGTGATGGTG AACCTCTTCTTTCGCTAAAA
C-1835	pFT25_CT759_for	ACAATTTACACAGAATCTTAAAGAGAGAAATTAACATG GAGCAAGAAATAGAGTA
C-1836	pFT25_CT759_rev	CAGGAGTTCAATGGTGATGGTGATGAGAGGTGTCTGAATTC GTAATCTATCCC
C-1837	pFT25_CT568_for	ACAATTTACACAGAATCTTAAAGAGAGAAATTAACATG CGGATCACTCGTTCG
C-1838	pFT25_CT568_rev	CAGGAGTTCAATGGTGATGGTGATGATGGGAGGTGTCTTT CTAAACATAAACACC
C-1839	pFT25_CT142_for	ACAATTTACACAGAATCTTAAAGAGAGAAATTAACATG AGTGATTCTGACAAAAT
C-1840	pFT25_CT142_rev	CAGGAGTTCAAGAGAGAGAGGTGTCTCTCTATCTCTGGGT ATA
C-1841	pFT25_CT868_for	ACAATTTACACAGAATCTTAAAGAGAGAAATTAACATG TCTGATCTACAATCCT
C-1842	pFT25_CT868_rev	CAGGAGTTCAATGGTGATGGTGATGATGGTGGTGAGGTGG AAAAGAGCTTTTGGCTTCAG

C-1843	pFT25_CT875_for	ACAATTTACACAGAATCTTAAAGAGAGAAAATTAACATG AGCATCGGGGAGTAG
C-1844	pFT25_CT875_rev	CAGGAGTTCAATGGTGTATGGTGTATGATGGTGGAGGTGTTT CCTATCGACTTCTCTATT
C-1845	pFT25_CT623_for	ACAATTTACACAGAATCTTAAAGAGAGAAAATTAACATG AAAAATACTTTTATAAAG
C-1846	pFT25_CT623_rev	CAGGAGTTCAATGGTGTATGGTGTATGATGGTGGTGTGAGAATG AAGAAATTAACCTAG
C-1847	pFT25_CT289_for	ACAATTTACACAGAATCTTAAAGAGAGAAAATTAACATG GTGATCCCTAAGGTGGA
C-1848	pFT25_CT289_rev	CAGGAGTTCAATGGTGTATGGTGTATGATGGAGGTGTGGTTG CGTTGAGCCTCCTC
C-1849	pFT25_CT289_rev295	AGTCCGTCTCCGAAGAATCACACCGGTATTGAGAGCATT GCCTGTTTGGTTGGAG
C-1850	pFT25_CT289_for317	TGCAGAAGCTGTTGCCGAGCTCCAACCAGGCGCATAATG CTCATCAATACCGTTGT
C-1851	pFT25_CT389_for	ACAATTTACACAGAATCTTAAAGAGAGAAAATTAACATG ATGAAACCTCTACGTTTC
C-1852	pFT25_CT389_rev	CAGGAGTTCAATGGTGTATGGTGTATGATGGTGGTGTGAGGTGG AAGCCATAACTTAATCGAAA
C-2184	CT017_pKM55_fwd	GACTCCGTCCAGTATTGATCGGGAGAGCCGAGCGAGCATG CTCATTTTTGCCCCTTC
C-2185	CT017_pKM55_rev	ACCACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATTG CCCCTCTTTTACTGACA
C-2186	CT142_pKM55_fwd	GACTCCGTCCAGTATTGATCGGGAGAGCCGAGCGAGCATG AGTGATTCTGACAAAAT
C-2187	CT142_pKM55_rev	ACCACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATT CTCCTATCTCTGGGTATA
C-2188	CT503_pKM55_fwd	GACTCCGTCCAGTATTGATCGGGAGAGCCGAGCGAGCAT GTGGCTTTGGTCTTTAGT
C-2189	CT503_pKM55_rev	ACCACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATAA CCTCTTCTTTTCGCTAAAA
C-2261	pET24_17_for	TAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT ATGCTCATTTTTGCCCTTTC
C-2262	pET24_17_rev	CTTTGTTAGCAGCCGGATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGG TGCCCCTCTTTTACTGACA
C-2263	pET24_503_for	TAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT ATGTGGCTTTGGTCTTTAGT
C-2264	pET24_503_rev	CTTTGTTAGCAGCCGGATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGG AACCTCTCTTTTCGCTAAAA
C-2279	pET24_849_for	TAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT ATGTCAGCACCAACCTCAC
C-2280	pET24_849_rev	TTTGTTAGCAGCCGGATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGG GACAGGGGTTTATTTAATTG
C-2281	pET24_875_for	TAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT ATGAGCATCGGGGAGTAG
C-2282	pET24_875_rev	TTTGTTAGCAGCCGGATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT TCCCTATCGACTTCTCTATT
C-2315	CT875_pKM55_fwd	GACTCCGTCCAGTATTGATCGGGAGAGCCGAGCGAGCAT GAGCATCGGGGAGTAG
C-2316	CT875_pKM55_rev	ACCACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATTT CCCTATCGACTTCTCTATT
C-2319	mCherry_CT503_for	ATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACC ATGTGGCTTTGGTCTTTAGT
C-2320	mCherry_CT503_rev	TGGCCATGTTATCCTCCTCGCCCTTGCTCACCATGGTGGC AACCTCTCTTTTCGCTAAAA
C-2393	mCherry_CT017_for	ATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACC ATGCTCATTTTTGCCCTTTC
C-2394	mCherry_CT017_rev	TGGCCATGTTATCCTCCTCGCCCTTGCTCACCATGGTGGC TGCCCCTCTTTTACTGACA

C-2436	Y2H(BD)_CT017_hin	GCTGATCTCAGAGGAGGACCTGCATATGGCCATGGAGGCC ATGCTCATTTTTGCCCCTTC
C-2437	Y2H(BD)_CT017_her	GGGTTATGCTAGTTATGCGGCCGCTGCAGGTCGACGGAT TTATGCCCTTCTTTTACTG
C-2438	Y2H(BD)_CT017C_hin	GCTGATCTCAGAGGAGGACCTGCATATGGCCATGGAGGCC GGTTTACAATCGTTGGTACA
C-2439	Y2H(BD)_CT017N_her	GTTATGCTAGTTATGCGGCCGCTGCAGGTCGACGGATTTA TGGGACATCCTTAAATCTT
C-2443	Y2H(pEB1)_CT017_hin	CGACGTACCAGATTACGCTCATATGGCCATGGAGGCCAGT ATGCTCATTTTTGCCCCTTC
C-2444	Y2H(pEB1)_CT017_her	GGTTTTTCAGTATCTACGATTCATGGTGATGGTGATGGTG TGCCCTTCTTTTACTGACA
C-2571	pFT25_Integrin_for	TTACACAGAATTCATTAAGAGGAGAAATTAACATATGCA AACAGATGAAAATAGATGTT
C-2572	pFT25_Integrin_rev	CAGGAGTTCAATGGTGATGGTGATGATGGTGATGGTG GTCTGGACCAGTGGGACA

2.10.2 Oligonukleotide zur Sequenzierung

Nr.	Name	Sequenz (5' → 3')
C-585	Integrin seqB	GAGGAATGTTACACGGCTGC
C-587	Integrin seqD	GCCAGCAACGGACAGATCTG
C-795	seq pKM32 tim hin	TTTCGTCTTCACCTCGAGAAA
C-1114	Seq pEB1 s	GACTCACTATAGGGCGAGCG
C-1115	Seq pEB1 as	CAGTATCTACGATTCATGGTG
C-1292	pFT25 seq-rev	CAATAAAAAACGCCCGGCGG
C-1401	seq-pKM55-s	TATCGATTCTAGCCGAGTCC
C-1402	seq-pKM55-as	ACACGCTGAACTTGTGGCCG
C-1490	Seq hin mCherry	TTTAGTGAACCGTCAGATCC
C-1576	momp_gCtrE_for	TGCCGCCAGAAAAAGATAGC
C-1577	momp_gCtrE_rev	ACCGAAATCGAGCCCAGAAA
C-1823	CT875_seq_intern	TCCGGATCAAGTAGTCGTAC
C-1891	Intern_seq_CT623	CAGAGATTGGTCGCTCTGG
C-1950	Seq_mCherry_rev	CTTGAAGCGCATGAACTC
C-2095	Seq_pET24a_Fwd	GATAACAATTCCCCTCTAG
C-2096	Seq_pET24a_Rev	CTTTCGGGCTTTGTTAG
GATC	pEGFP_N	CCGTCCAGCTCGACCAG
GATC	CMV-F	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
GATC	pEGFP_C2-RP	TTTAAAGCAAGTAAAACCTC
GATC	pET-24a	GGGTTATGCTAGTTATTGCTCAG
GATC	pGBT9-FP	AGTGCGACATCATCATCG
GATC	pGBT9-RP	CGTTTTTAAAACCTAAGAGTCAC
GATC	pACT2-FP	GATGATGAAGATACCCAC

2.11 Plasmide

Die aufgeführten Plasmidnummern beziehen sich auf die laborinterne Sammlung.

Nr.	Name	Konstruktion
#2186	pDB1	Integration des N-Terminus von <i>ct017</i> in pFT25 (Baumann).
#2187	pDB2	Integration des C-Terminus von <i>ct017</i> in pFT25 (Baumann).
#2192	pDB3	pFT25 mit <i>ct017</i> D1, Deletion der ersten 129 nt (Baumann).
#2193	pDB4	pFT25 mit <i>ct017</i> D2, Deletion der ersten 285 nt (Baumann).
#2194	pDB5	pFT25 mit <i>ct017</i> D3, Deletion der ersten 468 nt (Baumann).
#2195	pDB6	pFT25 mit <i>ct017</i> Deletion der ersten SH3-Domäne (Δ 1SH3, nt 130-285) (Baumann).
#2403	pDB7	pFT25 mit <i>ct017</i> Deletion beider SH3-Domäne (Δ SH3, nt 130-468) (Baumann).
#1662	pEB1	pGADT7 mit Integration eines His6-Fragments (Becker).
#1995	pEB35	pEB1 mit EGE-Rezeptor ohne Transmembrandomäne AS 1 - 1209 (Becker).
#2063	pET24 CEN ARS URA	pET24 Expressionsvektor mit His ₆ -Tag mit integrierter CEN ARS URA Kasette (Engel).
#1910	pAF164	mCherry mit <i>cpn0592</i> , Lda3-Homolog (Herbst).
#1612	pFT8	Expressionsvektor mit N-term. GST- und C-term. His ₆ -Tag (Fechtner).
#1924	pFT25	Integration eines C-terminalen 10xHis-Tags unter Wegnahme des N-terminalen 6xHis-Tags in pKM32 (Fechtner).
#2139	pFT35	pFT8 mit <i>CtrE omcB</i> FL (ohne Signalsequenz) (Fechtner).
#1301	pGBKT7	Clontech, 2-Hybrid-System
#1302	pGBKT7-53	Clontech, 2-Hybrid-System, Positivkontrolle in Verbindung mit #1676
#1677	pGBKT7-Lam	Clontech, 2-Hybrid-System, Negativkontrolle in Verbindung mit #1676
#1675	pGADT7	Clontech, 2-Hybrid-System
#1676	pGADT7-T	Clontech, 2-Hybrid-System
#2408	pHcEGFPN1	GFP-Transfektionsvektor (M. J. Humphries, Uni Manchester)
#2409	pHcEGFPN1 Integrin- β 1	pHcEGFPN-1 mit humanen Integrin- β 1 (M. J. Humphries, Uni Manchester)
#1877	pKM37	pKM33, (GST-Expressionsvektor) mit <i>Cpn</i> GroEL-1 (Mölleken).
#1878	pKM38	pKM32 mit <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> Invasin AD Variante (Mölleken).
#1740	pKM50	pKM32 mit Inv497 aus <i>Y. pseudotuberculosis</i> (Mölleken).
#1895	pKM55	Humaner GFP-Transfektionsvektor (Mölleken).
#2358	pKM80	pKM95 mit Rab11A
#1720	mCherry	Humaner mCherry-Transfektionsvektor (Kerres).
#2027	pSK2	pEB1 mit Integrin- β 1 ohne Transmembrandomäne AS 1 - 728 (Kobus).
#2028	pSK3	pEB1 mit LDL-Rezeptor ohne Transmembrandomäne AS 1 - 787 (Kobus).
#2244	pSK5	pFT25 mit Deletion der zweiten SH3-Domäne (Δ 2SH3, nt 310-468) in <i>ct017</i> (Kobus).
#1859	pST30	PCR auf genomische <i>Cpn</i> DNA mit Primer C-1541 und C-1542. Integration in den <i>Sma</i> I geöffneten pFT25.
#1963	pST33	Amplifikation des Gens <i>ct849</i> mit C-1523 + C-1524 auf genomischer <i>CtrE</i> DNA. Integration in den <i>Sma</i> I geöffneten pST25.
#1972	pST42	Amplifikation des Gens <i>ct017</i> mit C-1831 + C-1832 auf #pST34. Integration in den <i>Sma</i> I geöffneten pFT25.
#1973	pST43	Amplifikation des Gens <i>ct875</i> mit C-1843 + C-1844 auf #pST35. Integration in den <i>Sma</i> I geöffneten pFT25.
#1974	pST44	Amplifikation des Gens <i>ct503</i> mit C-1833 + C-1834 auf #pST36. Integration in den <i>Sma</i> I geöffneten pFT25.
#1975	pST45	Amplifikation des Gens <i>ct795</i> mit C-1835 + C-1836 auf #pST37. Integration in den <i>Sma</i> I geöffneten pFT25.

#1976	pST46	Amplifikation des Gens <i>ct568</i> mittels <i>Taq</i> -PCR (C-1837 + C-1838) auf #pST38. Homologe Rekombination in den <i>SmaI</i> geöffneten pFT25.
#1977	pST47	Amplifikation des Gens <i>ct142</i> mit C-1839 + C-1840 auf #pST40. Integration in den <i>SmaI</i> geöffneten pFT25.
#1978	pST48	Amplifikation des Gens <i>ct868</i> (Beginn nach der Transmembrandomäne) mit C-1841 + C-1842 auf #pST41. Homologe Rekombination in den <i>SmaI</i> geöffneten pFT25.
#1979	pST49	Amplifikation des Gens <i>ct389</i> mit C-1851 + C-1852 auf genomischer <i>CtrE</i> DNA. Integration in den <i>SmaI</i> geöffneten pFT25.
#1980	pST50	Amplifikation des Gens <i>ct623</i> mit C-1845 + C-1846 auf genomische <i>CtrE</i> DNA. Integration in den <i>SmaI</i> geöffneten pFT25.
#2253	pST55	Integration des Gens <i>ct017</i> (PCR mit C-2184 und C-2185 auf #pST42) in den <i>SmaI</i> geöffneten pKM55.
#2254	pST56	Integration des Gens <i>ct142</i> (PCR mit C-2186 und C-2187 auf #pST47) in den <i>SmaI</i> geöffneten pKM55.
#2255	pST57	Integration des Gens <i>ct503</i> (PCR mit C-2188 und C-2189 auf #pST44) in den <i>SmaI</i> geöffneten pKM55.
#2256	pST58	Integration des Gens <i>ct875</i> (PCR mit C-2315 und C-2316 auf #pST43) in den <i>SmaI</i> geöffneten pKM55.
#2257	pST59	Integration des Gens <i>ct503</i> (PCR mit C-2263 und C-2264 auf #pST36) in den <i>NdeI</i> und <i>NoI</i> geöffneten pET24 CEN ARS URA.
#2258	pST60	Integration des Gens <i>ct849</i> (PCR mit C-2279 und C-2280 auf #pST33) in den <i>NdeI</i> und <i>NoI</i> geöffneten pET24 CEN ARS URA.
#2259	pST61	Integration des Gens <i>ct875</i> (PCR mit C-2281 und C-2282 auf #pST35) in den <i>NdeI</i> und <i>NoI</i> geöffneten pET24 CEN ARS URA.
#2292	pST63	Amplifikation des Gens <i>ct503</i> mit C-2319 und C-2320 auf #pST44 anschließender Klonierung in den <i>SmaI</i> geöffneten mCherry.
#2293	pST64	Amplifikation des Gens <i>ct107</i> mit C-2393 und C-2394 auf #pST42) und Integration in den <i>SmaI</i> geöffneten mCherry.
#2294	pST65	Amplifikation des Gens <i>ct017</i> (PCR mit C-2443 und C-2444 auf #pST42) und Integration in den <i>SmaI</i> geöffneten pEB1.
#2312	pST73	Amplifikation des Gens <i>ct017</i> (PCR mit C-2436 und C-2437 auf #pST42) und Integration in den <i>SmaI</i> geöffneten pGBKT7.
#2313	pST74	Amplifikation des N-Terminus von <i>ct017</i> mit C-2436 und C-2439 auf #pST42 und Integration in den <i>SmaI</i> geöffneten pGBKT7.
#2314	pST75	Amplifikation des C-Terminus von <i>ct017</i> mit C-2438 und C-2439 auf #pST42 und Integration in den <i>SmaI</i> geöffneten pGBKT7.
#2404	pST76	Amplifikation der ecto Domäne von Integrin- β 1 mit C-2571 und C-2572 auf #pKM35 Integration in den <i>SmaI</i> geöffneten pFT25.
#2394	Integrin α 5	Integrin α 5 mit einem GFP-Transfektionsvektor (Addgene).

2.12 Zellen und Zelllinien

2.12.1 Prokaryotische Zellen und Zelllinien

Chlamydia trachomatis

Serovar E DK-20 isoliert im Institute of Ophthalmology, London, erhalten von Dr. Straube aus Jena

Serovar L2/434/Bu ATCC Nr. VR-902B
(kultiviert und bereitgestellt von K. Mölleken)

Chlamydia pneumoniae

GiD: Herkunft: Gießener Isolat eines Patienten mit akuter Bronchitis
(Jantos, Heck *et al.* 1997)
(kultiviert und bereitgestellt von A. Engel)

Escherichia coli

BL21: *F⁻ ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm* (DE3) (Invitrogen)

Origami (DE3): *Δara-leu 7697 ΔlacX74 ΔphoAPvuII phoR araD139 galE galK
rpsLF⁺ [lac⁺ (lac^l)pro] gor522::Tn10(Tc^R) trxB::kan* (DE3)
(Novagen)

Rosetta: *F⁺ pmoT hsdSB(r_B-m_B-) gal dcm* (DE3) pRARE (*argU, argW, ileX,
gbyT, leuW, proL*) (Novagen)

XL₁-blue: *supE44hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac-[F⁺ proAB lacI^q
ZΔM15Tn10(tetr)]* (Stratagene)

2.12.2 Eukaryotische Zellen und Zelllinien**Adhärente Zelllinien**

HEp-2 Zelllinie: epitheliale Larynxcarzinom-Zelllinie menschlichen Ursprungs, HeLa-Morphologie, 46 Chromosomen (ATCC Nr.: CCL-23)

Hec-1B Zelllinie: endometriale Zelllinie menschlichen Ursprungs (Adenokarzinom) (ATCC Nr.: HTB-1B)

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

Primäre epitheliale

Eileiterzellen: Isolation aus Spendermaterial durch Dr. Stefan Jerchel, Universität Lübeck

GD25 Zelllinie: Maus Fibroblastenzelllinie Nullmutante für Integrin-β1 (Fassler, Pfaff *et al.* 1995) Geschenk von Dr. Staffan Johansson Universität Uppsala.

GD25 + Integrin- β 1: Komplementierte GD25 Zelllinie (stabile Integration von Integrin- β 1A) (Wennerberg, Lohikangas *et al.* 1996) Geschenk von Dr. Staffan Johansson Universität Uppsala.

Saccharomyces cerevisiae

AH109 *MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4 Δ gal80 Δ*
LYS2::GAL1UAS - GAL1TATA - HIS3::GAL2UAS - GAL2TATA -
ADE2 UR43::MEL1UAS - MEL1TATA - LacZ MEL1
 (Clontech)

CEN.PK 2-1C: *MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3- Δ 1 MAL2-8^cSUC2*
 (Entian, Schuster *et al.* 1999)

2.13 Medien und Medienzusätze

2.13.1 Medien für *E. coli*

LB-Medium:

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

In 1 l ddH₂O lösen und autoklavieren. Zugabe von Ampicillin (50 mg/l), Chloramphenicol (20 mg/l) oder Kanamycin (10 mg/l) flüssig bzw. (15 mg/ml) fest.

2.13.2 Medien für *S. cerevisiae*

YPD⁺-Medium:

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

In 1 l ddH₂O lösen und autoklavieren.

SD-Minimalmedium (Platten):

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

SD-Minimalmedium (flüssig):

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

Für Agarplatten die Komponenten in 1 l ddH₂O lösen und vor dem Autoklavieren mit 1 M NaOH auf pH 6 einstellen. Zur Selektion wird die entsprechende Aminosäure oder Nukleobase nicht mit in den Aminosäuremix gegeben. Selektionsplatten für den Hefe-zwei-Hybrid können nach dem Autoklavieren mit 2 ml X- α -Gal (Stocklösung 20 mg/ml in DMF) und/oder 2,5 μ M 3AT versetzt werden.

Aminosäuremix +24:

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

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

2.13.3 Zell- und Chlamydienkulturmedium

Zellkulturmedium (+5):

500 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	
50 ml FKS (hitzeinaktiviert 1 h bei 56°C)	Endkonzentration: 10 %
5 ml MEM nicht essentielle Aminosäuren (100x)	Endkonzentration: 1x
5 ml MEM Vitamine (100x)	Endkonzentration: 1x
5 ml Fungizone (250 µg/ml)	Endkonzentration: 2,5 µg/ml
0,5 ml Gentamycin (50 mg/ml)	Endkonzentration: 50 µg/ml

Die Komponenten wurden unter sterilen Bedingungen zusammen pipettiert, gemischt und bei 4 °C gelagert. Zellkulturzusätze wurden von der Firma Life Technologie bezogen.

Chlamydienkulturmedium:

Das Chlamydienkulturmedium entspricht dem Zellkulturmedium, enthält zusätzlich aber Cycloheximid in einer Konzentration von 1,2 mg/ml (Stocklösung: 1 mg Cycloheximid in 10 ml HBSS lösen, aliquotieren und bei -20°C lagern).

3 Methoden

3.1 Kultivierung humaner Zellen

3.1.1 Passagieren adhärenter Zellen durch Trypsinbehandlung

- Aus einer konfluent mit Zellen bewachsenen Zellkulturflasche (75 cm²) wird das Zellkulturmedium abgenommen und der Zellrasen einmal mit 10 ml HBSS gewaschen.
- Anschließend werden die Zellen mit 5 ml Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung überschichtet und bis zum Ablösen der Zellen inkubiert. Durch leichtes Schwenken der Flasche wird das Ablösen erleichtert.
- Durch Zugabe von 5 ml Zellkulturmedium und vorsichtiges Mischen der Suspension wird die Trypsin-Aktivität gestoppt.
- Die Suspension wird in ein 12 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und 10 min bei 43,3 x g (500 Upm, Hettich Rotanta 460R) zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen und das Sediment in 5 ml Zellkulturmedium vorsichtig resuspendiert.
- Zur Passage in 75 cm² Zellkulturflaschen werden 15 ml Zellkulturmedium vorgelegt und 1 ml der Zellsuspension hinzugefügt und die Zellen 2 Tage bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert.
- Zur Passage in 25 cm² Zellkulturflaschen werden 5 ml Medium vorgelegt und 0,2 µl bis 0,5 µl der Zellsuspension hinzugegeben. Die Zellen werden im Anschluss 2 Tage inkubiert, bis sie einen konfluenten Zellrasen bilden.
- Zur Passage in 24-Well Platten wird jeweils ein steriles Deckgläschen in jede Vertiefung gelegt und die Zellen je nach Bedarf 1:10 bis 1:40 in Zellkulturmedium verdünnt und je 1 ml Zellsuspension pro Vertiefung ausgebracht. Die Zellen werden 1-2 Tage bis zu Erlangung des gewünschten Dichtegrads inkubiert.
- Alternativ kann die Zellzahl der Suspension mit einer Thoma Zählkammer bestimmt werden. Hierfür werden 5 µl der unverdünnten Zellsuspension in die Zählkammer eingefüllt. Die Anzahl der Zellen wird unter dem Binokular bestimmt und unter Berücksichtigung des Zählkammer-spezifischen Verdünnungsfaktors die Zellzahl pro ml errechnet.

3.1.2 Einfrieren eukaryotischer Zellen

- Die Zellen werden wie unter 3.1.1 beschrieben durch Trypsinbehandlung abgelöst und sedimentiert.
- Das Sediment wird in 1 ml Einfriermedium (Biofreeze) resuspendiert und die Zellsuspension in zwei Kryo-Röhrchen überführt.
- Die Zellen werden schonend in einer Isopropanol-Einfrierbox bei -80 °C eingefroren.

3.2 Chlamydienkultur

Chlamydien sind obligat intrazellulär lebende Bakterien, die für ihre Vermehrung Wirtszellen benötigen. In der Zellkultur kann die Infektion des Zellrasens durch Zentrifugation der Bakterien unterstützt werden, da das Eindringen der Bakterien erleichtert wird. Das Chlamydienkulturmedium enthält Cycloheximid, ein Inhibitor der eukaryotischen Proteinbiosynthese, welches die Zellteilung der Humanzellen verringert und die vermehrte ATP-Bildung fördert. Beides wirkt sich positiv auf die Zellteilung und Entwicklung der Chlamydien aus.

3.2.1 Passagieren von Chlamydien in 25 cm^2 Zellkulturflaschen

Größere Mengen an Chlamydien werden zur Generierung eines eigenen Pools, gradienten gereinigter EBs oder zur Gewinnung von genomischer DNA benötigt. Die Aufzucht des in dieser Arbeit verwendeten *Chlamydia trachomatis* Serovar E Stamms erfolgte im Labor zuvor nicht, daher wurde der Erreger von Prof. Dr. Straube zur Verfügung gestellt. Die Infektion wurde im Labor etabliert und als Grundstock ein infektiöser Pool angelegt.

- Von konfluenten HEp-2 Zellen in 25 cm^2 Zellkulturflaschen wird das Medium entfernt.
- 1 ml Chlamydien suspension (Lagerung bei -80 °C) wird aufgetaut und 200 μl Suspension werden durch Zugabe von Zellkulturmedium auf ein Volumen von 40 ml aufgefüllt, gut gemischt und je 5 ml in 8 Zellkulturflaschen pipettiert.
- Die Flaschen werden verschlossen und für 60 min bei $1560 \times g$ (3000 Upm, Hettich Rotanta 460R) und 30 °C zentrifugiert und anschließend 60 min zur Adsorption bei 37 °C und 6 % CO_2 im Brutschrank inkubiert.
- Das Medium wird abgenommen und durch 5 ml Chlamydienkulturmedium ersetzt (2.13.3) und die infizierte Zellen für 48 h bei 37 °C und 6 % CO_2 im Brutschrank inkubiert.

- Nach 2 Tagen wird der Grad der Infektion mikroskopisch begutachtet, wobei deutliche sichtbare Inklusionen auf eine starke Infektion hinweisen. In diesem Fall können die Chlamydien aus einer Flasche auf vier neue Flaschen mit konfluenten HEp-2 Zellen aufgeteilt werden.
- Mit Hilfe eines sterilen Zellschabers werden die infizierte Zellen vom Flaschengrund gelöst und die Suspension von bis zu sechs Flaschen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen vereint.
- Die Suspension wird 45 s bei 40 % Leistung mit dem Ultraschallstab (Snonplus HD2200, Bandelin) behandelt und für 10 min bei 1560 x g (3000 Upm, Hettich Rotanta 460R) und 20 °C zum Pelletieren von Humanzelltrümmern zentrifugiert (Differentialzentrifugation).
- Der Überstand wird in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und erneut zentrifugiert.
- Der Überstand des zweiten Zentrifugationsschrittes wird zur Infektion neuer Zellkulturflaschen oder der Generation eines chlamydialen Pools verwendet. Alternativ können die Chlamydien sedimentiert und später weiterverarbeitet werden.

3.2.2 Herstellung eines chlamydialen Pools

- Zur Herstellung von Chlamydien suspensionen mit geringer Anzahl infektiöser Partikel wird der Überstand stark infizierter Zellen nach der Differentialzentrifugation (s. Kapitel 3.2.1) 1:1 mit SPG-Puffer verdünnt.
- Der so erzeugte „Chlamydien-Pool“ wird in 1 ml Aliquots portioniert und bei -80 °C gelagert.

3.2.3 Sedimentation und Einfrieren von Chlamydien

- Nach der Differentialzentrifugation (s. Kapitel 3.2.1) wird die Chlamydien suspension in ein steriles Ultrazentrifugenröhrchen überführt und 30 min bei 30.000 x g und 4 °C (Beckmann J-25) sedimentiert.
- Der Überstand wird verworfen und das Sediment in 1 ml SPG-Puffer, unter Zuhilfenahme des Ultraschallbads resuspendiert.
- Die Suspension wird in ein Kryo-Röhrchen überführt und bei -80 °C gelagert.

3.2.4 Reinigung von Chlamydien mittels Gastrografin-Gradient

Chlamydien werden mittels Dichtegradientenzentrifugation von eukaryotischen Zelltrümmern gereinigt. Für die Reinigung werden die geernteten Chlamydien von bis zu 32 Zellkulturflaschen auf einem Dichtegradienten aus Gastrografin aufgetrennt.

- Die differentialzentrifugierte und in Kryo-Röhrchen eingefrorene Chlamydien suspension wird vorsichtig aufgetaut und bei 21.885 x g (15.000 Upm Hereaus Biofuge Primo R) und 4 °C für 30 min sedimentiert.
- Das Pellet wird in 1 ml HBSS unter Zuhilfenahme des Ultraschallbads vollständig resuspendiert.
- In ein steriles Zentrifugenröhrchen werden 9 ml 30 % Gastrografin Lösung gegeben. Die Chlamydien suspension wird vorsichtig auf pipettiert und bei 30000 x g (Beckmann J2-21) und 4 °C 1 h zentrifugiert.
- Das Pellet wird zweimal mit 1 ml HBSS gewaschen und für 30 min bei 4 °C und 21.885 x g (15.000 Upm, Heraeus Biofuge Primo R) zentrifugiert.
- Das Chlamydien pellet wird in 1 ml SPG aufgenommen, vollständig resuspendiert, aliquotiert (250 µl) und bei -80 °C eingefroren.

3.2.5 Bestimmung der Infektiösität von chlamydialen Suspensionen

Zur Bestimmung der Infektiösität einer gewonnenen Chlamydien suspension wird die Anzahl an einschlussbildender Einheit (IUF: „*infection forming unit*“) pro ml mittels Titration bestimmt.

- Die zu bestimmende Chlamydien suspension (Gradient oder Pool) wird in Verdünnungsstufen von 1:10 bis 10^{-05} schrittweise mit Zellkulturmedium verdünnt.
- In einer 96-Well Mikrotiterplatte werden HEp-2 Zellen zu einem konfluenten Zellrasen angezogen und in jede Vertiefung werden 100 µl der Verdünnung pipettiert. Die Titration erfolgt in 3-fach Bestimmung.
- Die Platte wird für 60 min bei 1560 x g (3000 Upm, Hettich Rotanta 460R) und 30 °C zentrifugiert und im Anschluss erfolgt die Adsorption für 60 min bei 37 °C und 6 % CO₂ im Brutschrank.
- Das Medium wird abgenommen, durch 200 µl Chlamydienkulturmedium pro Vertiefung ersetzt und die infizierten Zellen für 24 h im Brutschrank inkubiert.
- Der Überstand wird abgenommen und die Zellen mit 100 µl Methanol pro Vertiefung für 5 min fixiert.

- Die gebildeten Einschlüsse werden durch direkte Immunfluoreszenz gefärbt. Die Einschlüsse je Vertiefung werden mittels Fluoreszenzmikroskop bei 20 x Vergrößerung gezählt und die Zahl der einschlussbildenden Partikel pro ml der Ausgangssuspension errechnet.

3.2.6 Kurzzeitinfektion von Chlamydien

Für die Analyse früher Zeitpunkte der chlamydialen Infektion werden Kurzzeitinfektionen durchgeführt.

- Halbkonfluente Zellen (etwa 5×10^5 Zellen pro Deckgläschen) werden 10 min auf 4 °C abgekühlt und das Medium abgenommen.
- Chlamydien (Pool MOI: 5 oder gradientengereinigte EBs MOI: 20) werden in 200 µl kaltem Zellkulturmedium auf die Zellen pipettiert und für 15 min bei 1560 x g (3000 Upm, Hettich Rotanta 460R) und 4 °C zentrifugiert.
- Direkt im Anschluss wird das Medium abgenommen und gegen 1 ml auf 37 °C vorgewärmtem Zellkulturmedium ersetzt.
- Die Inkubation erfolgt auf 37 °C bei 6 % CO₂ im Brutschrank für 5-90 min.
- Die Zellen können mit 3 % PFA für 20 min fixiert oder für die Lebendfärbung verwendet werden.

3.3 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die verwendeten *S. cerevisiae* Stämme werden bei 30 °C in unter (Kapitel 2.13.2) beschriebenen Fest- und Flüssigmedien kultiviert. Die Anzucht von Flüssigkulturen erfolgt unter rotierendem Schütteln. Die Selektion auf plasmidhaltige Zellen erfolgt durch das Weglassen der entsprechenden Marker-Aminosäure oder Nukleo-Base.

3.3.1 Hefe-zwei-Hybrid-System

Mit Hilfe des Hefe-zwei-Hybrid-Systems kann die direkte Interaktion zweier Proteine *in vivo* untersucht werden. Dieses System basiert auf dem Transkriptionsfaktor Gal4p der Bäckerhefe *S. cerevisiae*. Der Transkriptionsfaktor besteht aus zwei funktionellen Domänen, der DNA-Bindedomäne (BD), die an die UAS (Upstream-Aktivierungssequenz) des *GAL*-Promotors binden und die Aktivierungsdomäne (AD), die eine Interaktion mit der basalen Transkriptionsmaschinerie eingeht und so die Transkription aktiviert (Abbildung 3.1). Zum Nachweis

einer Protein-Protein Interaktion werden die zu testenden Gene durch Integration in den Vektor pGBKT7 mit der BD-Domäne bzw. durch Verwendung des Vektors pEB1 mit der AD-Domäne fusioniert. Beide Konstrukte werden in *S. cerevisiae* kotransformiert, sodass eine positive Interaktion der Testproteine dazu führt, dass die Funktionalität des Gal4p Transkriptionsfaktors wieder hergestellt wird. DNA-Bindedomäne und Aktivierungsdomäne gelangen in räumliche Nähe und induzieren die Transkription der Reportergene (*HIS3*, *ADE2* und *MEL1*), die in das Genom des Stamms AH109 integriert sind, wodurch die Hefen auf den verschiedenen Selektionsmedien Kolonien bilden können.

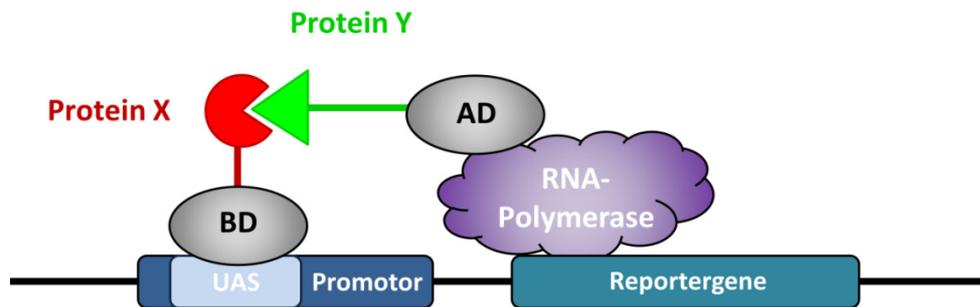


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Hefe-zwei-Hybrid-Systems.

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

3.3.2 Nachweis der Proteinexpression

- Zur Kontrolle der Proteinexpression wird eine 5 ml Hefekultur in Selektivmedium (SD Trp⁻Leu⁻) angesetzt und über Nacht bei 30°C inkubiert.
- Im Anschluss wird die Kultur auf frisches Selektivmedium mit einer OD₆₀₀ von 0,2 überimpft und erneut 4-5 h inkubiert bis zu einer OD₆₀₀ von 1.
- 3 OD₆₀₀ an Zellen werden 1 min bei 13.000 U_{rpm} (Heraeus Biofuge pico) pelletiert.
- Die Zellen werden in 50 µl 8 M Harnstoff, 0,5 % SDS und 0,2 % Sarkosyl resuspendiert, mit 15 µl Protein-Ladepuffer und 10 µl 1 M DTT versetzt und 10 min bei 100 °C gekocht und anschließend auf Eis abgekühlt.
- 30 µl der Proteinprobe werden auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Westernblot analysiert.

3.3.3 Serieller Verdünnungs-Tropftest

- Von einer ü/N-Hefekultur in Selektivmedium (SD Trp⁻Leu⁻) wird eine OD₆₀₀ von 0,2 in eine frische 5 ml Kultur überimpft und 4-5 h bei 30 °C inkubiert.
- Unter Zuhilfenahme einer Zählkammer wird die Zellzahl pro ml bestimmt.
- 2 x 10⁶ Zellen werden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und auf 1 ml mit sterilen ddH₂O aufgefüllt.
- Durch serielle Verdünnung um den Faktor 10 werden die Zellkonzentrationen 2 x 10⁵/ml, 2 x 10⁴/ml und 2 x 10³/ml angesetzt.
- Durch Auftragen von 5 µl jeder Verdünnung auf Selektivplatten werden 10.000, 1000, 100 bzw. 10 Zellen aufgetropft. Das Wachstum der Hefen erfolgt für mindestens 2 Tage bei 30 °C.

3.4 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Anzucht der verwendeten *E. coli* Stämme erfolgte in LB-Medium in aeroben Schüttelkulturen (140 Upm) bei 37 °C. Auf Plasmid-Transformanten wird über die Zugabe von 50 µg/ml Ampicillin oder 15 µg/ml Kanamycin zum Medium selektioniert. Der Rosetta *E. coli* Stamm benötigt zusätzlich die Selektion auf Chloramphenicol (20 µg/ml), da er ein Plasmid trägt, das für sechs seltene tRNAs kodiert.

3.4.1 Herstellung von elektrokompetenten *E. colis*

- Zellen aus der Stammsammlung werden auf einer LB-Platte mit Selektionsmarker ausgestrichen und ü/N bei 37°C inkubiert. Zum Beispiel XL₁-blue auf LB-Platten mit Tetrazyklin (30 µl/Platte), Rosetta auf LB-Platten mit Chloramphenicol (20 µg/ml).
- Zwei 5 ml Kulturen werden angesetzt und ü/N bei 37 °C inkubiert.
- Mit jeder ü/N-Kultur wird 1 l LB-Medium überimpft und bei 37 °C schüttelnd inkubiert bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7 - 0,8.
- Die 1 l Kulturen werden 30 min auf Eis abgekühlt und 15 min bei 4000 Upm (Beckmann J2-21) und 4 °C abzentrifugiert.
- Die pelletierten Zellen jeder Kultur werden zweimal mit 1000 ml eiskaltem, sterilem ddH₂O gewaschen.
- Die Pellets werden in je 20 ml eiskaltem, sterilem 10 %igem Glycerin resuspendiert und erneut 15 min bei 4000 Upm und 4 °C zentrifugiert.

- Die Zellen werden in je 2-3 ml 10 %igem Glycerin resuspendiert, aliquotiert und 1 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren.
- Die elektrokompententen Zellen werden bei -80 °C gelagert, die Transformationseffizienz wird durch eine Testtransformation mit 0,01 ng pBIISK+ in 1 µl Volumen bestimmt.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Generierung chlamydialer genomischer DNA

Für die Gewinnung geringer Mengen genomischer DNA, wie sie für Klonierungen benötigt wird, ist die Chlamydien-Ernte von vier infizierten 25 cm² Zellkulturflaschen ausreichend.

- Chlamydien auftauen und die Bakterien 20 min bei 4 °C und 15.000 Upm (Heraeus BiofugePrimo R) sedimentieren.
- Das Pellet wird in 100 µl sterilem ddH₂O aufgenommen und mit 1 µl Protease K (40 mg/ml) versetzt und 3 h bei 55 °C inkubiert.
- Im Anschluss wird die Protease K 30 min bei 100 °C hitzeinaktiviert.
- Dem Ansatz werden 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zugesetzt. Die Emulsion gut mischen, 5 min bei RT inkubiert und anschließend 10 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert.
- Die DNA-haltige, wässrige obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführen und 10 µl 3 M NaAc pH 5 und 110 µl Isopropanol hinzufügen, die Probe gut mischen und 30 min bei 4 °C und 15.000 Upm (Heraeus BiofugePrimo R) zentrifugieren.
- Die sedimentierte DNA wird mit 70 % EtOH überschichtet und erneut 10 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert und anschließend im Vakuum-Konzentrator (Speed-Vac Vacuum-Konzentrator) getrocknet.
- Die DNA wird in 100 µl sterilem ddH₂O resuspendiert und kann bei -20 °C gelagert werden.

3.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion werden spezifische synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die komplementär zu den Randbereichen der zu amplifizierenden Zielsequenz sind, genutzt, um den dazwischen liegenden Abschnitt zu vervielfältigen. Die Amplifikation verläuft in einem dreiphasigen Zyklus, der in Denaturierung des DNA-Doppelstrangs, Anlagerung

(Annealing) der Oligonukleotide und DNA-Synthese (Elongation), durch eine thermostabile DNA-Polymerase, eingeteilt wird. Auf diese Weise wird eine exponentielle Vermehrung der Zielsequenz erreicht, da jeder neu gebildete Strang als Matrize für die weitere Synthese verwendet wird.

3.5.2.1 Amplifikation von Gensequenzen

Zur Amplifikation einer Gensequenz für die homologe Rekombination werden Oligonukleotide eingesetzt, die 40 nt Homologie zum Zielvektor und 20 nt Homologien zur zu amplifizierenden Sequenz aufweisen. Als Matrize dienen genomische DNA oder Plasmide, die das gewünschte Gen tragen. Die Anlagerungstemperatur wird für jedes Oligonukleotidpaar nach folgender Regel berechnet:

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

Wobei **A** für die Anzahl der Guanin- und Cytosin-Basen innerhalb der Oligonukleotidsequenz bzw. **B** für die Adenin- und Thymin-Basen steht.

Die optimale Elongationstemperatur ist abhängig von der verwendeten thermostabilen DNA-Polymerase. Um fehlerfreie Gensequenzen für Klonierungen zu generieren, wird eine *Pfx*-Polymerase mit Korrekturlesefunktion („*proof-reading*“) verwendet, die eine sehr hohe Amplifikationsgenauigkeit erzielt und deren Temperaturoptimum bei 68 °C liegt. Für PCR-Reaktionen, die keine Korrekturlesefunktion benötigen, wird die *Taq*-Polymerase bei einer Elongationstemperatur von 72 °C verwendet. Die Elongationszeit ist abhängig von der Größe des zu amplifizierenden Fragments und wird mit 1 min pro 1000 Nukleotide (nt) angesetzt. Die PCR-Reaktion wird im Thermocycler (BioRad) durchgeführt. Die PCR-Proben werden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

PCR-Ansatz:

	<i>Pfx</i> -Polymerase		<i>Taq</i> -Polymerase
x µl	10-100 ng DNA	x µl	10-100 ng DNA
1 µl	Oligonukleotide 1 (50 pmol)	1 µl	Oligonukleotide 1 (50 pmol)
1 µl	Oligonukleotide 2 (50 pmol)	1 µl	Oligonukleotide 2 (50 pmol)
5 µl	dNTP (4 mM)	5 µl	dNTP (4 mM)
5 µl	Puffer (10 x)	5 µl	Puffer (10 x)
4 µl	Mg ₂ SO ₄ (25 mM)	4 µl	MgCl ₂ (25 mM)
5 µl	Enhancer (10 x)		
0,5 µl	<i>Pfx</i> -Polymerase (1 U/µl)	1 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (1 U/µl)
ad 50 µl	ddH ₂ O	ad 50 µl	ddH ₂ O

PCR-Bedingungen:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
initiale Denaturierung	95 °C	5 min	x 35
Denaturierung	95 °C	1 min	
Annealing	49 - 58 °C	1 min	
Elongation	68 °C / 72 °C	1-2 min	
finale Elongation	68 °C / 72 °C	7 min	
Abkühlen	16 °C	∞	

3.5.2.2 PCR auf Hefezellen

Zur Verifikation positiver Klone einer homologen Rekombination können Hefezellen als Matrix für die PCR-Reaktion verwendet werden. Zellen einer Einzelkolonie werden in 10 µl ddH₂O resuspendiert und zu einem modifizierten PCR-Ansatz gegeben.

PCR-Ansatz:

10 µl	ddH ₂ O + Hefezellen	0,3 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (1 U/µl)
0,3 µl	Oligonukleotid 1 (50 pmol)	1,8 µl	MgCl ₂ (25 mM)
0,3 µl	Oligonukleotid 2 (50 pmol)	1 µl	DMSO
0,24 µl	dNTPs (25 mM)	1 µl	Tween 20
3 µl	Puffer (10 x)	12,06 µl	ddH ₂ O

Die PCR-Bedingungen werden wie unter Kapitel 3.5.2.1 beschrieben gewählt.

3.5.3 Auftrennung von DNA-Molekülen durch Agarose-Gelelektrophorese

Zur präparativen oder analytischen Auftrennung von DNA-Fragmenten werden 0,7 % bis 2 % Agarosegele verwendet je nach Größe des zu trennenden DNA-Moleküls. Die DNA-Proben werden mit Blaumarker (4x) versetzt und durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Durch Zugabe des DNA-interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid (1 µg/ml), wird die DNA unter UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht. Zur Größenbestimmung der aufgetrennten DNA-Fragmente wird ein Längenstandard (Gene Ruler™ 1 kb Ladder Mix) aufgetragen.

3.5.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgt unter Verwendung des Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben.

3.5.5 Transformation und homologe Rekombination in *S. cerevisiae*

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

Ein gewünschtes DNA-Fragment kann über homologe *in vivo* Rekombination in einen zuvor linearisierten Zielvektor integriert werden. Um den Vorgang zu ermöglichen werden dem gewünschten Gen über die Oligonukleotide bei der Amplifikation im 5'-Bereich 40 nt Homologie zum Zielvektor angefügt.

- Eine 50 ml YDP⁺-Hauptkultur wird mit einer ü/N-Kultur des zu transformierenden Hefestammes auf eine OD₆₀₀ 0,1 angeimpft und erneut schüttelnd (140 Upm) bei 30 °C inkubiert bis zu einer Konzentration von 2 x 10⁷ Zellen/ml.
- Die Kultur wird 5 min bei 3500 Upm (Heraeus Megafuge 1.0R) sedimentiert.
- Der Überstand wird verworfen und die Zellen in 25 ml ddH₂O gewaschen.
- Das erhaltene Zellpellet wird in 1 ml 100 mM LiAc resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt und 5 s bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert.
- Die Zellen werden in 100 mM LiAc pH 8,4 - 8,9 resuspendiert, sodass die Zellzahl bei etwa 2 x 10⁹ Zellen/ml liegt.
- Für die Transformationen werden 50 µl Aliquots in Reaktionsgefäße überführt, die Zellen erneut 5 s bei 13.000 Upm sedimentiert und der Überstand abgenommen.
- Die Carrier-DNA (2 mg/ml) wird zum Denaturieren für 10 min auf 100 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt.
- Zu den kompetenten Hefezellen wird der folgende „Transformationsmix“ in der vorgegebenen Reihenfolge hinzugefügt:

240	µl	PEG (50 % w/v)
36	µl	1 M LiAc pH 8,4 - 8,9
50	µl	Carrier-DNA
x	µl	zu transformierende DNA (0,1 – 1 µg), bzw. lin. Plasmid und PCR-Produkt (1:3)
34-x	µl	ddH ₂ O

- Die Ansätze werden gut gemischt und 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock für 30 min bei 42 °C im Thermoblock.
- Die Transformationsansätze werden bei 13.000 Upm für 5 s zentrifugiert (Heraeus Biofuge pico) und in 200 µl ddH₂O resuspendiert.

- Die Zellsuspension wird zu je 90 % und 10 % auf Selektionsplatten ausgestrichen und bei 30 °C für 2-3 Tage inkubiert.

3.5.6 Isolation von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

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

- 4 ml einer ü/N-Kultur werden in ein Kryo-Röhrchen überführt und für 5 s bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge pico) pelletiert.
- Das Pellet wird einmal mit 1 ml ddH₂O gewaschen.
- Die Zellen werden in 500 µl Puffer P1 mit RNase A (100 µg/ml) resuspendiert, 500 µl Puffer P2 hinzugefügt und vorsichtig gemischt.
- Zur Zellsuspension werden ca. 2/3 des Volumens an Glasperlen zugesetzt.
- Der Zellaufschluss erfolgt für 2 x 20 s mit 5 s Pause bei 5500 Upm im Zellhomogenisator (Homogenisator precelly s24).
- Die Glasperlen werden für 2 min bei 2000 Upm sedimentiert und 1 ml des Überstands wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt.
- 500 µl Puffer P3 werden zu pipettiert, gemischt und die Probe wird 10 min auf Eis inkubiert bevor sie 15 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert wird.
- 750 µl des Überstandes werden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 750 µl Isopropanol aufgefüllt und gut gemischt.
- Durch Zentrifugation für 30 min bei 13.000 Upm wird die DNA gefällt. Das DNA-Präzipitat wird mit 70 %igem Ethanol gewaschen.
- Das DNA Pellet wird im Vakuum-Konzentrator (Speed-Vac Vacuum-Konzentrator) getrocknet und in 20 µl ddH₂O aufgenommen.

3.5.7 Transformation von *E. coli*

3.5.7.1 Ein-Minuten Transformation

Bei der Ein-Minuten Transformation handelt es sich um ein schnelles Verfahren mit niedriger Effizienz; daher ist sie nur für die Transformation von Plasmid-DNA geeignet. Enthält das zu transformierende Plasmid einen Kanamycin Selektionsmarker ist die Effizienz dieser Methode nicht hoch genug um Kolonien zu erhalten.

- 7 µl DMSO kompetente *E. coli* Zellen werden auf Eis aufgetaut.
- Die Zellen werden mit 1 µl Plasmid-DNA (1-100 ng) versetzt.
- Der Ansatz wird 1 min bei 42 °C erhitzt und sofort mit 100 µl LB-Medium versetzt.
- Die Zellsuspension wird auf eine Selektionsplatte ausgestrichen und ü/N bei 37 °C inkubiert.

3.5.7.2 Transformation durch Elektroporation

Für gering konzentrierte Plasmid-DNA, die aus *S. cerevisiae* isoliert wurde, oder zur Transformation von Plasmiden mit Kanamycin Selektionsmarker wird die sehr effiziente *E. coli* Transformation durch Elektroporation genutzt.

- 10 µl elektrokompente *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut und mit 4 µl DNA und 80 µl ddH₂O versetzt.
- Der Ansatz wird in eine Elektroporationsküvette eingefüllt und unter folgenden Bedingungen der Hochspannung ausgesetzt: Spannung: 2,1 kV, Widerstand: 200 Ohm, Kapazität: 25 µF (BioRad Gene Pulser und BioRad Pulse Controller).
- Dem Ansatz wird 1 ml LB-Medium zugefügt und 30-60 min unter Schütteln bei 37 °C inkubiert.
- Das Volumen des Ansatzes wird durch Zentrifugation für 5 s bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge pico) und abziehen von ca. 500 µl Überstand eingeengt.
- Die Zellen werden resuspendiert und auf Selektionsplatten ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgt ü/N bei 37 °C.

3.5.8 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

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

3.5.8.1 Plasmid Minipräparation

- 1,5 ml einer ü/N-Kultur wird in ein Reaktionsgefäß überführt, 5 s bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge pico) pelletiert und der Überstand verworfen.
- Die Zellen werden in 100 µl Puffer P1 + RNaseA (100 µg/ml) resuspendiert.
- Der Suspension werden 100 µl Puffer P2 hinzugefügt und durch Invertieren gemischt.
- Anschließend werden 100 µl P3 zugegeben und durch Schütteln gemischt.

- Der Ansatz wird 10 min bei 13.000 Upm zentrifugiert.
- Der Überstand wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 700 µl Isopropanol versetzt, gut gemischt und 30 min bei 13.000 Upm zentrifugiert.
- Das DNA-Präzipitat wird mit 500 µl 70 % EtOH überschichtet und erneut 10 min bei 13.000 Upm zentrifugiert.
- Die DNA wird im Vakuum-Konzentrator (Speed-Vac Vacuum-Konzentrator) getrocknet und in 50 µl sterilem ddH₂O aufgenommen.

3.5.8.2 Plasmid Midipräparation

Für die saubere Präparation größere Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* werden 50 ml ü/N-Kultur mit Hilfe des Plasmid Midi Kits der Firma Qiagen nach Herstellerangaben aufgearbeitet.

3.5.9 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Spaltung von Plasmid-DNA und zur Kontrolle einer korrekten Integration nach einer homologen Rekombination werden Restriktionsenzyme mit den Enzym-spezifischen Puffern des Herstellers verwendet und die DNA für mindestens 2 h oder ü/N verdaut. Die erhaltenen DNA-Fragmente werden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und gegebenenfalls unter Zuhilfenahme des QIAquick Gel Extraction Kit aus dem Gel eluiert.

3.5.10 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration isolierter Plasmid-DNA wird über spektralphotometrische Messung bei 260 nm, dem charakteristischen Absorptionsmaximum von DNA, von 1 µl DNA-Lösung im NanoDrop (peqlab) bestimmt. Der Abgleich erfolgte gegen 1 µl ddH₂O. Das Absorptionsergebnis entspricht der Menge an DNA in µg/µl der Ausgangslösung. Der Absorptionsquotient 260/280 nm gibt Auskunft über die Reinheit der Probe und sollte bei DNA-Lösungen zwischen 1,8 und 2 liegen.

3.5.11 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen aller generierten Plasmide werden von der Firma GATC-Biotech durchgeführt.

3.6 Biochemische Methoden

3.6.1 Induktion der Genexpression in *E. coli*

Zur Expression von Fusionsproteinen unter Kontrolle des induzierbaren *lac*-Promotor wird der *E. coli* Kultur bei einer OD_{600} von 0,5 IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt. Der Erfolg der Genexpression wird durch die Aufarbeitung von Proteinproben und deren Analyse mittels SDS-PAGE kontrolliert.

- Von einer 50 ml ü/N-Kultur wird eine 1 l-Induktionskultur auf eine Start- OD_{600} 0,1 überimpft und schüttelnd bei 37°C inkubiert.
- Bei Erreichen einer OD_{600} von ca. 0,5 wird die Genexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kultur für 4 h unter Schütteln bei 37 °C weiter inkubiert.
- Im Anschluss werden die *E. coli* Zellen für 10 min bei 5000 Upm (Beckman Avanti J-25) pelletiert.
- Das Pellet wird mit 40 ml PBS Puffer gewaschen und 15 min bei 4600 Upm (Heraeus Megafuge1.0R) zentrifugiert.
- Das Zellpellet wird in 1 ml PBS resuspendiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

3.6.2 Affinitätschromatographische Aufarbeitung von Proteinen

Mittels Affinitätschromatographie können Fusionsproteine, die einen His- oder einen GST-Tag (Glutathion-S-Transferase) tragen, über Ni-NTA- bzw. Glutathion-Agarose aus *E. coli* Zellextrakt extrahiert werden. Der Tag bindet aufgrund seiner Affinität am entsprechenden Trägermaterial, während Proteine ohne Tag durch mehrmaliges Waschen entfernt werden können. Final werden durch die Zugabe eines spezifischen Kompetitors (Imidazol bzw. reduziertes Glutathion), die über den Tag gebundenen Proteine vom Trägermaterial gelöst.

3.6.2.1 Reinigung von His-Fusionsproteinen unter denaturierenden Bedingungen

- Das Zellpellet einer Induktionskultur wird aufgetaut und mit 20 ml Puffer B versetzt.
- Optional können 2 % Sarkosyl und / oder 1 % Triton X-100 hinzugefügt werden.
- Die Lyse erfolgt unter rotierendem Schütteln ü/N bei RT.

- Das Lysat wird auf Eis 3 x 10 s mit dem Ultraschallstab (Sonoplus HD2200, Bandelin) bei 40 % Leistung sonifiziert.
- Anschließend wird das Lysat 30 min bei 15.000 Upm (Beckman Avanti J-25) zentrifugiert.
- Der geklärte Überstand wird mit 1 ml Ni-NTA-Agarose versetzt und unter rotierendem Schütteln für 1 h bei RT inkubiert. Optional kann dem Ansatz eine geringe Konzentration Imidazol (bis 20 mM) zugefügt werden, um unspezifische Proteinbindungen an die Agarose zu unterbinden.
- Eine Protein-Säule wird mit einem Gazestopfen versehen, sodass die Ni-NTA-Agarose zurückgehalten wird.
- Die Säule wird mit dem Proteingemisch beladen und die Agarose zweimal mit 10 ml Puffer B + 20 – 60 mM Imidazol und im Anschluss mit 10 ml Puffer C + 40 – 80 mM Imidazol gewaschen.
 - Die verwendete Imidazolkonzentration ist proteinspezifisch und wird für jedes Protein neu bestimmt.
 - Ctad1, Ctad8, Ctad9: 40 mM/60 mM, Ctad2: 40 mM/60 mM/80 mM, Ctad4: 20 mM/40 mM.
- Die Elution der Proteine erfolgt durch Zugabe von fünfmal 1 ml Puffer C + 500 mM Imidazol, nach fünfminütiger Inkubationszeit vor Abnahme jeder Fraktion.
- Nach Kontrolle der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE werden die Proteine zur Renaturierung in abgekochte und abgekühlte Dialyseschläuche (Ausschlussgröße 12-15 kDa) gefüllt und zweimal gegen 2 l PBS ü/N auf 4 °C dialysiert.

3.6.2.2 Reinigung von GST-Fusionsproteinen unter nativen Bedingungen

GST-Fusionsproteine können nur unter nativen Bedingungen aufgearbeitet werden. Alle Schritte erfolgen deshalb auf 4 °C.

- Das Zellpellet einer Induktionskultur wird aufgetaut und mit 20 ml PBS versetzt.
- 1 mM PMSF; 0,5 mg/ml Lysozym; Proteaseinhibitor (1:100) und 1 % Triton X-100 werden hinzugefügt.
- Die Zellyse erfolgt ü/N auf Eis.
- Das Lysat wird auf Eis 3 x 10 s mit dem Ultraschallstab (Sonoplus HD2200, Bandelin) bei 40 % Leistung sonifiziert. Zwischen den Ultraschall-Schritten sollten Pausen gemacht werden, damit sich das Lysat abzukühlen kann.

- Anschließend wird das Lysat 30 min bei 15.000 Upm und 4 °C (Beckman Avanti J-25) zentrifugiert.
- 500 µl Gluthation-Agarose werden mit 20 ml PBS gewaschen und zum geklärten Überstand gegeben. Der Ansatz wird für 1 h unter rotierendem Schütteln auf 4 °C inkubiert.
- Eine Protein-Säule wird mit einem Gazestopfen bestückt, um die Agarose am Durchfluss zu hindern.
- Die Proteinlösung wird auf die Säule geladen und im Anschluss zweimal mit 10 ml PBS gewaschen.
- Die Elution der Proteine erfolgt durch Zugabe von fünfmal 1 ml 50 mM Tris + 10 mM red. Glutathion, wobei eine fünfminütige Inkubation vor Abnahme der ersten Fraktion erfolgt.
- Die Elutionsfraktionen werden in Dialyseschläuche (Ausschlussgröße 12-15 kDa) gefüllt und gegen 2 l PBS ü/N auf 4 °C dialysiert, um das red. Glutathion zu entfernen.
- Nach der Dialyse wird die Proteinlösung in Reaktionsgefäße gefüllt und zur Stabilisierung von Fusionsproteinen mit Proteaseinhibitor (1:100) versetzt.

3.6.3 Proteinmengenbestimmung mittels Bradford-Reagenz

Die Proteinmengenbestimmung nach Bradford basiert auf einer spezifischen Farbreaktion, bei der Coomassie Brilliantblau G250 verwendet wird. Dieser Farbstoff reagiert mit den Proteinen und bildet Komplexe, wobei eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm erfolgt.

Die Proteinmenge im Rohextrakt wird anhand der Adsorptionswerte einer erstellten Standardkurve bekannten Proteingehaltes (0 µg – 10 µg, in 2 µg Schritten) mit Rinderserumalbumin (BSA) ermittelt.

Je nach Proteinkonzentration werden 800 – x µl ddH₂O mit 200 µl Bradford-Reagenz und x µl Proteinlösung gemischt und 10 min bei RT inkubiert. (x = 1 – 10 µl). Die Absorption wird bei 595 nm mit dem BioPhotometer plus (Eppendorf) bestimmt.

Für die Proteinkonzentration im Ausgangsextrakt gilt:

$$\text{Proteinkonz. im Extrakt } [\mu\text{g/ml}] = \frac{\text{Abs. } 595 * 1000}{0,06^+ * x \mu\text{l}}$$

⁺ermittelt aus der Steigung der Standardkurve, x µl: eingesetztes Volumen an Proteinlösung

3.6.4 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Mittels der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) werden Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die Proteine erhalten durch die Bindung von SDS eine negative Ladung, die sich proportional zur molaren Masse verhält und die Mobilität im elektrischen Feld bewirkt, sodass die Proteine durch die Gelmatrix entsprechend ihrer Masse aufgetrennt werden. Bei der verwendeten Methode nach Lämmli werden die Proteine zunächst durch das Sammelgel für eine klarere Bandenbildung konzentriert und anschließend im Trenngel aufgetrennt.

3.6.4.1 Probenaufbereitung für die SDS-PAGE

Proteinextrakte aus *E. coli* Kulturen:

- 0,5 OD₆₀₀ Zellen werden pelletiert 5 s bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge Pico), in 32,5 µl ddH₂O resuspendiert und mit 12,5 µl Protein-Ladepuffer und 5 µl 1 M DTT versetzt.
- Die Probe wird 10 min bei 100 °C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt.

Proteinextrakte aus *S. cerevisiae* Kulturen:

- Siehe Kapitel 3.3.2

Lösliche Proteinproben:

- x µl einer Proteinprobe werden auf 32,5 µl mit ddH₂O aufgefüllt mit 12,5 µl Protein-Ladepuffer und 5 µl 1 M DTT versetzt.
- Die Probe wird 10 min bei 100 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt.

3.6.4.2 Herstellung von Trenn- und Sammelgel

- Die Komponenten des Trenngels werden vermischt und als letztes TEMED und 10 % APS hinzugefügt.
- Die Lösung wird zügig, luftblasenfrei zwischen die 7 x 9 cm große Glas- und Aluminiumplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet.
- Nach dem Auspolymerisieren des Gels wird das Isopropanol abgegossen und die Gel-front wiederholt mit ddH₂O gespült.
- Die Komponenten des Sammelgels werden vermischt und luftblasenfrei auf das Trenngel gegossen. Zuletzt wird einem Kamm eingesteckt, der die Probentaschen formt.

Komponenten	Trenngel		Sammelgel
	10 %	12 %	4,5 %
30 % Acrylamidlösung (30:0,8)	13,3 ml	16 ml	1,5 ml
4x Trenn- bzw. Sammelgelpuffer	10 ml	10 ml	2,5 ml
ddH ₂ O	16,5 ml	14 ml	6 ml
10 % Ammoniumpersulfat (APS)	200 µl	200 µl	200 µl
TEMED	50 µl	50 µl	50 µl

3.6.4.3 SDS-Gelelektrophorese

Das auspolymerisierte Gel wird in die Apparatur (Minigel-Elektrophoresekammern Hoefler SE 260) eingespannt und die Kammern mit Laufpuffer gefüllt. Maximal 25 µl Probe/Ladetasche werden aufgetragen. Als Größenstandard werden 5–7,5 µl PageRuler™ Prestained Protein Ladder aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt bei einer maximalen Stromspannung von 200 V (etwa 20 mA) für 1-2 h.

3.6.4.4 Färbung von Proteingelen mit Coomassie-Brillant-Blau

Das Proteingel wird in ddH₂O überführt, 30 s bei 600 W in der Mikrowelle erwärmt und anschließend 10 min auf dem Schüttler gewaschen. Dieser Vorgang wird einmal wiederholt. Die Färbelösung wird hinzugefügt und für 15 s bei 360 W in der Mikrowelle erwärmt. Die Färbung erfolgt bei leichtem Schwenken auf RT bis deutliche Proteinbanden sichtbar sind. Die Coomassie-Lösung wird abgenommen und das Gel in ddH₂O gewaschen.

3.6.5 Westernblot und Immundetektion

Das Verfahren beruht auf dem Transfer von Proteinen aus einem Acrylamidgel auf eine PVDF-Membran, wodurch diese immobilisiert werden. Die Proteine können auf der Membran mittels Antikörperreaktion spezifisch nachgewiesen werden.

3.6.5.1 Proteintransfer auf eine PVDF-Membran

- Zwei Filterpapiere und eine PVDF-Membran werden in der Größe des zu blottenden Gels vorbereitet.
- Die Filterpapiere werden in Transferpuffer inkubiert. Die PVDF-Membran wird erst in Methanol aktiviert und dann in Transferpuffer inkubiert.

- In folgender Reihenfolge wird der Blot luftblasenfrei auf eine Graphitplatte der Blotapparatur geschichtet: zuunterst ein Filterpapier, dann die Membran, das SDS-Gel und zuoberst das verbleibende Filterpapier. Die zweite Graphitplatte wird aufgelegt und die Apparatur an die Stromquelle angeschlossen.
- Der Proteintransfer erfolgt bei 200 mA für 20-45 min. Eine Beschwerung der Apparatur mit 2 kg begünstigt den Transfer.
- Im Anschluss wird die Membran 30 min bei RT oder ü/N bei 4 °C in Blockierlösung inkubiert.

3.6.5.2 Immundetektion von Proteinen

Um spezifische Proteine auf einer PVDF-Membran zu detektieren werden Antikörper eingesetzt. Der primäre Antikörper richtet sich spezifisch gegen ein Protein oder einen Tag des Proteins. Der sekundäre Antikörper verstärkt das Signal und ist mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert, welche die Farbentwicklung katalysiert. Blots für Immundetektionen mit Anti-phospho Antikörpern, werden anstelle von PBS mit TBS behandelt.

- Die PVDF-Membran wird mit primärem Antikörper verdünnt in 5 ml Blockierungslösung für 1 h bei RT oder ü/N bei 4 °C rotierend schüttelnd inkubiert.
- Die Membran wird 3 x 10 min mit PBS Puffer schüttelnd gewaschen.
- Im Anschluss folgt die Inkubation der Membran mit sekundärem Antikörper verdünnt in 5 ml Blockierungslösung für 1 h bei RT oder ü/N bei 4 °C unter rotierendem Schütteln.
- Anschließend wird die Membran erneut 3 x 10 min mit PBS gewaschen.
- Für die Farbentwicklung wird die Membran in 20 ml Farbsubstrat-Lösung (20 ml Detektionspuffer + 33 µl BCIP-Lösung [0,5 g BCIP in 10 ml DMF] + 33 µl NBT-Lösung [0,5 g NBT in 10 ml 70 %igem DMF]) inkubiert, bis die gewünschte Bandenintensität erreicht ist.
- Die Farbreaktion wird durch mehrfaches Waschen mit ddH₂O gestoppt.

3.6.6 Beschichtung und Beschichtungskontrolle von Latexkugeln

Die Verwendung von proteinbeschichteten Latexkugeln ermöglicht die Analyse des Adhäsionsverhaltens einzelner chlamydialer Proteine, ohne den Einfluss weiterer bakterieller Fakto-

ren. Verwendet werden grün bzw. blau fluoreszierende 1 μm carboxylierte Latexkugeln. Die Beschichtung mit Protein erfolgte durch Adsorption nach (Dersch und Isberg 1999).

3.6.6.1 Proteinbeschichtung von Latexkugeln

- $1 \cdot 10^9$ Latexkugeln werden zu 1 ml PBS pipettiert und 5 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge Pico) pelletiert.
- Das Pellet wird in einem 1 ml Kopplungspuffer resuspendiert und erneut 5 min bei 13.000 Upm zentrifugiert.
- Die Latexkugeln werden in 200 μl Totalvolumen, bestehend aus nativer Proteinlösung (5-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in Kopplungspuffer, resuspendiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert.
- Dem Ansatz werden 500 μl Kopplungspuffer zu pipettiert, die Suspension für 2 min im Ultraschallwasserbad sonifiziert, 500 μl BSA-Lösung (40 mg/ml in Kopplungspuffer) zugefügt und erneut für 1 h bei 37 °C inkubiert.
- Die Latexkugeln werden 5 min bei 13.000 Upm pelletiert und mit 1 ml BSA-Lösung (1 mg/ml in PBS) gewaschen.
- Die Latexkugeln werden in 500 μl BSA-Lösung (0,2 mg/ml in PBS) resuspendiert und bei 4 °C gelagert.

3.6.6.2 Überprüfung der Beschichtungsqualität

Die Proteinbeschichtung von Latexkugeln wird mittels Westernblot-Analyse überprüft.

- $2 \cdot 10^7$ Kugeln werden 5 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge Pico) pelletiert und der Überstand abgezogen.
- Die Kugeln werden in 13 μl ddH₂O resuspendiert und mit 5 μl Protein-Ladepuffer sowie 2 μl 1 M DTT versetzt.
- Die Probe wird 10 min bei 100 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt.
- Die gesamte Probe wird auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Westernblot analysiert.

3.6.7 Markierung von Proteinen mit Biotin

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

- 1,1 mg Biotin werden unmittelbar vor Gebrauch in 250 µl ddH₂O (10 mM) resuspendiert.
- Von der Biotin-Lösung werden x µl zu der Protein-Lösung gegeben. Die nötige Menge an Biotin-Lösung berechnet sich nach folgender Formel:

$$x \text{ µl Biotin – Lösung} = \frac{x \text{ mg Protein}}{x \text{ Da Protein MW}} * 20 * 100000$$

- Die Protein/Biotin-Lösung wird für 2 h auf Eis inkubiert.
- Anschließend wird die Reaktion mit 1 M Tris pH 7,5 bei einer Endkonzentration von 50 mM Tris ü/N auf Eis abgestoppt.

3.6.8 Interaktionsstudien

3.6.8.1 Protein-Protein-Interaktionsstudien mittels Far-Western

Der Far-Western stellt eine Methode zur direkten Analyse von Protein-Protein Interaktionen *in vitro* da (Wu, Li *et al.* 2007).

Proteine werden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die immobilisierten Proteine werden auf der Membran mit 6 M Guanidin-HCl erst vollständig denaturiert und anschließend durch Verringerung der Guanidin-HCl Konzentration schrittweise renaturiert. Im Anschluss wird die Membran mit Biotin-markiertem Protein inkubiert und gebundenes Protein mit Streptavidin-AP-konjugiertem Antikörper detektiert.

In dieser Arbeit wurden 1-2 µg Protein als Zielprotein auf einer PVDF-Membran immobilisiert, renaturiert und ü/N bei 4°C mit 8 µg/ml biotinyliertem Protein inkubiert.

Guanidin-HCl (M)	6	3	1	0,1	0
Glycerin (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
5 M NaCl (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
1 M Tris/HCl pH7,5 (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
0,5 M EDTA (ml)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
10 % Tween-20 (ml)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
1 M DTT (µl)	25	25	25	25	25
8 M Guanidin-HCl (ml)	18,75	9,30	3,13	0,31	0
Milchpulver (g)	1	1	1	1	1
ddH ₂ O (ml)	2,45	12,82	18,07	20,89	21,2
Volumen total (ml)	25	25	25	25	25
Zeit	30 min	30 min	30 min	30 min	ü/N
Temperatur	RT	RT	RT	4 °C	4 °C

3.6.8.2 Rezeptor-Pulldown Experimente mit biotinyliertem Protein

Zur Identifikation potentieller humaner Interaktionspartner werden rekombinante His-Fusionsproteine biotinyliert und mit adhärenen Humanzellen (HEp-2) inkubiert. Die gebildeten Komplexe werden mit zellpermeablen (DSP) oder zellinpermeablen (DTSSP), spaltbaren Crosslinker vernetzt und mittels Streptavidin-Agarose aus dem Zellysate extrahiert. Die Spaltung des Crosslinkers erfolgt durch Inkubation mit DTT.

- 800 µg Protein werden mit 20-fachem Überschuss EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin markiert (s. Kapitel 3.6.7) und auf 8 ml mit Zellkulturmedium aufgefüllt.
- Der konfluente Zellrasen von vier 75 cm² Zellkulturflaschen wird zweimal mit HBSS gewaschen.
- Zwei Flaschen werden mit je 4 ml der Proteinlösung überschichtet (Endkonzentration 100 mg/ml) und die anderen zwei Flaschen werden als Kontrolle mit HBSS in Zellkulturmedium überschichtet.
- Die Adhäsion der Proteine erfolgt für 1 h bei 37 °C und 6 % CO₂ im Brutschrank.
- Der Überstand wird abgenommen, der Zellrasen zweimal mit HBSS gewaschen und alle Interaktionen mit 4 ml 1 mM Crosslinker (DSP oder DTSSP) für 30 min bei RT vernetzt.
- Die Reaktion wird durch zweimaliges Waschen mit 50 mM Tris pH 7,5 abgestoppt, wobei vor Abnahme der zweiten Waschfraktion die Lösung 10 min bei RT auf den Zellen inkubiert wird.
- Die Zellen werden einmal mit HBSS gewaschen.
- Der Zellrasen wird in 4 ml 50 mM Tris pH 7,5 mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst, in ein Zentrifugenröhrchen überführt, wobei die gleich behandelten Flaschen vereint werden und 10 min bei 2800 Upm (Hettich Rotanta 460R) zentrifugiert.
- Das Zellpellet wird in 500 µl Phospho-Lysis-Puffer mit Proteaseinhibitor (Verdünnung 1:100) resuspendiert und 10 s bei 10 % Leistung mit dem Ultraschallstab (Sonoplus HD2200, Bandelin) sonifiziert.
- Die Lyse erfolgt für 1 h auf Eis oder ü/N auf 4 °C. Im Anschluss wird der Überstand durch Zentrifugation für 2 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge Pico) geklärt.
- Zweimal 250 µl Streptavidin-Agarose werden mit Hilfe von Spin-Säulen zweimal mit PBS gewaschen.
- Das Lysat (mit rek. Protein bzw. HBSS) wird auf der Spin-Säule mit der Agarose für 60 min bei RT unter rotierendem Schütteln inkubiert.
- Die Agarose wird zweimal mit 500 µl PBS für 1 min bei 13.000 Upm gewaschen.

- Die Elution der Proteine erfolgt durch Inkubation mit 100 µl 50 mM DTT^{*} verdünnt in PBS für 60 min auf RT.
- 30 µl der Proteinlösung werden mit Protein-Ladepuffer versetzt und 10 min bei 100 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt.
- Der gesamte Ansatz wird mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach der empfindlichen Coomassie-Methode gefärbt, wobei alle Schritte unter leichtem Schwenken erfolgen.
 - Fixierung der Proteine im Gel mit 46 % Methanol, 7 % Essigsäure für 1 h.
 - Färbung des Gels für 1-2 h mit Coomassie-Lösung (0,1 % Coomassie Brilliant-Blau G250, 46 % Methanol, 7 % Essigsäure, filtriert).
 - Entfärben mit 5 % Methanol, 7,5 % Essigsäure ü/N.
- Beide Elutionsfraktionen werden verglichen und die Proteinbanden, die in der Protein-Fraktion jedoch nicht in der HBSS-Fraktion auftreten, aus dem Gel extrahiert.
- Die Proteinbanden werden für die massenspektrometrischen Analyse zur Zentralen Bioanalytik des Zentrums für Molekulare Medizin Köln gesandt.

3.6.9 Löslichkeitstest chlamydialer Proteine mit Detergenzien

- Jeweils 75 µl gradientengereinigter EBs von *C. trachomatis* Serovar E (10^8 IFU/ml) werden für 30 min bei 21.885 g (15.000 U_{pm} Hereaus Biofuge Primo R) und 4 °C pelletiert.
- Das Pellet wird in 100 µl HBSS resuspendiert und mit HBSS oder Detergenzien (Endkonzentration: 1 % Triton X-100, 2 % Sarkosyl) auf 150 µl aufgefüllt und 1 h bei 37 °C inkubiert.
- Die Suspension wird für 1 h bei 100.000 g (Ultrazentrifuge Optima MaxE, Beckmann, Rotor MLS50) und 4 °C zentrifugiert.
- Der lösliche Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 37,5 µl Protein-Ladepuffer und 12,5 µl 1 M DTT^{*} versetzt und 10 min bei 100 °C erhitzt.
- Das Zellpellet wird in 70 µl H₂O, 20 µl Protein-Ladepuffer und 10 µl 1 M DTT^{*} resuspendiert und für 10 min bei 100 °C erhitzt.
- Für den Westernblot werden jeweils 12,5 µl der Pelletfraktion und 25 µl des Überstandes geladen und mit verschiedenen chlamydialen Antikörpern detektiert.

3.6.10 Generierung polyklonaler Antikörper

3.6.10.1 Produktion polyklonaler Antikörper

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sechs polyklonale Antikörper angefertigt. Fünf Antikörper (Ctad1, Ctad2, Ctad4, Ctad8, Ctad9) wurden durch die Immunisierung von Kaninchen und einer durch die Immunisierung einer Ziege (EFTu, *Cpn*) durch die Firma Eurogentec generiert.

Der Immunisierungsprozess verläuft bei beiden Spezies gleich, aber die Menge an injiziertem Antigen variiert. Kaninchen werden pro Injektion mit 100 µg und Ziegen mit 200 µg Antigen behandelt. Für die Immunisierungen wurde rekombinantes His-Fusionsprotein der verschiedenen Kandidaten unter denaturierenden Bedingungen gereinigt und gegen PBS dialysiert. Für einen Kaninchen-Antikörper werden insgesamt 800 µg Protein benötigt, da jeweils vier aufeinanderfolgende Immunisierungen an zwei unterschiedlichen Kaninchen durchgeführt werden. Für einen Ziegen-Antikörper werden ebenfalls 800 µg Protein benötigt, da nur ein Tier immunisiert wird. Für die ersten beiden Injektionen werden 400 µg Protein über eine 10 %ige Coomassie gefärbte SDS-PAGE aufgetrennt und das Vollängenprotein aus dem Gel ausgeschnitten. Die folgenden beiden Injektionen werden mit nativer Proteinlösung durchgeführt. Bevor final das Serum generiert wird, besteht die Möglichkeit das Serum zu testen und ggf. eine weitere Injektion mit nativer Proteinlösung vorzunehmen. Diese Möglichkeit wurde für jeweils ein Kaninchen der Antikörper Ctad4, Ctad8 und Ctad9 genutzt.

3.6.10.2 Antigenreinigung polyklonaler Antikörper

Um die Spezifität und Reinheit eines polyklonalen Antikörpers zu erhöhen kann mittels NHS-Sepharose eine Antigenreinigung des Serums vorgenommen werden. Hierzu wird das spezifische Antigen stabil an eine NHS-Sepharose gebunden (Amidbindung) und mit dem Antiserum inkubiert, wodurch die Bindung spezifischer Epitope an das Antigen erlaubt wird. Im Folgenden kann der Antikörper durch Elution gewonnen werden (Methode nach (Harlow und Lane 1999)). Für die Antigenreinigung werden 3 ml Serum, 1,5 ml NHS-Sepharose und 1 mg rekombinantes Protein benötigt.

- 1,5 ml NHS-Sepharose werden in eine Säule mit Fritte geben und durch Zugabe von zweimal 10 ml kaltem 1 mM HCl das Isopropanol herauswaschen.
- Die NHS-Sepharose wird mit 10 ml Kopplungspuffer (0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3) gewaschen.

- 1 mg Proteinlösung in PBS wird mit dem gleichen Volumen an Kopplungspuffer gemischt und die verschlossene Säule ü/N bei 4 °C auf dem Rad inkubieren.
- Um nicht-reagierte Gruppen zu blockieren, werden 4 ml Blockierungslösung (0,5 M Ethanolamin, 0,1 M Tris pH 8,5) zugefügt und 4 h bei 4 °C auf dem Rad inkubiert.
- Es wird dreimal alternierend mit 5 ml Puffer 1 (0,1 M Tris pH 8,0) und 5 ml Puffer 2 (0,1 M NaAc, 0,5 M NaCl pH 4,0) gewaschen.
- 3 ml polyklonales Antiserum werden in 8 ml 0,1 M Tris pH 8,0 auf die Säule geben und 4 h bei 4 °C auf dem Rad inkubieren.
- Es wird mit 10 ml 10 mM Tris pH 7,5 und 10 ml 500 mM NaCl gewaschen.
- Die 1. Elution (saure Elution) des Antikörpers erfolgt mit 2 x 2 ml 100 mM Glycin pH 2,5 5 min Inkubation auf der Säule vor Entnahme des Eluats. Die Eluate werden mit 200 µl 1 M Tris pH 9,0 versetzt um den pH-Wert zu neutralisieren.
- Die 2. Elution (basische Elution) des Antikörpers erfolgt mit 2 x 2 ml 0,1 M Triethanolamin pH 11,5 (für 5 min). Die Eluate werden mit 200 µl 1 M Tris pH 8,0 versetzt um den pH-Wert zu neutralisieren.
- Bei schwachen Antiseren kann das Elutionsvolumen verringert werden, um den Antikörper aufzukonzentrieren.
- Der gereinigte Antikörper wird portioniert und bei -20 °C gelagert.

3.6.10.3 Abreicherung polyklonaler Antikörper

Die Spezifität von Antiseren oder antigengereinigte Antikörper kann effektiv durch eine Abreicherung gegen fixierte oder geblottete Zellen gesteigert werden.

3.6.10.3.1 Abreicherung gegen fixierte Humanzellen

- Ein konfluenten HEp-2 Zellrasen einer 25 cm² Zellkulturflasche wird einmal mit HBSS gewaschen und entweder 3 min mit MeOH oder 20 min mit 3 % PFA fixiert und zweimal mit HBSS gewaschen.
- 2 ml Antiserum oder 500 µl antigengereinigter Antikörper werden ü/N auf 4 °C unter leichtem Schwenken gegen fixierte Zelle abgereichert und im Anschluss bei -20 °C gelagert werden.
- Optional kann dem Ansatz 3 % BSA und 0,3 % Tween 20 zugesetzt werden.

3.6.10.3.2 Abreicherung gegen geblottete Zellen

- Aus HEp-2 oder *E. coli* Zellen wird mit Phospho-Lysis-Puffer ein Zellysat generiert und mit Protein-Ladepuffer und 1 M DTT versetzt und 10 min bei 100 °C erhitzt.
- Das Zellysat wird mittels Westernblot auf eine PVDF-Membran transferiert und mit 500 µl Antiserum oder 500 µl antigengereinigtem Antikörper + 3 % BSA und 0,3 % Tween 20 ü/N bei 4 °C unter rotierendem Schütteln inkubiert.
- Soll der abgereicherte Antikörper für die Immunfluoreszenz verwendet werden, kann das immobilisierte Zellysat auf der Membran mit Guanidin-HCl nach dem Far-Western Protokoll (s. Kapitel 3.6.8.1) renaturiert werden. Die Membran muss vor der Inkubation mit der Antikörperlösung zweimal in PBS unter leichtem Schwenken gewaschen werden.

3.6.11 Markierung von Antikörpern mit FITC

Eine Markierung von Antikörpern für Lokalisationsstudien mit NHS-Fluorescein wird mit einem 20-fach molaren Überschuss durchgeführt. Für die Markierung wird antigengereinigter und gegen PBS dialysierter Antikörper verwendet.

- 1 mg NHS-Fluorescein wird unmittelbar vor Gebrauch in 100 µl DMSO resuspendiert.
- Die Menge an NHS-Fluorescein, die zu der Antikörperlösung pipettiert wird berechnet sich nach folgender Formel:

$$\mathbf{x \mu l \text{ FITC - Lösung} = \frac{x \text{ mg Protein}}{150000 \text{ Da IgG MW}} * 20 * 47340}$$

- Die Lösung wird für 2 h auf Eis inkubiert.
- Die Lösung wird durch Zugabe von 1 M Tris pH 7,5 bei einer Endkonzentration von 50 mM abgestoppt.
- Die Lösung wird in eine Dialyseschlauch (Ausschlussgröße 12-15 kDa) gefüllt und ü/N bei 4 °C gegen 2 l PBS dialysiert.
- Sollte der markierte Antikörper nach der Dialyse in einer Immunfärbung ein stark grün fluoreszierendes Hintergrundsignal erzeugen, kann mit den Dye-Removal-Columns (Thermo) nach Herstellerangaben ungebundenes Fluorescein aus der Antikörperlösung entfernt werden.

3.7 Zellbiologische Methoden

3.7.1 Adhäsionsexperimente

3.7.1.1 Adhäsionsanalyse mit proteinbeschichteten Latexkügelchen

Mit Hilfe von grün fluoreszierenden Latexkügelchen können die adhäsiven Eigenschaften von Proteinen an eukaryotische Zellen untersucht werden. Hierzu werden HEp-2 Zellen mit proteinbeschichteten Latexkügelchen inkubiert und mittels Durchflusszytometrie im FACS Aria (BD) die mittlere Fluoreszenz der gebundenen Latexkügelchen quantifiziert.

- Ein konfluenter Zellrasen (1×10^6 pro Well) wird einmal mit HBSS gewaschen.
- Ein 10-facher Überschuss (1×10^7) an proteinbeschichtete Latexkügelchen (s. Kapitel 3.6.6.1) in 200 μ l Zellkulturmedium wird vorsichtig auf den Zellrasen pipettiert und durch schwenken verteilt.
- Durch Inkubation für 2 h bei 37 °C und 6 % CO₂ im Brutschrank wird die Bindung der Proteine ermöglicht.
- Nicht gebundene Latexkügelchen werden durch mehrmaliges Waschen mit PBS unter mikroskopischer Beobachtung entfernt, bis die Zellzwischenräume frei von Latexkügelchen sind.
- Durch Zugabe von 300 μ l Cell Dissociation Solution und Inkubation für 10 min bei 37 °C werden die Zellen abgelöst.
- Die Zellen werden in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 300 μ l 3 % PFA versetzt und bis zur Messung auf 4 °C gelagert.
- Im FACS Aria wird von jeweils 10.000 Zellen und daran gebundene Latexkügelchen die mittlere FITC-Fluoreszenz bestimmt (Bedienung des FACS erfolgt durch Klaus L. Meyer).

3.7.1.2 Adhäsionsanalyse mit löslichen Protein

- Ein konfluenter Zellrasen (1×10^6 Zellen pro Well) wird einmal mit kaltem HBSS gewaschen.
- Optional: Wird die Adhäsionsanalyse bei 4 °C durchgeführt, werden die Zellen zuvor 10 min bei 4 °C abgekühlt.
- Die Zellen werden mit 100 μ g/ml rekombinantem Protein in Zellkulturmedium überschichtet und für unterschiedliche Zeitpunkte (1 min, 15 min, 30 min und 60 min) bei 37 °C und 6 % CO₂ im Brutschrank oder 4 °C inkubiert.

- Die Proteinlösung wird entfernt und die Humanzellen dreimal mit HBSS gewaschen.
- Die Humanzellen werden durch Inkubation mit 200 µl Cell Dissociation Solution für 10 min bei 37 °C abgelöst, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 4000 Upm (Heraeus Biofuge Pico) pelletiert.
- Das Zellpellet wird in 32,5 µl PBS resuspendiert, mit 12,5 µl Protein-Ladepuffer und 5 µl 1 M DTT versetzt und 10 min bei 100 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt.
- 10 µl des Ansatzes werden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblot-Analyse ausgewertet.

3.7.1.3 Adhäsionsanalyse mit CFSE-markierten chlamydialen EBs

Um den Einfluss von Proteinen auf die Adhäsion von chlamydialen EBs an HEp-2 Zellen mittel Durchflusszytometrie untersuchen zu können, müssen die Bakterien zuvor für das FACSaria kenntlich gemacht werden. Dies geschieht durch die Verwendung von Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE), ein Farbstoff, der nur in lebende EBs eingelagert wird.

- Ein 200 µl Aliquot gradientengereinigte Chlamydien wird mit 800 µl PBS + 0,1 % BSA aufgefüllt, mit 5 µl CFSE (5 mM Stocklösung in DMSO) versetzt und für 1,5 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.
- Der Suspension werden 500 µl PBS + 1 % BSA zugefügt und 20 min bei 4 °C und 15.000 Upm (Heraeus Biofuge Primo R) zentrifugiert.
- Das Chlamydienpellet wird zweimal mit PBS + 1 % BSA gewaschen und in 200 µl SPG-Puffer vollständig resuspendiert. Die CFSE-EBs können bei -80 °C gelagert werden.
- Ein konfluenter HEp-2 Zellrasen (1 x 10⁶ Zellen pro Well) wird einmal mit HBSS gewaschen und mit 100 µg/ml Protein in Zellkulturmedium überschichtet. Als Kontrolle wird PBS verdünnt in Zellkultur verwendet.
- Die Inkubation erfolgt für 1 h bei 37 °C und 6 % CO₂ in Brutschrank.
- Verschiedene IFUs (5 x 10⁶, 1 x 10⁷, 2 x 10⁷) an CFSE-markierten EBs werden zu der Proteinlösung pipettiert und durch schwenken verteilt.
- Die Zellen werden erneute für 1 h bei 37 °C und 6 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.
- Der Zellrasen wird zweimal mit HBSS gewaschen und mit 200 µl Cell Dissociation Solution abgelöst (10 min RT).
- Die Zellsuspension wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 250 µl 3 % PFA ü/N fixiert.

- Die quantitative Analyse erfolgt durch Bestimmung der mittleren Fluoreszenz von 10.000 HEp-2 Zellen mit gebundenen CFSE-markierten EBs mit dem FACSaria durch Klaus L. Meyer.

3.7.2 Neutralisationsexperimente

3.7.2.1 Neutralisation der chlamydialen Infektion mit rekombinanten Protein

Um den Einfluss von chlamydialen Proteinen in der Infektion zu untersuchen, werden HEp-2 Zellen mit rekombinantem Protein eines potentiellen Adhäsins vorbehandelt. Ein möglicher humaner Interaktionspartner wird durch das Protein besetzt und kann in der anschließend stationären Infektion nicht von den Bakterien genutzt werden. Zur Durchführung des Experimentes werden gradientengereinigte chlamydiale EBs, sowie rekombinant hergestelltes Protein benötigt.

- Ein konfluenter HEp-2 Zellrasen (1×10^6 Zellen pro Well mit Deckgläschen) wird einmal mit HBSS gewaschen.
- Mit 250 μ l Proteinlösung (12,5-200 μ g/ml) in Zellkulturmedium werden die Zellen überschichtet. Als Kontrolle des Experimentes wird Medium mit GST, als unspezifisches Protein, bzw. mit PBS versetzt. Die Zellen werden für 2 h bei 37 °C und 6 % CO₂ in Brutschrank inkubiert.
- Anschließend werden 50 μ l Chlamydien in Zellkulturmedium (gereinigte Chlamydien in SPG-Puffer MOI: 20) der Proteinsuspension hinzugefügt, durch Schwenken verteilt und 2 h bei 37 °C und 6 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.
- Die Suspension wird abgenommen und durch 1 ml Chlamydienkulturmedium ersetzt.
- Die Infektion erfolgt für 24 h bei *C. trachomatis* und 48 h bei *C. pneumoniae* bei 37 °C und 6 % CO₂ im Brutschrank, anschließend werden die Zellen mit Methanol fixiert.
- Gebildete Einschlüsse werden mittels direkter Immunfluoreszenz angefärbt (Pathfinder) und mikroskopisch je nach Versuch zehn bzw. 20 Gesichtsfelder durch Auszählen der Einschlüsse quantifiziert.

3.7.2.2 Neutralisation der chlamydialen Infektion mit Antiserum

Um den Einfluss von chlamydialen Proteinen in der Infektion zu untersuchen, wird eine Infektion mit EBs durchgeführt, die mit Antiserum oder Präimmunserum vorbehandelt wurden. Das Antiserum bindet an das potentielle chlamydiale Adhäsins und kann seine Funktion in der

Infektion nicht mehr ausüben. Zur Durchführung des Experimentes werden gradientengereinigte EBs, sowie Präimmunsereum und finales Antiserum benötigt.

- 2×10^7 IUF gradientengereinigte EBs werden mit in Medium verdünnte Präimmunsereum bzw. Antiserum (1:10, 1:100 bzw. 1:1000) auf 50 μ l aufgefüllt und 2 h bei 4 °C inkubiert.
- Ein konfluenter HEp-2 Zellrasen (1×10^6 Zellen pro Well mit Deckgläschen) wird einmal mit HBSS gewaschen, mit 200 μ l Zellkulturmedium überschichtet und mit 50 μ l der Chlamydiensuspension versehen.
- Nach 2 h Inkubation bei 37 °C im Brutschank wird die Suspension abgenommen und der Zellrasen mit 1 ml Chlamydienkulturmedium überschichtet.
- Die Zellen werden für 24 h (*CtE*) bei 37 °C und 6 % CO₂ im Brutschrank inkubiert und anschließend mit Methanol fixiert.
- Gebildete Einschlüsse werden mittels direkter Immunfluoreszenz angefärbt (Pathfinder) und die Anzahl von 10 Gesichtsfedern quantifiziert.

3.7.3 Internalisierung proteinbeschichteter Latexkügelchen

Für die Analyse des Internalisationsverhaltens werden proteinbeschichtete, grün bzw. blau fluoreszierende Latexkügelchen eingesetzt (s. Kapitel 3.6.6.1).

- Ein halbkonfluenter Zellrasen (5×10^5 Zellen pro Well mit Deckgläschen) wird einmal mit HBSS gewaschen.
- Ein 5-facher Überschuss an Latexkügelchen ($2,5 \times 10^6$) in 200 μ l Zellkulturmedium wird zu den Zellen pipettiert, durch Schwenken verteilt und 5 min bei 700 Upm (Hettich Rotanta 460R) zentrifugiert.
- Die Inkubation erfolgt für 4 h bei 37 °C und 6 % CO₂ im Brutschrank.
- Die Zellen werden unter mikroskopischer Beobachtung mit HBSS gewaschen, bis die Zellzwischenräume frei von ungebundenen Latexkügelchen sind.
- Die Zellen werden mit 3 % PFA (frisch angesetzt) 10 min bei RT fixiert, zweimal mit HBSS gewaschen und anschließend direkt mittels indirekter Immunfluoreszenz gefärbt, ohne eine Permeabilisierung durchzuführen.
- Die gebundenen und internalisierten Kügelchen von 50 Zellen werden bestimmt.

3.7.4 Transfektion von HEp-2 Zellen mit TurboFect

Bei der Transfektion können Expressionsvektoren in Humanzellen eingebracht werden. Durch die Aktivierung des CMV-Promotors werden GFP- oder mCherry-Fusionsproteine exprimiert, deren Lokalisation mikroskopisch analysiert werden kann.

- HEp-2 Zellen werden dünn (etwa 5×10^4) in Zellkulturmedium ohne Antibiotika auf Deckgläschen ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 6 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.
- Das Medium wird abgenommen und durch 500 µl frisches Medium (ohne Antibiotika) ersetzt.
- Pro Well werden 100 µl serumfreies Zellkulturmedium ohne Antibiotika mit 0,5 µg Plasmid-DNA und 2 µl TurboFect Reagenz versetzt und durch Auf- und Abpipettieren gemischt.
- Die Lösung wird für 15-20 min bei RT inkubiert und anschließend tropfenweise zu den Zellen pipettiert. Die Platte leicht schwenken um die Lösung gleichmäßige zu verteilen.
- Die Zellen werden für 16-24 h bei 37 °C und 6 % CO₂ im Brutschrank inkubiert und im Anschluss 10 min bei RT mit 3 % PFA fixiert.

3.8 Mikroskopie

3.8.1 Fixierung humaner Zellen

Humanzellen können bevor sie mikroskopisch analysiert werden mit PFA oder Methanol fixiert werden.

Fixierung mit Methanol:

- Das Zellkulturmedium von den Zellen abnehmen und einmal mit HBSS waschen.
- Die Zellen mit 200 µl Methanol überschichten und 5 min bei RT fixieren.
- Methanol abnehmen und die Zellen einmal mit HBSS waschen.
- Die Zellen können in HBSS bei 4 °C über mehrere Wochen gelagert werden.

Fixierung mit para-Formaldehyd:

- Das Zellkulturmedium von den Zellen abnehmen und einmal mit HBSS waschen.
- Die Zellen werden mit 250 µl 3 % PFA (30 % Stocklösung in PBS verdünnt) für 10 min bzw. 20 min (Infektion) bei RT oder 4 °C fixiert.
- PFA abnehmen und die Zellen mit 1 ml HBSS überschichten.

- Die Zellen können bei 4 °C gelagert werden.

3.8.2 Permeabilisierung PFA-fixierter Zellen

PFA fixierte Zellen können bevor sie für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt, permeabilisiert werden.

- HBSS von den Zellen abnehmen.
- Mit 200 µl 0,2 % Triton X-100 in PBS oder 0,2 % Triton X-100 + 0,1 % SDS in PBS die Zellen überschichten und für 15 min bei RT permeabilisieren.
- Die Lösung abnehmen und die Zellen einmal mit PBS waschen, bevor sie für die Antikörperfärbung eingesetzt werden.

3.8.3 Immunfluoreszenz

Für die Färbung können direktmarkierte Antikörper (z.B.: Pathfinder, ein monoklonaler FITC-konjugierter Antikörper gegen chlamydienspezifische Lipopolysaccharide) verwendet werden (direkte Immunfluoreszenz, IF), oder spezifischer humaner oder chlamydialer primärer Antikörper in Kombination mit Fluoreszenz-konjugierten sekundären Antikörpern (indirekte Immunfluoreszenz).

- Die fixierten Zellen werden einmal mit PBS gewaschen.
- Es werden 30 µl Antikörper (in PBS verdünnt) auf den Zellen verteilt.
- Die Färbung erfolgt für 20 min im Dunkeln bei RT (direkte IF) oder 30-60 min bei 30 °C.
- Die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen und mit 30 µl verdünnten sekundären Antikörper versehen (indirekte IF) und für 30-60 min bei 30 °C inkubiert.
- Die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen.
- Optional 1: Die Färbung kann mit 3 % PFA für 5 min bei RT fixiert werden. Dieser Schritt sollte immer durchgeführt werden, wenn im Anschluss die Färbung mit einem direktmarkierten primären Antikörper mit gleicher Wirtsspezifität eines zuvor genutzten primären Antikörpers durchgeführt wird. Färbung erfolgt für 30-60 min bei 30 °C.
- Optional 2: Die Zellen können mit DAPI (1 µg/ml) oder anderen Farbstoffen (WGA, Bodipy) für 10 min bei RT gefärbt werden.

- Die Deckgläschen werden der Platte entnommen, getrocknet und der Zellrasen in einen Tropfen Vectashield auf einem vorbereiteten Objektträger gesetzt und mit Nagellack fixiert. Das Präparat kann im Dunkeln bei 4 °C gelagert werden.

3.8.4 Lebendfärbung von Chlamydien

Für die Lebendfärbung werden Kurzzeitinfektionen für 15 min wie unter 3.2.6 beschrieben durchgeführt. Die 24-Well Platte hat im Brutschrank direkten Kontakt zu einem auf 37 °C vorgewärmten Metallblock, um die Erwärmung der Zellen zu beschleunigen. Alle Schritte der Lebendfärbung erfolgen dann auf Eis.

- Das Zellkulturmedium wird abgenommen und 500 µl vorgekühlter Lebendzell-Mikroskopie-Puffer (LM-Puffer) auf die Zellen gegeben. Die Zellen werden 5 min abgekühlt, indem die 24-Well Platte auf Eis bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert wird.
- Der Puffer wird abgenommen und 40 µl Antikörperlösung (primäre Antikörper verdünnt in LM-Puffer) auf die Zellen gegeben.
- Die Färbung erfolgt für 30 min auf Eis bei 4 °C.
- Die Zellen werden dreimal mit kaltem LM-Puffer gewaschen.
- 40 µl Antikörperlösung (sekundärer Antikörper verdünnt in LM-Puffer) wird auf die Zellen gegeben.
- Die Färbung erfolgt für 30 min auf Eis bei 4 °C.
- Die Zellen werden erneut dreimal mit kaltem LM-Puffer gewaschen und mit 3 % PFA 5 min bei RT fixiert.
- Das PFA wird abgenommen und die Zellen mit 500 µl LM-Puffer versehen.
- Im Anschluss können die Zellen 10 min bei RT mit DAPI (1 µg/ml) gefärbt werden.
- Die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen und das Deckgläschen aus der Vertiefung der Platte entnommen, getrocknet und mit dem Zellrasen in einen Tropfen Vectashield auf einen vorbereiteten Objektträger gesetzt und mit Nagellack fixiert.

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung neuer potentieller *Chlamydia trachomatis* Serovar E Adhäsi

Chlamydien als obligat intrazelluläre Bakterien benötigen Proteine, sogenannte Adhäsi, um den Kontakt zur und die nachfolgende Aufnahme in die Wirtszelle einzuleiten. Eine Konneutralisation mit den bekannten Adhäsinen OmcB und Pmp21 führt zu keiner vollständigen Reduktion der *C. pneumoniae* Infektion (Becker und Hegemann 2014). Ein ähnliches Verhalten bei *C. trachomatis* ist anzunehmen. Woraus folgt, dass Chlamydien wie andere Pathogene weitere Adhäsi besitzen und multiple Strategien entwickelten um Wirtszellen zu infizieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher neue potentielle Adhäsi von *C. trachomatis* Serovar E identifiziert und charakterisiert werden.

4.1.1 Auswahl der zu testenden *C. trachomatis* Proteine

Zur Ermittlung interessanter Proteinkandidaten wurde ein literatur- und bioinformatikbasierter Ansatz gewählt. Anhand der drei Hauptkriterien (i) spätere Expression, (ii) immun-dominante Antigenwirkung und (iii) das Vorhandensein struktureller Hinweise auf eine Außenmembranprotein-Funktion, wurden verschiedene Proteine ausgewählt. Ihr Adhäsionsverhalten sollte im Anschluss mit rekombinantem Protein überprüft werden.

Basierend auf der Annahme, dass Proteine mit einer Funktion in der frühen Infektion spät in der vorherigen Infektion gebildet und in den metabolisch inaktiven EB eingelagert werden, erfolgte die Auswahl spät im Zyklus exprimierter bzw. stark hochregulierter Gene anhand von publizierten *C. trachomatis* Serovar D Transkriptomdaten (Belland, Zhong *et al.* 2003). Ein solches Expressionsverhalten ist u.a. für das chlamydiale Adhäsion OmcB bekannt (Belland, Zhong *et al.* 2003).

Des Weiteren wurden Proteine berücksichtigt, deren Homologe im Maus-Infektionsmodell durch Cruz-Fisher *et al.* bei *C. muridarum* als immun-dominante Antigene identifiziert wurden. Denn sowohl OmcB als auch Momp, beides Bestandteile des cOMCs, zählen zu den am stärksten exprimierten chlamydialen Antigenen (Newhall, Batteiger *et al.* 1982, Portig, Goodall *et al.* 2003, Cruz-Fisher, Cheng *et al.* 2011). Bei diesem Infektionsmodell wurden Mäuse intranasal oder intravaginal mit EBs bzw. mit UV-behandelten EBs infiziert. Um nachfolgend die Antigenwirkung aller Proteine zu ermitteln, wurden Proteom-Microarray-Chips mit dem gewonnenen Mäuseseren beprobt und ausgewertet.

Die anhand der drei Kriterien vorselektionierten 25 Proteine wurden danach mit der pCOMP Datenbank abgeglichen (Heinz, Tischler *et al.* 2009). Diese Datenbank sagt eine potentielle Membranlokalisierung von chlamydialen Proteinen vorher.

Anschließend wurden alle Proteine mit verschiedenen weiteren bioinformatischen Vorhersageprogrammen analysiert, um beispielsweise Signalsequenzen oder Transmembrandomänen zu identifizieren (s. elek. Anhang). Außerdem wurde die OMPdb Datenbank verwendet, die Vergleiche mit integralen β -Barrel Außenmembranproteinen (OMP) von gramnegativen Bakterien ermöglicht (Tsirigos, Bagos *et al.* 2011). Für CT142 wurde eine partielle Homologie zu TonB, einer Familie von Außenmembranrezeptoren für Siderophore und Vitamine, ermittelt. Für die Proteine CT503, CT759 und CT868 wurden geringe Homologien zu Vertretern der „Outer Membrane Fimbrial Usher Porin (FUP)“ Familie, der Autotransporter-2 Familie, dem das *Yersinia* Adhäsion YadA zugehört, respektive einer uncharakterisierten Invasin Familie ermittelt. Alle Proteine die mindestens zwei Kriterien erfüllten, wurden in die Liste zu

Tabelle 4.1: Übersicht der ausgewählten Kandidaten.

Auflistung der zwölf ausgewählten Proteine. Die Nomenklatur der Proteine richtete sich nach den CT-Nummern der Homologen in *Ctr D*, da eine Annotierung des *Ctr E* Genoms noch nicht vorgenommen wurde. Alle ausgewählten Kandidaten sind für mindestens zwei der Hauptkriterien (Expression, Immundominanz, pCOMP) positiv oder weisen eine weitere Eigenschaft (weitere Kriterien) auf, welche ihre Auswahl unterstützte (grau unterlegt). Die Kategorisierung der Expression in „spät“ bewertet eine beginnende Expression/Hochregulation der Genexpression ab 16 hpi oder später im Entwicklungszyklus, während „mittig“ eine Expression ab 8 hpi klassifiziert. p: mutmaßliche (putativ) Vorhersage als integrales Membranprotein. OMPdb Datenbank: Vorhersage von partiellen Homologien zu bekannten β -Barrel Domänen von Außenmembranproteinen. Yaa3: *C. pneumoniae* Homolog zu CT849. Die Proteine wurde mit Ctad1 bis 12 benannt (Ctad: *C. trachomatis* Adhäsion).

Protein	Synonym	Expression Belland 2003	Immundominanz Cruz-Fisher 2011	pCOMP Datenbank	Weitere Kriterien
CT017	Ctad1	spät	ja	p. integral	
CT142	Ctad2	mittig	nein	Integral	OMPdb
CT503	Ctad4	mittig	ja	kein Treffer	OMPdb
CT568	Ctad5	spät	nein	kein Treffer	
CT620	Ctad12	spät	nein	p. integral	
CT759	Ctad6	spät	nein	kein Treffer	OMPdb
CT868	Ctad8	spät	nein	kein Treffer	OMPdb
CT875	Ctad9	nicht gelistet	ja	p. integral	
CT289	Ctad11	spät	nein	kein Treffer	Nelson 2010
CT389	Ctad3	mittig	nein	kein Treffer	
CT623	Ctad7	spät	nein	integral	
CT849	Ctad10	spät	nein	integral	Yaa3

untersuchender potentieller Adhäsine aufgenommen (Tabelle 4.1). Die Ausnahme bildete CT568, welches lediglich das Kriterium der späten Expression erfüllte. CT568 wurde erstens zur Überprüfung dieses Kriteriums und zweitens, sollte es keine adhäsiven Eigenschaften besitzen, als interne Negativkontrolle mitgeführt. Zusätzlich wurden vier Proteine gesondert von den oben aufgeführten Kriterien aufgenommen (Tabelle 4.1 abgetrennt). CT289, CT389 und CT623 wurden aufgrund ihrer publizierten Anreicherung in der cOMC Fraktion Sarkosyl-behandelter EBs, und einer damit verbunden potentiellen Präsentation auf der bakteriellen Zelloberfläche, berücksichtigt (Liu, Afrane *et al.* 2010). Bei CT849 handelt es sich um das Homolog zu Yaa3 von *C. pneumoniae*, welches bereits zuvor im Hefe-Adhäsionssystem positiv auf Adhäsion getestet wurde (Fechtner 2009).

Bei den zwölf selektionierten Proteinen handelt es sich überwiegend um hypothetische Proteine. Für CT759 wird aufgrund der Präsenz zweier LysM Domänen eine Muramidase Funktion angenommen (NCBI). CT868 besitzt eine Deubiquitinase Protease Domäne und CT623 zählt zu den CHLPN 76 kD Proteinomologen (NCBI, Sanger Pfam Search).

Die ausgewählten Kandidaten wurden in Ctd1-12 (*C. trachomatis* Adhäsine) umbenannt. Um grundlegende Kenntnisse über ihre Funktion zu gewinnen, erfolgte initial die Überprüfung ihrer Bindungseigenschaft an Humanzellen, sowie die Analyse ihrer Neutralisationsfähigkeit bei einer chlamydialen Infektion. Hierfür wurden alle Kandidaten als rekombinantes Protein hergestellt.

4.1.2 Generierung rekombinanter Ctd-Proteine

Um rekombinantes Protein für die kommenden Experimente zu gewinnen, wurden die mittels PCR amplifizierte Gene durch Integration in den Expressionsvektor pFT25 C-terminal mit einem His₁₀-Tag fusioniert. Die Gene *ctad11* und *ctad12* konnten auch nach Verwendung verschiedener DNA-Polymerasen nicht amplifiziert werden. Eine Analyse dieser beiden Proteine war daher nicht möglich. Die verbliebenen zehn Proteine wurden exprimiert, affinitätschromatographisch gereinigt, dialysiert und die Reinheit des gewonnenen Proteins mittels coomassiegefärbten SDS-Gelen und Westernblot Analysen überprüft (Abbildung 4.1). Alle Proteine konnten aufgereinigt werden, wiesen zum Teil jedoch weitere Banden auf. Bei den Banden unterhalb des jeweiligen Vollängenproteins handelt es sich zumeist um Abbruchfragmente, da sie nicht nur im SDS-Gel, sondern auch mit dem anti-His Antikörper detektiertbar waren. Allerdings konnte auch eine unspezifische Bande bei allen Proteinen detektiert werden (Abbildung 4.1 A, Stern). Ctd2, Ctd4 und Ctd10 zeigten zusätzlich höhermolekulare Banden, die ebenfalls vom anti-His Antikörper erkannt wurden. Bei Ctd2 und Ctd4 könnte es sich um Proteindimere handeln (bei ~ 55 kDa). Proteinkomplexe sollten durch das Kochen

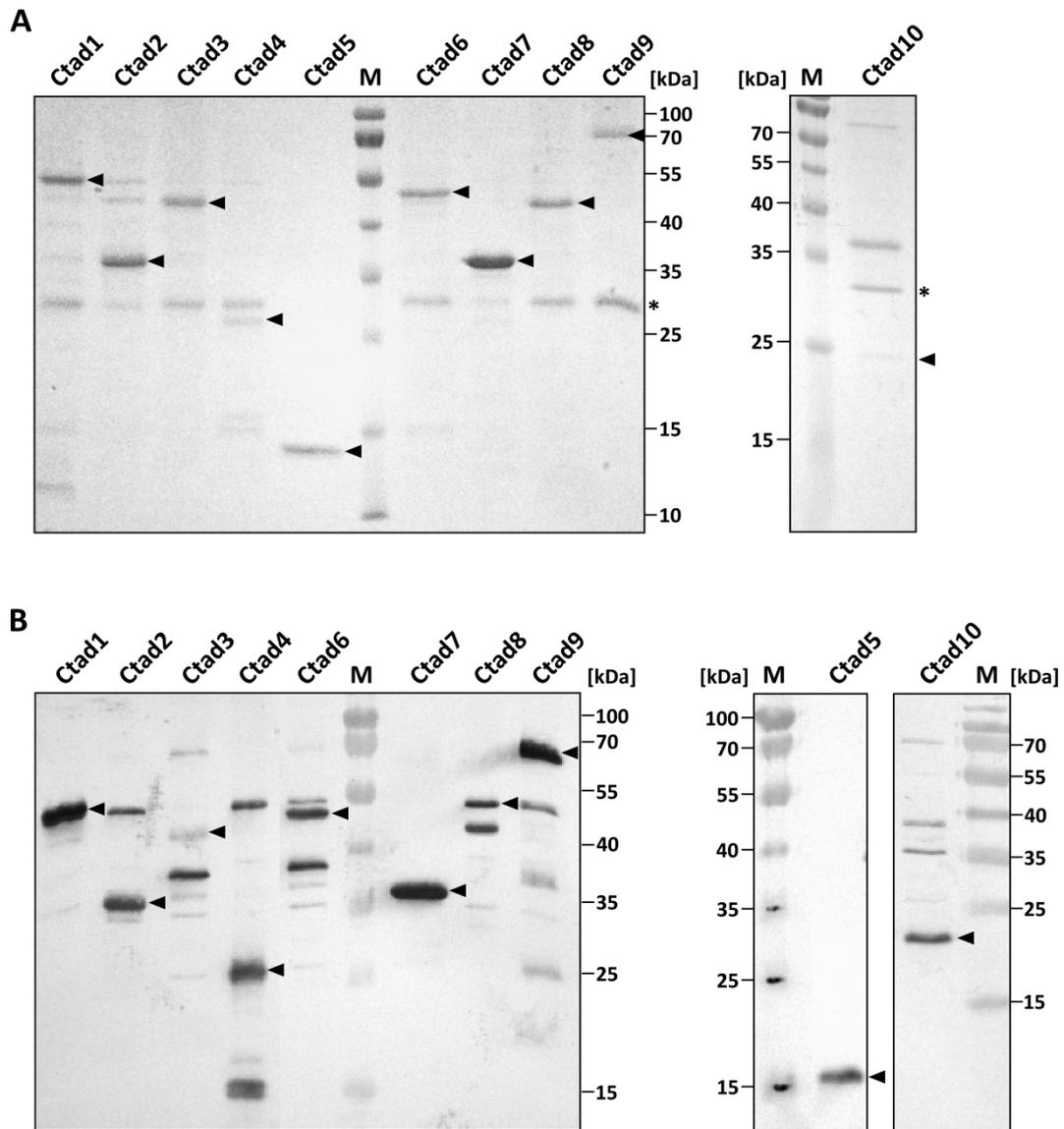


Abbildung 4.1: Aufreinigung der zehn Kandidatenproteine Ctad1 bis Ctad10.

Je Protein wurde eine 1 l *E. coli* Kultur bei 37 °C für 4 h inkubiert und bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 mit 1 mM IPTG induziert. Ctad10 wurde zusammen mit dem Chaperon Tfl6 exprimiert, welches durch Zugabe von 1 mg/ml Arabinose induziert wird. Die Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen über den His₁₀-Tag affinitätschromatographisch aufgearbeitet und zur Renaturierung gegen PBS bei 4 °C dialysiert (s. Kapitel 3.6.2.1). 32,5 µl der dialysierte Proteine wurden zu Proteinproben verarbeitet, 10 µl des Ansatzes mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend (A) mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt, oder (B) die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert, mit α-His Antikörper (1:2500) und AP-konjugiertem α-Maus Antikörper (1:7500) detektiert. Die Pfeile markieren die jeweiligen Vollängenproteinbanden. Stern: unspezifische Bande. M: Proteinstandard. Theor. MW Ctad1: 49 kDa, Ctad2: 33 kDa, Ctad3: 48 kDa, Ctad4: 23 kDa, Ctad5: 14 kDa, Ctad6: 50 kDa, Ctad7: 25 kDa, Ctad8: 42 kDa, Ctad9: 67 kDa, Ctad10: 19 kDa, Tfl6: 48 kDa.

mit DTT eigentlich denaturiert werden. Allerdings ist bekannt, dass einige Protein wie beispielsweise integrale Membranprotein sich unter den Standardbedingungen nicht vollständig denaturieren lassen (Wiener 2004). Da Ctad10 nur durch die Koexpression mit einem Chaperon (pTf16) exprimiert werden konnte, könnte es sich bei den höhermolekularen Banden um das Chaperon und seine potentiellen Abbruchbanden handeln.

Alle rekombinanten Ctad-Proteine (rCtad) liefen im SDS-Gel etwa auf Höhe oder lediglich leicht über ihrem theoretischen Molekulargewicht (max. ca. 5 kDa) und konnten für die Analyse der Bindung an Humanzellen eingesetzt werden.

Die erzielte Proteinausbeute an Ctad5 und Ctad10 fiel sehr gering aus und wurden durch die Verfolgung verschiedener Strategien versucht zu optimieren. Bei Ctad5 war die Renaturierung des Proteins problematisch. Daher wurden verschiedene Dialysepuffer, Dialysestrategien und ein On-Column-Renaturation mit dem Äktaprime Plus System durchgeführt. Das vollständige Präzipitieren des Proteins konnte jedoch nicht verhindert werden. Eine native Proteinaufreinigung blieb ebenfalls erfolglos (Daten nicht gezeigt). Bei Ctad10 war die Menge an exprimiertem und daraus resultierend gereinigtem Protein sehr gering. Die Expression konnte durch die Koexpression mit dem Chaperon (pTf16) nicht im erhofften Maße gesteigert werden. Die Verwendung verschiedener *E. coli* Expressionsstämme, -temperaturen und -vektoren bewirkten ebenfalls keine Verbesserung der Expression (Daten nicht gezeigt). Da die Expression und Reinigung des *C. pneumoniae* Homologes Yaa3 in einem parallel laufenden Projekt die gleichen Probleme bereitete (Fechtner 2012), wurden die Arbeiten an Ctad10 und Ctad5 nach den ersten Bindeanalysen im Rahmen dieser Arbeit eingestellt.

4.1.3 Die Ctad-Proteine vermitteln unterschiedliche Adhäsivitäten an HEP-2 Zellen

Für die eingehende Analyse der Bindungseigenschaft der rekombinanten Ctad-Proteine an Humanzellen wurden grün fluoreszierende Latexkügelchen, mit jeweils 200 µg/ml Proteinlösung beschichtet. Als Positivkontrolle wurde ein Adhäsion und Internalisierung vermittelndes Fragment des Invasin Proteins von *Yersinia pseudotuberculosis* verwendet (Dersch und Isberg 1999), sowie BSA als Negativkontrolle.

Der Erfolg der Beschichtung wurde mittels Westernblot überprüft (Abbildung 4.2 A). Alle Proteine konnten auf den Kügelchen nachgewiesen werden, wobei die Effizienz der Beschichtung stark variierte. Ctad8 und die Positivkontrolle Invasin waren etwa gleichwertig beschichtet, während Ctad1, Ctad5 und Ctad9 ungefähr halb so effizient beschichtet waren. Ctad6, Ctad7 und Ctad10 waren nochmals um etwa die Hälfte ineffizienter beladen als Ctad1. Im Gegensatz dazu waren die Ctad2, Ctad3 und Ctad4 Kügelchen etwa zwei- bis fünfmal so stark beschichtet wie die Invasin Kügelchen.

Im Folgenden wurden humane HEP-2 Zellen mit den proteinbeschichteten Kügelchen inkubiert und die mittlere Fluoreszenz der Zellen mit gebundenen fluoreszierenden Kügelchen mittels Durchflusszytometrie im FACSaria ermittelt (Abbildung 4.2 B). Die mittlere Fluores-

zenz (P1 Mittelwert) von Invasin wurde auf 100 % Adhäsion normiert. Die unspezifische Bindung der BSA Kügelchen lag bei 6 %. Die Ctad-Proteine vermittelten unterschiedlich starke Bindungen an die Humanzellen. Ctad2, Ctad4, Ctad8 und Ctad9 beschichtete Kügelchen adhärten mit 218 %, 205 %, 148 % bzw. 180 % stärker an HEp-2 Zellen als die Positivkontrolle Invasin. Eine etwa gleichwertige Bindung zu Invasin vermittelten Ctad1 (118 %)

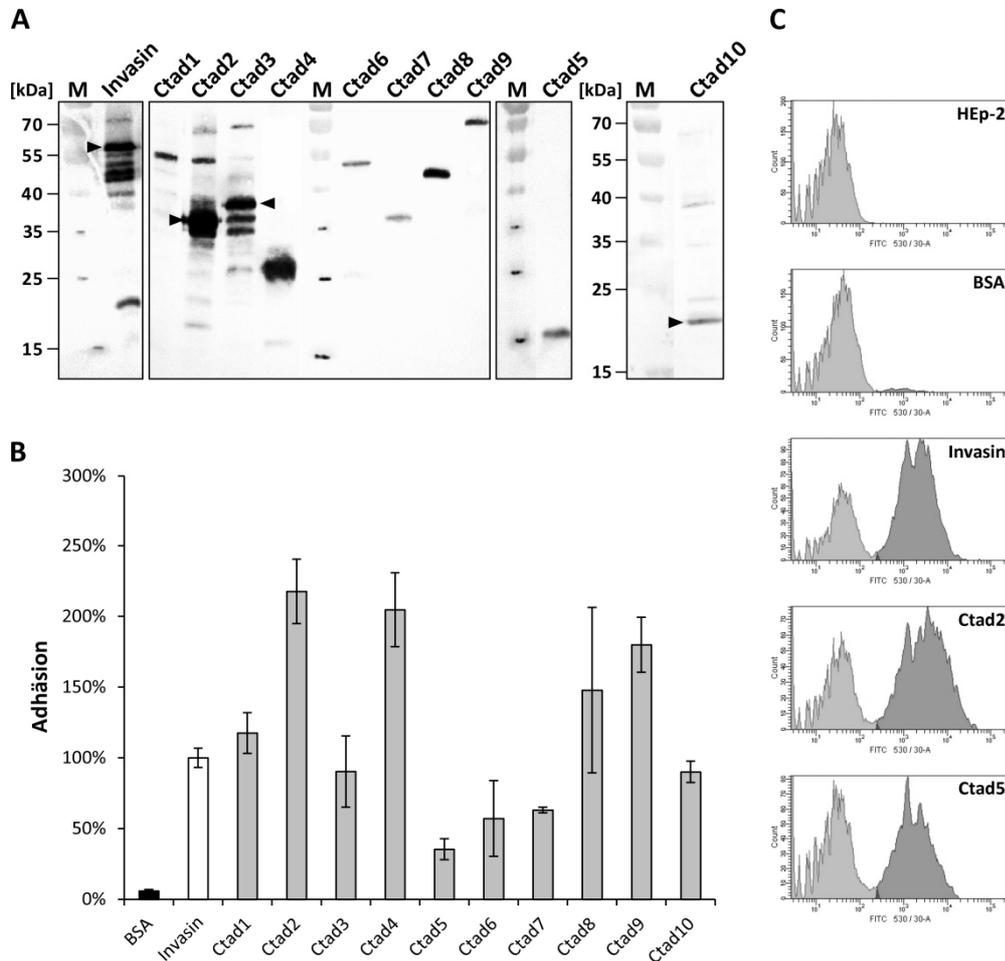


Abbildung 4.2: Adhäsionstest von Ctad-beschichteten Latexkügelchen an HEp-2 Zellen.

A) Zur Kontrolle der Proteinbeschichtung wurden die Proteine von 2×10^7 Latexkügelchen mittels SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und mit α -His Antikörper (1:2500) und AP-konjugiertem α -Maus Antikörper (1:7500) detektiert. M: Proteinstandard.

B) FACS-Auswertung der Adhäsionsexperimente. 1×10^9 grün fluoreszierende Latexkügelchen wurden mit $200 \mu\text{g/ml}$ rekombinanten Protein beschichtet. Ein 10-facher Überschuss an Kügelchen wurde zu konfluenten HEp-2 Zellen (1×10^6) gegeben und für 2 h bei 37°C und $6\% \text{CO}_2$ inkubiert. Ungebundene Kügelchen wurden durch Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden abgelöst und mit $3\% \text{PFA}$ fixiert. Die Quantifizierung der Adhäsion erfolgte durch Bestimmung der mittleren Fluoreszenz (P1 Mittelwert) von 10.000 HEp-2 Zellen und daran gebundenen Latexkügelchen im FACSaria. P1 setzt sich aus der Autofluoreszenz der Zellen und der Fluoreszenz der gebundenen Kügelchen zusammensetzt. Die ermittelte Adhäsion von Invasin-beschichteten Latexkügelchen wurde auf 100 % Adhäsion normiert. Die Experimente wurden als Triplikate durchgeführt ($n=2$, Ctad10 $n=1$).

C) Repräsentative Darstellung der FACS Ausgabedaten. Gegenüberstellung der Fluoreszenz bei 530 nm (X-Achse) gegen die Zellzahl (Y-Achse).

Ctad3 und Ctad10 (beide 90 %). Eine schwächere Bindung, die immer noch deutlich über der unspezifischen Bindung von BSA lag, vermittelten Ctad7 mit 63 %, Ctad6 (57 %) und Ctad5 mit lediglich 35 %. Die unterschiedlich starken Bindungen waren bereits in den FACS Histogrammen sichtbar (Abbildung 4.2 C).

Ein absoluter Vergleich der Bindungsstärke der Ctad-Proteine war schwierig, da die Beschichtungsqualität der Kügelchen stark variierte. Kügelchen, die stark gekoppelt waren, wie Ctad2 und Ctad4, zeigten eine überdurchschnittlich gute Bindung. Wohingegen Ctad3 im Vergleich zu Invasin eine gleichwertige Bindung vermittelte, bei deutlich stärkerer Beladung. Interessanterweise unterschieden sich jedoch die gleichwertig beschichteten Proteine Ctad1 bzw. Ctad9 und Ctad5 stark in der Bindung.

Sechs der untersuchten Ctad-Proteine vermittelten eine sehr gute bis überdurchschnittliche Bindung an Humanzellen.

4.1.4 Alle Ctad Proteinen verringern die chlamydiale Infektion

Die Präinkubation von Humanzellen mit rekombinanten Proteinen bekannter chlamydialer Adhäsine, wie OmcB oder Pmps, vermittelt eine Reduktion der Infektion (Moelleken und Hegemann 2008, Becker und Hegemann 2014). Das Protein besetzt dabei den Rezeptor auf der Humanzelle, wodurch dieser nicht mehr vom Bakterium gebunden werden kann und die Etablierung der Infektion negativ beeinträchtigt. Daher wurde zur weiteren Charakterisierung der Einfluss der rekombinanten Ctad-Proteine auf die chlamydiale Infektion untersucht.

Humane HEp-2 Zellen wurden mit jeweils 200 µg/ml Ctad-Proteinlösung inkubiert. Die Qualität der rekombinanten Proteine wurde zuvor überprüft und entsprach der Proteinqualität der vorherigen Bindestudie (Abbildung 4.3 A, vgl. Abbildung 4.2 A). Ctad5 und Ctad10 konnten in diesem Experiment nicht weiter untersucht werden, da keine ausreichenden Proteinmengen generiert werden konnten (s. Kapitel 4.1.2).

Zur Auswertung der Neutralisationsexperimente wurde die Anzahl der gebildeten Inklusionen bei PBS vorbehandelten Zellen auf 100 % Infektion normiert (Abbildung 4.3 B). Die Vorbehandlung der HEp-2 Zellen mit GST, als nicht-chlamydiales rekombinantes Protein, führte zu keiner signifikanten Veränderung der Infektion (Restinfektion 99 %). Alle getesteten Ctad-Proteine reduzierten die chlamydiale Infektion signifikant, wobei die Stärke der Reduktion je nach Protein variierte. So reduzierten Ctad1, Ctad2, Ctad3 und Ctad9 die Infektion um 20 % bis 28 % auf 72 %, 76 %, 80 % bzw. 76 %. Eine Vorinkubation mit Ctad4, Ctad6, Ctad7 oder Ctad8 senkte die Infektion durchschnittlich um 40 % (Restinfektion 62 %, 57 %, 59 % bzw. 54 %). Eine Veränderung in Morphologie und Größe der Inklusionen war dabei nicht zu beobachten (Abbildung 4.3 C). Folglich beeinflusst die Präinkubation der Zellen die initialen

Schritte der Infektion, die Adhäsion und/oder die Internalisierung, aber nicht die intrazelluläre Entwicklung der Bakterien.

Zusammenfassend konnte mit diesem Experiment gezeigt werden, dass alle rekombinanten Ctad-Proteine die Infektiosität von *C. trachomatis* EBs verringern, indem sie ihren potentiellen humanen Interaktionspartner blockieren. Somit kann für alle Ctad Proteine eine essentielle Rolle in der frühen Infektion postuliert werden.

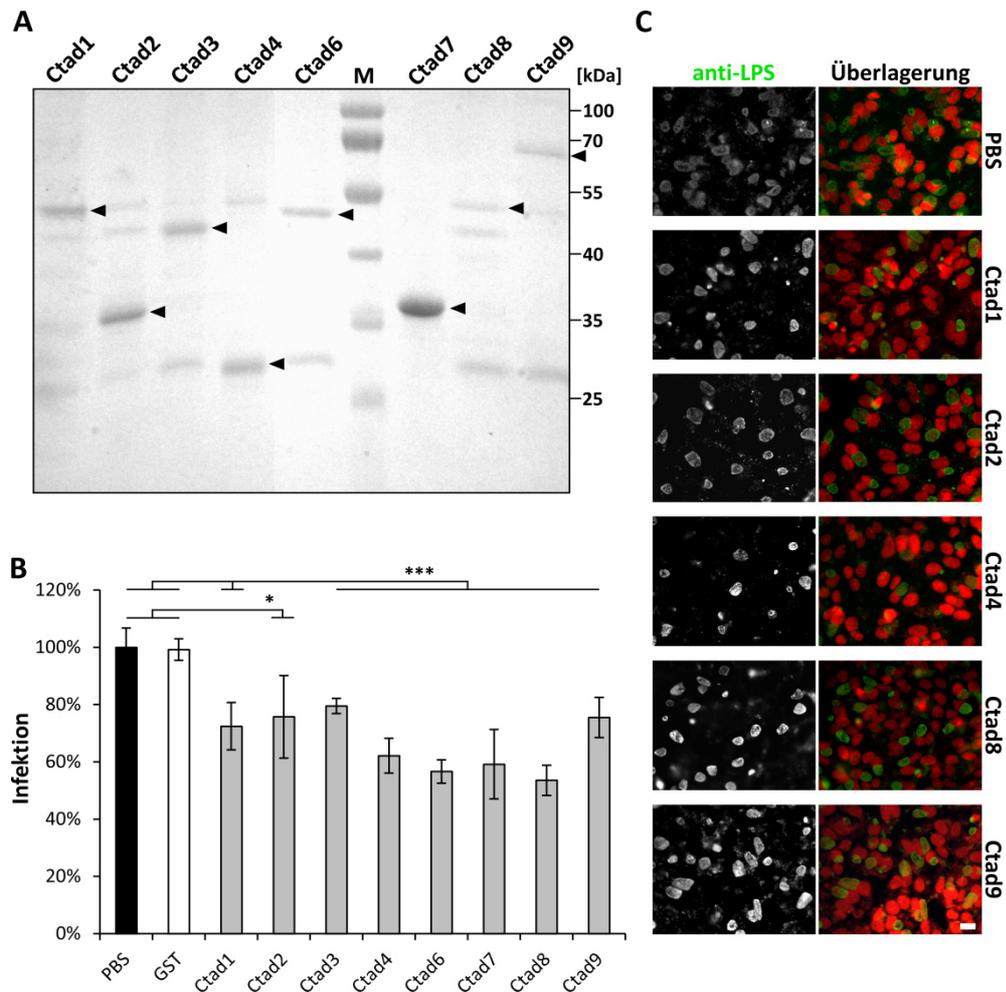


Abbildung 4.3: Alle rekombinanten Ctad-Proteine reduzieren die chlamydiale Infektion signifikant.

A) Kontrolle des eingesetzten rekombinanten Proteins mit coomassiegefärbtem SDS-Gel. Pfeilspitze: Proteinvollängenbanden. M: Proteinstandard.

B) Darstellung der Neutralisationsauswertung. 1×10^6 HEp-2 Zellen wurden mit 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protein bzw. PBS in Zellkulturmedium 2 h bei 37 °C inkubiert, bevor sie mit gradientengereinigten *Ctr* E EBs für 2 h bei 37 °C infiziert wurden (MOI: 20). Die Infektion wurde nach 24 h mit Methanol fixiert. Die gebildeten Einschlüsse wurden mittels FITC-konjugierten α -LPS Antikörper (1:8) gefärbt. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch von 20 Gesichtsfeldern bei 43-facher Objektivvergrößerung in Triplikaten (n=2).

*** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

C) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Neutralisationsexperimente. Die Einschlüsse wurden mit α -LPS Antikörper (grün) und die DNA mit DAPI (rot) gefärbt. Größenstandard: 5 μm .

4.2 Weiterführende Analysen der fünf besten Ctad-Kandidaten

Nach Auswertung der Bindungs- und Neutralisationseigenschaften wurde erneut eine Selektion vorgenommen, um die Kandidaten für die weiteren Analysen einzugrenzen. Da alle Kandidaten einen reduzierenden Effekt auf die chlamydiale Infektion ausübten, wurden die Proteine mit den besten adhäsiven Eigenschaften gewählt. Bei denen handelte es sich um Ctad1, Ctad2, Ctad4, Ctad8 und Ctad9. Ctad4 und Ctad8 überzeugten zusätzlich mit den stärksten neutralisierenden Eigenschaften. Obwohl Ctad6 und Ctad7 ebenfalls eine starke Reduktion der Infektion vermittelten, wurden sie aufgrund der schwachen Adhäsion nicht berücksichtigt. Im Folgenden sollten die Bindungs- und Neutralisationsstudien verifiziert und die Eigenschaften der Proteine weiter charakterisiert werden. Dafür wurden u.a. polyklonale Antikörper der fünf Proteine generiert.

4.2.1 Lösliches Cad1, Ctad2, Ctad4 und Ctad9 Protein bindet an humane HEp-2 Zellen

Um die Bindungseigenschaften der fünf Kandidaten genauer zu untersuchen, wurde lösliches rekombinantes Protein zu HEp-2 Zellen gegeben und bei 37 °C bzw. 4 °C inkubiert, letzteres um biologische Aktivität zu unterbinden. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Menge an gebundenem Protein mittels Westernblot quantifiziert (Abbildung 4.4 A).

GST konnte zu keinem Zeitpunkt, weder bei 4 °C noch bei 37 °C, auf den Zellen detektiert werden. Für Ctad1 konnte bei 4 °C nach 15 min eine schwache Bande detektiert werden, die nach 30 min leicht an Stärke gewann und anschließend etwa konstant blieb. Bei 37 °C konnte ebenfalls ab 15 min eine schwache Bande beobachtet werden, die im zeitlichen Verlauf stärker wurde. Die Adhäsion bei 37 °C fiel generell stärker aus als bei 4 °C, so adhärte zum 60 min Zeitpunkt 5-fach mehr Protein an den Zellen (Abbildung 4.4 B). Ctad2 adhärte bei 4 °C bereits ab der ersten Minute, wobei die Bande im zeitlichen Verlauf nicht wesentlich an Intensität zunahm. Bei 37 °C konnte für die ersten zwei Zeitpunkte (1 min, 15 min) nur eine leichte Zunahme der Bandenintensität detektiert werden. Nach 30 min gewann das Signal an Stärke und nahm zum 60 min Zeitpunkt erneut deutlich zu, sodass die Bindung bei 37 °C im Vergleich zu 4 °C um den Faktor 3,5 erhöht war. Für Ctad4 konnte zu allen Zeitpunkten bei 4 °C eine etwa gleichwertig gute Bindung detektiert werden. Bei 37 °C erfolgte die erste Detektion ebenfalls ab 1 min, nahm über den zeitlichen Verlauf jedoch stetig an Intensität zu. Im Vergleich zum 60 min Zeitpunkt bei 4 °C wurde bei 37 °C sechsmal mehr gebundenes Protein detektiert (Abbildung 4.4 A, B). Ctad8 hingegen konnte bei 4 °C zu keinem Zeitpunkt an den Zellen detektiert werden und war auch bei 37 °C erst ab 30 min als leichte Bande

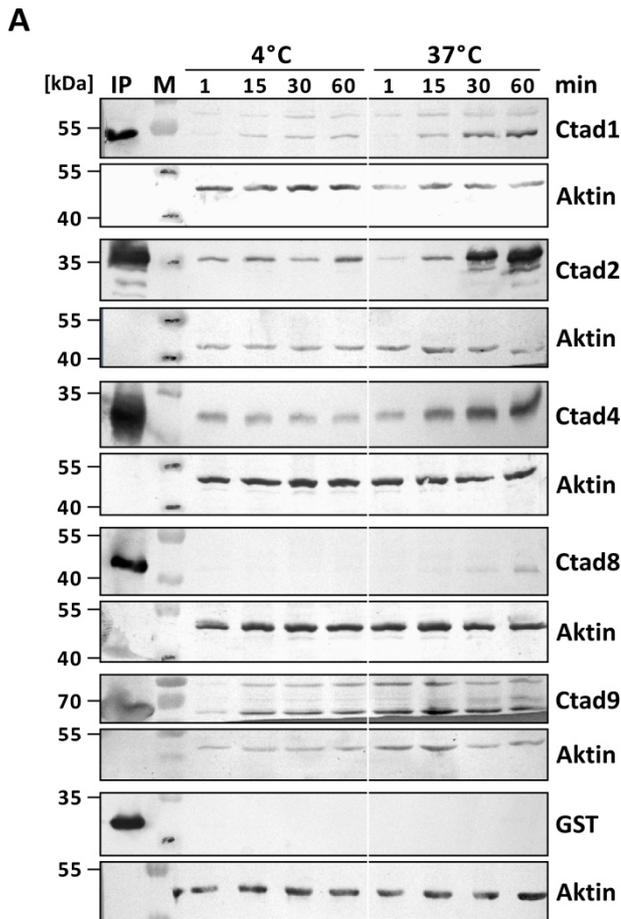


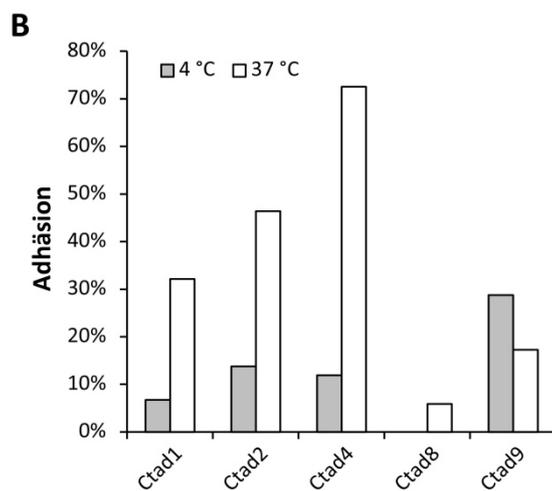
Abbildung 4.4: Protein Bindeexperiment mit löslichem Protein.

A) Repräsentative Westernblots des löslichen Proteinbindeexperimentes.

100 µg/ml Proteinlösung in Zellkulturmedium wurden zu vorgekühlten HEP-2 Zellen gegeben (1×10^6) und bei 4 °C bzw. 37 °C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen intensiv mit PBS gewaschen, abgelöst und pelletiert. Die Pellets und die Inputkontrolle (10 µl Proteinlösung) wurden zu Proteinproben verarbeitet und mittels Westernblot analysiert. Die Detektion erfolgte mit α -His (1:2500) und AP- α -Maus Antikörper (1:7500). Aktin diente als Ladekontrolle. M: Proteinstandard.

Ctad1: 49 kDa, Ctad2: 33 kDa, Ctad4: 23 kDa, Ctad8: 42 kDa, Ctad9: 67 kDa, GST: 28 kDa, Aktin: 42 kDa.

B) Bestimmung der Adhäsion zum Endzeitpunkt (60 min) durch Quantifizierung der Bandenintensität mit dem Programm ImageJ und Normierung mittels Inputbande. Bei Ctad9 ist zu berücksichtigen, dass durch den ungleichmäßig belichteten Hintergrund Unterschiede in der quantifizierten Bandenintensität bei 4 °C und 37 °C durch die Software auftreten.



sichtbar. Die Bindung verdoppelte sich zum 60 min Wert noch einmal, blieb im Vergleich zu den anderen Ctad-Proteinen jedoch gering (Abbildung 4.4 B). Für Ctad9 ließ sich ab 1 min bei 4 °C eine schwache Bande detektieren, die nach 15 min an Intensität (ca. 6-fach) gewann und anschließend konstant blieb. Bei 37 °C war unmittelbar ab der ersten Minute eine Bande zu detektieren, die zu allen Zeitpunkten etwa gleichwertig blieb und den Signalintensitäten bei

4 °C glich. Die stagnierende Bindung von Ctad9 und Ctad1 könnte auf die Absättigung eines potentiellen Interaktionspartners hindeuten (Abbildung 4.4 A, B).

Die Bindung von Ctad8 bestätigte sich nicht und warf erstmals Zweifel an einer Funktion als Adhäsion auf. Bevor die Arbeiten an Ctad8 jedoch vorschnell eingestellt werden, sollten noch weitere Fertigkeiten geprüft werden. Für die Proteine Ctad1, Ctad2, Ctad4 und Ctad9 konnten die adhäsiven Eigenschaften mit löslichem Protein bestätigt werden. Somit konnte die Adhäsivität dieser Proteine in zwei unabhängigen Experimenten gezeigt werden (vgl. Abbildung 4.2 B).

4.2.2 Nur Ctad4 reduziert die Adhäsion von EBs signifikant

Alle Ctad-Proteine vermittelten eine Reduktion der Infektion (s. Kapitel 4.1.4). Um zu analysieren, ob die Minderung auf einer verringerten Adhäsion oder beeinträchtigten Internalisierung basiert, wurden Adhäsionsstudien mit CFSE-markierten EBs an proteinvorbehandelten Humanzellen durchgeführt. Die CFSE-Markierung der EBs ermöglicht ihre Detektion im FACSaria, wodurch die Adhäsion der Bakterien an Humanzellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen bestimmt werden kann. Um eine Übersättigung der Zellen mit Bakterien zu vermeiden, wurden steigende Konzentrationen an EBs (IFU = *infection forming unit*) eingesetzt.

Die mittlere Fluoreszenz an PBS-behandelten Humanzellen mit adhären EBs, der höchsten verwendeten IFU, wurde auf 100 % Adhäsion normiert (Abbildung 4.5). Die Adhäsion der EBs an PBS vorbehandelten HEP-2 Zellen verhielt sich proportional zur eingesetzten Menge (Verdopplung der Adhäsion bei Verdopplung der IFU). Die Vorbehandlung der Humanzellen mit rekombinanten Ctad1 Protein reduzierte die Adhäsion der Bakterien bei der höchsten eingesetzten IFU um 28 % und lag nur geringfügig über der Signifikanzgrenze ($p = 0,05068$) (Abbildung 4.5 A). Bei Ctad2, Ctad8 bzw. Ctad9 vorbehandelten Zellen war eine Reduktion der Adhäsion durch die hohe Standardabweichung nicht signifikant und wurde daher als wildtypisch eingeschätzt (Abbildung 4.5 B, D und E). Die Präinkubation der HEP-2 Zellen mit Ctad4 verringerte die Adhäsion der Bakterien signifikant um 21 % (Abbildung 4.5 C).

Die neutralisierende Wirkung von rekombinanten Ctad1 und Ctad4 Protein auf die chlamydiale Infektion konnte somit auf eine Reduktion der Adhäsion zurückgeführt werden. Für Ctad2, Ctad8 und Ctad9 konnte hingegen keine signifikante Reduktion der Adhäsion aufgezeigt werden.

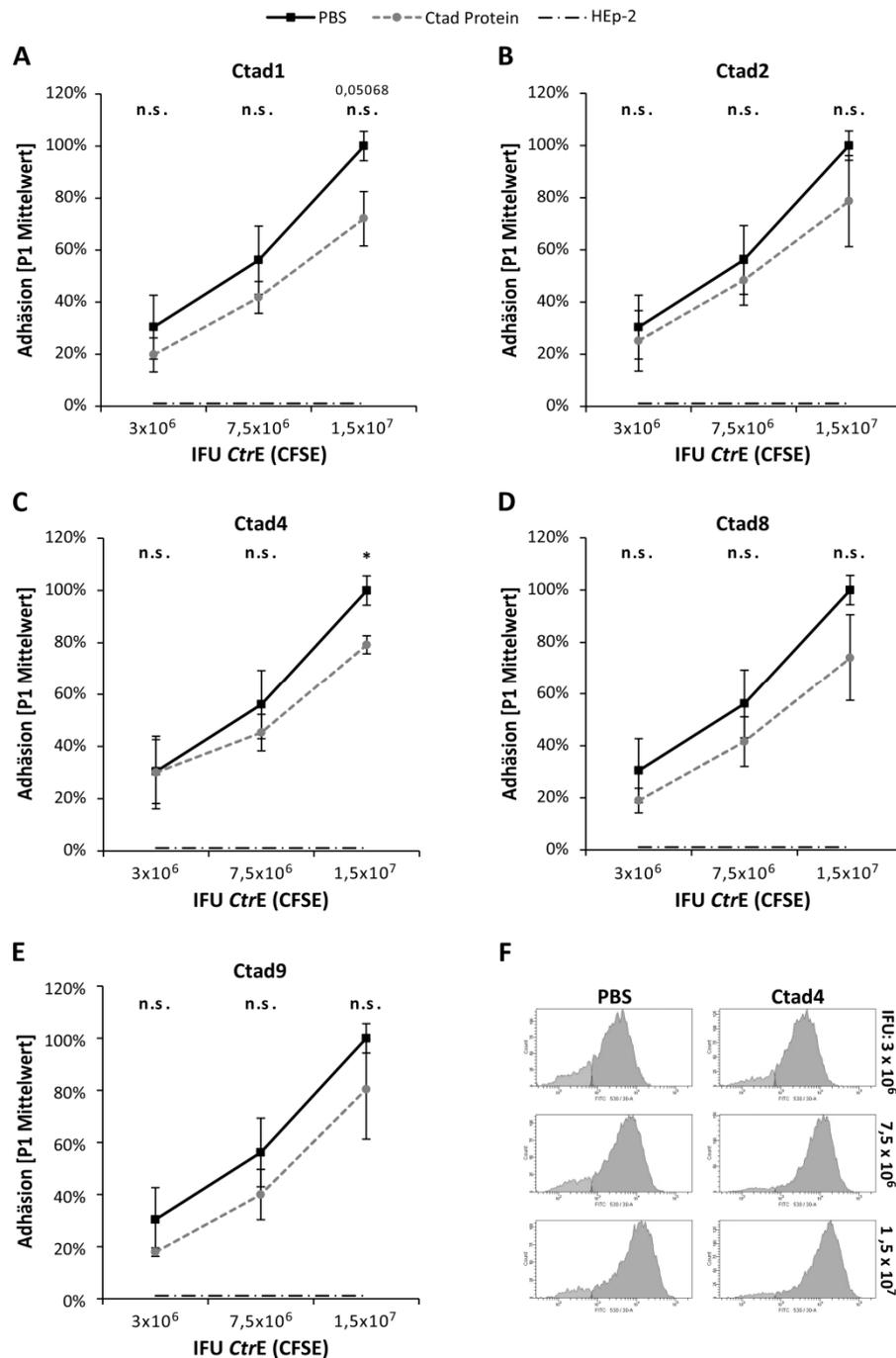


Abbildung 4.5: Adhäsion von CFSE-markierten EBs an proteinvorbehandelten HEp-2 Zellen.

A-E) Auswertung der Adhäsion von CFSE-markierten *CtrE* EBs an HEp-2 Zellen. 1×10^6 Zellen wurden 1 h bei 37°C mit $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ rekombinantes Protein vorbehandelt und anschließend für 1 h bei 37°C mit CFSE-markierten EBs steigender IFU versetzt. Die Zellen wurden anschließend gewaschen, abgelöst und mit PFA fixiert. Die mittlere FITC-Fluoreszenz von 10.000 Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Experimente wurden in Dupletts durchgeführt ($n=3$, Ctad2 und Ctad4 $n=2$). * $p < 0,05$. n.s.: nicht signifikant.

F) Repräsentative FACS-Ausgabedaten für PBS bzw. Ctad4. Gegenüberstellung der Zellzahl (Y-Achse) gegen die FITC-Fluoreszenz (X-Achse), wobei der hellgraue Bereich (links) Zellen ohne gebundene EBs und der dunkelgraue Bereich (rechts) Zellen mit gebundenen EBs repräsentiert. Die Eingrenzung erfolgte anhand von unbehandelten Zellen.

4.2.3 Patientenseren erkennen vier der fünf Ctad-Proteine

Eins der Hauptausschlusskriterien für die Kandidaten war die vorhergesagte Immundominanz basierend auf einem proteomweiten Antigentest bei *C. muridarum* (s. Kapitel 4.1.1) (Cruz-Fisher, Cheng *et al.* 2011). Daher erfolgte eine Überprüfung der Immunreaktivität der rekombinanten Ctad-Proteine mit Seren von Patienten, bei denen eine *C. trachomatis* Infektion oder eine Mischinfektion mit *C. pneumoniae* nachgewiesen worden war (Abbildung 4.6).

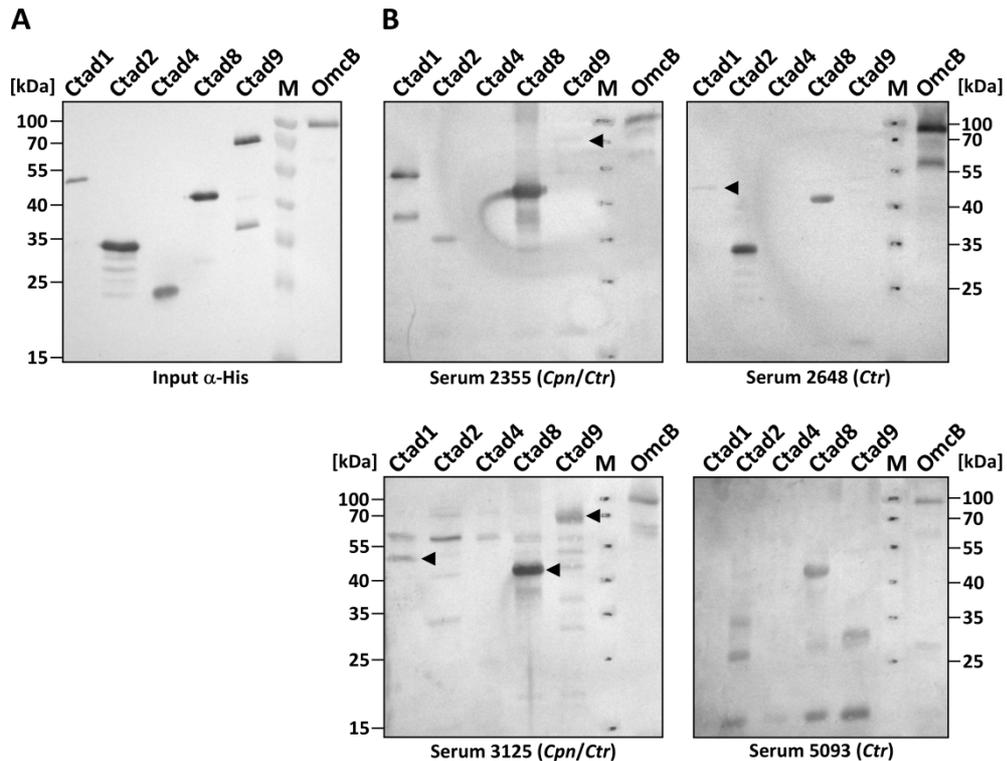


Abbildung 4.6: Ermittlung der Immunreaktivität der fünf Ctad-Proteine mit Patientenseren.

A) Ladekontrolle der eingesetzten rekombinanten Proteine. Detektion: α -His (1:2500) und AP- α -Maus Antikörper (1:7500).

B) Westernblot Analyse zur Ermittlung der Immunreaktivität. Jeweils 1 μ g Protein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und die Proteine auf der PVDF-Membran mittels Guanidin-HCl Gradienten renaturiert. Die Proteine wurden mit Patientenseren (1:1000) inkubiert und gebundener Antikörper mit AP- α -Human Antikörper (1:7500) detektiert. M: Proteinstandard. Ctad1: 49 kDa, Ctad2: 33 kDa, Ctad4: 23 kDa, Ctad8: 42 kDa, Ctad9: 67 kDa, GST-OmcB: 83 kDa.

Alle vier getesteten Seren erkannten das immundominante Kontrollprotein OmcB (Abbildung 4.6 B). Die Antikörperreaktion auf die fünf Ctad-Proteine fiel unterschiedlich aus. So wurde Ctad4 von keinem der verwendeten Seren erkannt. Im Gegensatz dazu reagierten alle vier Seren sehr stark auf Ctad8. Ctad2 wurde von drei Patientenseren als Antigen unterschiedlich stark erkannt; darunter waren zwei reine *C. trachomatis* Infektionen und eine Mischinfektion. Ctad1 wurde ebenfalls unterschiedlich stark von drei Seren als Antigen erkannt. Die Detektion von Ctad9 erfolgte nur durch zwei Seren, wobei Serum 3125 eine starke Detektion zeigte und

Serum 2355 nur eine sehr schwache. Auffallend war jedoch, dass Ctad9 ausschließlich von Seren einer Mischinfektion erkannt wurde, obwohl kein Homolog in *C. pneumoniae* existiert. Die serologische Analyse bestätigte, dass Ctad1 und Ctad9 jedoch auch Ctad2 und Ctad8 immunreaktive Antigene sind. Eine Immundominanz für Ctad4 konnte nicht bestätigt werden.

4.2.4 Die hypothetischen Ctad-Proteine werden während der Infektion exprimiert

Da es sich bei Ctad1, Ctad2, Ctad4 und Ctad9 bis zu diesem Zeitpunkt um uncharakterisierte hypothetische Proteine handelte, wurde mit den neu generierten Antikörpern zuerst die Expression anhand einer Zeitkinetik durch den gesamten chlamydialen Entwicklungszyklus überprüft (Abbildung 4.7). Das intrachlamydiale Kontrollprotein DnaK konnte bereits zum Start der Infektion (0 hpi) als schwache Bande detektiert werden, welche den Ausgangszustand der im metabolisch inaktiven EB vorhandenen DnaK Proteinmenge repräsentiert. Ab 12 h nach der Infektion (hpi) bis zum Ende des Zyklus (48 hpi) gewann die Bande stetig an Intensität, welches auf die konstitutive Expression des Protein und die Zunahme der Bakterien zurückzuführen ist. Ein ähnliches Expressionsmuster zeigte Momp, das ab dem Start der Infektion als dünne Bande, unterhalb einer unspezifischen Bande, detektierbar war und ab 24 hpi deutlich an Stärke gewann (Abbildung 4.7, Pfeilspitze vgl. uninfizierte Zellen (HEp-2)). Beim sechs Stundenwert war wahrscheinlich durch die etwas geringere Beladung (vgl. Aktin Ladekontrolle) keine Bande für Momp zu detektieren. Die Expression von S1, einem ribosomalen chlamydialem Protein, war erstmals 18 hpi zu beobachten, also zu einem Zeitpunkt im Entwicklungszyklus zu dem die RB Replikation erfolgt. Ab 36 hpi blieb die S1 Konzentration etwa konstant, ein Zeichen dafür, dass die Replikation der RBs zum größten Teil abgeschlossen ist und die Ausdifferenzierung zu EBs erfolgt. Ob bereits ab 30 hpi die S1 Expression stagnierte und im Vergleich zu 36 hpi konstant blieb, kann aufgrund der etwas geringeren Beladung nicht genau beurteilt werden. Die geringere Bande bei 42 hpi kann jedoch auf die geringere Beladung zurückgeführt werden (Abbildung 4.7).

Ein deutliches Einsetzen der Expression war für Ctad1 und Ctad8 18 hpi zu sehen. Die Expression beider Proteine stieg 24 hpi weiter an und blieb ab 30 hpi etwa konstant. Zu früheren Zeitpunkten als 18 hpi konnte keine eindeutige Aussage über die Expression getroffen werden, da beide Antiseren Hintergrundbanden erzeugen, die schwache spezifische Expressionsbanden überdecken könnten. Für Ctad2 und Ctad9 konnten erst ab 30 hpi bzw. 36 hpi eine Expression ermittelt werden. Die Expression von Ctad2 nahm von 30 hpi auf 36 hpi stark zu und schien anschließend bis 48 h wieder schwächer zu werden. Im Gegensatz dazu blieb die

Expression von Ctad9 bis zum Ende des Zyklus etwa konstant. Ctad4 war ebenfalls aufgrund einer unspezifischen Bande auf gleicher Höhe des Proteins erst ab 30 hpi eindeutig zu erkennen. Die Stärke der Expression nahm bis 48 hpi stetig zu.

Somit konnte die Expression aller fünf Ctad-Proteine erstmalig nachgewiesen werden.

Komplementierend zu den Ergebnissen des Expressionsverlaufs wurden subzelluläre mikroskopische Lokalisationsanalysen beginnend ab 24 hpi unternommen. Die Darstellung der Ergebnisse und der daraus resultierenden weiteren Untersuchungen der fünf Ctad-Proteine erfolgt der Übersichtlichkeit halber von jetzt an getrennt voneinander.

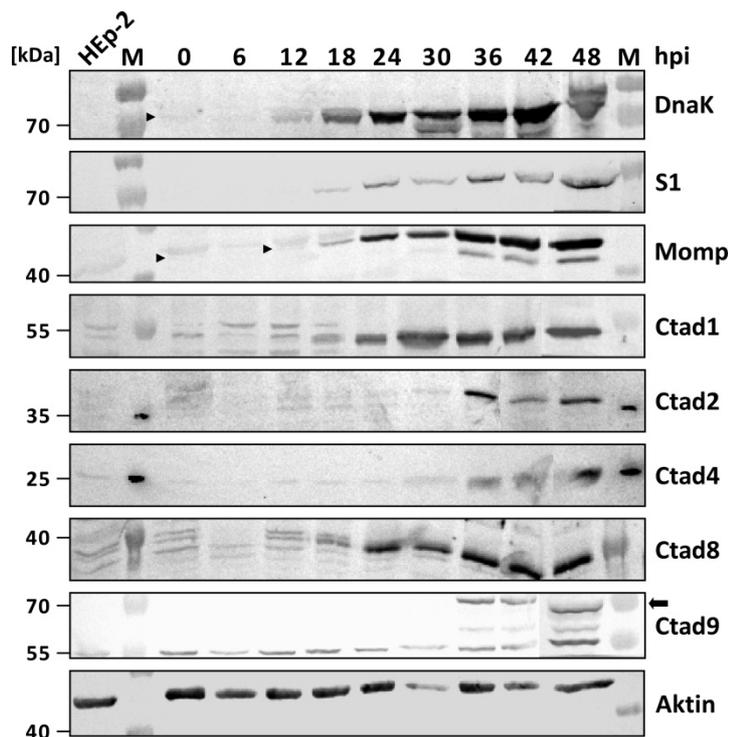


Abbildung 4.7: Analyse der Ctad-Proteinexpression im chlamydialen Entwicklungszyklus.

Westernblot Analyse der Ctad-Expression. Je zwei 25 cm² Zellkulturflaschen wurden konfluent mit HEp-2 Zellen bewachsen, mit *Ctr E* infiziert (MOI: 5), zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und mit 150 µl Phospho-Lysis-Puffer, 57,9 µl Protein-Ladepuffer und 23,1 µl 1 M DTT aufgekocht um Gesamtzelllysate zu generieren. Die Probene wurden mit primärem α-DnaK (1:500), abgereicherten α-Ctad1 (1:500), α-Ctad2 (1:200), α-Ctad4 (1:100), α-Ctad8 (1:200) bzw. α-Ctad9 (1:200) Serum (s. Kapitel 3.6.10.3.1) und sekundärem AP-α-Kaninchen Antikörper (1:7500) sowie mit primären α-S1 (1:500), α-Momp (1:500) und α-Aktin (1:3000) und sekundärem AP-α-Maus Antikörper (1:7500) detektiert. HEp-2: uninfierte Zellen. Pfeilspitze markiert schwache Banden. Pfeil: Ctad9 Vollängenprotein. Theor. MW: Ctad1: 48 kDa, Ctad2: 31 kDa, Ctad4: 22 kDa, Ctad8: 40 kDa, Ctad9: 66 kDa, DnaK: 71 kDa, Momp: 42 kDa, S1: 62 kDa, Aktin: 42 kDa.

4.3 Charakterisierung von Ctad8

4.3.1 Ctad8 lokalisiert an der Inklusionsmembran

Im Laufe der Arbeit stellte sich heraus, dass Ctad8 bereits als ChlaDub1 (Cdu1) bekannt ist. Cdu1 besitzt eine deubiquitinierende und deneddylierende Proteasefunktion (Misaghi, Balsara *et al.* 2006), die supprimierend auf die Aktivierung von NF- κ B wirkt (Le Negrate, Krieg *et al.* 2008). Da aufgrund des stark kondensierten chlamydialen Genoms angenommen wird, dass viele Proteine mehr als eine Funktion besitzen, wurden die Arbeiten an Ctad8 dennoch weitergeführt. Aufgrund der publizierten Mikroskopie zu Cdu1 wird eine Sekretion ins Wirtszellzytosol postuliert (vgl. (Le Negrate, Krieg *et al.* 2008)). Bei objektiver Betrachtung dieser Mikroskopie lässt die präsentierte Qualität jedoch keinen Rückschluss auf eine genaue Lokalisation zu. Außerdem machen die Autoren widersprüchliche Angaben zum Zeitpunkt der Fixierung. Daher wurde die Lokalisation von Ctad8 (Cdu1) in *C. trachomatis* infizierten HEp-2 Zellen mit einem selbst generierten anti-Ctad8 Antikörper erneut analysiert (Abbildung 4.8).

Bereits das Prä-Immuneserum erkannte auf infizierten Zellen (48 hpi) unspezifisch tubuläre Strukturen im Zytoplasma (Abbildung 4.8 A). Daher wurde der Antikörper antigengereinigt und der Hintergrund des Antikörpers auf uninfizierten Zellen bestimmt (Abbildung 4.8 B). Der gereinigte anti-Ctad8 Antikörper vermittelte eine diffuse Hintergrundfärbung des Zytoplasmas, mit einer Anreicherung des Signals im Zellkern. Die mit dem Prä-Immuneserum detektierten tubulären Strukturen waren nicht mehr zu beobachten. Daher wurde der Antikörper für die Lokalisationsanalyse in infizierten Zellen eingesetzt und eine Kofärbung mit anti-Momp Antikörper, zur Markierung der Bakterien, durchgeführt. Nach 24 hpi war eine punktierte Lokalisation von Ctad8 in der Inklusion zu beobachten, wobei nur teilweise eine Kolo-kalisation mit Momp an den Bakterien auftrat und eine Anreicherung des Signals an der Inklusionsmembran beobachtet wurde. Des Weiteren waren Signale im Zytoplasma der Zelle detektierbar. Ob es sich hierbei um sekretiertes Protein oder um ein unspezifisches Hintergrundsignal handelte, konnte nicht eindeutig bestimmt werden, aufgrund des bereits zuvor beschriebenen Hintergrunds in uninfizierten Zellen. Die Anreicherung des Signals an der Inklusionsmembran nahm 48 hpi zu und die Signale im Inklusionslumen bzw. an den Bakterien wurden geringer (Abbildung 4.8 C). Die Lokalisation des Ctad8 Proteins an der Inklusionsmembran blieb bis zur Lyse der Inklusion und der Freisetzung der EBs bestehen, wie in der Aufnahme nach 66 h zu sehen ist. An den bereits aus dem Einschluss freigesetzten bakteriellen Partikeln konnte hingegen kein Ctad8 Signal detektiert werden (Abbildung 4.8 C Pfeil).

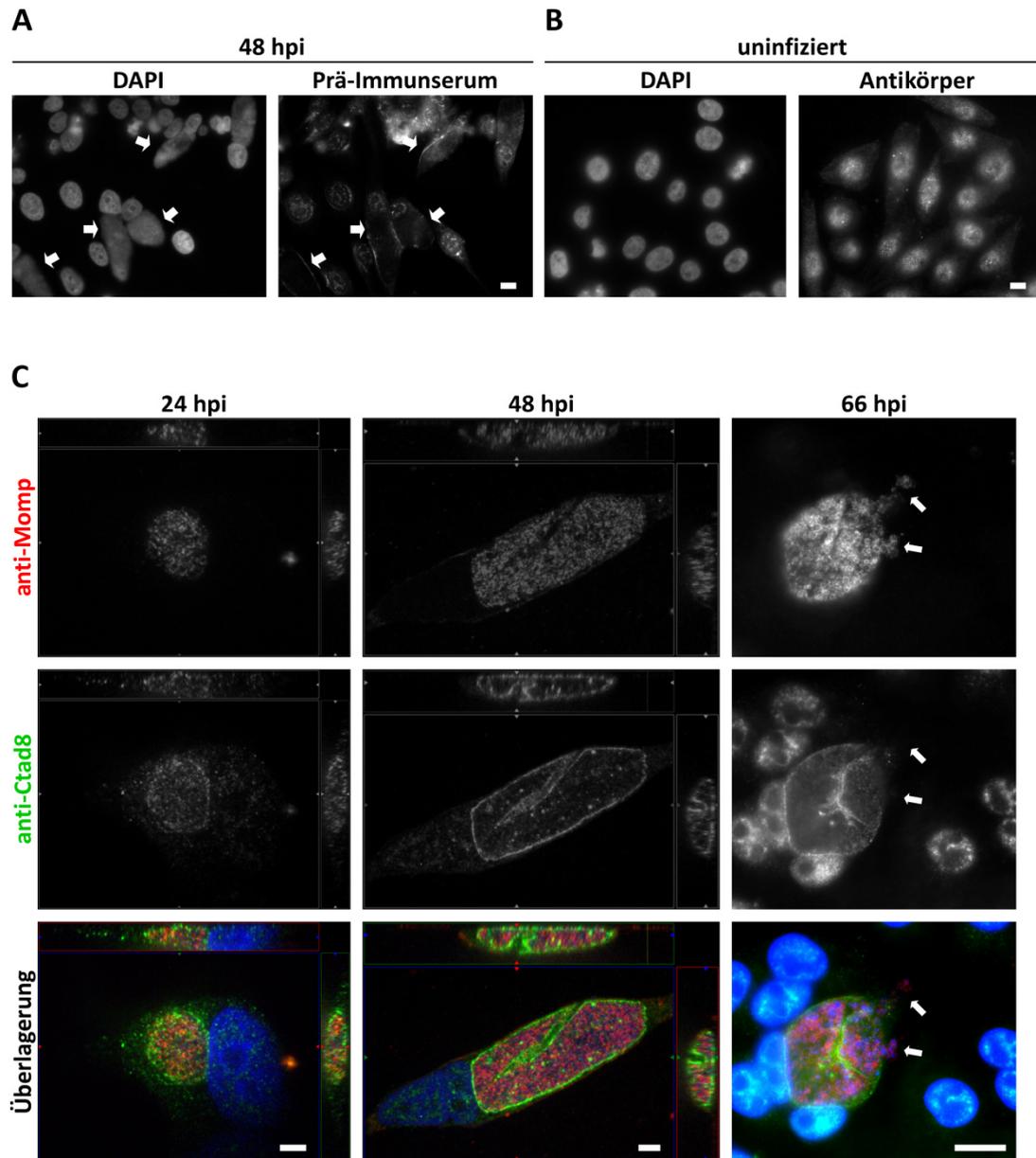


Abbildung 4.8: Lokalisationsanalyse von Ctad8.

A) HEp-2 Zellen wurden mit *Ctr E* (MOI: 0,5) für 48 h infiziert und mit Methanol fixiert. Die Färbung erfolgte mit Ctad8 Prä-Immunsereum (1:25), sekundärem Alexa488- α -Kaninchen Antikörper (1:200) und DAPI (1:1000). Pfeile markieren Inklusionen. Größenstandard: 10 μ m.

B) Uninfizierte HEp-2 Zellen wurden mit 3 % PFA fixiert und anschließend mit 0,2 % Triton permeabilisiert. Die Färbung erfolgte mit α -Ctad8 Antikörper (1:3), sekundärem Alexa488- α -Kaninchen Antikörper (1:150) und DAPI (1:1000). Größenstandard: 10 μ m.

C) *Ctr E* infizierte HEp-2 Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit 3 % PFA fixiert, anschließend mit 0,2 % Triton permeabilisiert und mit primären α -Ctad8 Antikörper (1:3), α -Momp Antikörper, sekundären Alexa488- α -Kaninchen Antikörper (1:200) bzw. Alexa594- α -Maus Antikörper (1:200) und DAPI (1:1000) gefärbt. 24 hpi und 48 hpi: Konfokalmikroskopie. Pfeile markieren bereits freigesetzte Bakterien. Größenstandard: 10 μ m.

Zur Überprüfung der Spezifität des eingesetzten anti-Ctad8 Antikörpers wurde dieser gegen BSA bzw. rCtad8 proteinbeschichtete Kügelchen abgereichert (Abbildung 4.9). Die Proteinbeschichtung der Ctad8-gekoppelten Kügelchen wurde zuvor mittels Westernblot überprüft

(Abbildung 4.9 A). Die Kontrollfärbung der Kügelchen nach der Absorption bestätigte, dass der Ctad8 Antikörper an die Ctad8-gekoppelten Kügelchen gebunden hatte. Aber auch an den BSA-gekoppelten Kügelchen konnten geringe Mengen Antikörper detektiert werden (Abbildung 4.9 B). Die Färbung mit dem BSA präabsorbierten anti-Ctad8 Antikörper bestätigte die bereits zuvor beobachtete Lokalisation und Spezifität des Proteins an der Inklusionsmembran, da für den spezifisch antigenangereicherten Ctad8 Antikörper kein Signal mehr an der Inklusionsmembran detektierbar war. Die unspezifische Hintergrundfärbung in Zytoplasma und Zellkern blieb jedoch bestehen (Abbildung 4.9 C).

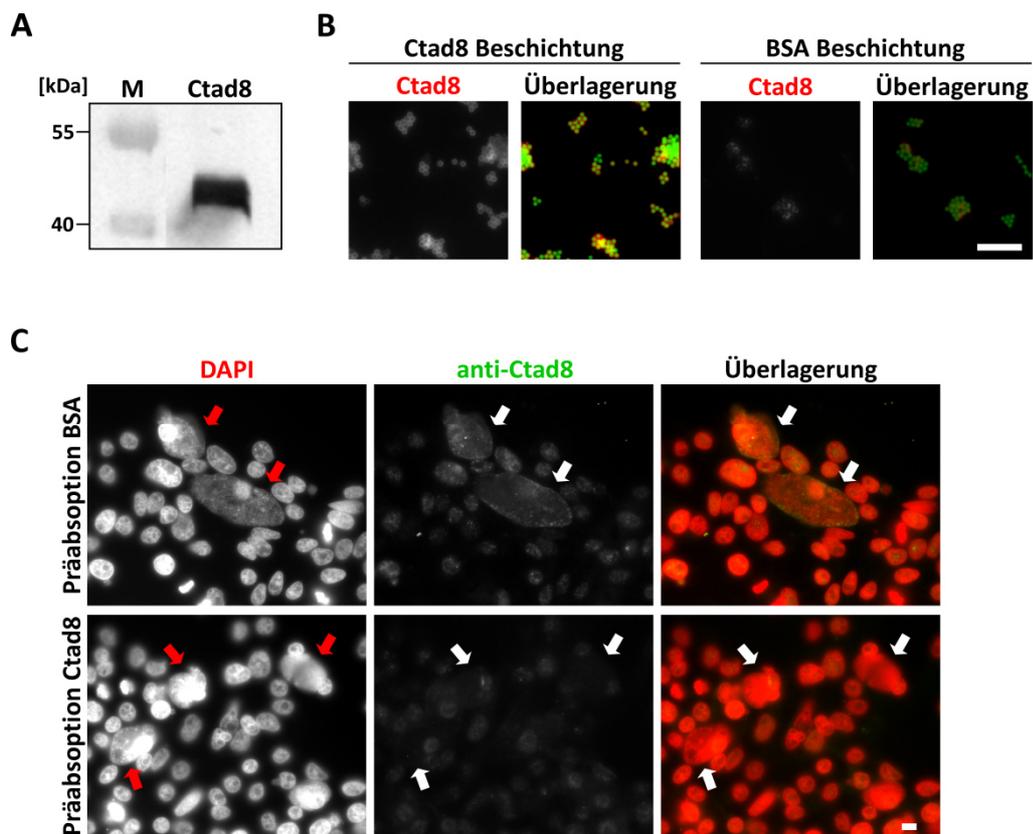


Abbildung 4.9: Die Präabsorption des α -Ctad8 Antikörpers mit Ctad8 Antigen bestätigte seine Spezifität. Grün fluoreszierende Kügelchen wurden mit 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rCtad8 Protein bzw. BSA beschichtet und je 60 μl antigenereinigter Antikörper wurden mit 3 % BSA und 0,3 % Tween versetzt und ü/N auf 4 °C mit den Kügelchen inkubiert. Der Antikörper wurde abgenommen und für die Immunfluoreszenz eingesetzt.

A) Kontrolle der Proteinbeschichtung mittels Westernblot: α -His (1:2500) und AP- α -Maus Antikörper (1:7500).
B) Färbung der Kügelchen nach der Antikörper Präabsorption mit Alex594- α -Kaninchen Antikörper (1:200). Die Aufnahmen wurden unter denselben Aufnahmebedingungen generiert. Größenstandard: 10 μm
C) *Ctr E* infizierte HEP-2 Zellen wurden 48 hpi mit 3 % PFA fixiert und anschließend mit 0,2 % Triton permeabilisiert (MOI: 0,5). Die Färbung erfolgte mit BSA bzw. Ctad8 präabsorbiertem α -Ctad8 Antikörper (1:2), Alex488- α -Kaninchen Antikörper und DAPI (1:1000, rot dargestellt). Pfeile markieren Inklusionen. Größenstandard: 10 μm .

Zur Überprüfung der beschriebenen Lokalisation von Ctad8 an der Inklusionsmembran wurden Kofärbungen mit einem Antikörper gegen IncA, einem bekannten Inklusionsmembranprotein vorgenommen. Sowohl 24 hpi als auch 48 hpi konnte eine eindeutige Kolo-kalisation

von Ctad8 mit IncA beobachtet werden (Abbildung 4.10, 48 hpi s. Abbildung A.1.1), welches tatsächlich eine Lokalisation von Ctad8 an der Inklusionsmembran impliziert. An wenigen bakteriellen Partikeln konnte eine partielle Assoziation von Ctad8 und Momp bestimmt werden, die aber auch bei IncA auftrat und wahrscheinlich den Zeitpunkt der Proteinsekretion darstellt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine eindeutige Lokalisation für Ctad8 an der Inklusionsmembran bestimmt werden konnte. Aufgrund der Lokalisation und den bereits zuvor geschilderten Schwächen in der Adhäsion (s. Kapitel 4.2.1) kann eine Funktion von Ctad8 als Adhäsion ausgeschlossen werden, weshalb die Arbeiten an diesem Protein eingestellt wurden.

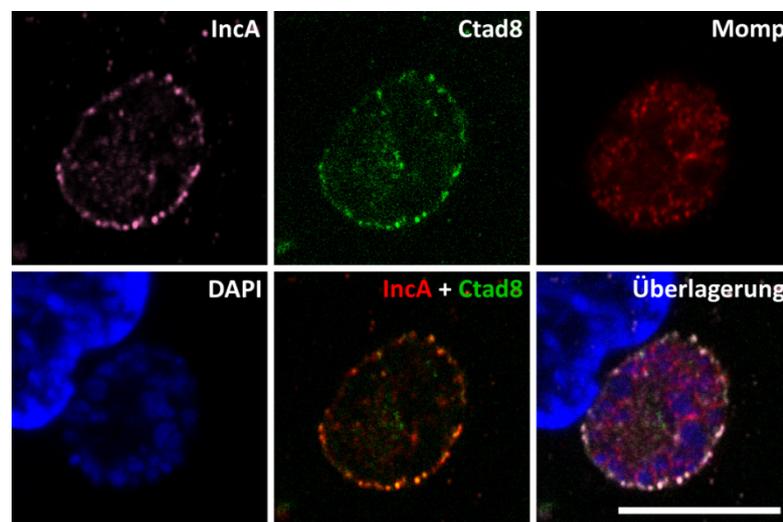


Abbildung 4.10: Ctad8 kolokalisiert mit IncA.

HEp-2 Zellen wurden für 24 h mit *CtrE* infiziert, mit 3 % PFA fixiert und anschließend mit 0,2 % Triton permeabilisiert. Die Färbung erfolgte mit primären α -IncA (1:30), α -Momp Antikörper (1:100) und sekundären Alexa649- α -Kaninchen (1:200) und Alexa594- α -Maus Antikörper (1:200). Anschließend wurde die Färbung mit 3 % PFA fixiert, um unspezifische Reaktion des sekundären Kaninchen-Antikörpers mit dem im Anschluss verwendeten FITC-markierten α -Ctad8 Antikörper (pur) zu verhindern. Färbung der DNA mit DAPI (1:1000). IncA+Ctad8: IncA fehlfarben in rot dargestellt. Größenstandard: 10 μ m. Infektion 48 hpi s. Abbildung A.1.1.

4.4 Charakterisierung von Ctad2

4.4.1 Ctad2 lokalisiert auf RBs und könnte sekretiert werden

Ctad2 ist ein Protein ohne bekannte Domänen. Da die zuvor erhobenen Daten eine Funktion als Adhäsion suggerierten, wurde die Lokalisation von Ctad2 während der Infektion mit einem neu generierten Antikörper analysiert. Zuerst wurde das Prä-Immunsereum von Ctad2 auf infizierten HEp-2 Zellen getestet, welches ebenfalls filamentöse Strukturen in der Zelle anfärbte (Abbildung 4.11 A). Daher erfolgte eine Antigenreinigung des Serums, und der gewonnene Antikörper wurde für die Lokalisationsanalyse verwendet. Auf uninfizierten Zellen erzeugte dieser ein punktiertes Hintergrundsignal im Zellkern und weiterhin die fädigen Strukturen im Zytoplasma jedoch in geringer Intensität (Abbildung 4.11 B, Pfeil).

Zur Überprüfung der Expressionsdaten von Ctad2 wurden bereits 24 hpi Zeitwerte gefärbt, um die Diskrepanz zwischen ermittelter Proteinexpression in der Infektionskinetik (Protein ab 30 hpi) und den publizierten Transkriptomdaten (mRNA ab 8 hpi) aufzuklären (s. Abbildung 4.7, Tabelle 4.1, (Belland, Zhong *et al.* 2003). Zudem wurden die infizierten Zellen mit 3 % PFA fixiert und anschließend mit 0,2 % Triton permeabilisiert, wodurch Zell- und Inklusionsmembran für den Antikörper durchlässig werden, eine Färbung von intrachlamydialen Proteinen jedoch vermieden wird. Auf der Bakterienoberfläche lokalisierte Proteine sind hierbei anfärbbar (Wuppermann, Molleken *et al.* 2008, Mölleken, Schmidt *et al.* 2010).

24 hpi konnte für Ctad2 ein punktiertes Signal im Einschluss detektiert werden (Abbildung 4.11 C, Pfeil). Ein Großteil der Signale schien dabei losgelöst von den Momp gefärbten RBs im Inklusionslumen zu lokalisieren. Das Signal im Inklusionslumen unterschied sich in der Intensität und der Kompaktheit von den unspezifischen Signalen im Zellkern. Ob das Protein auch in die Humanzelle sekretiert wird, konnte aufgrund des Antikörperhintergrunds nicht eindeutig bestimmt werden. 48 hpi trugen nur einige bakterielle Partikel in der Inklusion ein Ctad2 Signal, bei denen es sich von der Größe des DAPI Signals, das sie umschlossen, um RBs handeln könnte. Darüber hinaus wurden in einigen uninfizierten Zellen filamentöse Strukturen angefärbt, die z. T. ihren Ursprung an Inklusion benachbarter Zellen zu haben schienen. Ob es sich dabei ebenfalls um sekretiertes Protein oder um das bereits erwähnte unspezifische Hintergrundsignal des Antikörpers handelte ist unklar (Abbildung 4.11 C, Pfeil vgl. B).

Somit konnte Ctad2 mikroskopisch spät in der Infektion nur auf einigen RBs detektiert werden. Ob Ctad2 48 hpi intrachlamydial in EBs vorliegt, kann aufgrund der Fixierung nicht ausgeschlossen werden. Die Detektion von Ctad2 zu späten Zeitpunkten in der Infektionskinetik unterstützt diese Annahme (vgl. Abbildung 4.7). Adhäsine sollten spät in der Infektion aller-

dings oberflächenzugänglich und EB-assoziiert vorliegen, da die infektiösen Partikel kurz vor der Freisetzung und Einleitung einer neuen Infektion stehen. Eine Funktion von Ctad2 als Adhäsion kann daher ausgeschlossen werden. Bei Ctad2 könnte es sich jedoch um einen neuen Effektor handeln, der in die Inklusion oder vielleicht auch in die Humanzelle sekretiert wird.

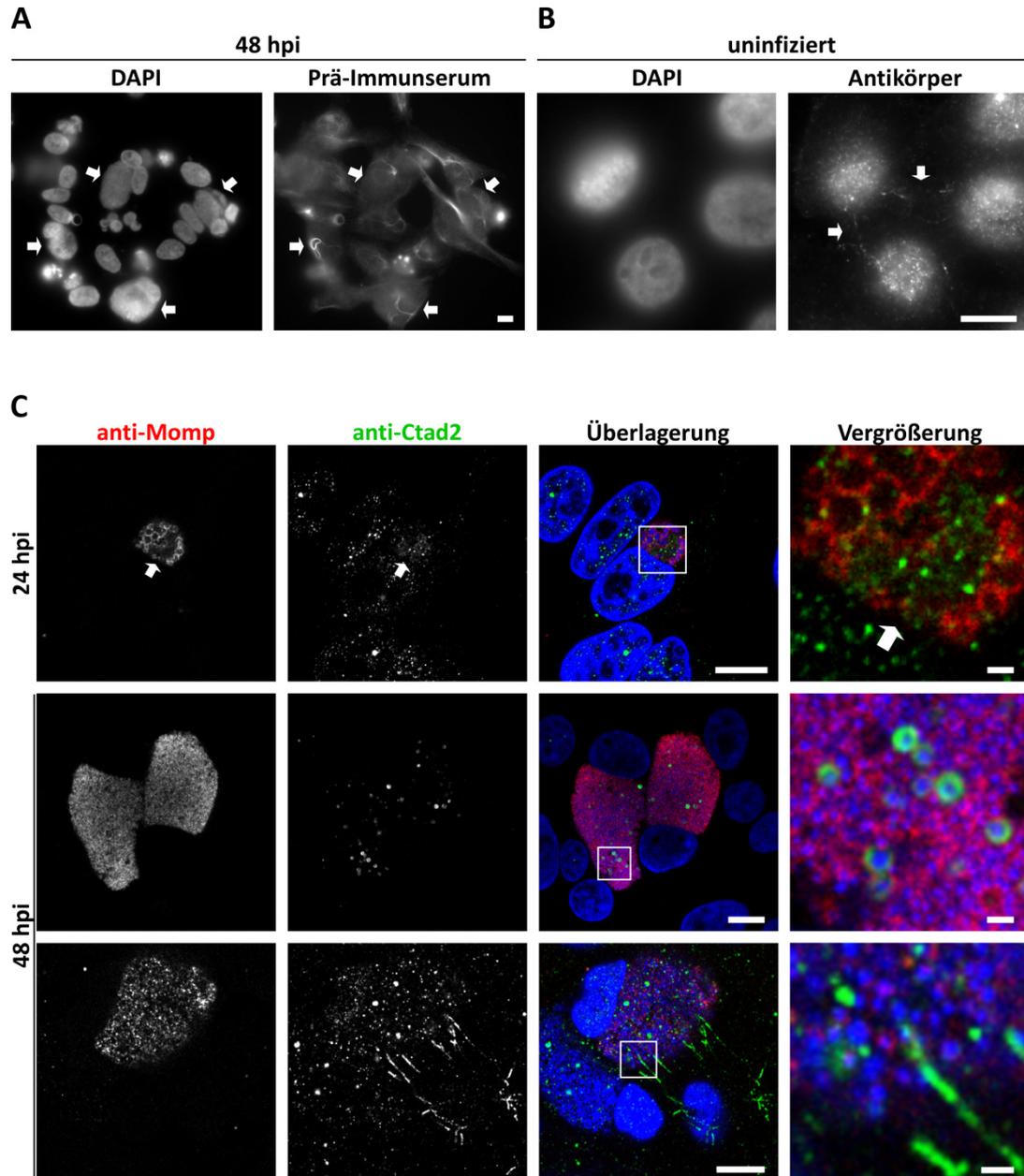


Abbildung 4.11: Ctad2 lokalisiert spät in der Infektion hauptsächlich an RBs.

A) Methanolfixierte HEp-2 Zellen wurden mit Ctad2 Prä-Immunsereum (1:25) und sekundärem Alexa488- α -Kaninchen Antikörper (1:200) und DAPI (1:1000) gefärbt. Pfeile: Inklusionen. Größenstandard: 10 μ m.

B) Uninfizierte HEp-2 Zellen wurden mit 3 % PFA fixiert, permeabilisiert (0,2 % Triton), mit α -Ctad2 Antikörper (1:1), Alexa488- α -Kaninchen Antikörper (1:200) und DAPI (1:1000) gefärbt. Pfeile markieren unspezifische fädige Strukturen. Größenstandard: 10 μ m

C) Konfokalmikroskopie von *CtrE* infizierten HEp-2 Zellen (MOI: 0,5). Zellen wurden mit 3 % PFA fixiert, anschließend mit 0,2 % Triton permeabilisiert, mit primären α -Ctad2 (1:1) und α -Momp (1:100) Antikörper, sekundären Alexa488- α -Kaninchen (1:200), Alexa594- α -Maus Antikörper (1:200) und DAPI (1:1000) gefärbt. Größenstandard: 10 μ m, Vergrößerung: 1 μ m. Pfeil: potentiell sekretiertes Protein.

4.4.2 Die Sekretion von Ctad2 ist uneindeutig

Zur Überprüfung der Spezifität des anti-Ctad2 Antikörpers wurde eine Präabsorption des antigengereinigten Antikörpers gegen BSA- bzw. rCtad2-beschichtete Kügelchen durchgeführt (Abbildung 4.12 A). Die erfolgreiche Absorption wurde durch Gegenfärbung der Kügelchen bestätigt und der Antikörper für die vergleichende Analyse eingesetzt (Abbildung 4.12 B und C). Wie zuvor auf uninfizierten Zellen zu beobachten, färbte sowohl der BSA- als auch der Ctad2-abgereicherte anti-Ctad2 Antikörper unspezifisch punktiert den Zellkern infizierter als auch uninfizierter Humanzellen. Mit dem BSA abgereicherten anti-Ctad2 Antikörper konnte 24 hpi die zuvor beobachtete Lokalisation von Ctad2 im Einschluss bestätigt werden. Der antigenabgereicherte anti-Ctad2 Antikörper färbte 24 hpi allerdings ebenfalls diffus den Einschluss, wenn auch in geringerer Intensität bei gleichen Aufnahmebedingungen (Abbildung 4.12 C, vgl. Überlagerung). Eine eindeutige Aussage über die Sekretion des Proteins konnte daher nicht erzielt werden. Die spät in der Infektion ermittelte Lokalisation von Ctad2 an RBs konnte durch die Präabsorption des Antikörpers als spezifisch bestätigt werden (Abbildung 4.12 D). Zur Spezifität der fädigen Strukturen konnte keine Aussage getroffen werden, da zu keinem der hier untersuchten Zeitpunkt und mit keinem der abgereicherten Antikörper, Fäden detektierbar waren. Die Spezifität der Lokalisation des Proteins konnte somit nur für die späte Infektion eindeutig bestätigt werden.

Um die potentielle Sekretion des Proteins ins Wirtszellzytoplasma zu untersuchen, wurde die Lokalisation von transfiziert exprimiertem Ctad2-GFP in HEp-2 Zellen studiert. Ctad2-GFP lokalisierte wie exprimiertes GFP des Leervektors im Zytoplasma der Zelle und im Zellkern (Abbildung 4.13). Eine spezifische Lokalisation für Ctad2-GFP an einem Zellorganell oder an der Zellmembran konnte nicht beobachtet werden.

Abschließend legen die RB-assoziierte Lokalisation und die potentielle Sekretion von Ctad2 eher eine Funktion als neues Effektorprotein und nicht als Adhäsion nahe, daher wurden die Arbeiten an Ctad2 im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr weitergeführt.

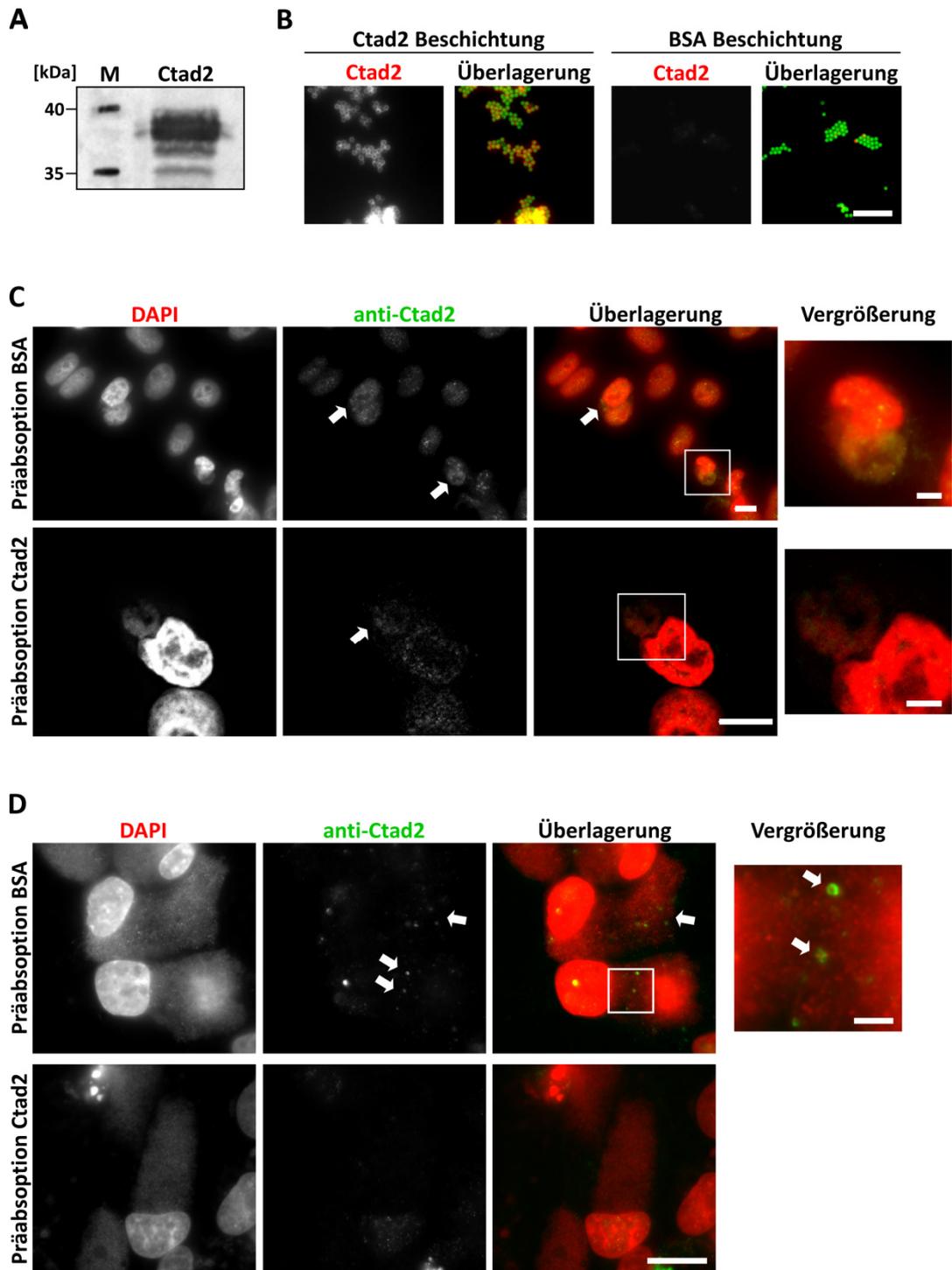


Abbildung 4.12: Bestimmung der Spezifität des anti-Ctad2 Antikörpers.

Die Präabsorption des Antikörpers, Infektion und Färbung im Anschluss wurden wie in Abbildung 4.9 beschrieben durchgeführt.

- A)** Kontrolle der Proteinbeschichtung mittels Westernblot: α -His (1:2500) und AP- α -Maus Antikörper (1:7500).
B) Färbung der Kügelchen nach der Antikörper Präabsorption mit Alex594- α -Kaninchen Antikörper (1:200). Die Aufnahmen wurden unter denselben Aufnahmebedingungen generiert. Größenstandard: 10 μ m
C) und **D)** Fixierung der *CtrE* Infektion 24 hpi (**C**) bzw. 48 hpi (**D**) mit 3 % PFA und anschließender Permeabilisierung mit 0,2 % Triton. Die Färbung erfolgte mit BSA oder Ctad2 präabsorbiertem α -Ctad2 Antikörper (pur), sekundärem Alexa488- α -Maus Antikörper (1:200) und DAPI (1:1000). Die Aufnahmen wurden unter denselben Aufnahmebedingungen generiert. Größenstandard: 10 μ m, Vergrößerung: 2 μ m.

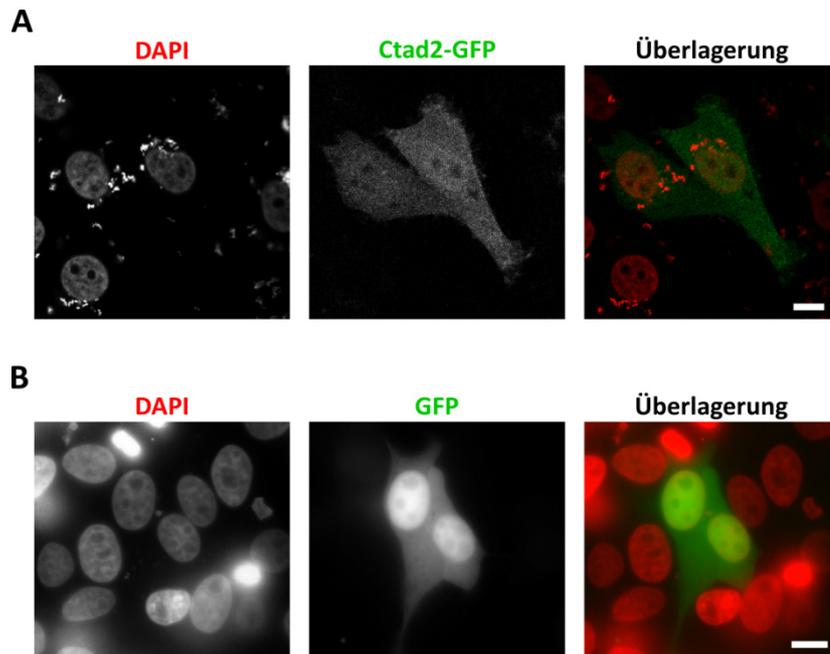


Abbildung 4.13: Transfiziert exprimiertes Ctad2-GFP lokalisiert im Zytoplasma der Zelle. Die Transfektion erfolgte für 18 h, anschließend wurden die Zellen mit 3 % PFA fixiert und mit DAPI (1:1000) gefärbt. Größenstandard: 10 µm

A) Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahme von Ctad2-GFP transfizierten HEp-2 Zellen.

B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des transfizierten Leervektors (pKM55).

4.5 Charakterisierung von Ctad4

4.5.1 Ctad4 wird nur spät im Infektionszyklus exprimiert

Ctad4 ist ein kleines 184 Aminosäure umfassendes Protein, für das keine bekannten Domänen vorhergesagt wurden. Ctad4 erfüllte in den vorangegangenen Experimenten alle Eigenschaften eines potentiellen Adhäsins. Ctad4 vermittelte (i) Bindung an Humanzellen, reduzierte (ii) die chlamydiale Infektion und (iii) die Adhäsion von EBs. Daher wurde im Folgenden die Lokalisation des Proteins während der Infektion mit dem neu generierten anti-Ctad4 Antikörper analysiert. Standardmäßig wurde zuerst das Prä-Immunsereum auf *C. trachomatis* E infizierten Zellen getestet, wobei keine signifikante Färbung ermittelt werden konnte (Abbildung 4.14 A).

24 hpi konnte kein Ctad4 Protein in der Inklusion detektiert werden. Der anti-Ctad4 Antikörper färbte in infizierten als auch in uninfizierten Zellen deutlich sichtbar unspezifisch eine Struktur neben dem Zellkern (Abbildung 4.14 B vgl. C, Pfeilspitze). Nach 48 hpi konnten Ctad4 Signale im Einschluss detektiert werden. Anhand der Größe des assoziierten DAPI Signals konnte Ctad4 sowohl in der Nähe von EBs (Abbildung 4.14 C, offene Pfeilspitze) als auch an RBs (offener Pfeil) detektiert werden. Die Signale an den RBs erschienen jedoch

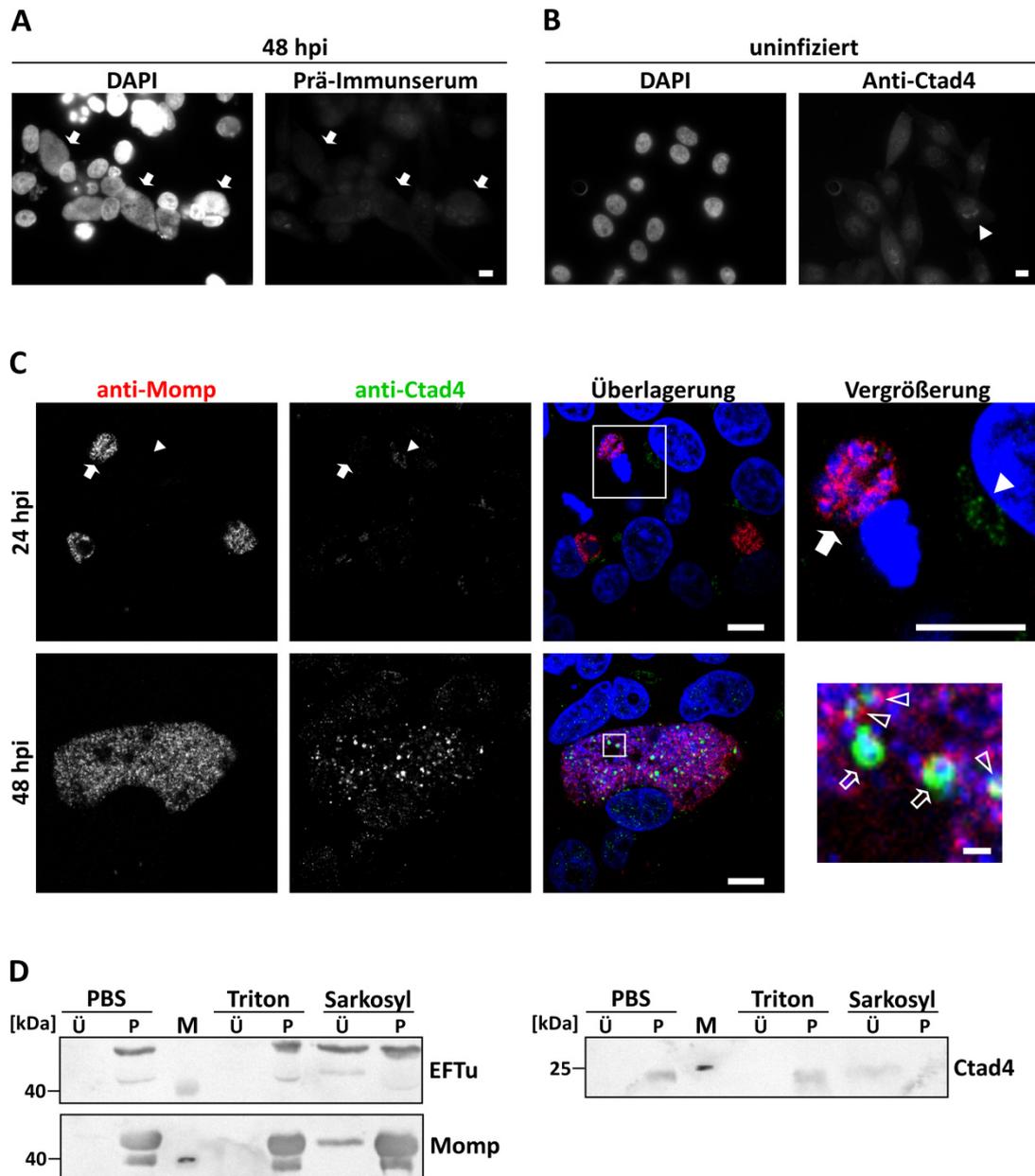


Abbildung 4.14: Ctad4 konnte spät in der Infektion an RBs und EBs detektiert werden.

A) Methanolfixierte HEp-2 Zellen wurden mit Ctad4 Prä-Immunsereum (1:25), sekundärem Alexa488- α -Kaninchen Antikörper (1:200) und DAPI (1:1000) gefärbt.

B) Uninfizierte HEp-2 Zellen wurden PFA fixiert, mit 0,2 % Triton permeabilisiert und mit α -Ctad4 Antikörper (pur), Alexa488- α -Kaninchen Antikörper (1:200) und DAPI (1:1000) gefärbt.

C) Konfokalmikroskopie von *CtrE* infizierten HEp-2 Zellen. Zellen wurden mit 3 % PFA fixiert und anschließend mit 0,2 % Triton permeabilisiert. Die Färbung erfolgte mit primären α -Ctad4 Antikörper (pur), α -Momp (1:100) Antikörper, sekundären Alexa488- α -Kaninchen Antikörper (1:200) bzw. Alexa594- α -Maus Antikörper (1:200) und DAPI (1:1000).

Gefüllte Pfeile: markieren Inklusionen, gefüllte Pfeilspitzen: unspezifische Signale. Offene Pfeilspitze: Ctad4 an EBs, offene Pfeil: Ctad4 an RBs. Größenstandard: 10 μ m, Vergrößerung: 1 μ m

D) Behandlung von EBs mit PBS oder Detergezien. Durchführung und Detektion der Kontrollproteine s. Abbildung 4.18. Die Detektion von Ctad4 erfolgte mit abgereichertem α -Ctad4 Antiserum (1:100) (s. Kapitel 3.6.10.3.1) und AP- α -Kaninchen Antikörper (1:7500). Ü: Überstand, P: Pellet, M: Proteinstandard, Ctad4: 23 kDa, EFTu: 43 kDa, Momp: 42 kDa.

stärker, wobei Ctad4 die DNA der Bakterien partiell zu umschließen schien. Ob Ctad4 bakterienassoziiert oder im Inklusionslumen nah der Bakterien lokalisiert, konnte aufgrund des schwachen Momp Signals nicht eindeutig bestimmt werden. Die Qualität des bekannten ringförmigen Momp Signales verringert sich im Allgemeinen bei einer PFA-Fixierung und vor allem zu späten Zeitpunkten, wahrscheinlich aufgrund der hohen Bakterienzahl im Einschluss. Die Detektion von Ctad4 an nur einigen Bakterien könnte der PFA-Fixierung geschuldet sein, durch die nur oberflächlich präsentierte Proteine zugänglich sind (Möller, Schmidt *et al.* 2010). Eine Sekretion von Ctad4 in die Inklusion, mit einer Lokalisation nahe dem Bakterium, kann daher nicht ausgeschlossen werden, und würde zur detektierten partiellen Färbung passen. Allerdings ist auch zu berücksichtigen, dass der anti-Ctad4 Antikörper sehr schwach ist, unverdünnt eingesetzt werden musste und deshalb die eingesetzte Antikörpermenge vielleicht nicht ausreichte, um alle vorhandenen Epitope effektiv anzufärben. Die Spezifität des anti-Ctad4 Antikörpers konnte mittels Präabsorption gegen rekombinantes Ctad4 Protein bestätigt werden (Abbildung A.1.2).

Folglich konnte die Lokalisation von Ctad4 an EBs in der Mikroskopie nicht genau bestimmt werden. Um zu überprüfen ob Ctad4 löslich auf der EB-Oberfläche präsentiert wird, wurden die Proben des Proteinlöslichkeitsexperiments mit dem Ctad4 Antikörper beprobt (Abbildung 4.14 D, s. auch Kapitel 4.6.2). Hierbei konnte Ctad4 weder durch die Behandlung der EB mit PBS noch mit Triton von der Oberfläche gelöst werden und lokalisierte wie das intrachlamydiale Protein EFTu in der Pelletfraktion. Eine kovalente Verknüpfung zum cOMC konnte aufgrund der vollständigen Lokalisation von Ctad4 im Überstand von Sarkosyl-behandelten EBs ausgeschlossen werden, wohingegen der sarkosylunlösliche cOMC, repräsentiert durch Momp, überwiegend pelletiert wurde. Demzufolge könnte es sich bei Ctad4 um ein intrachlamydiales Protein handeln, das erst durch das Extrahieren des cOMC in den Überstand freigesetzt wurde.

Zusammenfassend spricht trotz der anfänglich vielversprechenden ersten Ergebnisse die ermittelte Lokalisation von Ctad4, an nur einigen Bakterien der späten Infektion, gegen eine Funktion als Adhäsion. Ctad4 könnte aber vielleicht ins Inklusionslumen sekretiert werden.

4.5.2 Transfiziertes Ctad4 lokalisiert an Vesikeln im Zytoplasma

Unter der Annahme das Ctad4 potentiell in die Inklusion sekretiert wird, wurden Transfektionsstudien in Humanzellen durchgeführt. Eine spezifische Lokalisation in Humanzellen könnten erste Hinweise auf eine potentielle Funktion geben. Deshalb wurde die Lokalisation von transfiziert exprimiertem Ctad4-GFP in HEp-2 Zellen analysiert (Abbildung 4.15).

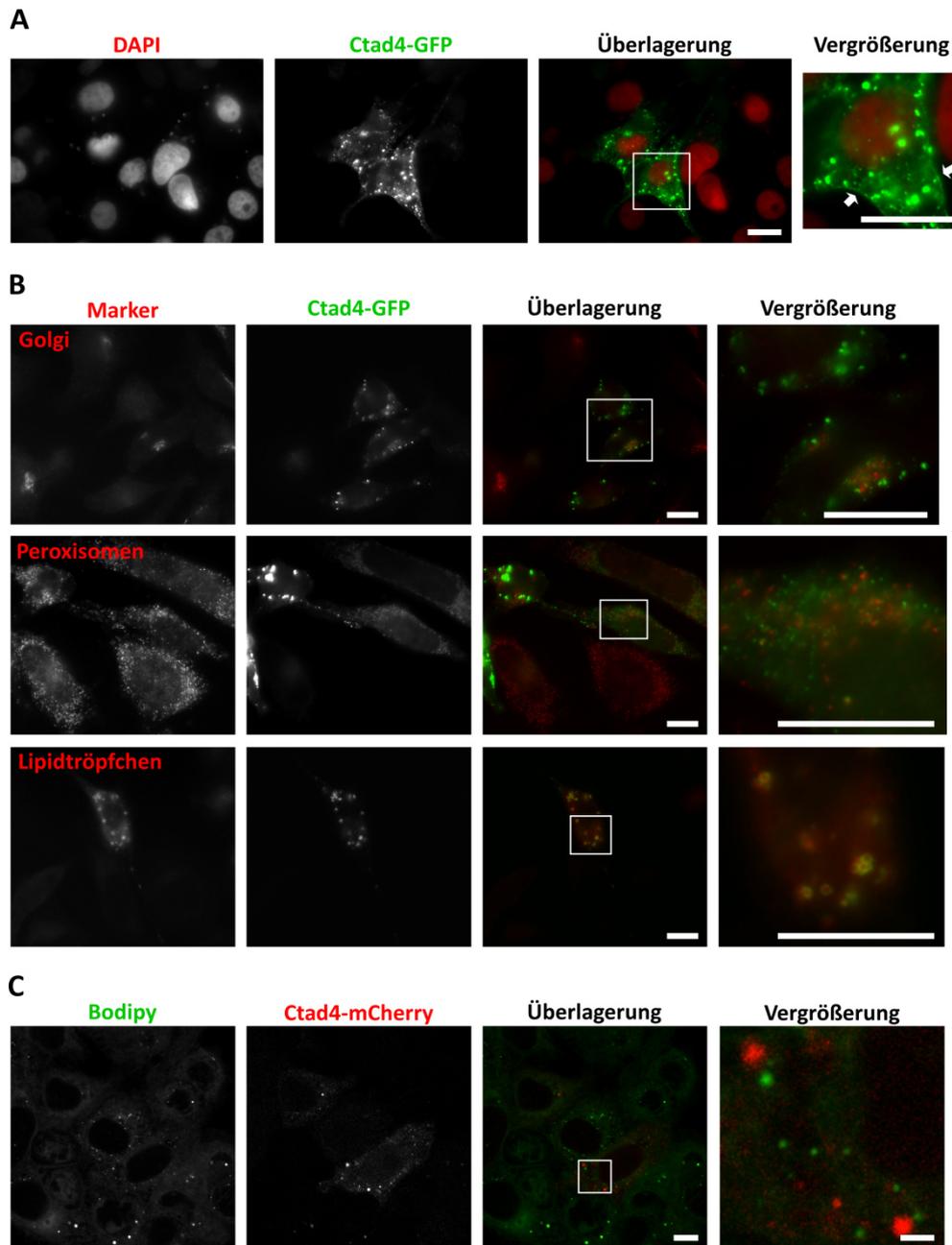


Abbildung 4.15: Transfiziert exprimiertes Ctad4-GFP kolokalisiert mit CPn0592, aber nicht an Bodipy gefärbten LDs.

A) Transfizierte Expression von Ctad4-GFP in HEp-2 Zellen für 17 h. Anschließend wurden die Zellen mit 3 % PFA fixiert und mit DAPI (1:1000) gefärbt. Pfeile: Protein an der Membran.

B) Ctad4-GFP transfizierte HEp-2 wurden mit α -C100orf118 (1:100, Golgi-Marker) bzw. α -Pmp70 Antikörper (1:100, Peroxisomen-Marker) und sekundären Alexa594- α -Kaninchen bzw. Alexa594- α -Maus Antikörper (1:200) gefärbt. Für die LD Lokalisationsanalyse wurden Ctad4-GFP und CPn0592-mCherry (Lda3 Homolog) kotransfiziert exprimiert und nach 17 h mit 3 % PFA fixiert.

C) HEp-2 Zellen wurden 12 h mit Ölsäure (100 μ M) behandelt, mit Ctad4-mCherry für 17 h transfiziert und anschließend mit 3 % PFA fixiert. Die Färbung der Lipidtröpfchen (LD) erfolgte mit Bodipy (1:1000).

Größenstandard: 10 μ m, Vergrößerung C: 2 μ m.

Ctad4-GFP lokalisierte an einer Vielzahl von Vesikeln im Zytoplasma der Zellen. Außerdem wurden geringere Mengen an der Plasmamembran detektiert (Abbildung 4.15 A, Pfeile).

Anschließend wurden Ctad4-GFP transfizierte exprimierende Zellen mit verschiedenen Markern gefärbt, um die Natur der Vesikel zu bestimmen (Abbildung 4.15 B). Bei der Verwendung eines Golgi-Antikörpers konnte der Golgi-Apparat immer in Nähe des Zellkerns gefärbt werden. Eine Akkumulation der Ctad4 Vesikel in dieser Region konnte jedoch nicht beobachtet werden. Ferner konnte keine Kolo-kalisation von Ctad4-GFP mit Peroxisomen beobachtet werden. Zwar assoziierten einige Ctad4-GFP Signale mit Peroxisomen, welches aber eher auf die massive Präsenz der Peroxisomen im Zytoplasma zurückzuführen war als auf eine spezifische Interaktion. Als Letztes wurde eine Lokalisation an Lipidtröpfchen (*lipid droplets* (LDs), Speichern von neutralen Fetten, durch die Koftransfektion mit CPn0529-mCherry untersucht. CPn0529 ist das *C. pneumoniae* Homolog zu Lda3, dem „*lipid droplet associated protein 3*“ von *C. trachomatis*. Die für transfiziert exprimiertes Lda3 beschriebene Lokalisation an LDs konnte bereits zuvor für CPn0529-mCherry bestätigt werden (Kumar, Cocchiaro *et al.* 2006, Herbst 2011). Tatsächlich konnte eine Kolo-kalisation von Ctad4-GFP und CPn0529-mCherry in HEp-2 Zellen beobachtet werden (Abbildung 4.15 B). Um die Lokalisation von Ctad4 an LDs zu bestätigen, wurden HEp-2 Zellen mit Ölsäure behandelt, welches die Anzahl der LDs in der Zelle steigert und anschließend mit Ctad4-mCherry transfiziert. Eine Lokalisation von Ctad4 an Bodipy gefärbten LDs konnte jedoch nicht beobachtet werden (Abbildung 4.15 C). Dieser Befund kann dreierlei Ursachen haben: (i) Die Rekrutierung von Ctad4 an LDs erfordert Lda3. (ii) Die Zusammensetzung der LDs ist durch die Ölsäure Behandlung modifiziert worden, sodass Ctad4 nicht mehr mit ihnen interagieren kann. (iii) Die Verwendung des mCherry-Tags anstelle des GFP-Tags beeinflusst die Lokalisation von Ctad4.

Zusammenfassend konnte für transfizierte exprimiertes Ctad4 eine Lokalisation an Vesikeln beschrieben werden, bei denen es sich vielleicht um Lipidtröpfchen handelt. Im Allgemeinen scheint transfiziert exprimiertes Ctad4 eine Affinität zu hydrophoben und/oder lipophilen Strukturen zu besitzen, da es sowohl an der Plasmamembran als auch in Vesikeln lokalisierte. Die genaue Funktion von Ctad4 bleibt jedoch unklar und benötigt weitere Aufklärung. Da im Rahmen dieser Arbeit jedoch Adhäsine untersucht werden sollten, wurden die Arbeiten an Ctad4 eingestellt.

4.6 Charakterisierung von Ctad9

4.6.1 Ctad9 lokalisiert spät in der Infektion auf EBs

Das hypothetische Protein Ctad9 war zu Beginn dieser Arbeit ein uncharakterisiertes Protein, für das keine bekannten Domänen vorhergesagt wurden. Das *ctad9* Gen existiert in allen *C. trachomatis* Serovaren, ansonsten jedoch nur noch in *C. muridarum* (49 % Identität) und in einer N-terminal verkürzten Variante in *C. suis* (60 % Homologie des C-Terminus).

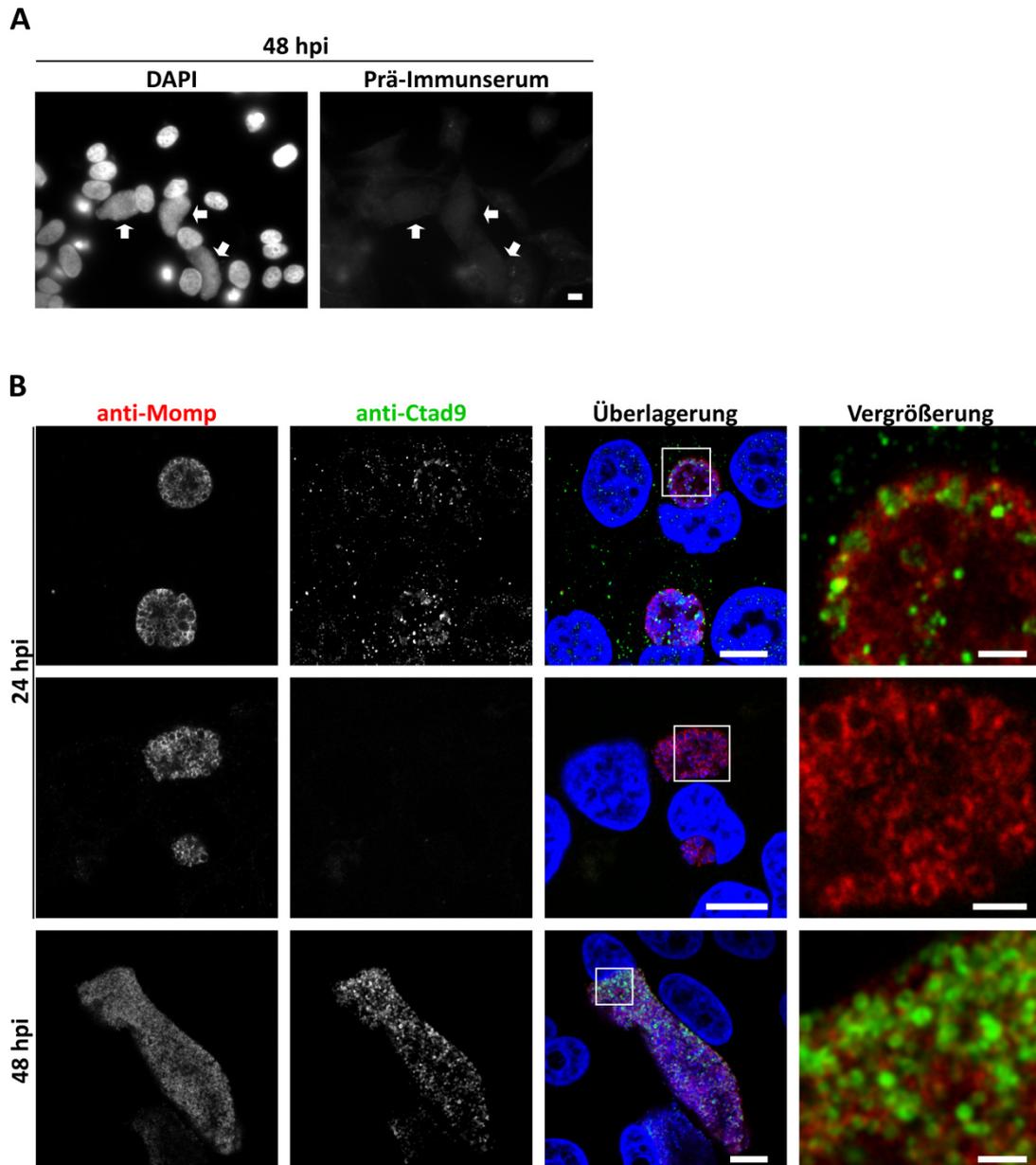


Abbildung 4.16: Ctad9 wird spät in der Infektion auf EBs präsentiert.

A) Methanolfixierte HEp-2 Zellen wurden mit Ctad9 Prä-Immuneserum (1:25) und sekundärem Alexa488- α -Kaninchen Antikörper (1:200) und DAPI (1:1000) gefärbt. Pfeile markieren Inklusionen. Standard: 10 μ m.

B) Konfokalmikroskopie von *CtrE* infizierten HEp-2 Zellen. Zellen wurden mit 3 % PFA fixiert und anschließend mit 0,2 % Triton permeabilisiert, mit primären α -Ctad9 Antikörper (1:5), α -Momp (1:100) Antikörper, sekundären Alexa488- α -Kaninchen Antikörper (1:200), Alexa594- α -Maus Antikörper (1:200) und DAPI (1:1000) gefärbt. Größenstandard: 10 μ m, Vergrößerung: 2 μ m.

In den vorangegangenen Experimenten konnte Ctad9 mit guten Bindeeigenschaften und leichter Reduktion der Infektion überzeugen. Im Folgenden wurde die Lokalisation mit dem generierten anti-Ctad9 Antikörper analysiert. Das Prä-Immuserum erkannte keine chlamydiale Strukturen (Abbildung 4.16 A). 24 hpi konnten in unterschiedlichen Färbungsansätzen sowohl Inklusionen mit als auch ohne Ctad9 Signal detektiert werden (Abbildung 4.16 B). Wenn vorhanden lag das Ctad9 Signal bakterienassoziiert und vom Momp Signal umschlossen vor. Diese differentielle Präsenz könnte durch eine beginnende Expression des Proteins erklärt werden, wobei durch die Asynchronität des Entwicklungszyklus einige Inklusionen erst später Ctad9 exprimieren. Nach 48 h Infektion füllt der chlamydiale Einschluss das Zytoplasma der Humanzellen aus und ist gefüllt mit EBs. In diesem Stadium der Infektion konnte Ctad9 in ringförmigen Strukturen detektiert werden, die partiell mit Momp kolokalisierten (Abbildung 4.16 B).

Die Spezifität des Antikörpers wurde durch Präabsorption gegen rekombinantes Ctad9 Protein überprüft (Abbildung A.1.3). BSA präabsorbierter anti-Ctad9 Antikörper führte zu keiner Veränderung des bereits zuvor detektierten bakterienassoziierten Signals, während die spezifische Antigenabreicherung gegen Ctad9 zum vollständigen Verlust des Signals spät in der Infektion führte (Abbildung 4.17).

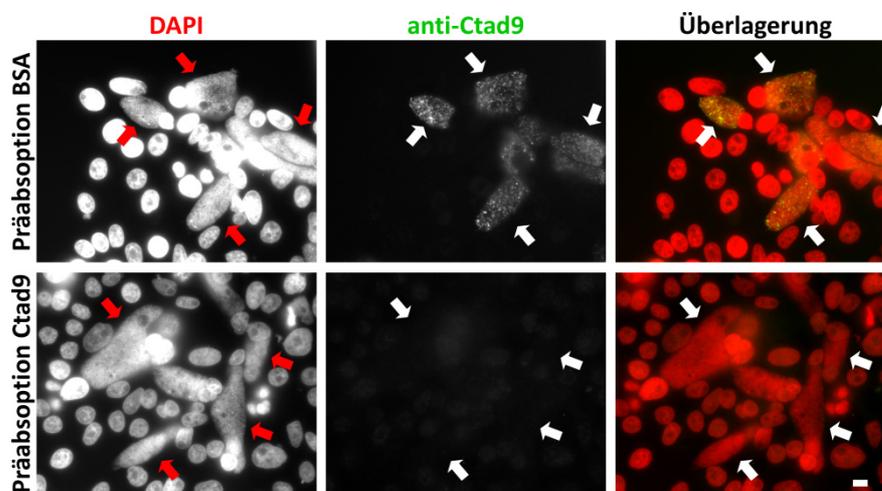


Abbildung 4.17: Präabsorption des anti-Ctad9 Antikörpers bestätigt seine Spezifität.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit präabsorbierten α -Ctad9 Antikörper auf infizierten HEP-2 Zellen 48 hpi mit 3 % PFA fixiert und mit 0,2 % Triton permeabilisiert. Die Färbung erfolgte mit BSA oder rCtad9 präabsorbiertem α -Ctad9 Antikörper (1:3), Alexa488- α -Kaninchen Antikörper (1:200) und DAPI (1:1000). Durchführung der Präabsorption siehe Abbildung 4.9. Pfeile markieren Inklusionen. Größenstandard: 10 μ m.

4.6.2 Ctad9 könnte oberflächenlokalisiert auf EBs vorliegen

Die zuvor beschriebene Lokalisation deutet auf eine Oberflächenzugänglichkeit von Ctad9 hin. Um diese Beobachtung biochemisch zu bestätigen, wurden Löslichkeitsexperimente von EB-Oberflächenproteinen durchgeführt. Hierfür wurden EBs mit Detergenzien oder zur Kontrolle mit PBS behandelt. Bei der Behandlung mit Triton können nicht kovalent verknüpfte Proteine nativ von der Zelloberfläche gelöst werden, während die Verwendung von Sarkosyl eine Extraktion des cOMCs von restlichen Zellbestandteilen vermittelt (Caldwell, Kromhout *et al.* 1981).

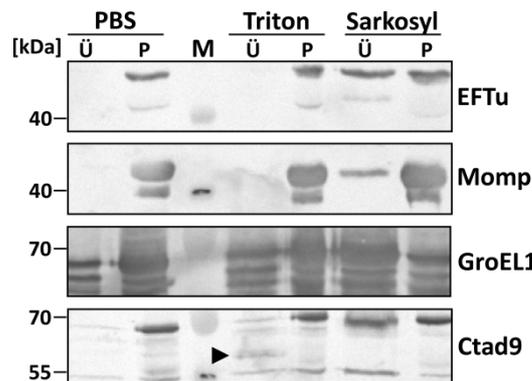


Abbildung 4.18: Ctad9 kann von der EB-Oberfläche gelöst werden.

EBs wurden mit PBS oder PBS mit 1 % Triton bzw. 2 % Sarkosyl für 1 h bei 37 °C behandelt und anschließend der Überstand (Ü) und das Pellet (P) durch Zentrifugation getrennt (s. Kapitel 3.6.9). Aliquots beider Fraktionen wurden mittels Westernblot analysiert. Die Detektion erfolgte mit primären α -GroEL1 (1:500), α -Momp (1:500), α -EFTu (1:300) bzw. abgereichertem α -Ctad9 Antiserum (1:200) (s. Kapitel 3.6.10.3.1) und sekundären AP- α -Maus, AP- α -Kaninchen (1:7500) bzw. AP- α -Ziege Antikörper (1:1000). Die Quantifizierung der Proteinverteilung erfolgte durch die Bestimmung der Bandenintensität von Überstand und Pellet mit der Software ImageJ. M: Proteinstandard. Pfeilspitze: Degradationsfragment, Ctad9: 67 kDa, EFTu: 43 kDa, GroEL1: 58 kDa, Momp: 42 kDa.

Weder EFTu noch Momp konnten nach der PBS-Behandlung der EBs im Überstand detektiert werden, während GroEL1 teilweise und auch Ctad9 zu einem geringen Teil von der EB-Oberfläche abgelöst wurden (Abbildung 4.18). Die Löslichkeit von GroEL1 durch PBS konnte bereits zuvor beschrieben werden (Wuppermann, Molleken *et al.* 2008). Die Lokalisation von EFTu in der Pelletfraktion belegt die Unversehrtheit der EBs.

Die Verwendung des nichtionischen Detergenz Triton steigerte die Löslichkeit von GroEL1 und zu einem geringen Teil auch von Ctad9. Zusätzlich konnte in dieser Fraktion eine etwa 60 kDa großes Ctad9 Fragment detektiert werden (Abbildung 4.18 A, Pfeilspitze). EFTu und Momp lokalisierten weiterhin im Pellet.

Durch die Verwendung des anionischen Detergenz Sarkosyl wurden etwa 50 % an EFTu, 60 % an Ctad9 und ein Großteil von GroEL1 in den Überstand überführt, während Momp

überwiegend im Pellet lokalisiert. Momp repräsentiert den cOMC, der aufgrund der starken Verknüpfung durch Disulfidbrücken sarkosylunlöslich ist (Caldwell, Kromhout *et al.* 1981). Zusammenfassend deutete, neben der zuvor ermittelten ringartigen Lokalisation von Ctad9 an PFA-fixierten EBs, auch die Proteinlöslichkeitsanalyse auf eine Oberflächenzugänglichkeit von Ctad9 hin.

4.6.3 Ctad9 wird früh in der Infektion sekretiert

Spät in der Infektion konnte Ctad9 ringförmig auf EBs detektiert werden (Abbildung 4.17). Daher wurde als nächstes die Lokalisation früh in der Infektion untersucht.

15 min nach Beginn der Infektion konnten für Ctad9 verschiedene Lokalisationen beobachtet werden. (i) Ctad9 Signale wurden von Momp umschlossen, (ii) bzw. kolokalisierte partiell mit Momp (Abbildung 4.19 A). (iii) Ctad9 und Momp lokalisierten nebeneinander und wiesen dabei nur einen geringen Kolokalisation auf (Abbildung 4.19 B). Diese Muster könnte auf eine Sekretion bzw. auf den Beginn einer Sekretion von Ctad9 früh in der Infektion hindeuten, würde jedoch nicht zu einer Funktion als Adhäsion passen.

Die potentielle Sekretion von Ctad9 wurde jüngst durch eine Publikation bestätigt, in der Ctad9 bzw. TepP „*Translocated early phosphoprotein*“ als eines der frühesten sekretierten chlamydialen Effektorproteine beschrieben wurde (Chen, Bastidas *et al.* 2014).

Daher konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei Ctad9 (TepP) um ein Adhäsion handelt.

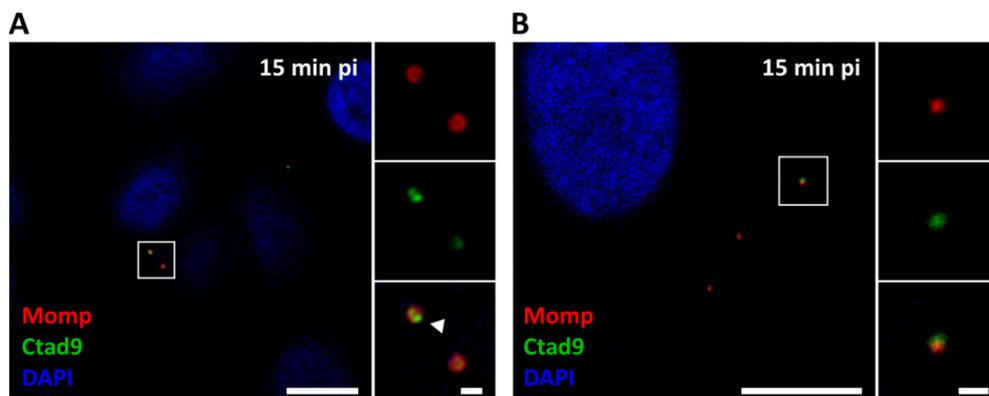


Abbildung 4.19: Ctad9 wird früh in der Infektion potentiell sekretiert.

A) und **B)** Konfokalmikroskopie der frühen Infektion. HEp-2 Zellen wurden mit *CtrE* für 15 min infiziert (MOI: 1, s. Kapitel 3.2.6), mit 3 % PFA fixiert und mit 0,2 % Triton permeabilisiert. Die Färbung erfolgte mit primären α -Ctad9 (1:5), α -Momp Antikörper (1:200), sekundären Alexa488- α -Kaninchen bzw. Alexa594- α -Maus Antikörper (1:200) und DAPI (1:1000). Pfeilspitze: partielle Kolokalisation von Ctad9 mit Momp. Größenstandard: 10 μ m, Vergrößerung: 1 μ m.

4.6.4 Ctad9-GFP lokalisierte an endozytotischen Vesikeln

Aufgrund der publizierten Daten zu Ctad9 (TepP) konnte eine Funktion als Adhäsion ausgeschlossen werden. Um zu untersuchen ob Ctad9 neben der postulierten Funktion bei der Etablierung der replikativen Nische (Chen, Bastidas *et al.* 2014), auch an der Aufnahme der Bakterien beteiligt ist, wurden Transfektionsstudien mit einem Ctad9-GFP Konstrukt

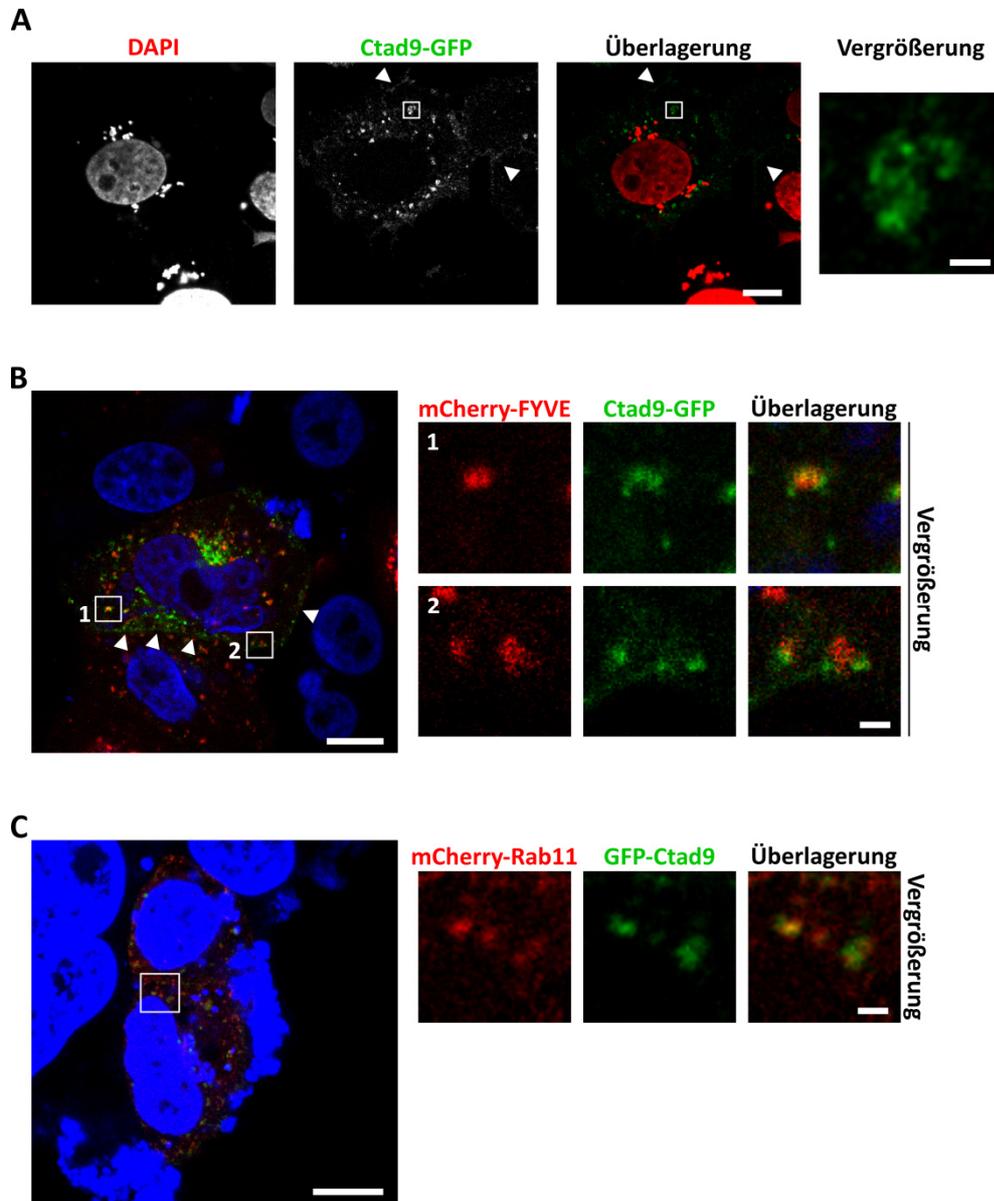


Abbildung 4.20: Ctad9-GFP lokalisiert an Endosomen verschiedener Herkunft.

Transfektion in HEp-2 Zellen für ca. 18 h. Die Zellen wurden mit 3 % PFA fixiert und anschließend mit DAPI (1:1000) gefärbt. Pfeilspitzen markieren Ctad9 an der Plasmamembran. Größenstandard: 10 μm , Vergrößerung: 1 μm .

A) Transfezierte Expression von Ctad9-GFP.

B) Kotransfektion der Konstrukte für Ctad9-GFP und mCherry-FYVE (Marker für frühe Endosomen).

C) Kotransfektion der Konstrukte für Ctad9-GFP und mCherry-Rab11 (Marker für Recycling Endosomen).

durchgeführt. Transfizierte exprimiertes Ctad9-GFP wurde an Vesikeln im Zytoplasma und zum Teil an der Plasmamembran der Humanzelle detektiert (Abbildung 4.20 A, letzteres Pfeilspitze).

Um die Herkunft dieser Vesikel näher zu bestimmen wurden Kotransfektionen mit mCherry-FYVE einem Marker für frühen Endosomen bzw. Rab11 als Marker für Recycling Endosomen durchgeführt (Halet 2005, Stenmark 2009).

Ctad9-GFP konnte an frühen Endosomen detektiert werden, wobei es zum Teil das FYVE-mCherry Signal zu umrunden schien (Abbildung 4.20 B1). Darüber hinaus lokalisierte Ctad9-GFP auch an der Plasmamembran der Zelle (Pfeilspitzen), u.a. akkumuliert in Bereichen an denen potentiell ein frühes Endosomen abgeschnürt wird (Abbildung 4.20 B2).

Auch an Rab11-positiven Vesikeln konnte assoziiertes Ctad9-GFP beobachtet werden (Abbildung 4.20 C). Die Häufigkeit dieses Ereignisses schien subjektiv betrachtet nicht so stark ausgeprägt wie die Assoziation mit dem frühen Endosomen.

Für transfiziert exprimiertes Ctad9-GFP konnte eine Lokalisation an endosomalen Vesikeln nachgewiesen werden. Somit könnte Ctad9 zusätzlich eine Funktion bei der Aufnahme des bakteriellen Partikels oder beim Verlassen des endosomalen Weges zukommen, um der Degradation im Lysosom zu entgehen.

Warum genau Ctad9 an Endosomen lokalisiert und ob ein Zusammenhang zur Funktion besteht benötigt weitere Aufklärung. Da Ctad9 (TepP) jedoch kein Adhäsion darstellt, wurde die Arbeit im Rahmen dieser Arbeit eingestellt.

4.7 Charakterisierung von Ctad1

4.7.1 Ctad1 ist ein oberflächenexponiert chlamydiales Protein

4.7.1.1 Ctad1 und Momp kolokalisieren spät in der Infektion

Ctad1 ist ein 433 Aminosäure großes uncharakterisiertes Protein, das im N-Terminus zwei vorhergesagte bakterielle SH3-Domänen besitzt. Ctad1 konnte neben Ctad4 in den vorherigen Experimenten am stärksten überzeugen. Ctad1 vermittelte gute Bindung an Humanzellen, reduzierte die chlamydiale Infektion und Adhäsion. Mit dem neu generierten anti-Ctad1 Antikörper wurde im Folgenden die Lokalisation in der Infektion analysiert. Das Prä-Immunsrum wurde zuvor auf 48 h infizierten HEp-2 Zellen getestet, wobei keine chlamydialen Proteine erkannte wurden (Abbildung 4.21 A).

Die Lokalisationsanalyse für Ctad1 erfolgte anfänglich in methanolfixierten Zellen 24 hpi und 48 hpi, da Ctad1 erstmals nach 18 hpi im Westernbot detektiert werden konnte (Abbildung 4.7). Sowohl 24 hpi also auch 48 hpi konnte Ctad1 in ringförmigen Strukturen, die mit Momp kolokalisierten, detektiert werden. Dabei traten die für Momp typischen homogenen Ringe auf, während Ctad1 ebenfalls Ringe bildete, die jedoch nicht immer gleichmäßig ausfielen (Abbildung 4.21 B).

Durch die Methanol-Fixierung werden sowohl Wirts- und Inklusionsmembran als auch die Bakterien permeabilisiert, sodass auch intrachlamydiale Proteine für den Antikörper zugänglich sind. Daher wurde die Oberflächenzugänglichkeit von Ctad1 spät in der Infektion nach PFA-Fixierung und anschließender Permeabilisierung mit Triton studiert, wodurch ein Permeabilisieren der Bakterien verhindert wird (Knudsen, Madsen *et al.* 1999, Wuppermann, Molleken *et al.* 2008, Mölleken, Schmidt *et al.* 2010). Die beobachtete ringförmige Lokalisation von Ctad1 an EBs trat auch nach PFA-Fixierung auf, wobei die Ringe noch etwas ungleichmäßiger als bei der Methanol-Fixierung ausfielen (Abbildung 4.21 C). Diese Daten deuten auf eine oberflächenzugängliche Lokalisation von Ctad1 hin, welche zusammen mit den zuvor erhobenen Adhäsionsdaten gut zu einer Funktion als Adhäsion passen. Eine ähnliche ringförmige Lokalisation konnte bereits für das Adhäsion Pmp21 unter gleichen Fixierungsbedingungen beschrieben werden (Mölleken, Schmidt *et al.* 2010).

Die Spezifität des anti-Ctad1 Antikörpers wurde wie zuvor beschrieben durch Präabsorption überprüft (Abbildung A.1.4) und konnte bestätigt werden. Der rCtad1 präabsorbierte Antikörper vermittelte keine Färbung der Inklusionen mehr, während der BSA präabsorbierten Ctad1 Antikörper weiterhin den Einschluss anfärbte (Abbildung 4.22).

Zusammenfassend konnte für Ctad1 eine spezifische, bakterienassoziierte potentielle Oberflächenlokalisierung ab 24 hpi beschrieben werden.

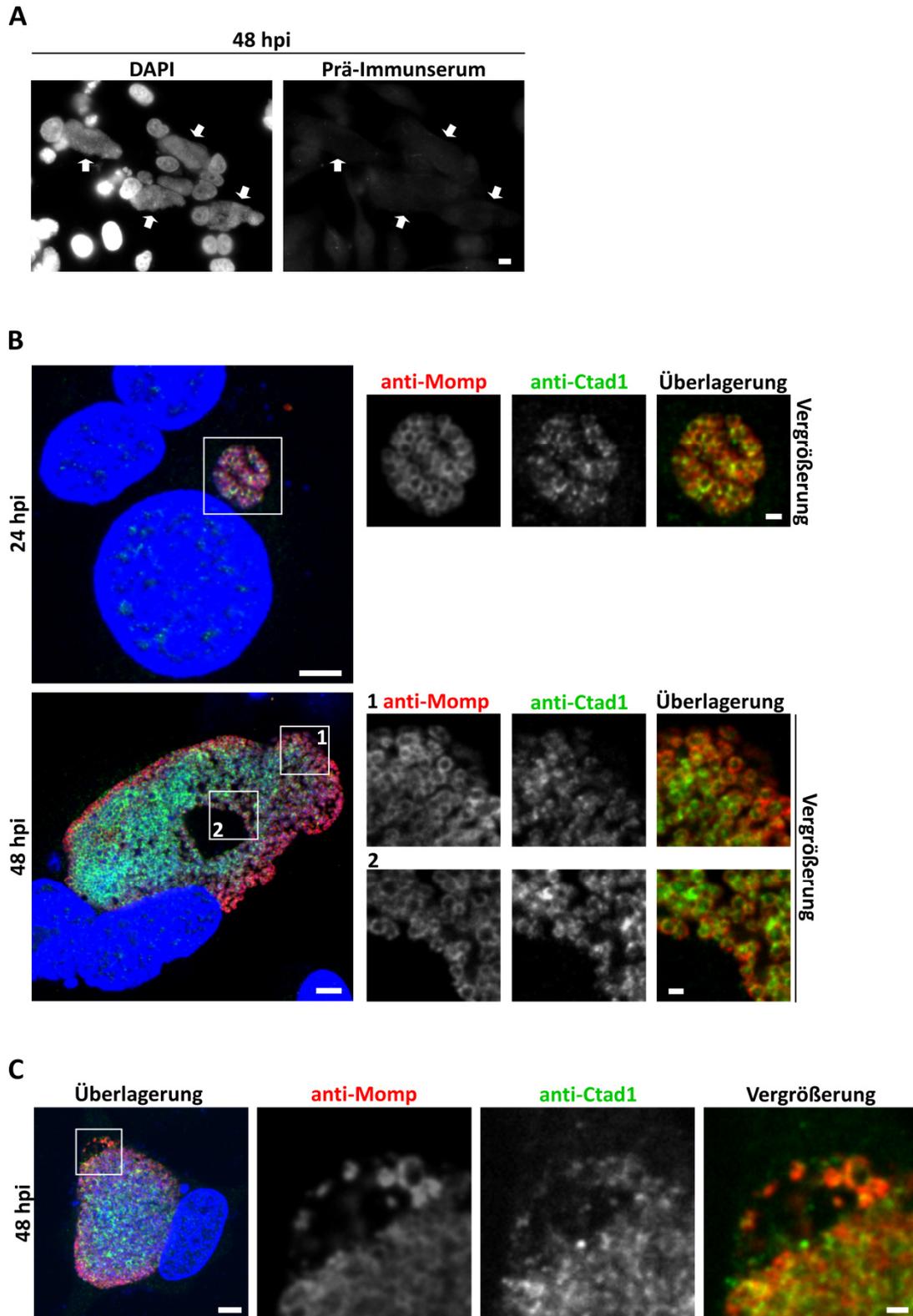


Abbildung 4.21: Ctad1 liegt in der Infektion bakterienassoziiert und oberflächenpräsentiert vor.

A) MeOH fixierte HEp-2 Zellen wurden mit Ctad1 Prä-Immunsereum (1:25), sekundärem Alexa488- α -Kaninchen Antikörper (1:200) und DAPI (1:1000) gefärbt. Pfeile markieren Inklusionen. Größenstandard: 10 μ m

B) und **C)** Konfokalmikroskopie der Lokalisationsanalyse von Ctad1 in *CtrE* infizierten HEp-2 Zellen (MOI: 0,5). Die Zellen wurden entweder methanolfixiert (**B**) oder mit 3 % PFA fixiert und anschließend mit 0,2 % Triton permeabilisiert (**C**). Die Färbung erfolgte mit α -Ctad1 Antikörper (1:20), α -Momp (1:100) Antikörper, sekundären Alexa488- α -Kaninchen Antikörper (1:200), Alexa594- α -Maus Antikörper (1:200) und DAPI (1:1000). Größenstandard: 5 μ m, Vergrößerung: 1 μ m

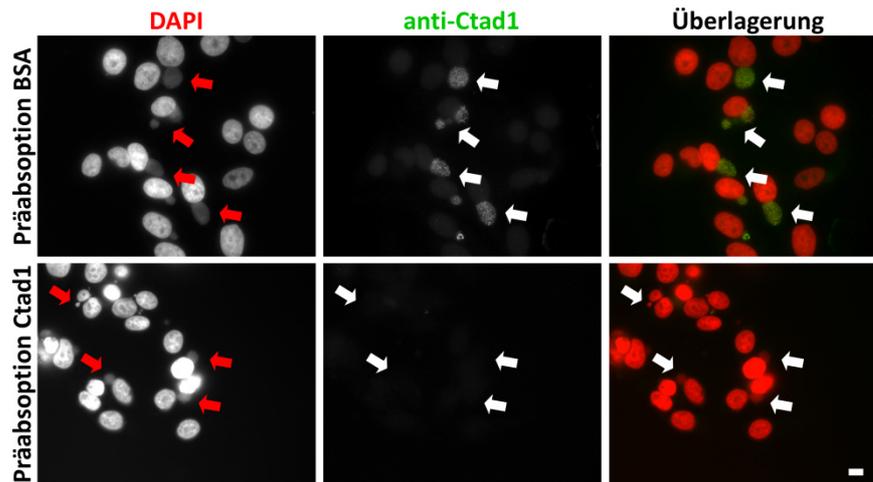


Abbildung 4.22: Kontrolle der Spezifität des anti-Ctad1 Antikörpers durch Präabsorption.

Durchführung der Präabsorption s. Abbildung 4.9 und Abbildung A.1.4. HEp-2 Zellen wurden 24 hpi mit 3 % PFA fixiert und mit 0,2 % Triton permeabilisiert. Die Färbung erfolgte mit BSA oder Ctad1 präabsorbiertem α -Ctad1 Antikörper (1:10), sekundärem Alexa488- α -Kaninchen Antikörper (1:200) und DAPI (1:1000). Pfeile markieren Inklusionen. Größenstandard: 10 μ m.

4.7.1.2 Ctad1 ist oberflächenlokalisiert und früh in der Infektion verfügbar

Ctad1 konnte in späten Inklusionen an Momp gefärbten EBs detektiert werden (Abbildung 4.21 B). Des Weiteren zeigten bereits freigesetzte EBs aus lysierten Inklusionen, nach Methanol-Behandlung, sehr deutlich ein ringförmiges mit Momp kolokalisierendes Ctad1 Signal (Abbildung 4.23 A).

Infolgedessen wurde die Lokalisation von Ctad1 früh in der Infektion untersucht. Kurzzeitinfectionen wurden nach 15 min bzw. 1 h PFA fixiert und gefärbt (Abbildung 4.23 B). Zu beiden Zeitpunkten konnte deutlich ein ringförmiges Signal für Ctad1 an den Momp gefärbten EBs nachgewiesen werden, wobei auch hier das Signal ungleichmäßig in der Intensität ausfiel. Die beobachtete Lokalisation von Ctad1 an EBs der späten Infektion konnte somit auch für die frühe Infektion bestätigt werden.

Die ermittelte Lokalisation von Ctad1 deutet auf eine potentielle Oberflächenzugänglichkeit von Ctad1 hin. Um diese biochemisch zu analysieren, wurden die Proben des Proteinlöslichkeitsexperiments mit dem Ctad1 Antikörper analysiert (Abbildung 4.23 C, s. auch Kapitel 4.6.2). Bereits durch PBS- bzw. Triton-Behandlung der EBs konnte GroEL1, aber auch 22 % respektive 25 % an Ctad1 von der EB-Oberfläche abgelöst werden, während EFTu und Momp in der Pelletfraktion verblieben (Abbildung 4.23 C).

Durch die Sarkosyl-Behandlung der EBs konnten etwa 50 % an EFTu, 60 % an Ctad1 und ein Großteil an GroEL1 gelöst im Überstand detektiert werden, während Momp als Bestandteil des sarkosylunlöslichen cOMC überwiegend im Pellet lokalisierte.

Zusammenfassend deutete neben der ermittelten ringartigen Lokalisation von Ctad1 auch die Proteinlöslichkeitsanalyse auf eine Oberflächenzugänglichkeit des Proteins hin. Daher scheint Ctad1 ein geeigneter Kandidat für ein neues Adhäsion zu sein, welcher im Folgenden detaillierter analysiert wurde.

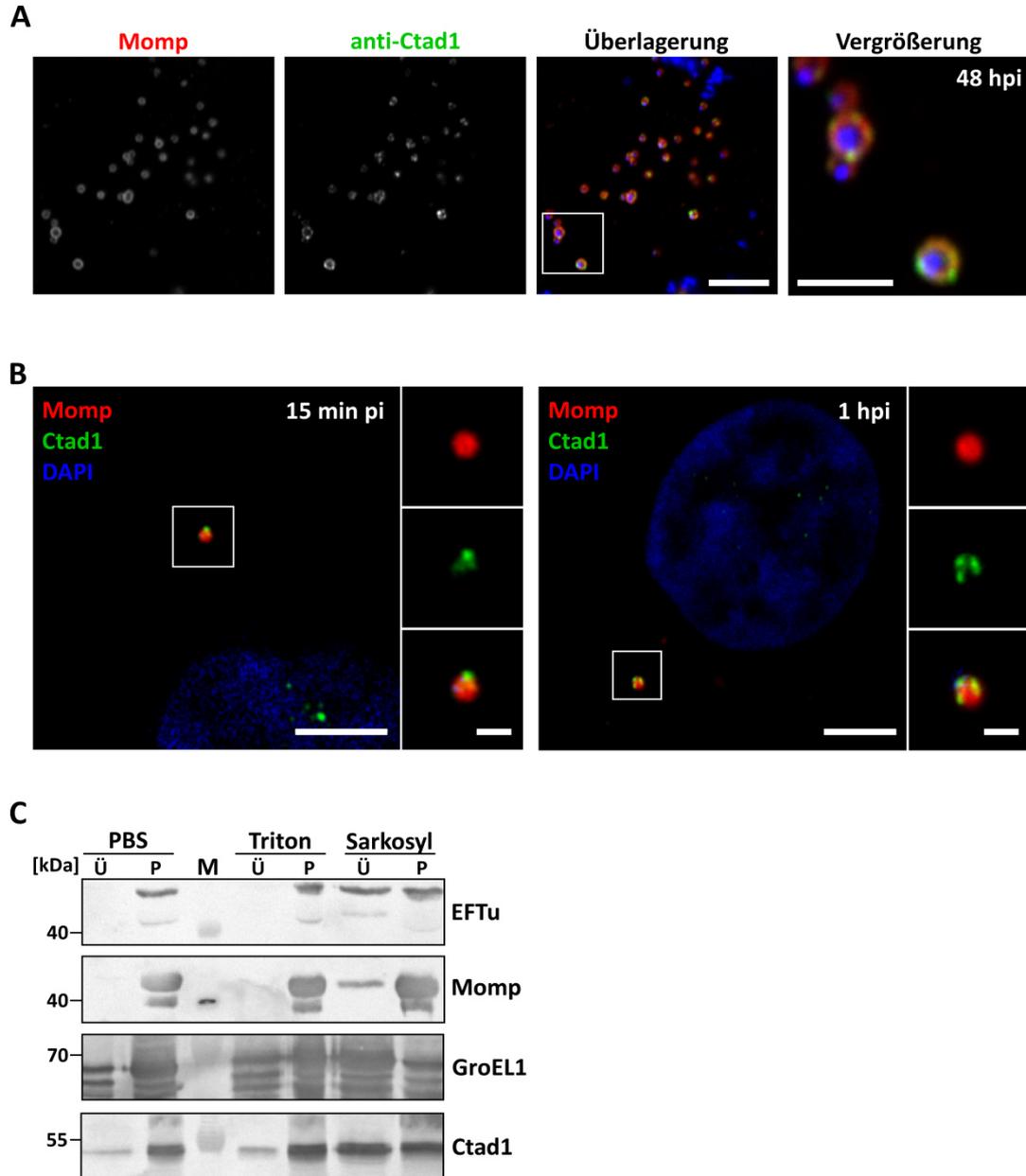


Abbildung 4.23: Ctad1 konnte spät und früh in der Infektion auf EBs detektiert werden.

A) Konfokalmikroskopie freigesetzter EBs spät in der Infektion. Die Zellen wurden mit 3 % PFA fixiert und anschließend mit MeOH permeabilisiert. Die Färbung erfolgte mit primären α -Ctad1 (1:20), α -Momp Antikörper (1:100), sekundären Alexa488- α -Kaninchen bzw. Alexa594- α -Maus Antikörper (1:200) und DAPI (1:1000). Größenstandard: 5 μ m, Vergrößerung: 2 μ m

B) Konfokalmikroskopie der frühen Infektion nach PFA-Fixierung und Permeabilisierung mit 0,2 % Triton. Die Färbung erfolgte wie unter A beschrieben. Größenstandard: 5 μ m, Vergrößerung: 1 μ m.

C) Westernblot Analyse des Proteinlöslichkeitsexperiments. Durchführung, Detektion der Kontrollproteine und Quantifizierung s. Abbildung 4.18. Detektion von Ctad1 mit abgereichertem α -Ctad1 Antiserum (1:200) (s. Kapitel 3.6.10.3.1) und sekundärem AP- α -Kaninchen Antikörper (1:7500). Ü: Überstand, P: Pellet, M: Proteinstandard, Ctad1: 49 kDa, EFTu: 43 kDa, GroEL1: 58 kDa, Momp: 42 kDa.

4.7.2 Analyse der Bindeeigenschaften von Ctad1

Die Bindungseigenschaft von rekombinantem Ctad1 an Humanzellen wurde zuerst in Abhängigkeit der Proteinkonzentration in einer Bindekinetik mit grün fluoreszierenden Latexkügelchen studiert (Abbildung 4.24 A-C).

Die erfolgreiche Beschichtung der Kügelchen mit rCtad1 wurde mittels Westernblot kontrolliert, wobei eine Zunahme der Bandenintensität bei steigender Proteinkonzentration ermittelt wurde. Die beiden geringsten Proteinkonzentration konnten nicht detektiert werden, da die gekoppelte Proteinmenge möglicherweise schon unterhalb der Detektionsgrenze lag (Abbildung 4.24 A). Obwohl für diese beiden Konzentrationen der Nachweis der Beschichtung fehlte, konnte eine signifikante Bindung der Kügelchen an Humanzellen ermittelt werden (Abbildung 4.24 B und C). Die mittlere Fluoreszenz der mit 0,1 μM beschichteten Kügelchen fiel mit 2900 gering aus, übertraf die unspezifische Bindung von BSA jedoch fast um das doppelte (mittlere Fluoreszenz 1519). Die mit 0,35 μM bzw. 0,75 μM Ctad1 Protein beschichteten Kügelchen vermittelten eine konzentrationsabhängige Zunahme der Adhäsion (8543 respektive 13987 mittlere Fluoreszenz). Die Adhäsion der Kügelchen wurde durch die Verdopplung der Proteinkonzentration auf 1,5 μM nochmal um ca. 15 % auf eine mittlere Fluoreszenz von 16445 gesteigert und blieb bei den folgenden Konzentrationen etwa konstant (3 μM : 16857, 4,5 μM : 16456, Abbildung 4.24 B und C).

Die Konzentrationskinetik zeigte eine dosisabhängige Bindung des rekombinanten Ctad1 Proteins an Humanzellen, die in einer Sättigung der Bindung resultierte.

Anschließend wurden die adhäsiven Eigenschaften von löslichem, rekombinanten Ctad1 Protein an HeLa und Hec-1B Zellen überprüft. Der Ursprung der HeLa (Gebärmutterhals) bzw. Hec-1B Zelllinien (Gebärmutterschleimhaut) entspricht am ehesten dem Zielgewebe einer natürlichen *C. trachomatis* Infektion.

Sowohl an Hec-1B als auch an HeLa Zellen konnte ab 15 min gebundenes Ctad1 Protein detektiert werden. Bei den Hec-1B Zellen adhärierte nach 30 min etwa gleich viel Protein im Vergleich zum 15 min Wert und nahm nach 60 min nochmals zu, während die Bindung an HeLa Zellen über den gesamten zeitlichen Verlauf stetig anstieg (Abbildung 4.24 D). Nach 60 min konnten, an beiden Zelllinien, etwa gleiche Mengen an gebundenem Ctad1 Protein ermittelt werden, während die Negativkontrolle GST an keine der beiden Zelllinien band.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Ctad1 eine konzentrationsabhängige Bindung an Humanzellen vermittelt und in der Lage ist an Epithelzellen verschiedenen Ursprungs zu binden.

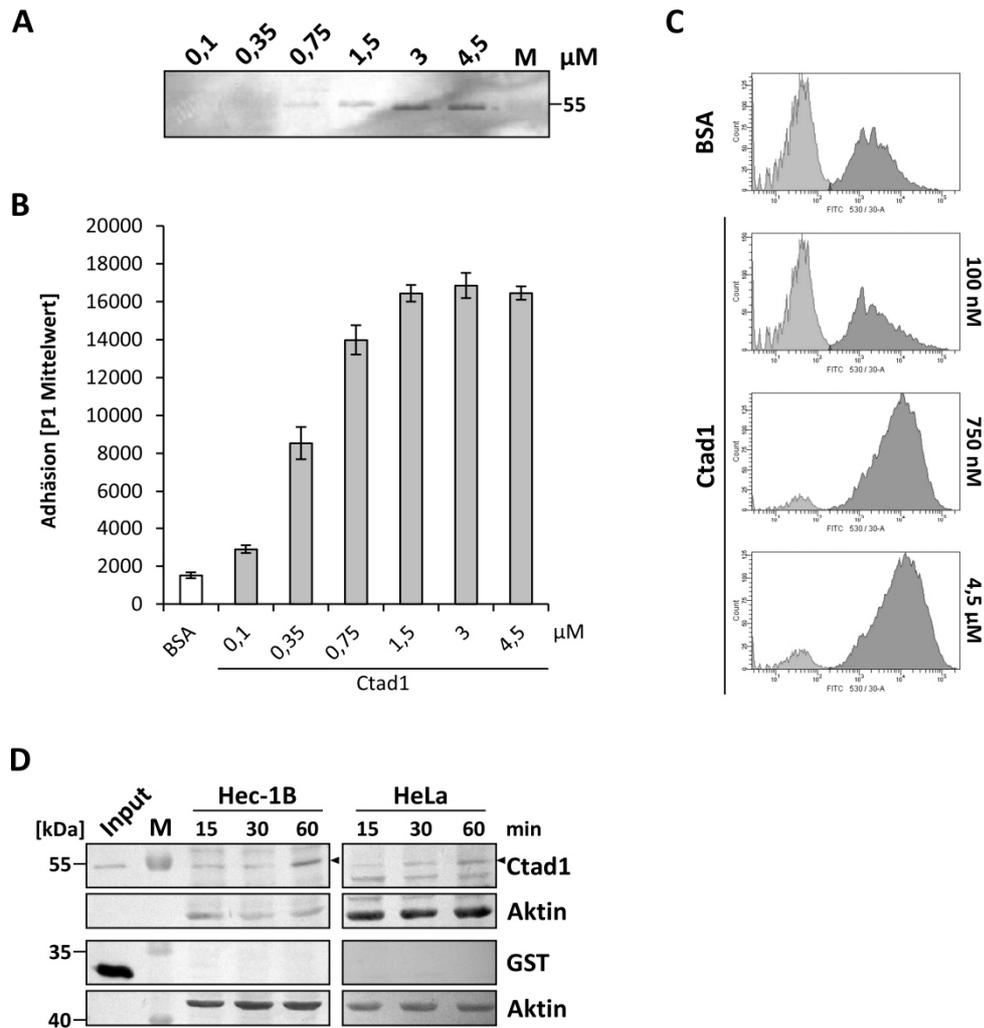


Abbildung 4.24: Rekombinantes Ctad1 Protein bindet dosisabhängig an Humanzellen.

A-C) Bindung von proteinbeschichteten Kügelchen an HEP-2 Zellen. Die Proteinbeschichtung der Kügelchen erfolgte mit Proteinkonzentrationen von 0,1 μM (4,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bis 4,5 μM (220,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Die experimentelle Durchführung erfolgte wie in Abbildung 4.2 B beschrieben.

A) Bestimmung der Proteinbeschichtung von 2×10^7 Latexkügelchen mittels Westernblot. Die Detektion erfolgte mit α -His Antikörper (1:2500) und AP- α -Maus Antikörper (1:7500). Ctad1: 49 kDa.

B) Die Quantifizierung der Adhäsion erfolgte durch Bestimmung der mittleren Fluoreszenz von 10.000 HEP-2 Zellen und daran gebundenen Latexkügelchen im FACSaria. Der P1 Mittelwert gibt die gemessenen Fluoreszenz aller HEP-2 Einzelzellen mit adhärten Latexkügelchen an (mittlere Fluoreszenz). Durchführung im Triplikate ($n=1$).

C) Darstellung ausgewählter FACS Ausgabedaten. Gegenüberstellung der FITC-Fluoreszenz bei 530 nm (X-Achse) gegen die Zellzahl (Y-Achse) aller gemessenen HEP-2 Zellen.

D) Bindung von löslichem rekombinanten Ctad1 Protein an Humanzellen. Darstellung repräsentativer Westernblots. Hec-1B oder HeLa Zellen wurden mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protein für unterschiedliche Zeitpunkte bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert (s. Abbildung 4.4). Die Detektion erfolgte mit α -His (1:2500) bzw. α -Aktin (1:1000) und AP-konjugiertem α -Maus Antikörper (1:7500). Pfeilspitze markiert Ctad1. Ctad1: 49 kDa, GST: 28 kDa, Aktin: 42 kDa. M: Proteinstandard.

4.7.3 Sowohl rekombinantes Ctad1 Protein als auch der Ctad1 Antikörper wirken neutralisierend auf die Infektion

Nachdem für rekombinantes Ctad1 eine konzentrationsabhängige Bindung an Humanzellen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4.24 A-C), stellte sich die Frage, ob die zuvor beobachtete Neutralisation der Infektion ebenfalls konzentrationsabhängig verläuft (s. Abbildung 4.3 B).

Daher wurden HEp-2 Zellen mit steigenden Mengen an rekombinantem Ctad1 Protein vorbehandelt und anschließend infiziert (Abbildung 4.25 A, B). Das nicht-chlamydiale Kontrollprotein GST vermittelte keine signifikante Beeinflussung der Infektion (Restinfektion 97 %). Im Gegensatz dazu führte die Vorbehandlung mit rekombinanten Ctad1 zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Infektion. Die maximale Reduktion der Infektion auf 83 % wurde mit der höchsten Proteinkonzentration von 100 µg/ml erzielt. Die Vorbehandlung mit 50 µg/ml Proteinlösung führte zu einer etwa gleichwertigen Reduktion der Infektion (Restinfektion 84 %). Die niedrigeren Konzentrationen von 25 µg/ml und 12,5 µg/ml vermittelten eine geringere Reduktion der Infektion auf 93 % respektive 95 %.

Das obige Ergebnis wurde im Folgenden mit einem Antikörper-Neutralisationsexperiment komplementiert. Hierbei werden die spezifischen oberflächenpräsentierten Epitope auf EBs durch den Antikörper abgedeckt und sind folglich für ihren eigentlichen Interaktionspartner nicht zugänglich. Bei den Adhäsinen OmcB und Pmp21 führt dieses zu einer verminderten Adhäsion und einer darin resultierenden reduzierten Infektion (Moelleken und Hegemann 2008, Mölleken, Schmidt *et al.* 2010). Zur Kontrolle unspezifischer Einflüsse des Serums wurden EBs mit den entsprechenden Prä-Immunsereen inkubiert.

Bei EFTu Antiserum vorbehandelten EBs konnte nur bei der höchsten Antikörperkonzentration (1:10) eine Reduktion der Infektion um 11 % ermittelt werden, während bei den höheren Verdünnungen keine Unterschiede zum Prä-Immuserum beobachtbar waren (Abbildung 4.25 C). Die Reduktion der Infektion der Ctad1 Antiserum vorbehandelten EBs betrug im Vergleich zum Prä-Immuserum durchschnittlich 18 %, bei allen drei eingesetzten Verdünnungen. Aufgrund der hohen Varianz zwischen den einzelnen Versuchsreplikaten fiel eine eindeutige Aussage jedoch schwer, da keine Signifikanz in der Reduktion bestand. Der generelle Trend des Experiments spricht jedoch für eine neutralisierende Wirkung des Ctad1 Antiserums auf die Infektion.

Zusammenfassend konnte sowohl eine dosisabhängige reduzierende Wirkung des rekombinanten Ctad1 Proteins, als auch des anti-Ctad1 Antikörpers auf die *C. trachomatis* E Infektion bestätigt werden.

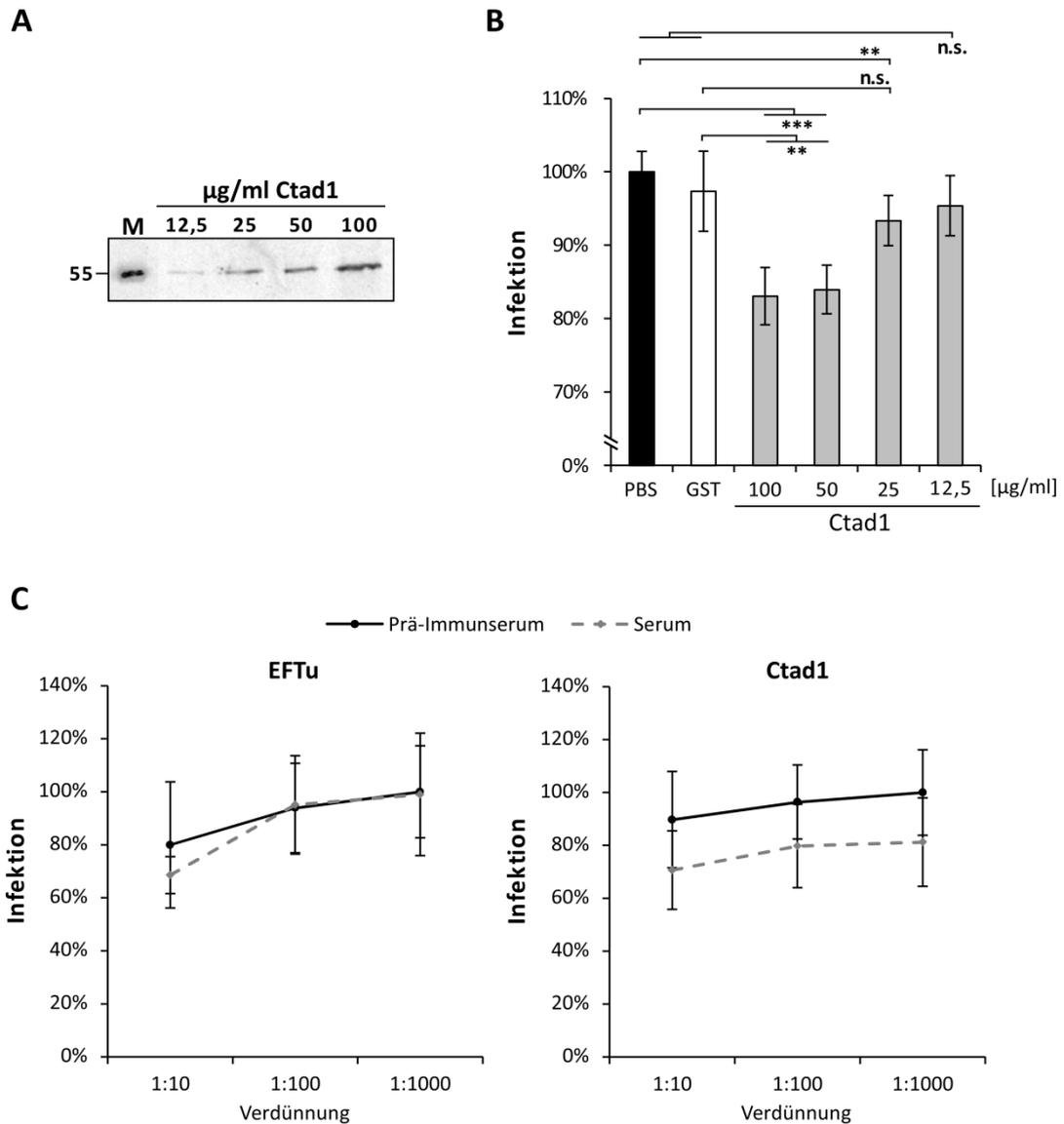


Abbildung 4.25: Untersuchung der neutralisierenden Wirkung von rekombinanten Ctad1 bzw. anti-Ctad1 Antikörper auf die chlamydiale Infektion.

A) und B) Neutralisationskinetik der chlamydialen Infektion mit rekombinanten Ctad1.

A) Kontrolle des eingesetzten Proteins mittels Westernblot (1 % der Ausgangslösung geladen). Die Detektion erfolgte mit α -His (1:2500) und α -Maus Antikörper (1:7500). M: Proteinstandard.

B) Neutralisationsexperiment mit rekombinanten Ctad1 Protein. 1×10^6 HEp-2 Zellen wurden mit steigenden Proteinkonzentrationen an rCtad1, rGST (100 $\mu\text{g/ml}$) bzw. PBS in Zellkulturmedium 2 h bei 37 °C inkubiert, bevor sie mit gradientengereinigten *Ctr E* EBs für 2 h bei 37 °C infiziert wurden (MOI: 20). Die Infektion wurde nach 24 h mit Methanol fixiert. Die gebildeten Einschlüsse wurden durch Verwendung eines FITC-konjugierten α -LPS Antikörpers (Pathfinder 1:8) identifiziert. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch von 10 Gesichtsfeldern bei 43-facher Objektivvergrößerung in Duplikaten ($n=3$). Die Anzahl der gebildeten Einschlüsse PBS-behandelter Zellen wurde auf 100 % Infektion normiert. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,1$, n.s.: nicht signifikant.

C) Neutralisationsexperiment mit α -Ctad1 Antikörper. EBs wurden für 2 h bei 4 °C mit verschiedenen Verdünnungen an Prä-Immunsereum bzw. Antikörper präinkubiert. Anschließend wurden 1×10^6 HEp-2 Zellen mit den EBs stationär für 2 h infiziert (MOI: 20). Im Folgenden wurde wie bei B beschrieben fortgefahren. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch von 10 Gesichtsfeldern bei 43-facher Objektivvergrößerung in Duplikaten ($n=3$). Die Vorbehandlung der EBs mit 1:1000 verdünntem Prä-Immunsereum wurde auf 100 % Infektion normiert.

4.7.4 Identifikation des humanen Interaktionspartners von Ctad1

Da gezeigt werden konnte, dass Ctad1 ein neues chlamydiales Adhäsins ist, wurde die Suche nach einem humanen Interaktionspartner begonnen.

4.7.4.1 Pulldown Experiment zur Identifikation eines Interaktionspartners

Zur Identifikation eines humanen Interaktionspartners wurden zu Beginn Rezeptor-Pulldown-Versuche durchgeführt. Mit dieser Methode wurde das bislang einzige Interaktionspaar bestehend aus chlamydialem Adhäsins (Pmp21) und humanem Rezeptor (EGFR) identifiziert (Mölleken, Becker *et al.* 2013).

Im hier durchgeführten Ansatz wurde biotinyliertes, rekombinantes Ctad1 Protein mit Humanzellen inkubiert (Abbildung 4.26 A). Die Bindung zwischen einem humanen Rezeptor und Ctad1 wurde vor der Zellyse durch einen reversiblen Crosslinker stabilisiert. Der Ctad1-Rezeptor-Komplex wurde anschließend durch die Bindung des Biotins an die Streptavidin-Agarose aus dem Gesamtzelllysat extrahiert. Danach erfolgte die Elution, der an Ctad1 gebundenen Proteine, durch die DTT-vermittelte Spaltung des Crosslinkers. Das Eluat wurde im SDS-Gel aufgetrennt, coomassiegefärbt und die Banden extrahiert, die nur in der Ctad1 Probe nicht jedoch in der PBS Kontrolle, auftraten (Abbildung 4.26 B). Die Proteinbanden wurden massenspektrometrisch analysiert, um die Identität der Proteine zu ermitteln, wobei insgesamt 195 potentielle Interaktionspartner aus 6 Proteinbanden (zweier Ansätzen) ermittelt wurden. Die Signifikanz der identifizierten Proteine wurde dabei mit Punkten (Score) bewertet. Anhand dieser Punkte wurden die besten 30 Proteine in funktionelle Gruppen eingeteilt (die vollständige Liste ist im elektronischen Anhang einsehbar). Darunter befanden sich neun zytoplasmatische, acht Kern-, sechs ER-, vier mitochondriale und drei Zellmembranproteine (Abbildung 4.26 C). Die meisten Proteine kamen aufgrund ihrer intrazellulären Lokalisation nicht als potentielle Interaktionspartner eines Adhäsins infrage. Als einziger Rezeptor konnte unter den 30 besten Proteinen der EGF-Rezeptor extrahiert werden. Mit einem geringeren Score konnte außerdem ein Mitglied der großen Integrin-Rezeptorfamilie extrahiert werden. Da in vorherigen Arbeiten für PmpD, dem *C. trachomatis* Äquivalent zu Pmp21, eine Interaktion zum EGF-Rezeptor bereits ausgeschlossen werden konnte (Becker 2013), wurde eine mögliche Interaktion von Ctad1 zu EGFR und Integrin weiter verfolgt.

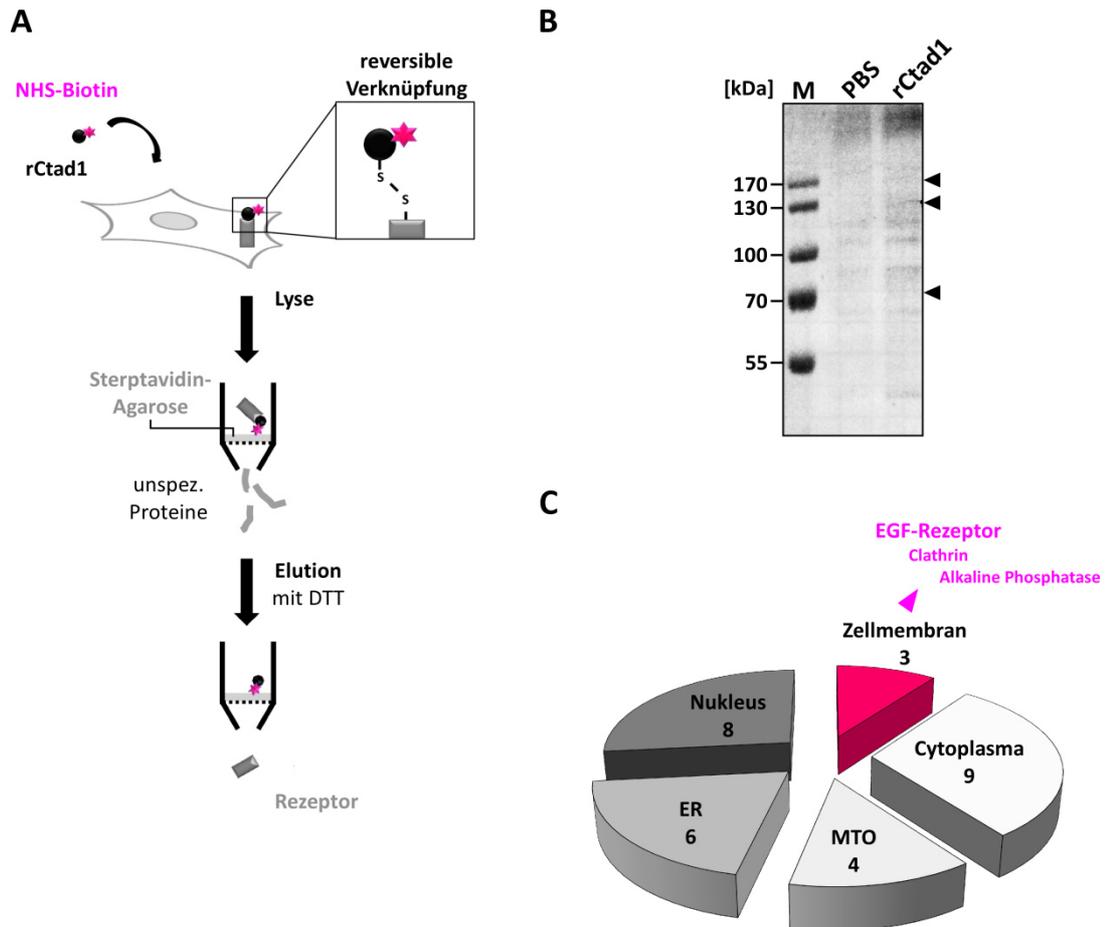


Abbildung 4.26: Rezeptor-Pulldown für Ctad1.

A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs, detaillierte Beschreibung siehe Kapitel 3.6.8.2.

B) Auftrennung des Rezeptor-Pulldown Eluats mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung. Pfeilspitzen markieren extrahierte Banden (n=2).

C) Auswertung der massenspektrometrischen Analyse, die am Zentrum für Bioanalytik des Zentrums für Molekulare Medizin an der Universität Köln erfolgte. Die 30 besten Kandidaten wurden in funktionelle Gruppen eingeteilt dargestellt (UniPort). ER: Endoplasmatische Retikulum, MTO: mitochondriale Proteine.

4.7.4.2 Ctad1 interagiert im Hefe-zwei-Hybrid-System nicht mit EGFR aber mit Integrin- β 1

Die Interaktion von Ctad1 zum EGF-Rezeptor bzw. zur β 1-Untereinheit des Integrin-Rezeptors wurde im Folgenden im Hefe-zwei-Hybrid-System getestet. Zur Kontrolle der Interaktionsspezifität wurde der LDL-Rezeptor mitgeführt, da dieser aus der Pmp21-EGFR Studie bereits zur Verfügung stand (Mölleken, Becker *et al.* 2013). Von allen Rezeptoren war jeweils die Ektodomäne mit der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) fusioniert worden (Becker 2013), daher wurde Ctad1 mit der Gal4-Bindedomäne (BD) fusioniert. Die Interaktion zu den verschiedenen Rezeptoren wurde mittels serieller Verdünnungstopftests auf Selektionsmedien analysiert. Alle proteinexprimierenden Hefen zeigten ein vergleichbares Wachstum auf

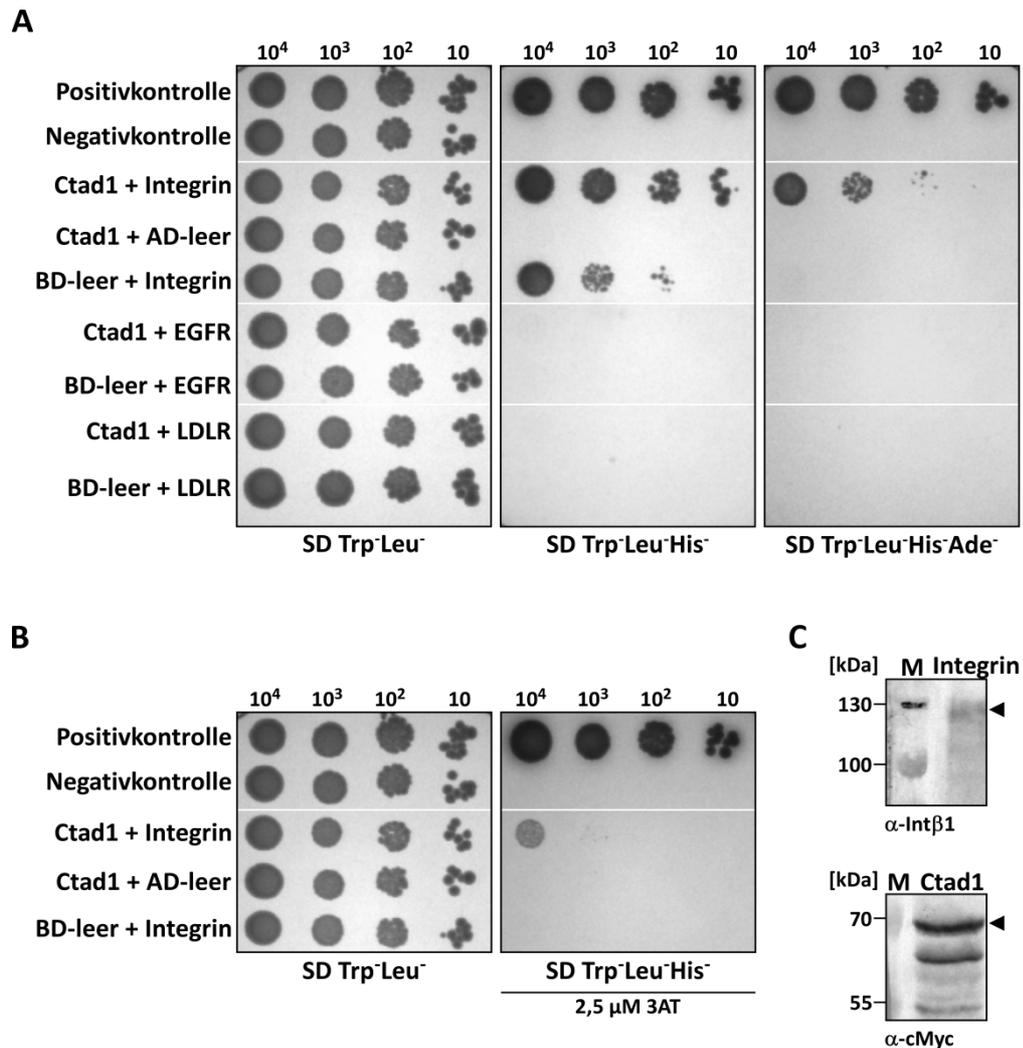


Abbildung 4.27: Analyse der Interaktion von Ctad1 mit verschiedenen Rezeptoren im Hefe-zwei-Hybrid-System.

Serieller Verdünnungstropftest zur Wachstumsanalyse von Hefezellen. Die Wachstumskontrolle erfolgte auf SD Trp⁻Leu⁻ Selektionsmedium und die Interaktionsanalyse der Fusionsproteine auf niedrig- (SD Trp⁻Leu⁻His⁻) und hochstringentem Selektionsmedium (SD Trp⁻Leu⁻His⁻Ade⁻) (**A**), Medium + 2,5 μM 3-Aminotriazol (3AT) (**B**). Positivkontrolle: p53 + SV40 T-Antigen, Negativkontrolle: Lamin C + SV40 T-Antigen.

C) Kontrolle der Proteinexpression in Hefe mittels Westernblot. Die Detektion erfolgte mit α-Integrin-β1 (1:100) und AP-α-Ziege Antikörper (1:1000) bzw. α-cMyc (1:400) und AP-α-Maus Antikörper (1:7500). M: Proteinstandard, AD-Integrin-β1: 100 kDa, BD-Ctad1: 68 kDa.

SD Trp⁻Leu⁻ Wachstumsmedium (Abbildung 4.27 A). Für Ctad1 und EGFR oder Ctad1 und LDLR koexprimierende Hefen konnte kein Wachstum auf SD Trp⁻Leu⁻His⁻ Selektionsmedium beobachtet werden. Allerdings wuchsen Ctad1 und Integrin-β1 koexprimierende Hefen gut auf niedrigstringentem SD Trp⁻Leu⁻His⁻ Medium, was auf eine Interaktion der AD- und BD-Fusionsproteine hindeutete. Integrin-β1 zeigte allerdings in Koexpression mit dem leeren BD-Vektor Autoaktivierung auf diesem Selektionsmedium. Auf hochstringentem SD Trp⁻Leu⁻His⁻Ade⁻ Selektionsmedium trat die Autoaktivität von Integrin-β1 nicht auf, die Interaktion von Ctad1 und Integrin-β1 blieb jedoch bestehen.

Um auszuschließen, dass die ermittelte Interaktion von Ctad1 und Integrin- β 1 auf die Autoaktivierung zurückzuführen war, wurden die Hefe-zwei-Hybrid-Analyse auf niedrigstringentem Selektionsmedium mit 3AT wiederholt (Abbildung 4.27 B). 3AT reprimierte die Autoaktivierung von Integrin- β 1, während die Ctad1 und Integrin- β 1 koexprimierenden Hefen auf dem Selektionsmedium wuchsen, wenn auch mit geringerer Effizienz im Vergleich zur Positivkontrolle.

Die Expression beider Fusionsproteine konnte im Westernblot nachgewiesen werden (Abbildung 4.27 C).

Mittels Hefe-zwei-Hybrid-Analyse ließ sich die Interaktion von Ctad1 und EGF-Rezeptor nicht bestätigen. Allerdings konnte eine Interaktion von Ctad1 zur β 1-Untereinheit des Integrin-Rezeptors beschrieben werden.

4.7.4.3 Ctad1 und Integrin- β 1 interagieren im Far-Westernblot Experiment

Im Folgenden sollte die Interaktion zwischen Ctad1 und Integrin- β 1 biochemisch nachgewiesen werden. Leider ließ sich keines der getesteten Integrin- β 1-Transfektionsplasmide in Humanzellen exprimieren. Daher wurde die Ektodomäne (AS 21-728) von Integrin- β 1 mit einem His₁₀-Tag fusioniert, in *E. coli* exprimiert und isoliert, um die direkte Interaktion beider Proteine im Far-Westernblot zu analysiert (Abbildung 4.28).

Als Positivkontrolle wurde die Bindedomäne des Integrin- β 1 bindenden Adhäsins Invasin von *Y. pseudotuberculosis* mitgeführt (Leong, Morrissey *et al.* 1993, Dersch und Isberg 1999). Um die Interaktion der Proteine im Far-Westernblot nachweisen zu können, wurden 200 μ g rCtad1 bzw. rIntegrin- β 1 biotinyliert. Der Erfolg der Biotinylierung konnte mittels Westernblot bestätigt werden (Abbildung 4.28 A). Die Analyse der immobilisierten Proteine mit anti-His Antikörper zeigte, dass im Vergleich zu Invasin dreimal weniger Ctad1 und um die Hälfte weniger GST Protein detektiertbar waren (Abbildung 4.28 B). Obwohl doppelt so viel Integrin- β 1 Protein aufgetragen wurde, war die detektierte Bande nur etwa halb so intensiv wie die Invasin Bande (Abbildung 4.28 B, Pfeil). Zusätzlich konnte eine prominente Abbruchbande bei ca. 55 kDa detektiert werden.

Das biotinylierte rCtad1 Protein zeigte keine Interaktion mit der Negativkontrolle GST (Abbildung 4.28 C). Im Gegensatz dazu konnte eine deutliche Interaktion mit rekombinantem Integrin- β 1 beobachtet werden, wobei Ctad1 sowohl mit dem Vollängenprotein als auch mit zwei Degradationsfragmenten interagiert. Des Weiteren band Ctad1_{Biotin} einige Proteine im humanen Zelllysat. So konnten intensivere Banden unterhalb der 55 kDa, knapp über und unter der 70 kDa und etwa auf Höhe der 130 kDa Markerbande ermittelt werden. Bei der 130 kDa Bande könnte es sich um endogenes Vollängen-Integrin- β 1 handeln, das aufgrund

seiner Glykosylierung grundsätzlich oberhalb seines theoretischen Molekulargewichtes von 88 kDa läuft.

Für biotinyliertes Integrin- β 1 konnte keine Wechselwirkung zur GST Negativkontrolle ermittelt werden. Allerdings blieb auch die erwartete Interaktion mit Invasin aus, wohingegen gebundenes Integrin- β 1 an immobilisiertem Ctad1 detektiert werden konnte.

In der Far-Westernblot Analyse konnte somit die *vice versa* Interaktion von Ctad1 zu Integrin- β 1 bestätigt werden.

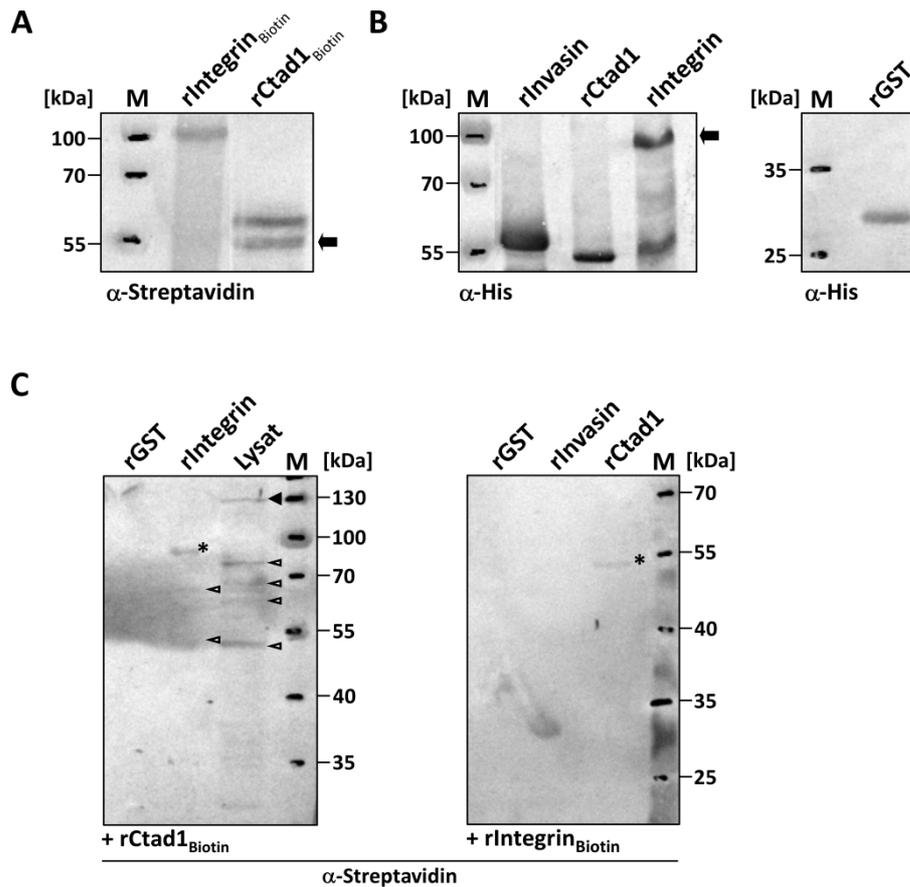


Abbildung 4.28: Analyse der Interaktion von rCtad1 und Integrin- β 1 im Far-Westernblot.

A) Rekombinantes Integrin- β 1 bzw. Ctad1 wurden mit 20-fachem Überschuss an NHS-Biotin biotinyliert. Der Erfolg der Biotinylierung wurde mittels Westernblot überprüft. Die Detektion erfolgte mit AP- α -Streptavidin Antikörper (1:1000). Pfeil: Ctad1

B) Ladekontrolle der aufgetragenen rekombinanten Proteine (je 1 μ g). Detektion mit α -His (1:2500) und AP- α -Maus Antikörper (1:7500). Pfeil: Rekombinantes Volllängen-Integrin- β 1.

C) Far-Westernblot Analyse der Ctad1-Integrin- β 1 Interaktion. 1 μ g rCtad1, rInvasin bzw. rGST und 2 μ g rIntegrin- β 1 bzw. Hep-2 Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf einer PVDF-Membran immobilisiert und mittels Guanidin-Gradienten renaturiert. Die Membran wurde anschließend mit biotinylierter rCtad1 bzw. rIntegrin- β 1 Proteinlösung (8 μ g/ml) inkubiert. Die Detektion der Interaktion erfolgte mit AP- α -Streptavidin Antikörper (1:1000). Stern: rCtad1 + rek. Integrin- β 1 (80 kDa), Pfeilspitze gefüllt: Ctad1 + potentiell zelluläres Volllängen-Integrin- β 1 theor. MW: 88 kDa, Pfeilspitze offen: Ctad1 Interaktion zu Abbruchbanden. Ctad1: 49 kDa, GST: 28 kDa, Invasin: 52 kDa, M: Proteinstandard.

4.7.4.4 Früh in der Infektion assoziiert Integrin- β 1 an gebundenen EBs

Aufgrund der zuvor beschriebenen Interaktion von Ctd1 zur β 1-Untereinheit des Integrin-Rezeptors wurde im Folgenden die *in vivo* Lokalisation beider Proteine während der frühen Infektion analysiert (Abbildung 4.29).

Hierfür wurde die Lokalisation von Ctd1, Momp und Integrin- β 1 in infizierten HEp-2 nach 15 min durch Lebendfärbung analysiert, um die extrazelluläre Lokalisation im möglichst naturgetreuen Zustand zu dokumentieren (Abbildung 4.29 A, C). Bei der Lebendfärbung erfolgt die Färbung der Infektion mit spezifischen Antikörpern bevor die Zellen fixiert werden. Hierbei konnte an adhärenen Momp gefärbten EBs ein assoziiertes Integrin- β 1 Signal detektiert werden (Abbildung 4.29 A). Die mikroskopische Quantifizierung dieses Ereignisses zeigte, dass 80 % aller EBs pro Zelle einem Integrin- β 1 Signal aufwiesen (Abbildung 4.29 C).

Zusätzlich wurde die Lokalisation von Ctd1 untersucht, das wie zuvor beschrieben mit Momp kolokalisierte. Darüber hinaus konnte eine direkte Assoziation von Ctd1 an Integrin- β 1 beobachtet werden (Abbildung 4.29 A, Vergrößerung).

Da auch auf uninfizierten Zellen Integrin- β 1 sowohl in stärkeren punktierten als auch in diffuseren flächigeren Signalen detektierbar war (Abbildung 4.29 B), war eine verstärkte Akkumulation des Integrin- β 1 Signals an EBs mit dieser Methode schwer einzuschätzen.

Um eine mögliche Akkumulation von Integrin- β 1 an gebundenen bzw. vielleicht bereits internalisierten EBs zu untersuchen, wurden Kurzzeitinfectionen durchgeführt und die PFA-fixierten Zellen mit Triton und SDS permeabilisiert. Einem Verfahren, das schon zuvor erfolgreich zum Färben früher Einschlüsse angewandt wurde (Chen, Bastidas *et al.* 2014).

1 hpi konnte Integrin- β 1 akkumuliert an Momp gefärbten EBs detektiert werden, wobei das Integrin- β 1 Signal den EB halb zu umrunden schien (Abbildung 4.29 D, Vergrößerung 2). Außerdem konnten Ereignisse beobachtet werden, bei denen das Integrin- β 1 Signal den EB komplett umschloss (Abbildung 4.29 D, Vergrößerung 1).

In der natürlichen Infektion infiziert *C. trachomatis* epitheliale Schleimhäute des Urogenitaltrakts, u.a. der Gebärmutter und der Eileiter. Um eine Verknüpfung zur natürlichen Infektion herzustellen, wurde untersucht, ob die Integrin- β 1 Akkumulation an gebundenen EBs auch in nachträglich infizierten primären Eileiterepithelzellen auftritt (Abbildung 4.30). In der Tat konnten 1 hpi an Momp gefärbten EBs die Akkumulation von Integrin- β 1 beobachtet werden. Einige EBs waren auf der Membran zugewandten Seite, also der potentiellen Kontaktstelle, ringförmig von Integrin- β 1 Signalen umgeben (Abbildung 4.30, untere Aufnahme, Achsenansicht). Des Weiteren konnten vermutlich internalisierte EBs mit einem partiell umrundenden Integrin- β 1 Signal beobachtet werden (Abbildung 4.30 untere Aufnahme, Pfeilspitze).

Beide Signalmuster deuten auf eine Funktion des Integrin-Rezeptors bei der Aufnahme des Bakteriums in Humanzellen hin.

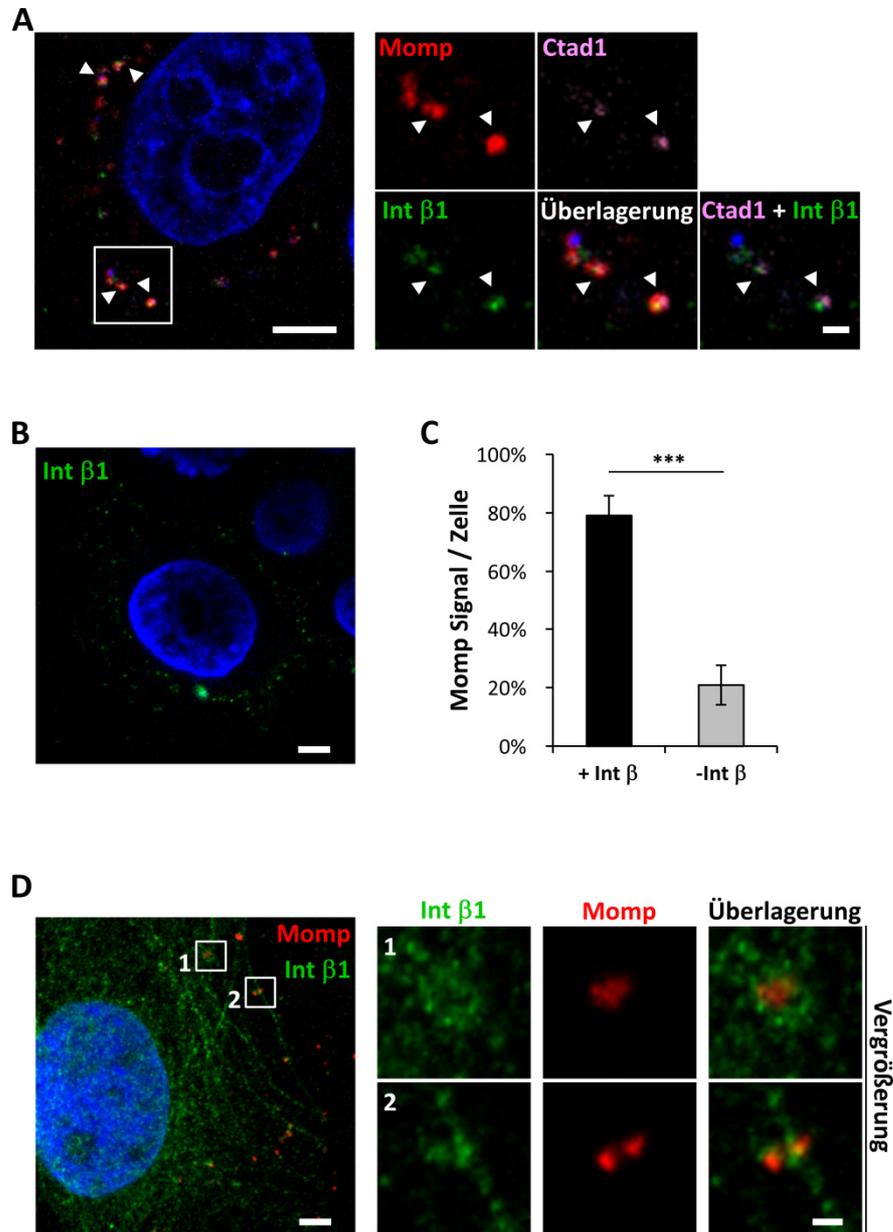


Abbildung 4.29: Integrin-β1 lokalisiert an der Bindestelle von *C. trachomatis* Serovar E.

A-C) HEp-2 Zellen wurden vorgekühlt und gradientengereinigten EBs (MOI: 20) 15 min bei 4 °C aufzentrifugiert. Die Lebendfärbung von infizierten (**A**) bzw. uninfizierten (**B**) Zellen wurde nach 15 min Inkubation bei 37 °C in kaltem LM-Puffer auf Eis durchgeführt. Die Färbung erfolgte mit primären α-Ctad1 (1:10), α-Integrin-β1 (1:10), α-Momp Antikörper (1:150), sekundären Alexa649-α-Kaninchen, Alexa488-α-Ziege und Alexa594-α-Maus Antikörper (1:200). Anschließend wurden die Zellen 5 min mit 3 % PFA fixiert und mit DAPI (1:1000) gefärbt. Detaillierte Beschreibung s. Kapitel 3.8.4. Quantifizierung der Assoziation von Integrin-β1 an Momp gefärbten EBs von 61 Zellen (**C**). *** $p < 0,001$

D) Kurzzeitinfektionen wurden 1 hpi mit PFA fixiert und im Anschluss mit 0,2 % Triton und 0,05 % SDS permeabilisiert. Die Färbung erfolgte mit α-Integrin-β1 und α-Momp Antikörper wie unter A-C beschrieben. Größenstandard: 5 μm, Vergrößerung: 1 μm.

Zusammenfassend konnte *in vivo* eine signifikante Assoziation von Integrin- β 1 an der chlamydialen Bindestelle gezeigt werden. Da sowohl in primären Eileiterepithelzellen als auch bei der epithelialen HEp-2 Zelllinie das gleiche Signalmuster auftrat, kann von einer Beteiligung des Integrin-Rezeptors auch in der natürlich vorkommenden Infektion ausgegangen werden.

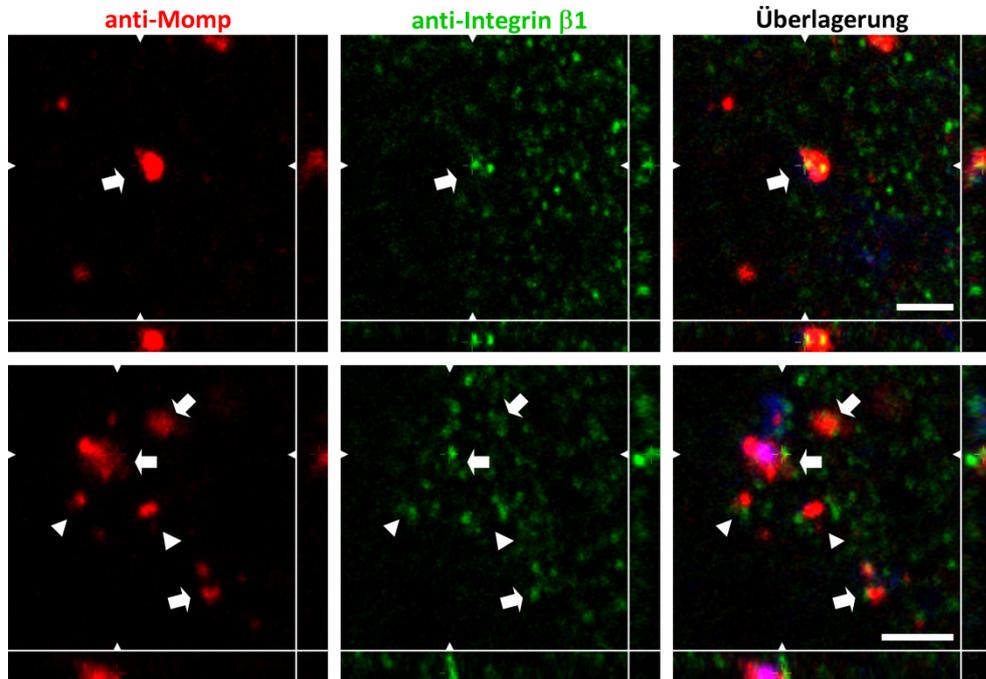


Abbildung 4.30: Frühe *C. trachomatis* Infektion von primären Eileiterepithelzellen.

Primäre Eileiterepithelzellen wurden aus Spendergewebe nach (Fotheringham, Levanon *et al.* 2011) isoliert und für dieses Experiment von Dr. Stefan Jerchel (Universitätsklinikum Lübeck) zur Verfügung gestellt. 1×10^5 Zellen wurden in DMEM kultiviert bis sie einen etwa 80 % konfluenten Zellrasen bildeten. Die Infektion erfolgte nach dem Kurzzeitinfektionsprotokoll in RPMI Medium + 5 % FKS (MOI: 20). Die Infektion wurde 1 hpi mit 3 % PFA fixiert und anschließend mit 0,5 % Triton und 0,05 % SDS permeabilisiert. Die Färbung erfolgte mit primären α -Momp (1:150), α -Integrin- β 1 Antikörper (1:10), sekundären Alexa594- α -Maus, Alexa488- α -Ziege Antikörper (1:200) und DAPI. Konfokalmikroskopische Aufnahmen mit Darstellung der XZ und YZ Ebene. Pfeile: EBs mit akkumuliertem Integrin- β 1, Pfeilspitze: potentiell internalisiertes EBs. Größenstandard: 1 μ m. Vollbild siehe Abbildung A.1.5.

4.7.5 Ctad1-beschichtete Latexkügelchen werden internalisiert

Invasin, das Adhäsion von Yersinien, bindet an Integrin- β 1 und vermittelt die Internalisierung des Bakteriums. Es konnte gezeigt werden, dass Invasin beschichteten Latexkügelchen hoch effizient in Humanzellen aufgenommen werden (Dersch und Isberg 1999). Daher wurde im Folgenden das Internalisierungsverhalten rCtad1-beschichteter Kügelchen in HEp-2 Zellen untersucht. Neben Ctad1 wurden als Positivkontrolle rInvasin und als Negativkontrolle GST-getaggte rGroEL1 beschichtete Kügelchen mitgeführt. Die Beschichtungseffizienz von Ctad1 und GroEL1 fiel etwa gleichstark aus, während etwa eineinhalbmal mehr Invasin auf den Kügelchen detektiert wurde (Abbildung 4.31 A). Die Anzahl aller gebundenen und internalisierten

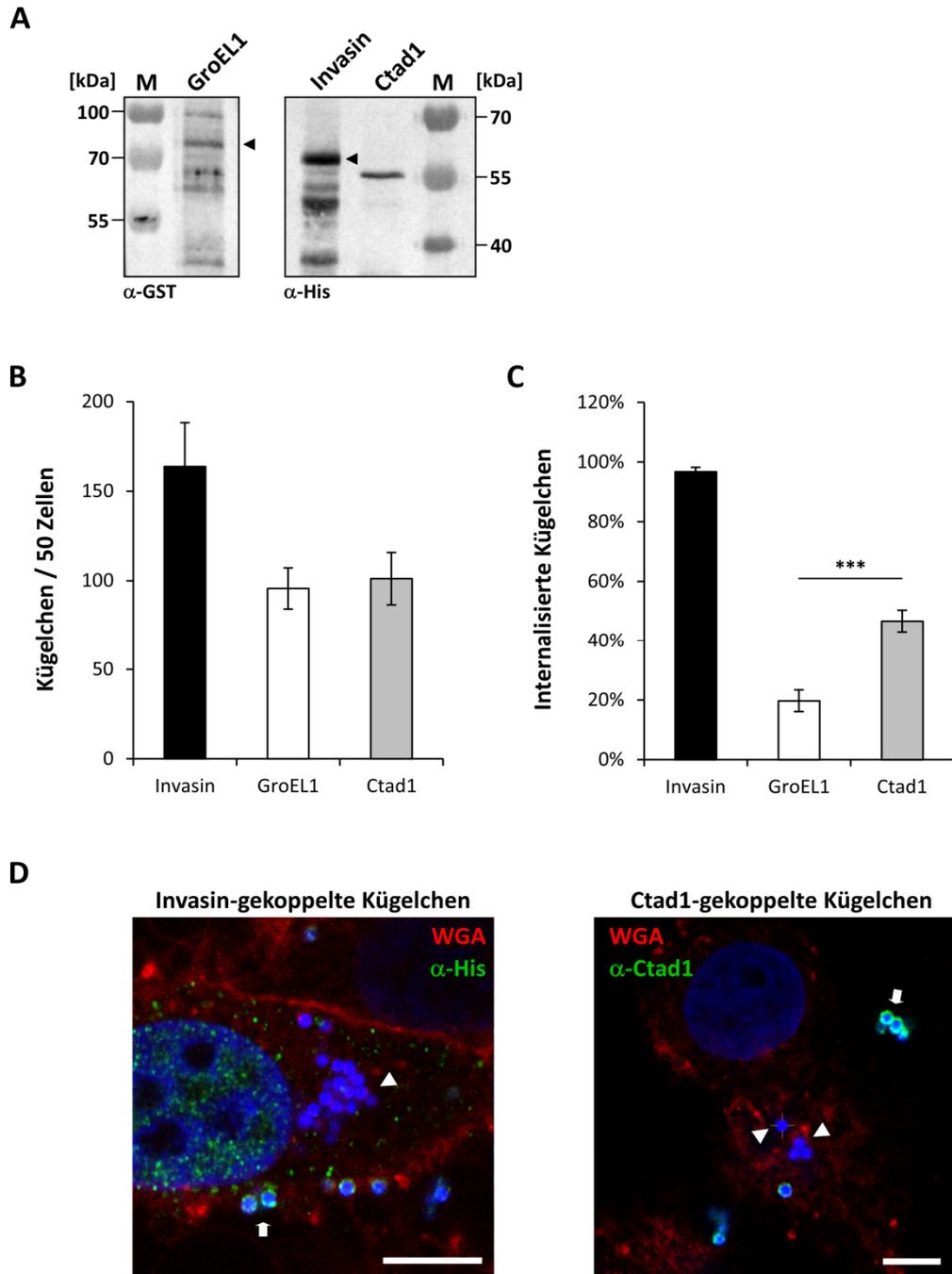


Abbildung 4.31: rCtad1 proteinbeschichtete Latexkügelchen werden in HEP-2 Zellen internalisiert.

A) Bestimmung der Proteinbeschichtung mittels Westernblot. Detektion mit α -His (1:2500) und AP- α -Maus Antikörper (1:7550) oder α -GST (für GroEL1, 1:1000) und AP- α -Kaninchen Antikörper (1:7500). Pfeilspitze: Volllängenprotein, M: Proteinstandard, Ctad1: 49 kDa, GroEL1: 86 kDa, Invasin: 52 kDa.

B) und **C)** Auswertung des Internalisierungsexperiments. Blau fluoreszierende Latexkügelchen wurden äquimolar mit $2,04 \mu\text{M}$ rekombinanten Protein beschichtet. 5×10^5 Zellen wurden mit 5-fachem Überschuss an Kügelchen versetzt und 5 min bei 700 Upm zentrifugiert. Die Internalisierung der Kügelchen erfolgte für 4 h bei 37°C . Im Anschluss wurden die Zellen mit 3 % PFA fixiert und mit primären α -Ctad1 (1:20), α -GroEL1 (1:50) bzw. α -His Antikörper (1:20) und sekundären Alexa488- α -Kaninchen bzw. Alexa488- α -Maus Antikörper (1:200) und DAPI (1:1000) gefärbt. Die gebundenen und internalisierten Kügelchen von 50 Zellen wurden mikroskopisch ausgewertet. Die Auswertung erfolgte in Triplikaten ($n=2$). *** $p < 0,001$

D) Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahme des Internalisierungsexperiments. Die Färbung erfolgte wie unter B beschrieben. Zusätzlich wurde die Plasmamembran mit WGA (1:200) gefärbt. Pfeilspitze markiert internalisierte Kügelchen, Pfeil markiert gebundene Kügelchen. Größenstandard: $5 \mu\text{m}$.

sierten Kügelchen wurde bestimmt (Abbildung 4.31 B), wobei Ctad1 und GroEL1 eine gleichwertige Bindung vermitteln, während etwa 1,5-mal mehr Invasin-beschichtete Kügelchen banden. Parallel wurden die internalisierten blau fluoreszierenden Kügelchen gezählt, die durch die Plasmamembran geschützt nicht vom Antikörper angefärbt werden können (Abbildung 4.31 C, D). 97 % aller Invasin-beschichteten Kügelchen wurden internalisiert, während lediglich 20 % der GroEL1 Kügelchen in die Humanzelle aufgenommen wurden. In der Tat wurden auch 47 % der Ctad1-beschichteten Kügelchen internalisiert. Somit fiel die Ctad1 Internalisierung weniger effizient als die Invasin-vermittelte Aufnahme aus, jedoch signifikant stärker im Vergleich zur Negativkontrolle GroEL1.

Ctad1 vermittelt seine eigene Internalisierung und kann daher nicht nur als Adhäsion sondern auch als Invasin bezeichnet werden.

4.7.6 Integrin- β 1 besitzt eine Funktion in der chlamydialen Infektion

Um die Funktion des Integrin-Rezeptors in der *C. trachomatis* Infektion genauer zu studieren, wurden Experimente auf der Mäuse Fibroblastenzelllinie GD25 durchgeführt, die kein Integrin- β 1 exprimiert (Fassler, Pfaff *et al.* 1995). Zur Kontrolle wurde die korrespondierende komplementierte GD25 + Integrin- β 1 Zelllinie verwendet (folgend als GD25+ β 1 abgekürzt) (Wennerberg, Lohikangas *et al.* 1996).

4.7.6.1 Das Fehlen von Integrin- β 1 in Humanzellen beeinflusst die Adhäsion von Ctad1 und die chlamydiale Infektion

Zuerst wurde der Integrin- β 1-Einfluss auf die Ctad1 Adhäsion getestet. Dafür wurde die Bindung Ctad1-beschichteter Latexkügelchen vergleichend an GD25 und GD25+ β 1 Zellen untersucht. Die erfolgreiche Proteinbeschichtung der Latexkügelchen mit rekombinanten Ctad1 bzw. rGST Protein konnte im Westernblot bestätigt werden (Abbildung 4.32 A). Die unspezifische Bindung von BSA- bzw. GST-beschichteten Kügelchen an GD25 Zellen war gering und erzeugte eine mittlere Fluoreszenz von 107 respektive 140 (Abbildung 4.32 B). Ctad1 beschichtete Kügelchen adhärten etwa doppelt so stark an GD25 Zellen (mittlere Fluoreszenz 257), wobei die Unterschiede in der Adhäsion nicht signifikant waren. Die Adhäsion an GD25+ β 1 Zellen fiel für alle drei getesteten Proteine stärker aus als bei den GD25 Zellen. So wiesen die Negativkontrollen BSA und rGST eine mittlere Fluoreszenz von 777 bzw. 884 auf. Die unspezifische Hintergrundbindung war somit gegenüber den GD25 Zellen durchschnittlich um den Faktor 7 erhöht. Die Adhäsion von rCtad1-beschichteten Kügelchen lag bei einer mittleren Fluoreszenz von 3341 und war im Vergleich zu den GD25 Zellen um den Faktor 13

erhöht und adhärirten um den Faktor 4 signifikant besser an den Integrin- $\beta 1$ exprimierenden Zellen als die Kontrollproteine.

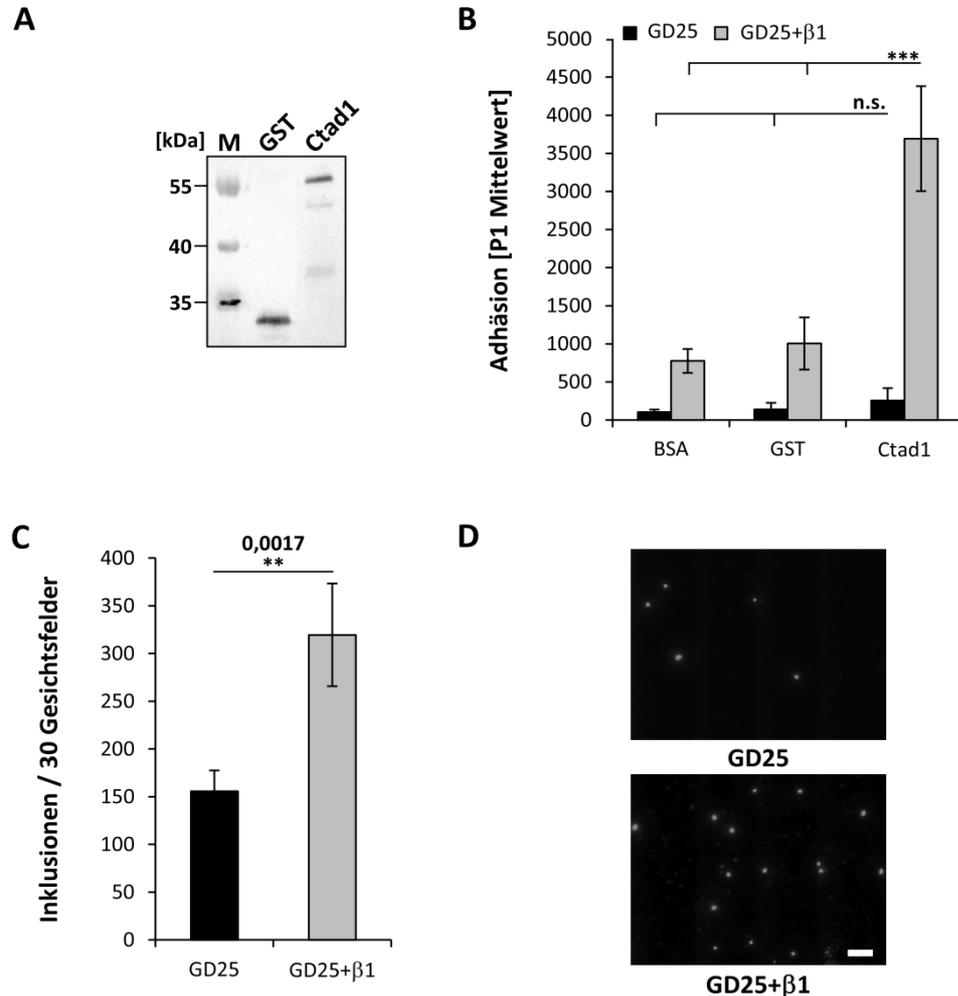


Abbildung 4.32: GD25 Zellen verringern die Bindung von rCtad1 und die *C. trachomatis* Infektion.

A) Kontrolle der Proteinbeschichtung mittels Westernblot. Detektion erfolgte mit α -His (1:2500) und AP- α -Maus Antikörper (1:7500). M: Proteinstandard. Ctad1: 49 kDa, GST: 28 kDa.

B) Auswertung des Adhäsionsexperiments mit proteinbeschichteten Latexkügelchen auf GD25 (-Int $\beta 1$) bzw. GD25 + Integrin- $\beta 1$ (GD25+ $\beta 1$) Zellen, zur Verfügung gestellt von Dr. Staffan Johansson (Universität Uppsala). Grün fluoreszierende Latexkügelchen wurden mit 2,04 μ M Protein beschichtet. Die Durchführung des Experiments erfolgte wie in Abbildung 4.2 B beschrieben. Die mittlere Fluoreszenz von 10.000 Zellen und adhärirten Kügelchen wurde bestimmt. Die Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt (n=2).

C) GD25 bzw. GD25 + Integrin- $\beta 1$ Zellen wurden mit *C. trachomatis* E durch Zentrifugation infiziert (MOI: 5). 24 hpi wurden die Zellen mit MeOH fixiert und mit FITC-konjugiertem α -LPS Antikörper (1:6) gefärbt. Die Auswertung erfolgte durch Auszählen von 30 Großaufnahmen bestehen aus je 4 x 4 Einzelbildern (n=5).

D) Repräsentative Darstellung einer Großaufnahme. Größenstandard: 100 μ m

*** p < 0,001; ** p < 0,01; n.s.: nicht signifikant

Zusammenfassend vermittelte Ctad1 an $\beta 1$ -negativen Zellen eine Bindung auf Niveau der Kontrollproteinen, wohingegen eine signifikante Bindung an $\beta 1$ -positiven Zellen im Vergleich zu den Kontrollproteinen und den $\beta 1$ -negativen Zellen bestimmt werden konnte.

Die obigen Daten wiesen auf eine Rolle von Integrin- β 1 bei der *C. trachomatis* E Infektion hin. Um dies zu überprüfen, wurden vergleichende Infektionen auf den GD25 und GD25+ β 1 Zellen durchgeführt (Abbildung 4.32 C und D). In GD25+ β 1 Zellen wurden pro 30 Gesichtsfelder durchschnittlich 320 Inklusionen gezählt. Im Gegensatz dazu wies die GD25 Zelllinie nur 156 Einschlüsse auf. Die Infektion auf Integrin- β 1-defizienten Zellen fiel somit um den Faktor 2 signifikant schlechter aus. Eine Veränderung der Morphologie der gebildeten Einschlüsse konnte dabei nicht beobachtet werden, was nochmals die verringerte Adhäsion und Internaisierung der Bakterien bestätigte (Abbildung 4.32 D).

Integrin- β 1 ist somit für eine optimale *C. trachomatis* E Infektion essentiell.

4.7.6.2 Ctad1 vermittelt eine Signalgebung in die Zelle

Nach dem für Ctad1 die Funktion als Adhäsion und Interaktionspartner des humanen Integrin-Rezeptors beschrieben werden konnte, wurde daraufhin untersucht ob Ctad1 eine Signalgebung in die Humanzelle induziert. Durch die Ligandenbindung des Integrin-Rezeptors wird eine Signalkaskade aktiviert, die nachfolgend zur Aktivierung von ERK „*extracellular-signal-regulation kinase*“ durch Phosphorylierung führt (Giancotti und Ruoslahti 1999).

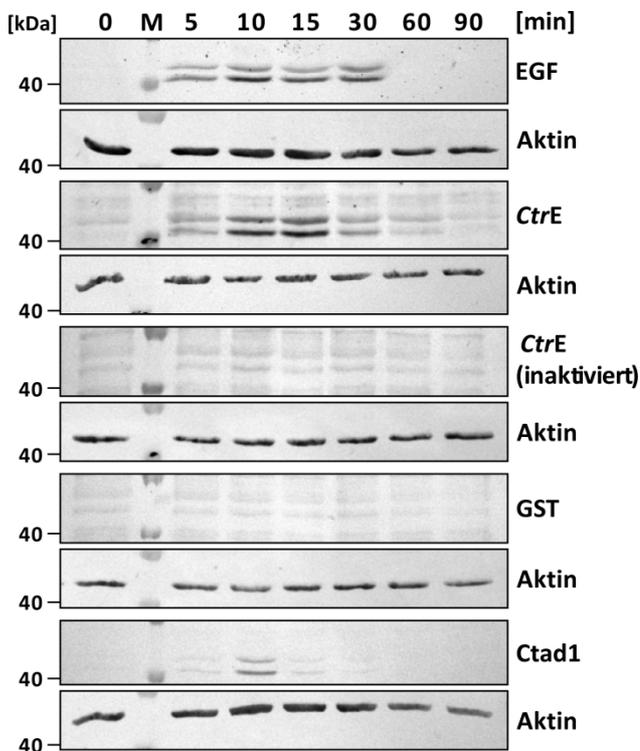


Abbildung 4.33: Aktivierung von ERK1/2 durch *Chlamydia trachomatis* und rekombinantes Ctad1.

Zeitkinetik der ERK1/2 Aktivierung durch rEGF (100 ng/ml), *Ctr* E (lebend oder abgetötet, MOI: 5), rGST oder rCtad1 (100 μ g/ml). HEp-2 Zellen wurden für 24 h auf serumfreiem Medium bei 37 °C ausgehungert, die Bakterien oder Proteine hinzugefügt und für die angegebenen Zeitpunkte bei 37 °C inkubiert. Ein Gesamtzelllysate wurde generiert und 30 μ l der Proteinprobe geladen. Die Detektion der ERK1/2 Aktivierung erfolgte mit α -phospho-ERK (1:200) und AP- α -Maus Antikörper (1:7500). Ladekontrolle: Aktin. M: Proteinstandard.

Die Chlamydien-vermittelte Aktivierung von ERK1/2 wurde bereits früh beschrieben, eine Aktivierung durch die Bindung und Aktivierung des EGF-Rezeptors durch Pmp21 wurde 2013 publiziert (Coombes und Mahony 2002, Rajalingam, Sharma *et al.* 2008, Mölleken,

Becker *et al.* 2013). Daher wurde der natürlich Ligand EGF des EGFRs als Kontrollprotein für diesen Versuch eingesetzt (Abbildung 4.33).

Eine ERK1/2 Aktivierung war bereits 5 min nach Zugabe von rEGF deutlich sichtbar und ebte nach 30 min wieder ab. Übereinstimmend mit publizierten Daten zu *C. trachomatis* L2 induzierte *C. trachomatis* E bereits nach 5 min ein deutliches phospho-ERK Signal (Rajalingam, Sharma *et al.* 2008), welches nach 10 min deutlich an Intensität gewann und bis zum 15 min Wert etwa konstant blieb. Anschließend nahm das Signal wieder ab und war nach 90 min wieder auf Hintergrundniveau reduziert. Im Gegensatz dazu konnte weder für hitzeinaktivierte EBs noch für das unspezifische rGST Protein eine Zunahme an phospho-ERK detektiert werden. Interessanterweise induzierte rCtad1 zwischen 5 min und 30 min die Bildung von phospho-ERK, die nach 10 min ihr Maximum erreichte. Folglich vermittelt Ctad1 höchst wahrscheinlich durch die Bindung an Integrin- β 1 eine ERK-Signaltransduktion in die Humanzelle.

4.7.7 Domänenanalyse von Ctad1

Um die Bindedomäne von Ctad1 detailliert zu charakterisieren wurden verschiedene Deletionsvarianten des Proteins generiert und untersucht.

4.7.7.1 Ermittlung einer Bindedomäne von Ctad1

Für die Charakterisierung der Bindedomäne von Ctad1 wurde zu Beginn das Volllängenprotein in zwei gleichgroße Hälften geteilt und die Bindungseigenschaft von N- und C-Terminus im löslichen Proteinbindeexperiment überprüft (Abbildung 4.34 A-C). Wie bereits zuvor beschrieben konnte für rCtad1 eine deutliche Bindung bei allen drei genommenen Zeitwerten detektiert werden, während die Negativkontrolle rGST keine Bindung vermittelte. Zu allen untersuchten Zeitpunkten konnte eine sehr effiziente Bindung von rCtad1N an HEp-2 Zellen ermittelt werden, wobei die Menge an adhärntem Protein über die Zeit zunahm. Die Bindung von Ctad1N fiel im Vergleich zum Volllängenprotein um ca. 40 % effizienter aus. Im Gegensatz dazu konnte für rekombinantes Ctad1C Protein keine Bindung nachgewiesen werden, wobei jedoch auch die Inputkontrolle etwas schwächer ausfiel. Aufgrund der massiven Bindung von Ctad1N wurden die weiteren Analysen auf den N-Terminus beschränkt, der die zwei SH3-Domänen trägt.

Die im Folgenden generierten Konstrukte orientierten sich an den beiden SH3-Domänen. Das Protein wurde schrittweise N-terminal verkürzt: Ctad1D1 (Δ 1-43 AS), Ctad1D2 (Δ 1-95 AS) und Ctad1D3 (Δ 1-156 AS), bzw. gezielt die SH3-Domänen einzeln oder zusammen

im Volllängenprotein deletiert: Ctad1 Δ SH3 (Δ 44-156 AS), Ctad1 Δ 1SH3 (Δ 44-95 AS) und Ctad1 Δ 2SH3 (Δ 103-156 AS) (Abbildung 4.34 B).

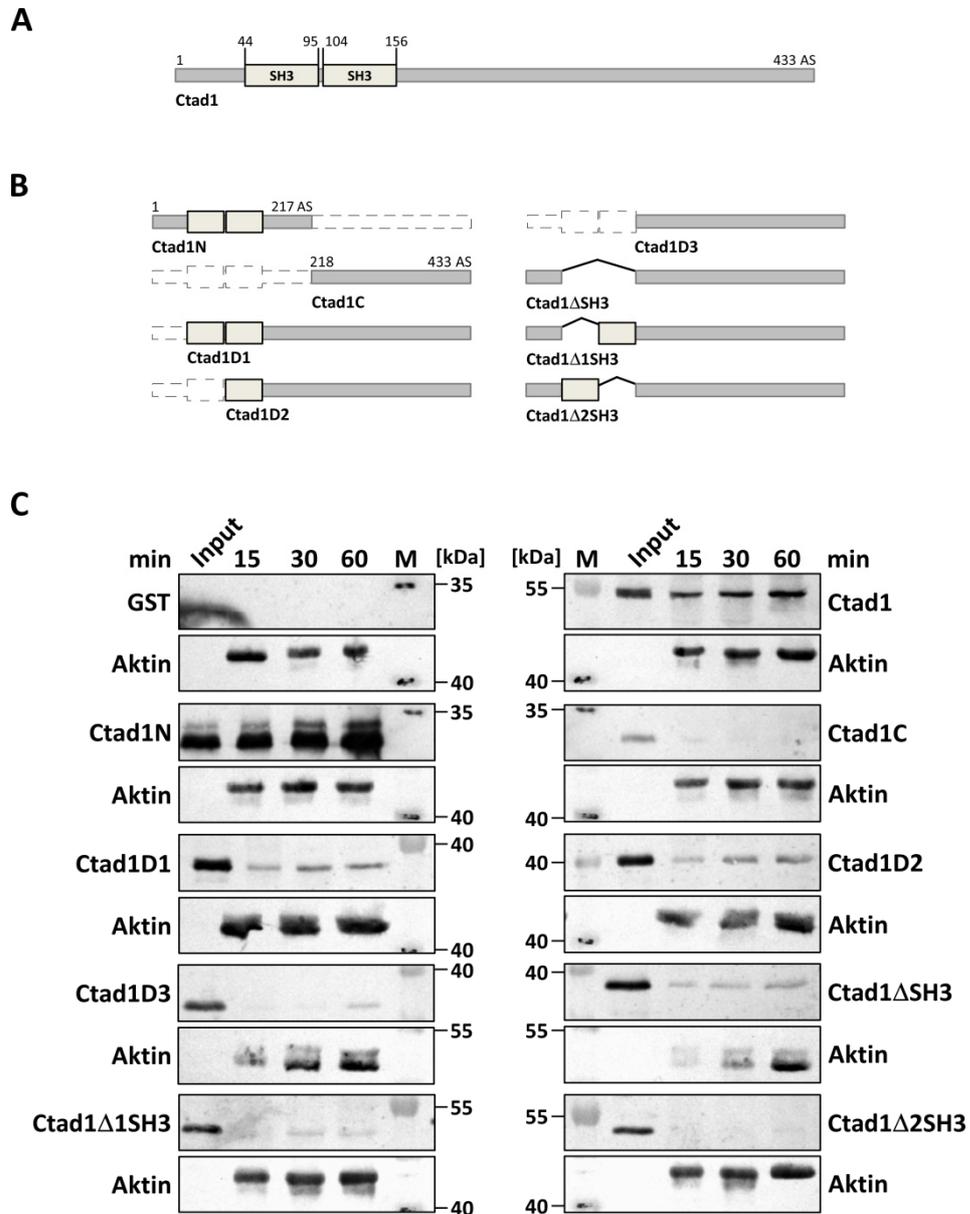


Abbildung 4.34: Analyse einer Bindedomäne von Ctad1.

A) Schematische Darstellung des Ctad1 Volllängenproteins. AS: Aminosäure.

B) Schematische Darstellung der generierten Deletionsvarianten von Ctad1. graue Boxen: SH3-Domänen. Deletierter Bereich gestrichelt dargestellt.

C) Westernblots des löslichen Proteinbindeexperimentes. 2,04 μ M rekombinantes Protein wurden zu konfluenten HEp-2 Zellen gegeben, auf 37 °C inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten zu Gesamtzellproteinproben verarbeitet s. Kapitel 3.7.1.2. Als Input wurden 1/100 der Ausgangslösung geladen. Quantifizierung der Bindung nach 60 min mit der Software ImageJ s. Abbildung A.1.6. Die Detektion erfolgte mit α -His (1:2500) und α -Maus Antikörper (1:7500). Aktin: Ladekontrolle. Theor. MW: Ctad1: 49 kDa, Ctad1N: 25 kDa, Ctad1C: 26 kDa, Ctad1D1: 45 kDa, Ctad1D2: 39 kDa, Ctad1D3: 33 kDa, Ctad1 Δ SH3: 37 kDa, Ctad1 Δ 1SH3: 43 kDa, Ctad1 Δ 2SH3: 43 kDa, GST: 28 kDa.

rCtad1D1 und rCtad1D2 adhärten ungefähr gleich stark an Humanzellen (Abbildung 4.34 C). Die Bindung nahm über die Zeit leicht zu, war allgemein jedoch viel geringer als beim

Volllängenprotein. Eine sehr schwache Adhäsion von rCtad1D3 konnte bei den ersten beiden Zeitpunkten ermittelt werden, mit nur leichter Zunahme nach 60 min, wobei beim ersten Zeitwert eine etwas geringere Beladung detektiert wurde (s. Aktinkontrolle). Die Bindung von rCtad1 Δ SH3 und Δ 1SH3 war im Vergleich zu Ctad1D1 und D2 nochmals um etwa die Hälfte reduziert, wobei Ctad1 Δ 1SH3 erstmals nach 30 min detektierbar war (Abbildung 4.34 C). Die Menge an gebundenem Protein nahm über den zeitlichen Verlauf kaum zu, allerdings war bei rCtad1 Δ SH3 für die ersten beiden Werte ebenfalls eine leicht geringere Beladung detektierbar. Eine besonders schwache Proteinbande wurde für rCtad1 Δ 2SH3 ausschließlich beim 60 min Wert detektiert. Die vergleichende Endzeitpunktbestimmung der detektierten Proteinmengen ist im Anhang einsehbar (Abbildung A.1.6).

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die bakteriellen SH3-Domänen im N-Terminus die Adhäsion an Humanzellen vermitteln, welchen Einfluss die ersten 43 Aminosäuren dabei spielen bleibt unklar.

Diese Ergebnisse konnten in einer Bachelorarbeit, die im Rahmen dieser Arbeit verfasst wurde, sowohl in Adhäsionsexperimenten mit löslichem Ctad1 Protein als auch mit proteinbeschichteten Latexkügelchen bestätigt werden (Baumann 2013).

4.7.7.2 Der N-Terminus vermittelt die Bindung zu Integrin- β 1

Die SH3-Domänen im N-Terminus von Ctad1 vermittelten die Bindung des Proteins an Humanzellen (Abbildung 4.34); folglich müssten sie auch mit Integrin- β 1 interagieren. Daher wurde die Interaktion von Ctad1N und Ctad1C mit Integrin- β 1 im Hefe-zwei-Hybrid-System untersucht (Abbildung 4.35 A).

Auf dem Wachstumsmedium SD Trp⁻Leu⁻ wuchsen alle proteinexprimierenden Hefen gleich gut. Ferner konnte auf dem Selektionsmedium nach Zugabe von 3AT keine Autoaktivierung detektiert werden. Für Ctad1 bzw. Ctad1N und Integrin- β 1 koexprimierenden Hefen konnte ein gleichwertiges Wachstum auf hochstringentem Medium beobachtet werden, während für Ctad1C und Integrin- β 1 kein Hefewachstum zu sehen war. Da sowohl Ctad1N als auch Ctad1C in den Hefen erfolgreich exprimiert wurden (Abbildung 4.35 C), vermittelt der N-Terminus von Ctad1 die Interaktion zu Integrin- β 1.

Um die Funktion der SH3-Domänen im Adhäsionsprozess *in vivo* zu bestätigen, wurden Neutralisationsexperimente durchgeführt. Hierzu wurden HEp-2 Zellen mit rekombinanten Ctad1 Δ SH3 Protein vorbehandelt und anschließend infiziert. Die Anzahl der gebildeten Einschlüsse bei PBS-vorbehandelten Zellen wurde auf 100 % Infektion normiert (Abbildung 4.35 C). Rekombinantes GST Protein führte zu keiner signifikanten Reduktion der Infektion (Restinfektion 97 %). Ctad1 reduzierte die Infektion signifikant um 17 % auf 83 %

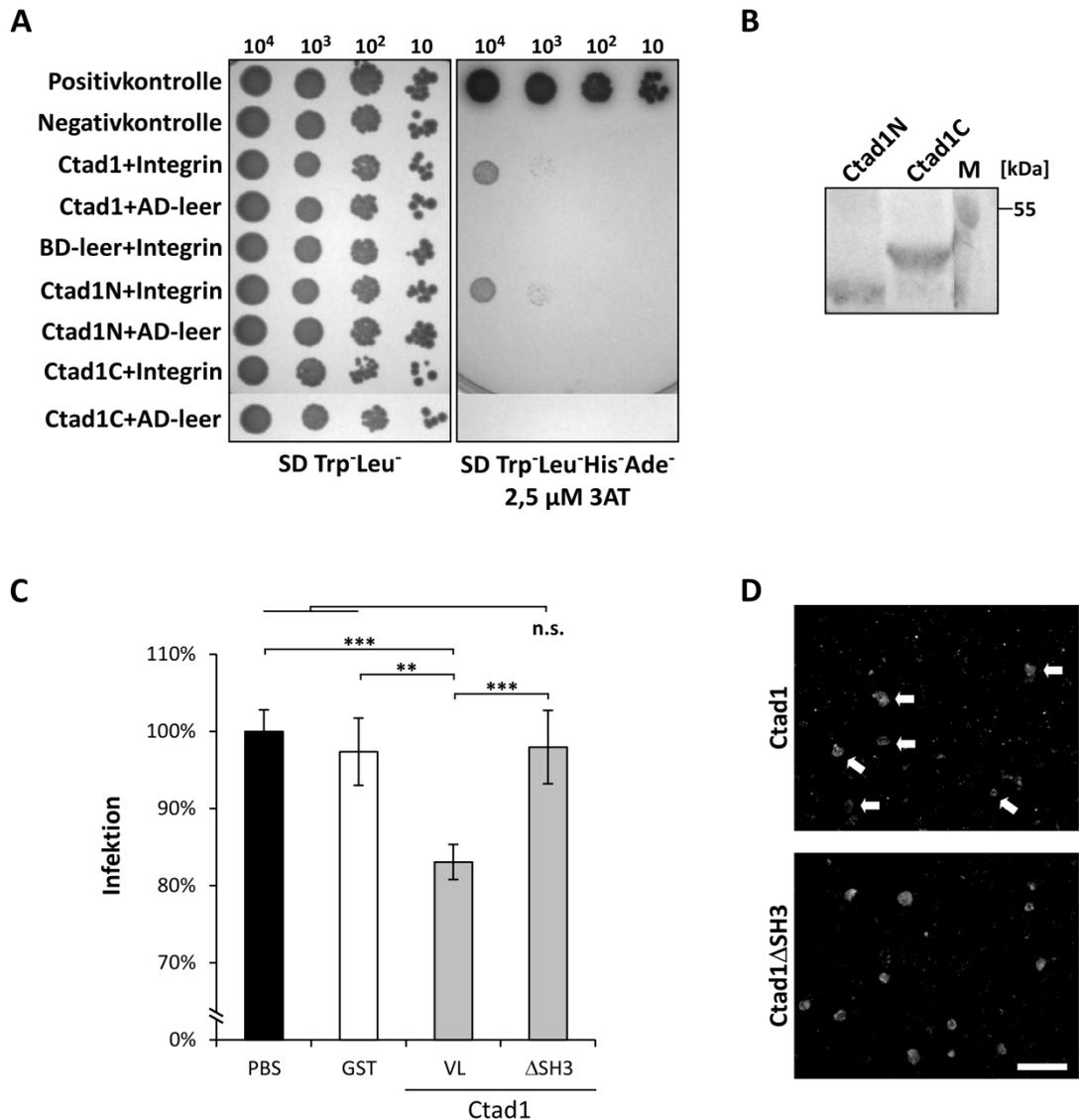


Abbildung 4.35: Der N-Terminus von Ctad1 vermittelt die Adhäsion und Neutralisation.

A) Serieller Verdünnungstropftest zur Analyse der Interaktion zwischen BD-Ctad1 Varianten und AD-Integrin-β1 Fusionsproteinen auf Hefewachstumsmedium (SD Trp⁻Leu⁻) und Selektionsmedium (SD Trp⁻Leu⁻His⁻Ade⁻ + 3AT). Positivkontrolle: p53 + SV40 T-Antigen, Negativkontrolle: Lamin C + SV40 T-Antigen.

B) Expressionskontrolle mittels Westernblot. Proben Generierung s. Kapitel 3.3.2. Die Detektion erfolgte mit α-cMyc Antikörper (1:400) und α-Maus Antikörper (1:7500). M: Proteinstandard, BD-Ctad1N: 44 kDa, BD-Ctad1C: 45 kDa.

C) Darstellung der Neutralisationsauswertung. 1 x 10⁶ HEp-2 Zellen wurden mit 2,04 μM Protein vorbehandelt und wie in Abbildung 4.3 B infiziert und gefärbt. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch von 10 Gesichtsfeldern bei 43-facher Objektivvergrößerung in Duplikaten (n=3). *** p < 0,001; ** p < 0,01; n.s.: nicht signifikant.

D) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der mit FITC-α-LPS Antikörper angefärbten Einschlüsse. Pfeil markiert Inklusionen zur besseren Abgrenzung zum unspezifischen Hintergrund. Größenstandard: 50 μm.

Restinfektion. Im Gegensatz dazu führte die Vorbehandlung mit rCtad1ΔSH3 zu keiner Reduktion der Infektion (Restinfektion 98 %, Abbildung 4.35 C+D).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Ctad1 zu Integrin-β1 durch den N-Terminus, der die SH3-Domänen trägt, vermittelt wird. Durch die Deletion der SH3-Domänen verliert das Ctad1 Protein die Fähigkeit die chlamydiale Infektion zu neutrali-

sieren. Daher kann gefolgert werden das Ctad1 mithilfe der SH3-Domänen an die β 1-Untereinheit des Integrin-Rezeptors bindet.

4.7.7.3 Test auf Selbstinteraktion von Ctad1

Die Avidität eines Liganden kann durch Integrin Clusterung gesteigert werden (van der Flier und Sonnenberg 2001). Die Fähigkeit zur Selbstassoziation eines Liganen oder Adhäsins kann das Clustern von Integrinen begünstigen und die Internalisierung steigern (Dersch und Isberg 1999). Daher wurde die Selbstinteraktion von Ctad1 im Hefe-zwei-Hybrid-System untersucht (Abbildung 4.36 A). Im seriellen Verdünnungstropftest wuchsen alle proteinexprimierenden Hefen gleichwertig auf dem Wachstumsmedium. Keines der Ctad1-Fusionsproteine vermittelte Autoaktivität auf dem niedrigstringenten Selektionsmedium, während BD-Ctad1 und AD-Ctad1 koexprimierende Hefen Wachstum zeigten, was auf eine Selbstinteraktion von Ctad1 hindeutete.

Die Expression beider Ctad1-Fusionsproteine konnte mittels Westernblot bestätigt werden (Abbildung 4.36 B).

Um die Position der Selbstinteraktionsdomäne zu definieren, wurden Far-Westernblot Analysen mit den generierten Ctad1 Varianten durchgeführt (Abbildung 4.36 C-F). Ctad1 Volllängenprotein wurde mit Biotin markiert und der Erfolg der Biotinylierung mittels Westernblot bestätigt (Abbildung 4.1 C).

Die Kontrollanalyse der immobilisierten Proteine zeigte Unterschiede in den geladenen Proteinmengen (Abbildung 4.36 D). Im Vergleich zum Volllängenprotein konnte etwa die doppelte Menge an Ctad1N, aber nur etwa ein Drittel an Ctad1C detektiert werden. Alle weiteren Ctad1 Varianten waren etwa gleichwertig detektierbar, mit geringfügig stärkeren Banden für die Proteine Ctad1D1 und D2. Ferner wurden bei allen Ctad1 Varianten Abbruchbanden detektiert. Die Proteine zeigten apparente Molekulargewichte, welche leicht über ihren theoretischen Molekulargewichten lagen (Abbildung 4.36 F). Zur Kontrolle der Interaktionsspezifität wurde rGST, sowie die beiden rekombinant exprimierten chlamydialen Proteine OmcB (Adhäsins) und EFTu (Elongationsfaktor) mitgeführt. In der Far-Westernblot Analyse konnte keine Interaktion von Ctad1_{Biotin} mit den drei Kontrollproteinen ermittelt werden (Abbildung 4.36 E). Wie bereits im Hefe-zwei-Hybrid interagiert das Volllängenprotein mit sich selbst. Außerdem konnte eine Interaktion von Ctad1_{Biotin} zu allen Varianten mit Ausnahme von Ctad1C und Ctad1D3 ermittelt werden.

Im Rahmen einer Bachelorarbeit sollte eine detailliertere Definition der Selbstassoziationsdomäne von Ctad1 erfolgen. Die zuvor präsentierten Ergebnisse der Far-Westernanalyse konnten dort bestätigt werden. Ein *vice versa* Ansatz mit biotinyliertem Ctad1D3 vermittelte jedoch

Interaktion zu immobilisiertem Ctad1. Mit verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Methoden gelang es nicht die Interaktionsdomäne genau zu definieren (Caliskan 2014).

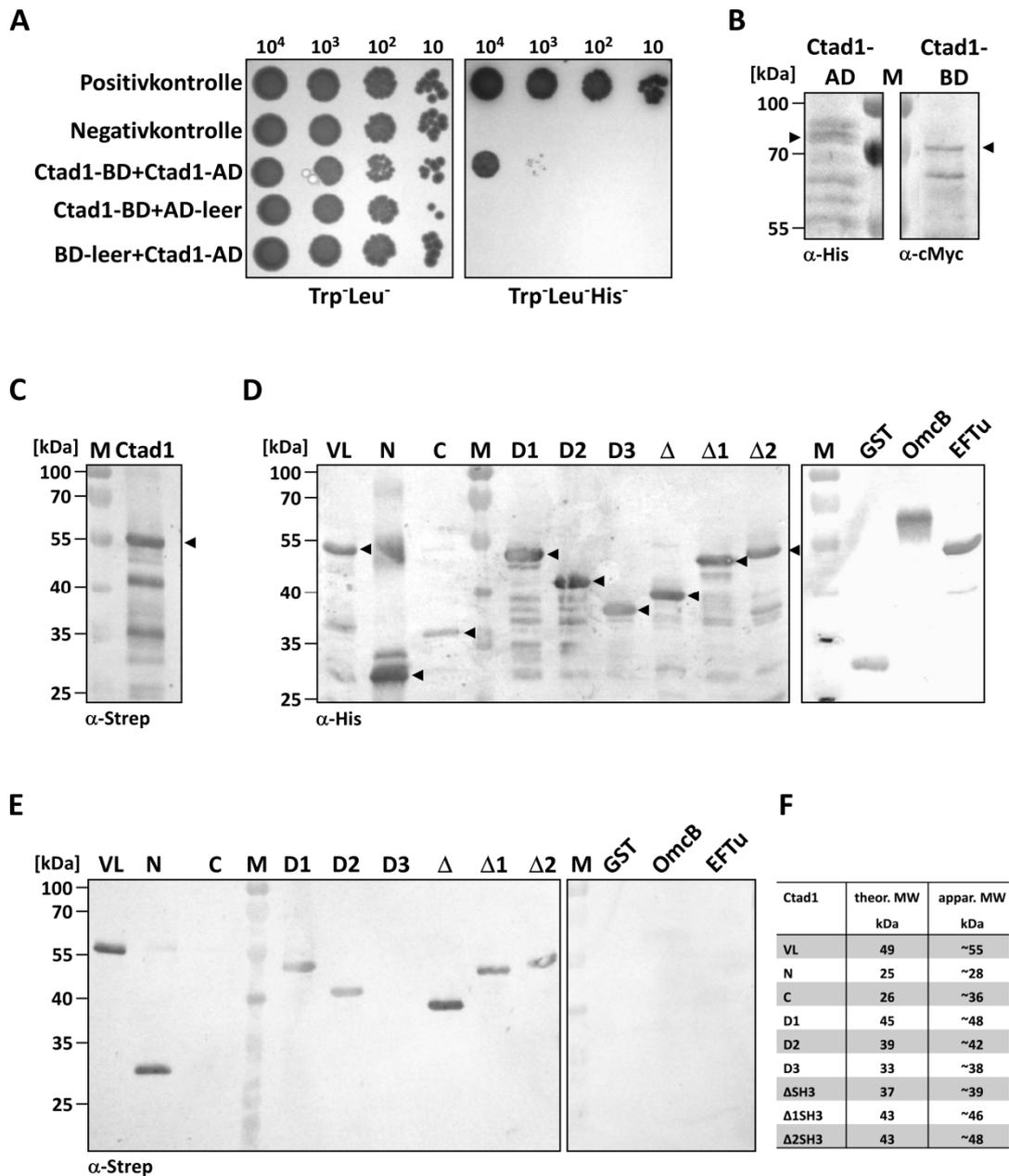


Abbildung 4.36: Analyse der Selbstinteraktion von Ctad1.

A) Serieller Verdünnungstropftest zur Analyse der Ctad1 Selbstinteraktion im Hefe-zwei-Hybrid-System. Das Wachstum der Hefen erfolgte auf SD Trp⁺Leu⁻ (Wachstumsmedium) und SD Trp⁺Leu⁺His⁻ (Selektionsmedium). Positivkontrolle: p53 + SV40 T-Antigen, Negativkontrolle: Lamin C + SV40 T-Antigen.

B) Kontrolle der Proteinexpression im Westernblot. Die Detektion erfolgte mit α -cMyc (1:400) bzw. α -His Antikörper (1:2500) und sekundärem AP- α -Maus Antikörper (1:7500). Ctad1-AD: 67 kDa, Ctad1-BD: 68 kDa.

C-F) Far-Westernblot Analyse der Ctad1 Selbstinteraktion. **C)** 200 μ g rCtad1 Protein wurden mit NHS-Biotin biotinyliert und mittels Westernblot überprüft. Die Detektion erfolgte mit AP- α -Streptavidin Antikörper (1:1000). **D)** Ladekontrolle der aufgetragenen Proteine (je 2 μ g), die Detektion erfolgte mit α -His (1:2500) und AP- α -Maus Antikörper (1:7500). **E)** Far-Westernanalyse der Selbstinteraktion. Die Durchführung erfolgte wie in Abbildung 4.28 C. Jeweils 2 μ g Protein wurden immobilisiert und mit 8 μ g/ml biotinyliertem Ctad1 inkubiert. Die Detektion der Interaktion erfolgte mit AP- α -Streptavidin Antikörper (1:1000). **F)** Gegenüberstellung der theor. und apparenten Molekulargewichte im SDS-Gel.

Pfeilspitzen: Volllängenprotein, M: Proteinstandard. GST: 28 kDa, OmcB:60 kDa, EFTu: 46 kDa.

4.7.8 rCtd1 neutralisiert die Infektion andere chlamydialer Serovare

Homologe zu Ctd1 existieren in allen Vertretern der Ordnung *Chlamydiales*, wobei allerdings deutliche Unterschiede in den Identitäten der Proteine auftreten. Die Identität von Ctd1 zu den Homologen der Umweltchlamydien fällt mit ca. 30 % gering aus. Bei den Mitgliedern der Familie *Chlamydiaceae* liegt die Identität speziesspezifisch zwischen 51 % und 100 % (Abbildung A.1.7).

Die Ctd1 Identitäten bei den humanpathogenen Chlamydien unterscheiden sich: bei allen *C. trachomatis* Serovaren beträgt sie min. 90 %, während die Identität zum *C. pneumoniae* Homolog CPn0104 bei nur 53 % liegt (Abbildung 4.37 A). Infolgedessen wurde getestet ob rekombinantes *C. trachomatis* E Ctd1 die Infektion von *C. pneumoniae* bzw. *C. trachomatis* Serovar L2 beeinflusst. Dazu wurden HEp-2 Zellen mit rCtd1 Protein vorbehandelt und mit *C. pneumoniae* bzw. *C. trachomatis* L2 infiziert (Abbildung 4.37 B-E).

Die gebildeten Einschlüsse bei PBS Vorbehandlung der Zellen wurde auf 100 % Infektion normiert. Bei der *C. pneumoniae* Infektion verringerte die Behandlung der Zellen mit rGST die Infektion bereits leicht um 12 % auf 88 % Restinfektion (Abbildung 4.37 B und C). Als Positivkontrolle wurde das M-Fragment des Adhäsins Pmp21 mitgeführt, welches die Infektion signifikant auf 58 % reduzierte, in Übereinstimmung mit publizierten Daten (Mölleken, Schmidt *et al.* 2010). Interessanterweise konnte für rCtd1 vorbehandelte Zellen eine signifikante Reduktion der *C. pneumoniae* Infektion auf 72 % ermittelt werden.

Die GST Vorbehandlung der *C. trachomatis* L2 infizierten Zellen hatte keinen Einfluss auf die Infektion. Es wurden durchschnittlich gleich viele Einschlüsse gegenüber PBS-behandelten HEp-2 Zellen gebildet (Abbildung 4.37 D und E). Auch hier führte die Vorbehandlung mit rekombinanten Ctd1 Protein zu einer signifikanten Reduktion der Infektion auf 81 %.

Ctd1 reduzierte sowohl die *C. trachomatis* L2 als auch speziessübergreifend die *C. pneumoniae* Infektion. Daher könnte eine konservierte Funktion von Ctd1 im chlamydialen Adhäsionsprozess postuliert werden.

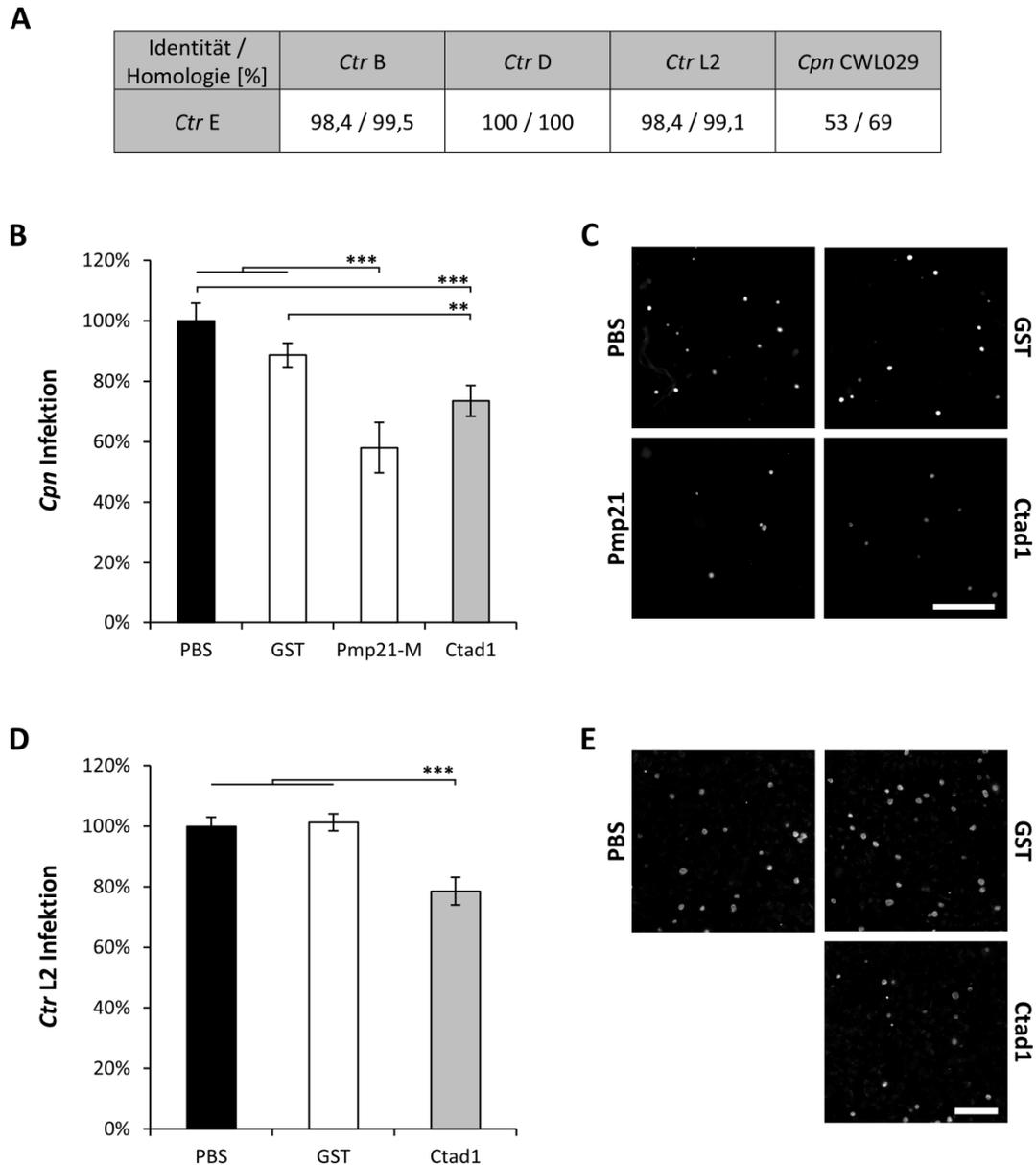


Abbildung 4.37: rCtad1 neutralisiert die *C. trachomatis* L2 und *C. pneumoniae* Infektion.

A) Vergleich der Ctad1 Sequenzidentitäten und Homologien der chlamydialen Spezies *C. trachomatis* Serovar B, D, E, L2 und des *C. pneumoniae* Homologes CPn0104 des Stamms CWL029 mit dem Programm *Emboss needle*.

B) Auswertung der Neutralisationsexperimente mit *C. pneumoniae*. 1×10^6 HEp-2 Zellen wurden mit 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protein für 2 h bei 37 °C vorbehandelt und anschließend stationär für 2 h bei 37 °C mit *C. pneumoniae* infiziert (MOI: 20). Die Infektion wurde nach 48 h mit Methanol fixiert, die Einschlüsse mit FITC- α -LPS Antikörper (1:6) und DAPI (1:1000) gefärbt. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch durch Auszählen der gebildeten Einschlüsse von 20 Gesichtsfeldern bei 43-facher Objektivvergrößerung in Triplikaten (n=2).

D) Darstellung der Neutralisationsauswertung von *C. trachomatis* L2. HEp-2 Zellen wurden mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protein vorbehandelt, stationär mit *C. trachomatis* L infiziert (MOI: 20) und die Infektion nach 24 h mit Methanol fixiert. Durchführung, Färbung und Auswertung erfolgte wie in B beschrieben. (n=2)

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

C) und **E)** Repräsentative Aufnahmen der Neutralisationsexperimente. Größenstandard: 100 μm .

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit eine umfangreiche Charakterisierung des hypothetischen Proteins Ctad1 geleistet werden. Ctad1 erfüllte alle Erfordernisse eines neuen Adhäsins: (i) Ctad1 lokalisierte auf der Oberfläche chlamydialer EBs, (ii) vermittelte die Bindung an Humanzellen und (iii) sowohl rekombinantes Protein als auch der spezifische Antikörper wirkten reduzierend auf die chlamydiale Infektion bzw. Adhäsion.

Zudem konnte der humane Interaktionspartner, die β 1-Untereinheit des Integrin-Rezeptors, im Hefe-zwei-Hybrid-System identifiziert und verifiziert werden. Sowohl in epithelialen Zelllinien als auch in primären Eileiterepithelzellen konnte eine Akkumulation von Integrin- β 1 an adhärierenden EBs detektiert werden. Darüber hinaus konnte erstmals ein Einfluss von Integrin- β 1 auf die chlamydiale Infektion bestätigt werden.

Die Interaktion von Ctad1 mit Humanzellen erfolgte über die SH3-Domänen im N-Terminus des Proteins. Übereinstimmend mit diesem Ergebnis, erfolgte die Interaktion von Ctad1 zu Integrin- β 1 über den N-Terminus. Die Deletion der SH3-Domänen im Volllängenprotein hob die reduzierende Wirkung von Ctad1 auf die chlamydiale Infektion auf.

Ferner konnte für Ctad1 nicht nur die Adhäsion an, sondern auch die Internalisierung in Humanzellen beschrieben werden. Folglich konnte Ctad1 in dieser Arbeit erfolgreich als neues *C. trachomatis* Serovar E Adhäsion und Invasin beschrieben werden, dessen Bindung eine wahrscheinlich Integrin-vermittelte Signaltransduktion in die Wirtszelle einleitet.

Zusätzlich besteht die begründete Annahme, dass Ctad1 ein neues spezieübergreifendes funktionell konserviertes Adhäsion sein könnte, da es auch neutralisierend auf die Infektion von *C. trachomatis* L2 und *C. pneumoniae* wirkt.

5 Diskussion

Die Kontaktaufnahme des Pathogens zur Wirtszelle ist der erste Schritt zur Etablierung einer erfolgreichen Infektion. Ein Verständnis dieser Schritte ist dabei unerlässlich, um diagnostische und therapeutische Behandlungen effizienter zu gestalten. Bei *C. trachomatis* erfolgt die initiale Adhäsion in zwei Schritten. Das Oberflächenprotein OmcB bindet zuerst an GAG-Moleküle der Wirtszelle (Stephens, Koshiyama *et al.* 2001). Die Adhäsion aller *C. trachomatis* Serovare erfolgt dabei Heparin-abhängig mit Ausnahme der Serovare E und F (Moelleken und Hegemann 2008). Die GAG-Bindung ist wahrscheinlich solange reversibel bis der zweite Schritt der Adhäsion erfolgt, bei dem das EB auf einen spezifischen Rezeptor trifft und diesen irreversibel bindet (Carabeo und Hackstadt 2001). Während für *C. pneumoniae* jüngst ein erstes Interaktionspaar, bestehend aus Pmp21 und EGF-Rezeptor, identifiziert werden konnte (Mölleken, Becker *et al.* 2013), ist solch ein Paar bei *C. trachomatis* noch unbekannt. Es gibt Hinweise auf involvierte Proteine auf beiden Seiten der *C. trachomatis* E Infektion. So konnte jüngst gezeigt werden, dass alle Mitglieder der Pmp-Familie adhäsive Eigenschaften besitzen (Becker und Hegemann 2014). Auf humaner Seite konnte neben den GAGs die Beteiligung verschiedener Oberflächenmolekülen wie dem FGF-Rezeptor, Östrogenrezeptor und der PDI in den vergangenen Jahren nachgewiesen werden (Davis, Raulston *et al.* 2002, Hall, Schell *et al.* 2011, Kim, Jiang *et al.* 2011). Ihre chlamydialen Interaktionspartner konnten bis jetzt jedoch nicht identifiziert werden. Auch ist unklar ob ihr Einfluss zur Infektion direkt oder indirekt ist. Da eine gleichzeitige Blockade der OmcB- und Pmp-vermittelten Adhäsion immer noch zu einer signifikanten *C. pneumoniae* Infektion führte (Becker und Hegemann 2014), besteht die begründete Annahme, dass noch weitere essentielle Adhäsine existieren. Durch extrapolieren dieser Annahme auf die *C. trachomatis* Infektion, sollten im Rahmen dieser Arbeit neue *C. trachomatis* Adhäsine identifiziert, charakterisiert und wenn möglich ihr humaner Interaktionspartner beschrieben werden. Fünf Kandidaten erfüllten die anfänglich aufgestellten Kriterien eines Adhäsins, allerdings konnte letztendlich allein Ctad1 in dieser Arbeit erfolgreich als Adhäsins identifiziert werden.

5.1 Ctad1 – ein neues chlamydiales Adhäsion

Ctad1 überzeugte mit adhäsiven und infektionsneutralisierenden Eigenschaften. Zusammen mit der ermittelten EB-oberflächenzugänglichen Lokalisation, konnte für Ctad1 eine essentielle Funktion als Adhäsion in der Infektion postuliert werden. Die Adhäsion von Ctad1 an Humanzellen erfolgt durch die Bindung an Integrin- β 1, welche eine Signaltransduktion in die Wirtszelle einleitet. Erstmals konnte eine essentielle Funktion von Integrin- β 1 bei der Etablierung der *C. trachomatis* E Infektion bewiesen werden.

5.1.1 Ctad1 erfüllt alle Charakteristika eines Adhäsions

5.1.1.1 Ctad1 vermittelt Bindung an Humanzellen

rCtad1-beschichtete Kügelchen vermitteln Bindung an HEp-2 Zellen, wobei eine konzentrationsabhängige Bindung mit einsetzender Sättigung zu beobachten war (Abbildung 4.2 Abbildung 4.24 A-C). Dieses Ergebnis ließ sich mit löslichem Protein bestätigen. Im Proteinbindeexperiment trat über den zeitlichen Verlauf ebenfalls eine zunehmende Bindung mit einsetzender Sättigung bei 4 °C und 37 °C auf (Abbildung 4.4). Die Bindung bei 4 °C fiel insgesamt geringer aus, wahrscheinlich aufgrund des verzögerten Reaktionsablaufs bei niedrigen Temperaturen. Die einsetzende Sättigung deutet auf eine limitierte Verfügbarkeit des Interaktionspartners hin, wie es bereits zuvor für die Bindung des Invasin Proteins von *Y. pseudotuberculosis* beobachtet werden konnte (Fechtner 2012). Weitere Studien mit löslichem Ctad1 belegen, eine Bindung des Proteins an verschiedene humane Epithelzellen, wie Hec-1B (Gebärmutter-schleimhaut) und HeLa (Gebärmutterhals), die dem natürlichen Gewebe einer *C. trachomatis* Infektion nahe kommen (Abbildung 4.24 D).

Zur Identifizierung einer Ctad1-Bindedomäne wurde das Protein anfänglich in zwei gleichgroße Fragmente geteilt und im löslichen Proteinbindeexperiment untersucht. Der N-Terminus vermittelte dabei eindeutig die Adhäsion, wobei eine deutlich gesteigerte Affinität im Vergleich zum Volllängenprotein auffiel (Abbildung 4.34 A-C). Die detaillierte Charakterisierung zeigte, dass die Ctad1-Bindung hauptsächlich durch die zwei SH3-Domänen im N-Terminus erfolgt, wobei die C-terminale SH3-Domäne geringfügig stärker zur Adhäsion beiträgt (Abbildung 4.34 B-C). Da Ctad1D3 allerdings die geringste Bindung an Humanzellen vermittelte, bleibt der Beitrag der ersten 43 Aminosäuren zum Adhäsionsprozess noch zu klären. Die starke Adhäsion des N-Terminus kann vielleicht durch das Fehlen regulatorischer Element des C-Terminus und/oder durch eine bessere Zugänglichkeit der Bindedomäne erklärt werden. So wurde beispielsweise im eukaryotischen ADA-Protein (*adhesion and degranulation promoting adapter protein*) eine hSH3-Domäne beschrieben. Eine Abwandlung der SH3-

Domäne, die N-terminal mit einer α -Helix assoziiert ist, die regulatorisch auf ihre Funktion wirkt (Heuer, Sylvester *et al.* 2006).

5.1.1.2 Rekombinantes Ctad1 Protein und der spezifische Antikörper reduzieren die Infektion

Neben der Adhäsivität, die für Ctad1 bereits erfolgreich belegt werden konnte (s. Kapitel 5.1.1.1), vermitteln Adhäsine bei Inkubation mit Humanzellen eine Reduktion der Infektion. Hierbei besetzt das rekombinante Protein den spezifischen Rezeptor, wodurch dieser für das natürliche Adhäsin des Bakteriums nicht mehr zugänglich ist.

Die anfänglich mit rekombinantem Ctad1 Protein (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) vorgenommene Neutralisation der Infektion verlief erfolgreich (Abbildung 4.3). Ctad1 reduzierte die Infektion signifikant um 28 % auf 72 % Restinfektion. Detaillierte Studien zur neutralisierenden Eigenschaft von Ctad1 bestätigten die anfänglichen Resultate und zeigten eine konzentrationsabhängige Reduktion der Infektion. Die Reduktion der beiden höchsten dabei verwendeten Konzentrationen (100 und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) lag durchschnittlich bei 16,5 % und glich, im Rahmen der Standardabweichung, den zuvor erhobenen Werte bei 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Abbildung 4.3 vgl. 4.25 B). Daher lässt sich auch hier eine Sättigung der Infektionsreduktion erkennen, welche vielleicht mit der Sättigung der Bindung korreliert. Die Neutralisation der Infektion mit dem generierten anti-Ctad1 Antikörper betrug durchschnittlich 18 %, wobei die verwendete Verdünnung kaum einen Einfluss auf das Ergebnis hatte (Abbildung 4.25 C). Beide Experimente deuten auf eine spezifische Bindung an ein mengenbegrenzt präsentiertes Oberflächenmolekül hin. Die beobachtete Reduktion der Infektion ging bei Verwendung der Ctad1 Δ SH3 Variante verloren, wodurch die Spezifität der Reduktion und die SH3-Abhängigkeit der Bindung belegt werden konnte (Abbildung 4.35 C+D).

Die Präinkubation von Humanzellen mit rCtad1 reduzierte die Adhäsion CFSE-markierter EBs um 28 % bei der höchsten verwendeten IFU (Abbildung 4.5 A). Folglich beruht die beobachtete Reduktion der Infektion auf einer verringerten Adhäsion der EBs und nicht auf einer reduzierten Internalisierung. Somit besitzt Ctad1 eine essentielle Funktion in der frühen Infektion und weist ähnliche Eigenschaften wie die bereits bekannten Adhäsine OmcB und Pmp21 auf (Moelleken und Hegemann 2008, Mölleken, Schmidt *et al.* 2010).

5.1.2 Ctad1 ist ein oberflächenexprimiertes Adhäsin

Endogenes und rekombinant erzeugtes Ctad1 Protein laufen im Proteingel unterhalb der 55 kDa Markerbande und somit leicht über ihrem theoretischen Molekulargewicht von

49 kDa (Abbildung 4.1, 4.7). Die Expression von Ctad1 konnte erstmals ab 18 hpi in der Infektionszeitkinetik im Westernblot nachgewiesen werden (Abbildung 4.7). Die Expression nahm im zeitlichen Verlauf bis 30 hpi zu und blieb anschließend bis zum Ende des Zyklus konstant. Der Anstieg kommt durch die gesteigerte Proteinexpression und die starke Vermehrung der RBs zustande. Somit konnte die anhand von Transkriptomdaten postulierte späte Expression von Ctad1 auf Proteinebene bestätigt werden (Belland, Zhong *et al.* 2003, Nicholson, Olinger *et al.* 2003).

Bei vergleichenden Sequenzierungen von *C. trachomatis* L2 EBs und RBs konnte *ctad1* mRNA, neben den mRNAs von 45 weiteren Genen, als angereichert im RB identifiziert werden. Diese Gene kodieren für Proteine mit unbekannter Funktion oder mit Funktion in der bakteriellen Zellteilung und für Bestandteil der äußeren Membran, beispielsweise Momp und verschiedene Vertreter der Pmp-Familie (Albrecht, Sharma *et al.* 2010). Ein weiterer Hinweis, dass es sich bei Ctad1 um ein cOMC-assoziiertes Protein handeln könnte.

Die späte Expression und die mRNA Anreicherung im RB unterstützen die Arbeitshypothese, die besagte, dass früh in der Infektion benötigte Proteine spät im vorherigen Zyklus exprimiert werden, um in den metabolisch-inaktiven EB eingelagert zu werden. Früh in der Infektion (0 hpi) konnte Ctad1 nicht eindeutig nachgewiesen werden, da zu diesem Zeitpunkt eine unspezifische Hintergrundbande, auf etwa gleicher Laufrhöhe, eine potentiell vorhandene schwache Proteinbande von Ctad1 verdecken könnte.

Mikroskopisch konnte Ctad1 ausschließlich bakterienassoziiert detektiert werden, sowohl 24 hpi in der replikativen Phase auf RBs (24 hpi), als auch spät im Zyklus, zu einem Zeitpunkt zu dem sich überwiegend infektiöse EBs im Einschluss befinden (48 hpi, Abbildung 4.21). Ctad1 zeigte dabei ein punktiertes, ringförmiges Signal, das mit den homogenen Ringen des Momp Signals kolokalisierte (Abbildung 4.23 A). Die Lokalisation wurde hierbei sowohl nach Methanol als auch nach PFA-Fixierung analysiert. Wie zuvor beschrieben fixiert Methanol die Zellen und permeabilisiert diese vollständig, während nach PFA-Fixierung und anschließender Permeabilisierung mit 0,2 % Triton ausschließlich oberflächenexponierte chlamydiale Proteine zugänglich sind (Knudsen, Madsen *et al.* 1999, Mülleken, Schmidt *et al.* 2010). Ferner konnte Ctad1 in der frühen Infektion, sowohl 15 min pi als auch 1 hpi nach PFA-Fixierung und Permeabilisierung mit 0,2 % Triton punktiert, ringartig in Kolokalisation mit Momp detektiert werden, was stark für eine Oberflächenlokalisierung spricht (Abbildung 4.23 B).

Die potentielle Oberflächenpräsenz von Ctad1 wird durch die Daten des Proteinlöslichkeits-experiments unterstützt. Hier konnte Ctad1 bereits nach PBS- oder Triton-Behandlung der EBs zu einem geringen Teil im Überstand detektiert werden (Abbildung 4.23 C). Ein Verhalten, das bereits zuvor, wenn auch viel effektiver, für das oberflächenexprimierte Chaperon

GroEL1 beschrieben wurde (Wuppermann, Molleken *et al.* 2008). Nach Sarkosyl-Behandlung der EBs wurde 60 % des Ctad1 Proteins im Überstand detektiert, welches auf eine nicht kovalente Verknüpfung zum cOMC hindeutet, der sarkoylunlöslich ist und daher pelletiert wird (Caldwell, Kromhout *et al.* 1981).

In Untersuchungen mit Patientenseren wurde Ctad1 von drei der vier getesteten Seren als immundominantes Antigen erkannt und bestätigte die für sein Homolog in *C. muridarum* gezeigte antigene Eigenschaft auch bei *C. trachomatis* (Abbildung 4.6, Tabelle 4.1) (Cruz-Fisher, Cheng *et al.* 2011). Ferner passt dieses Ergebnis zur Oberflächenlokalisierung von Ctad1, da Proteine des chlamydialen OMCs beliebte Ziele der humanen Immunantwort darstellen. OmcB beispielsweise ist eines der stärksten chlamydialen immundominanten Antigene und wurde von allen hier getesteten Seren erkannt (Portig, Goodall *et al.* 2003, Cruz-Fisher, Cheng *et al.* 2011). Eine Sekretion von Ctad1 in das Zytoplasma der Wirtszelle, um dort vom Immunsystem erkannt und als Antigen klassifiziert zu werden, kann aufgrund negativer Sekretion im heterologen *Yersinia* Expressionssystem des *C. trachomatis* L2 Homologes wahrscheinlich ausgeschlossen werden (da Cunha, Milho *et al.* 2014).

Bioinformatisch konnte eine Strukturhomologie der SH3-Domänen von Ctad1 mit der SH3 ähnlichen Gly-Trp (GW)-Domäne des InlB Adhäsins bei *Listeria monocytogenes* ermittelt werden (*Phyre*² Wahrscheinlichkeit: 98,8 %, Sequenzidentität: 11 %, (Kelley und Sternberg 2009)). Für InlB konnte, neben der Bindung zum Met-Rezeptor, eine alternative GW-Domänenvermittelte Bindung an Heparin-ähnliche GAGs und an den gC1q-Rezeptor beschrieben werden. Die GW-vermittelte Bindung tritt jedoch nur dann auf, wenn das Adhäsins von der bakteriellen Oberfläche gelöst wird (Shen, Naujokas *et al.* 2000, Marino, Banerjee *et al.* 2002). GW-Domänen ähneln bakteriellen SH3-Domänen in der Struktur, haben aber eine unterschiedliche Funktion. So erfolgt beispielsweise keine Bindung an prolinreiche Sequenzen, da zumindest bei InlB die dafür erforderlichen Aminosäuren durch den räumlichen Aufbau unzugänglich sind. Dennoch besitzen GW- und SH3-Domänen Gemeinsamkeiten. Alle bekannten Proteine mit GW-Domänen besitzen eine mutmaßliche Signalsequenz für den Export zur Zelloberfläche, während die Mehrheit der bakteriellen Proteine mit SH3-Domänen zum extrazellulären Raum lokalisieren (Marino, Banerjee *et al.* 2002). Die bioinformatischen Daten bekräftigen somit eine Oberflächenlokalisierung von Ctad1 und eine mögliche Funktion als Adhäsins.

Wie Ctad1 auf der chlamydialen Oberfläche präsentiert wird ist unklar. Eine Signalsequenz wird abhängig vom verwendeten Vorhersageprogramm erkannt. Während *Phobius* eine nicht genauer spezifizierte Signalsequenz (AS 1-15) voraussagt, prognostiziert *SignalP* keine Signalsequenz (Kall, Krogh *et al.* 2004, Petersen, Brunak *et al.* 2011). Gleiche Ergebnisse wurden allerdings auch in beiden Programmen bei der Vorhersage der Signalsequenz von OmcB er-

zielt. Die Analyse der Ctad1 Homologen der Gattung *Chlamydia* mittels *Effective* zeigte (Jehl, Arnold *et al.* 2011), dass alle Proteine, die N-terminal eine um sieben Aminosäuren längere Signalsequenz besitzen, als Sec-sekretiert vorhergesagt werden. Ein Sequenzabschnitt, der für die sieben gleichen Aminosäuren wie bei *C. muridarum* und vier weitere Spezies kodiert, existiert auch im *C. trachomatis* E Genom. Im Rahmen der Reannotierung der chlamydialen Genome, die derzeit erfolgt, wird dieser Abschnitt vielleicht noch dem *ctad1* Gen zugeschrieben. Daher kann über einen Sekretionsweg nur spekuliert werden, der die vollständige oder teilweise Präsentation von Ctad1 ermöglicht. Ctad1 könnte dabei, ähnlich wie OmcB, nur den für die Adhäsion notwendigen Teil des Proteins extrazellulär präsentieren, während der C-Terminus im Periplasma lokalisiert (Mygind, Christiansen *et al.* 1998, Stephens, Koshiyama *et al.* 2001). Eine durchaus plausible Verankerungsmöglichkeit, da Ctad1 bei *C. trachomatis* Serovar D als mutmaßlich in der Außenmembran integriertes Protein vorhergesagt wird, jedoch wie OmcB keine Transmembrandomäne besitzt (pCOMP, (Heinz, Tischler *et al.* 2009)). Ob Ctad1 wirklich nur partiell auf der Oberfläche zugänglich ist, konnte experimentell nicht überprüft werden, da der generierte Antikörper gegen Volllängenantigen gerichtet ist.

Zusammenfassend wird die mikroskopisch und biochemisch ermittelte Oberflächenlokalisation von den bioinformatischen Daten unterstützt. Daher kann für Ctad1 aufgrund der essentiellen Funktion in der frühen Infektion und der Lokalisation eine Funktion als Adhäsion postuliert werden.

5.1.3 Ctad1 und Integrin- β 1 – eine neues Interaktionspaar

5.1.3.1 Die Ctad1-Integrin- β 1 Interaktion

Die Sättigung der Ctad1-vermittelten Bindung deutete auf einen spezifischen, mengenbegrenzt zugänglichen Interaktionspartner hin. Im Gegensatz dazu erzeugte das *C. pneumoniae* spezifische Protein LIPP eine ungesättigte Bindung an Humanzellen, welche durch die Interaktion zu den unbegrenzt zugänglichen Membranlipiden zustande kommt (Fechtner 2012). Daher wurde angenommen, dass es sich bei dem humanen Interaktionspartner um einen Rezeptor oder ein Oberflächenprotein der Wirtszelle handelt.

Um den Interaktionspartner von Ctad1 zu identifizieren, wurde ein Rezeptor-Pulldown-Experiment durchgeführt, bei dem humane Proteine mit biotinyliertem Ctad1 Protein präzipitiert und die gewonnenen Proteine massenspektrometrisch analysiert wurden (Abbildung 4.26). Unter den identifizierten Membranproteinen fanden sich u.a. der EGF-Rezeptor und ein Mitglied der Integrin-Rezeptorfamilie. Der EGFR wurde kurz zuvor als Rezeptor der *C. pneumoniae* Infektion identifiziert (Mölleken, Becker *et al.* 2013). Eine wichtige Funktion bei

der Entwicklung der Inklusion in der *C. trachomatis* D Infektion wird diskutiert (Patel, Chen *et al.* 2014). Eine Interaktion vom *C. trachomatis* E PmpD zum EGFR konnte bereits ausgeschlossen werden (Becker 2013).

Um die Interaktion zwischen EGFR bzw. Integrin und Ctad1 zu testen wurden Hefe-zwei-Hybrid-Analysen (Y2H) durchgeführt, wobei weder der EGFR noch der zur Kontrolle der Spezifität mitgeführte LDLR mit Ctad1 interagierten. Allerdings interagierte Ctad1 mit der β 1-Untereinheit des Integrin-Rezeptors, welches sich in einem guten Hefewachstum auf hochstringentem Selektionsmedium äußerte (Abbildung 4.27 A). Daher kann angenommen werden, dass es sich bei der Ctad1-Integrin- β 1 Interaktion um eine relativ starke Bindung handelt. Diese Interaktion konnte mit rekombinantem Protein mittels Far-Westernblot Analyse beidseitig bestätigt werden (Abbildung 4.28 C). Die Interaktion zwischen Ctad1 und Integrin- β 1 erfolgte dabei nicht nur zu rekombinantem Integrin. Im Zellysate interagierte Ctad1 ebenfalls mit einem Protein von etwa 130 kDa, welches der ungefähren Laufhöhe von endogenem Integrin- β 1 entspricht (Sakai, Jove *et al.* 2001). Interessanterweise zeigte das mitgeführte Kontrollprotein Invasin keine Bindung an Integrin- β 1 (Abbildung 4.28 C). Aufgrund der heterologen Expression von Integrin- β 1 in *E. coli* fehlen die typisch eukaryotischen Modifikationen (Glykosylierung), was sich nachteilig auf die Interaktion zu Invasin auswirken könnte. Außerdem könnte die Renaturierung des immobilisierten Invasin Proteins auf der Membran unvollständig erfolgt sein, da der verwendete Far-Western Puffer DTT enthält. Die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen Cys⁹⁰⁷ und Cys⁹⁸² ist jedoch essentiell für die erfolgreiche Bindung zum Integrin-Rezeptor (Leong, Morrissey *et al.* 1993). Hieraus lässt sich ableiten, dass Invasin und Ctad1 vielleicht auf unterschiedlichem Wege die Interaktion zum Integrin-Rezeptor herstellen.

Invasin bindet Integrin- β 1 über eine Domäne, die strukturell der Fibronectin Typ III Domäne ähnelt und durch die räumliche Lokalisation dreier Aminosäuren (Asp₉₁₁, Asp₈₁₁ und Arg₈₈₃) gekennzeichnet ist. Allerdings ist die Bindedomäne im Invasin leicht vergrößert, wodurch wahrscheinlich die höhere Affinität zum Rezeptor vermittelt wird (Van Nhieu und Isberg 1991, Hamburger, Brown *et al.* 1999). Außerdem besitzt die Invasin-Bindedomäne kein klassisches fibronectintypisches RDG-Motiv. Die Bindung wird hauptsächlich durch die zwei strukturell konservierten Aspartate (Asp₉₁₁ und Asp₈₁₁) und ein Phenylalanin (Phe₈₀₈) bestimmt. Hierbei übernimmt Aspartat₉₁₁ potentiell die funktionelle Rolle des Aspartats des RGD-Motives (Leong, Fournier *et al.* 1990, Leong, Morrissey *et al.* 1995, Saltman, Lu *et al.* 1996).

Bei Ctad1 konnten die N-Terminus lokalisierten SH3-Domänen als essentiell für die Bindung an Humanzellen bestimmt werden (Abbildung 4.34). Auch im Y2H vermittelte der N-Terminus die Interaktion zu Integrin- β 1, während keine Bindung vom C-Terminus ausging

(Abbildung 4.35 A). Daher kann angenommen werden, dass die SH3-Domänen im N-Terminus die Bindung an die β 1-Untereinheit des Integrin-Rezeptors vermitteln. Ob die SH3-Domänen durch die Faltung des Proteins eine Bindedomäne ähnlich der des Invasins bilden, kann nur durch die Auflösung der Proteinstruktur eindeutig beantwortet werden. Aber sowohl die im Invasin lokalisierte Bindedomäne als auch SH3-Domänen sind durch ihren hydrophoben Aufbau gekennzeichnet (Hamburger, Brown *et al.* 1999, Di Nardo, Larson *et al.* 2003).

Klassisch binden Proteine mit SH3-Domänen an die PxxP-Motive ihrer Interaktionspartner, wobei P Prolin und x eine beliebige andere Aminosäure kennzeichnet. In den vergangenen Jahren konnten weitere Aminosäuren identifiziert werden, die zur Bindung an die SH3-Domäne beitragen, welches zur Einteilung des PxxP-Motivs in Klasse I (+xxPxxP) und Klasse II (xPxxPx+) Konsensussequenzmotive führte, wobei + eine positivgeladene Aminosäure darstellt und unter den beliebigen Aminosäuren (x) gehäuft hydrophobe Aminosäuren auftreten. Außerdem konnten Proteine beschrieben werden, die eine unkonventionelle Konsensussequenz besitzen, d.h. eine SH3-Bindesequenz, die nur ein oder gar kein Prolin enthält (non-consensus oder nicht-PxxP). PxxP-Motive vermitteln die Bindung an die sogenannte spezifische Tasche der SH3-Domäne. Nicht-PxxP-Motive gehen eine Reihe von weiteren Interaktionen mit strukturellen Elementen der SH3-Domäne ein, die in ihrer Gesamtheit als spezifische Zone bezeichnet wird. Der Bereich der SH3-Domäne, der dabei die Bindung vermittelt, ist proteinabhängig. Konventionelle und unkonventionelle Bindung können dabei zusammen wirken und zum Teil überlappen. So können beispielsweise zwei SH3-Domänen in einem Protein unterschiedliche Liganden binden (zusammengefasst aus (Kami, Takeya *et al.* 2002, Saksela und Permi 2012).

Eine Interaktion zwischen Integrinen und eukaryotischen SH3-Domänen Proteinen wurde bisher nur für den zytoplasmatischen Teil des Proteins beschrieben, nicht jedoch für den extrazellulären Teil (Legate und Fassler 2009). Eine Sekretion von Ctad1 in die Wirtszelle konnte bislang nicht nachgewiesen werden (da Cunha, Milho *et al.* 2014). Daher sprechen alle bisher präsentierten Daten eindeutig für eine direkte Interaktion der beiden Proteine. Beim InlB von *L. monocytogenes* konnte bereits eine Bindung zu einem spezifischen Rezeptor über eine SH3-ähnliche Domäne beschrieben werden (Marino, Banerjee *et al.* 2002). Folglich stellen SH3-Domänen bei Chlamydien durchaus eine geeignete Interaktionsdomäne zu Integrin-Rezeptoren dar.

Pathogene wie Yersinien vermitteln Integrin-abhängig ihre Aufnahme in die Wirtszelle, wobei alleine das Invasin Protein ausreicht um diesen Prozess zu induzieren (Dersch und Isberg 1999). In der Tat fungiert Ctad1 nicht nur als Adhäsion, sondern auch als Invasin der *C. trachomatis* Infektion. rCtad1-beschichtete Kügelchen wurden von HEP-2 Zellen signifikant

internalisiert (Abbildung 4.31 C). Die Rate der aufgenommenen Kügelchen lag dabei mit 47 % deutlich unter der hoch effizienten Aufnahme von Invasin mit 97 %, aber signifikant über der Negativkontrolle. Die effizientere Beschichtung der Invasin Kügelchen war dabei wahrscheinlich nicht für den Unterschied verantwortlich. Somit ist Ctad1 neben Pmp21 das zweite nachgewiesene chlamydiale Adhäsion, das auch als Invasin fungiert (Mölleken, Becker *et al.* 2013). Eine höhere Internalisierung von Ctad1-beschichteten Kügelchen von bis zu 80 %, konnte in endometrialen Hec-1B Zellen beobachtet werden. Dies könnte für die Präferenz des Gewebes oder für eine stärkere Präsenz eines spezifischen Rezeptors sprechen. Die gesteigerte Aufnahme der Kügelchen ließ sich durch die Vorbehandlung der Zellen mit anti-Integrin- $\beta 1$ Antikörper um etwa 20 % reduzieren. Dies unterstützt eine *in vivo* Interaktion von Ctad1 und Integrin- $\beta 1$. Aufgrund fehlender Wiederholungen und entsprechender Kontrollen sind dies nur vorläufige Daten, die nicht im Ergebnisteil aufgeführt wurden (s. Abbildung A.1.1). Der Unterschied in der Internalisierungsrate könnte an der bekanntermaßen geringen Expression von $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin in HEp-2 Zellen liegen (Tran van Nhieu und Isberg 1993), welches jedoch eine Bindung von Ctad1 an diese Rezeptorkonstellation implizieren würde. Für Invasine konnte ein Satz verschiedener Integrin-Rezeptor Paarungen ermittelt werden, denen gemein die Nutzung der $\beta 1$ -Untereinheit ist, während die α -Untereinheit variiert ($\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ oder $\alpha 6$) (Isberg und Leong 1990). Ein ähnliches Prinzip wäre für Chlamydien denkbar, um möglichst effizient die Internalisierung in Wirtszellen zu gestalten. Vor allem da Integrin- $\beta 1$ mit vielen α -Untereinheiten heterodimere Rezeptor-Komplexe bilden kann. Die beteiligten α -Untereinheiten müssen jedoch erst noch identifiziert werden.

Die Bindungsaffinität des Liganden zum Integrin-Rezeptor ist wichtig um zwischen reiner Adhäsion an den Rezeptor und rezeptorvermittelter Internalisierung zu unterscheiden (Tran van Nhieu und Isberg 1993). Die Avidität eines Liganden kann durch Integrin Clusterung gesteigert werden (van der Flier und Sonnenberg 2001), welches wahrscheinlich durch die Fähigkeit eines Liganden zur Selbstassoziation induziert werden kann (Dersch und Isberg 1999). Genau solch eine Fähigkeit der Selbstinteraktion konnte für Ctad1 sowohl im Y2H als auch mittels Far-Westernblot aufgezeigt werden (Abbildung 4.36 A, E). Eine definierte Interaktionsdomäne konnte dabei nicht identifiziert werden, was die Vermutung nahelegt, dass die Interaktion von mehreren distinkten regulatorischen Elementen abhängig ist.

Bei den beiden Pathogenen *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* wurden unterschiedliche Aufnahmeleistungen der Bakterien in Humanzellen beobachtet, welche wahrscheinlich auf der Fähigkeit zur Selbstassoziation des jeweils exprimierten Invasin Proteins beruht. Im Invasin von *Y. enterocolitica* fehlt die Selbstinteraktionsdomäne, wodurch die Internalisierungsrate geringer ausfällt. Daher wird vermutet, dass durch die oligomerisierten Invasine simultan Integri-

gebunden werden, was das Rezeptorclustern einleitet, gefolgt von der Induktion einer starken Signaltransduktion, die die effiziente Internalisierung vermittelt (Dersch und Isberg 1999).

Die Selbstinteraktion von Ctad1 könnte, ähnlich wie beim Invasin, die Internalisierung begünstigen, indem das Clustern der Rezeptoren induziert, die Avidität zu Ctad1 gesteigert und/oder die Induktion der Konformationsänderung des Rezeptors in die geöffnete Form eingeleitet wird.

Ob Ctad1 die Aktivierung des Rezeptors in die hochaffine Form alleine vermittelt oder dabei von weiteren Adhäsinen bzw. von intrazellulären Signalen anderer chlamydialer Effektoren unterstützt wird, kann bis jetzt noch nicht beantwortet werden. Ein geeigneter Kandidat wäre beispielsweise CT694, welches durch die Interaktion zu AHNAK die Aktivierung von innen unterstützen könnte (Hower, Wolf *et al.* 2009). Da die zytoplasmatischen Termini von Integrin-Rezeptoren von Calciumbindeproteinen gebunden werden können und potentiell durch sie reguliert werden, wäre eine Regulation durch AHNAK denkbar (Naik, Patel *et al.* 1997). Die genauen Funktionen von AHNAK sind noch nicht vollständig aufgeklärt, aber es scheint in einer Vielzahl von Prozessen involviert zu sein. Unter anderem wirkt AHNAK in Endozytoseprozessen und an der Ausbildung von Zell-Zellkontakten mit. Hierbei interagiert AHNAK mit dem Calcium-sensiblen Annexin2/S100A10 Komplex, der für eine Reihe von Membranfunktionen verantwortlich ist. Alle drei Proteine sind u.a. an der Aufnahme von *Salmonella* beteiligt (Davis, Loos *et al.* 2014).

Ebenfalls unklar ist, ob beide SH3-Domänen von Ctad1 an der Integrin Bindung beteiligt sind, da sie einen leicht unterschiedlichen Beitrag zur Bindung leisten (Abbildung 4.34 C). Möglich wäre (i) beide SH3-Domänen sind an der Bindung des Integrin-Rezeptors beteiligt oder (ii) die zweite SH3-Domäne vermittelt vorrangig die Bindung an Integrin und wird durch die erste SH3-Domäne unterstützt, die ein weiteres chlamydiales oder humanes Protein bindet.

5.1.3.2 Integrin- β 1 besitzt eine Funktion in der chlamydialen Infektion

Die im Y2H ermittelte und biochemisch belegte Interaktion von Ctad1 zu Integrin- β 1 bestätigte sich auch in der frühen Infektion. An adhärierenden EBs konnte die Assoziation von Ctad1 und Integrin- β 1 bereits 15 min pi in der Lebendfärbung detektiert werden, wobei 80 % der gebundenen EBs ein Integrin- β 1 Signal aufwiesen (Abbildung 4.29 A, C). Zusätzlich konnte 1 hpi, sowohl auf HEp-2 Zellen als auch auf primären humanen Eileiterepithelzellen, eine Akkumulation von Integrin- β 1 an adhärierenden EBs und sogar einige vom β 1 Signal partiell umschlossene EBs detektiert werden (Abbildung 4.29 D, 4.31). Letzteres deutet auf eine bereits erfolgreiche Internalisierung der Bakterien hin.

Die Lokalisationsdaten legen eine Ctd1-abhängige Beteiligung von Integrin- β 1 im Adhäsionsprozess nahe. Unter Verwendung einer Integrin- β 1-defizienten Zelllinie (GD25) konnte die essentielle Funktion des Rezeptors bestätigt werden und äußerte sich in einer signifikant reduzierten Infektion (um ca. 50 %). Diese Reduktion korrelierte mit einer signifikanten Beeinträchtigung des Bindungspotentials Ctd1-beschichteter Kügelchen (Abbildung 4.32) und unterstützten die zuvor postulierte Neutralisation von Ctd1 durch die Blockade des Integrin-Rezeptors. Somit konnte erstmals eine direkte funktionelle Verbindung von Integrin- β 1 zur chlamydiale Infektion gezeigt werden.

Diese Ergebnisse werden durch publizierte Daten zu *C. pneumoniae* unterstützt, denn dort konnte bereits eine Funktion von Integrin- β 2 in der frühen Infektion beschrieben werden. Die siRNA vermittelte Reduktion von Integrin- β 2 äußerte sich dabei in einer um ca. 50 % reduzierten Infektiosität (Wang, Johnston *et al.* 2010).

Die in dieser Arbeit und durch Wang *et al.* erzielten Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zu frühen Adhäsionsstudien mit *C. trachomatis* E an Hec-1B Zellen. Dort wurde eine Beteiligung von $\alpha\beta$ 1-Integrinen an der chlamydialen Infektion anhand von Neutralisationsstudien mit monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Integrin Untereinheiten, u.a. Integrin- β 1, ausgeschlossen. Die zur Kontrolle durchgeführte Neutralisation der *Y. pseudotuberculosis* Infektion mit zwei verschiedenen Integrin- β 1 Antikörpern (generiert gegen Volllängenantigenen) verlief hingegen erfolgreich (Wyrick, Davis *et al.* 1994). Warum genau die chlamydiale Infektion nicht beeinflusst wurde, kann nur spekuliert werden. Die Spezifität des Antikörpers ist vielleicht nicht ausreichend um die Bindedomäne effizient vor den Chlamydien abzuschirmen, vor allem, da die hier präsentierten Daten auf Unterschiede in der Ctd1- und Invasinvermittelten Integrin- β 1-Bindung hinweisen (s. Kapitel 5.1.3.1). Außerdem zeigte eine andere Arbeit, dass die Blockade des Integrin-Rezeptors durch Antikörper u.a. aufgrund der affinitätsabhängigen Zugänglichkeit der Domänen nicht immer gleichermaßen gegeben ist. So konnte beispielsweise die Integrin-abhängige Translokation von CagA bei *H. pylori* nur durch die Verwendung eines spezifischen, die offene Konformation stabilisierenden, Antikörpers unterbunden werden (Jimenez-Soto, Kutter *et al.* 2009).

Verbesserte Methoden wie der Gebrauch von siRNA oder die Verwendung einer defizienter Zelllinie, wie in dieser Arbeit, die gezielt das Expressionslevel eines spezifischen Rezeptors beeinflussen, führen zu überzeugenden Daten, die eine Funktion von Integrinen in der chlamydialen Infektion nahelegen.

C. trachomatis E leitete bereits 5 min nach Infektionsbeginn eine Signaltransduktion in die Wirtszelle ein, die zur Aktivierung von ERK1/2 führt (Abbildung 4.33), übereinstimmend mit publizierten Daten zu *C. trachomatis* L2 (Rajalingam, Sharma *et al.* 2008). Eine ähnlich geartete

ERK1/2 Aktivierung, wenn auch in geringerer Intensität und Dauer, konnte durch rekombinantes Ctad1 Protein induziert werden (Abbildung 4.33). Diese Signaltransduktion wird wahrscheinlich durch die Bindung an den Integrin-Rezeptor eingeleitet, wodurch eine Funktion des Rezeptors in der chlamydialen Infektion erneut unterstützt wird.

Des Weiteren bestehen erste Hinweise auf eine Ctad1-vermittelte Aktivierung von FAK (*focal adhesion kinase*) einer der ersten durch Integrinaktivierung angesprochenen Kinasen. Die detektierten Signale fielen jedoch sehr schwach aus und wurden aufgrund fehlender Wiederholungen und Kontrollen nicht in den Ergebnisteil aufgenommen (Abbildung A.1.9).

Frühere Arbeiten deuteten bereits auf eine Integrin-vermittelte Signalgebung in die Zelle bzw. eine Funktion in der chlamydialen Infektion hin. So konnte früh in der *C. pneumoniae* Infektion die Aktivierung von FAK beobachtet werden (Coombes und Mahony 2002). In der frühen *C. muridarum* Infektion konnten währenddessen mittels RNAi Analyse für einige Adapterproteine von Integrin, wie Talin, Vinculin, und die FAK akzessorische Proteine Abl und DOCK180 eine essentielle Funktion bestimmt werden (Elwell, Ceesay *et al.* 2008).

Jüngst veröffentlichte Daten bei *C. caviae* zeigen ebenfalls die Rekrutierung und Aktivierung von FAK an die Bindestelle von EBs. Die Rekrutierung von FAK wird dort allerdings durch den Effektor Tarp vermittelt, der eine sog. LD-Domäne für die direkte Interaktion mit FAK trägt. LD-Domänen finden sich normalerweise in eukaryotischen Proteinen wie dem Integrin-Bindeprotein Paxilin, das über diese Domäne FAK bindet. Die identifizierte chlamydiale LD-Domäne ist in allen untersuchten Tarp Homologen konserviert. Die Aktivierung von FAK führt bei *C. caviae* zur Rekrutierung von Cdc42, welches die Rekrutierung einer Untereinheit des Arp2/3-Komplexes nach sich zieht und die lokale Aktinpolymerisierung einleitet, die zur Aufnahme des Bakteriums führt (Subtil, Wyplosz *et al.* 2004, Thwaites, Nogueira *et al.* 2014).

Ob die initiale FAK Rekrutierung zur EB Bindestelle generell auch ohne Tarp erfolgt kann, ist unklar und aufgrund der eingeschränkten genetischen Manipulierbarkeit von Chlamydien schwer zu untersuchen. Vorstellbar wäre jedoch eine Tarp-vermittelt Verstärkung der initialen Integrin-vermittelten FAK Rekrutierung. Gerade bei *C. caviae* wäre eine Beteiligung von Integrin in der frühen Phase der Infektion denkbar, da viele Parallelen im Ablauf zur Yersinien-vermittelten Internalisierung bestehen. Neben der FAK-vermittelten Rekrutierung von Cdc42 spielen die kleinen GTPasen Rac1 und Arf6 eine entscheidende Rolle in der Internalisierung beider Spezies. Während Rac1 Cdc42 bei der Rekrutierung des Arp2/3-Komplexes unterstützt, vermittelt Arf6 die Rekrutierung der PIP₅-Kinase zur Bakterienbindestelle. Die PIP₅-Kinase leitet dort die Bildung von PI(4,5)P₂ ein und unterstützt damit die Aufnahme (Wong und Isberg 2003, Subtil, Wyplosz *et al.* 2004, Balañá, Niedergang *et al.* 2005).

Darüber hinaus vermittelt die Arf6-assoziierte Endozytose u.a. das Recyclen von Integrin-Rezeptoren (Sandvig, Pust *et al.* 2011). Bestandteile dieses Endozytosemechanismus könnten potentiell von den Bakterien für ihre eigene Aufnahme genutzt werden.

Bei *C. trachomatis* L2 konnte bereits zuvor eine Cdc42-unabhängige Aktivierung des Arp2/3-Komplexes gezeigt werden (Carabeo, Grieshaber *et al.* 2004), welches auf eine leicht unterschiedlich gewichtete Signaltransduktion zwischen den beiden Spezies hindeutet und vielleicht auf eine stärkere Funktion von Integrin in der Etablierung dieses Prozesses hinweist.

5.1.3.3 Die wechselseitige Beeinflussung zwischen Integrinen und weiteren Rezeptoren

Integrin-Rezeptoren stellen für Chlamydien interessante Zielstrukturen dar. Sie können sowohl Clathrin-unabhängig als auch Clathrin-abhängig endozytiert werden, wie es auch für Chlamydien bereits beobachtet wurde (s. Kapitel 1.5.4.3) (Caswell, Vadrevu *et al.* 2009).

Außerdem können Integrin-Rezeptoren eine Reihe von Signalmolekülen beeinflussen, für die schon eine Funktion in der chlamydialen Infektion beschrieben wurde. So können sie positiv oder negativ auf die Signaltransduktion von Wachstumsfaktorrezeptoren (GFR) wie PDGFR, EGFR, FGFR oder VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*), Zytokinrezeptoren oder Syndecanen (integrale membranassoziierte Protein-GAG-Komplexe) wirken. Beispielsweise wird durch die Interaktion mit GFRs wahrscheinlich eine Rezeptorgruppierung erzeugt, welche in einer gesteigerten Signalgebung resultiert. Allerdings können Integrine und GFRs auch auf unterschiedlichem Wege aktiviert werden, wobei die eingeleitete Signaltransition in einer Signalkaskade zusammenläuft, wie dies für die wachstumsfaktorabhängige Aktivierung der ERK Signalkaskade beschrieben wurde. Allerdings können umgekehrt auch Wachstumsfaktoren Integrin-Rezeptoren beeinflussen (zusammengefasst aus (van der Flier und Sonnenberg 2001, Streuli und Akhtar 2009)). So steigern beispielsweise die Liganden FGF2 und TGF- β 1 die Expression des α 5 β 1 Integrin-Rezeptors in Endothelzellen (Zambruno, Marchisio *et al.* 1995, Collo und Pepper 1999). In der *C. muridarum* Infektion leitet FGF2 durch die Aktivierung des ERK1/2 Signalweges die Genexpression ein. Eine Beladung der EB-Oberfläche mit FGF2 während der Freisetzung wird postuliert, da eine verbesserte FGF2-abhängige Bindung der EBs in der nächsten Infektion erfolgt (Kim, Jiang *et al.* 2011). Die FGF2-vermittelte Steigerung der EB Bindung an die Wirtszelle wurde auch bei *C. trachomatis* Serovar E beobachtet. Daher stellt sich die Frage, ob gesteigerte Adhäsion allein auf die verstärkte Bindung durch oberflächlich präsentiertes FGF2 zurückgeht, oder ob FGF2 vielleicht auch in Epithelzellen die Expression von Integrinen induziert. Eine gesteigerte Integrin Expression hätte eine ver-

besserte Ctad1-abhängige Aufnahme der EBs zur Folge (vgl. Abbildung 4.32 C). Der Einfluss einer derartig induzierten Genexpression in der frühen Infektion bleibt allerdings zu klären.

Neben Wachstumsfaktoren haben Hormone einen großen Einfluss auf die Expression und Präsentation von Integrinen. Da ein positiver Einfluss von Östrogen auf die *C. trachomatis* E-Infektion bereits gezeigt werden konnte (Hall, Schell *et al.* 2011), wird an dieser Stelle die Östrogen- und Östrogenrezeptor-abhängige Integrinregulation betrachtet.

Gerade endometriales Gewebe ist aufgrund des Menstruationszyklus unterschiedlichen Sexualhormonen ausgesetzt, für die ein Einfluss auf die Ausbildung des Gewebes ermittelt werden konnte. Integrine stellen eine geeignete Zielstruktur für die hormonabhängige Regulation dar, da sie durch die Verknüpfung mit der extrazellulären Matrix mitverantwortlich für die Integrität des Gewebes sind. Dieser Verband muss jedoch zyklusabhängig regelmäßig modifiziert werden. Bereits Wyrick *et al.* verwiesen in ihrer Arbeit über Integrine in der chlamydialen Infektion auf ihre unterschiedlich gewichtete Expression. So kann zwischen konstitutiv ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$) und zyklusspezifisch exprimierten Integrinen ($\alpha v\beta 3$, αv), aber auch zwischen Integrinen mit Lokalisation im luminalen und granularen Epithelium ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$) oder in Stromazellen ($\beta 3$, αv , $\alpha 5$) unterschieden werden (Wyrick, Davis *et al.* 1994). Allerdings gestaltet sich die gezielte Analyse der hormonellen Regulation der Integrine schwierig, da Effekte meist abhängig von der verwendeten Zelllinie auftreten.

In einer Untersuchung an Brustadenokarzinomzellen konnte eine Korrelation zwischen der Expression von Östrogenrezeptor (ER) und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin beobachtet werden, die aufgrund des Stichprobenumfangs jedoch nur eine limitierte Aussage zulässt (Zutter, Mazoujian *et al.* 1990). In Osterblasten Zellen konnte ein direkter Effekt der östrogeninduzierten Integrin- $\beta 1$ Expression beobachtet werden, der durch die Inhibierung des ERs aufgehoben wurde (Yeh, Chiu *et al.* 2010). Da eine ähnliche östrogenabhängige Induktion der Integrine $\beta 1$, $\alpha 5$ und $\alpha 6$ auch schon für Endothelzellen beschrieben wurde (Cid, Esparza *et al.* 1999), könnte es sich um einen generell geltenden Regulationsmechanismus handeln.

Weiterhin unterstützt wird eine zumindest teilweise ER-abhängige Regulation der Integrinexpression durch die verringerte Expression von ER β in Brustkrebs- und Kolonkrebszelllinien. Zwei Formen des ERs werden in Zellen exprimiert, α und β , die oftmals antagonistisch wirken. Die Reduktion der ER β Expression in Tumoren wird mit einer verringerten Interaktion der Zellen mit der extrazellulären Matrix und damit einem erhöhten invasiven Verhalten verbunden. Transfiziert exprimiertes ER β komplementiert diesen Defekt und vermittelt eine gesteigerte Expression von $\alpha 1$ und $\beta 1$ Integrin (Lindberg, Strom *et al.* 2010).

ERs können sowohl membranassoziiert als auch intrazellulär lokalisieren. Die membranassoziierten ERs leiten wahrscheinlich die Aktivierung von MAPK und ERK ein oder vermitteln die

Freisetzung von intrazellulärem Calcium. Dies kann wie die wachstumsfaktorabhängige Aktivierung von ERK intrazelluläres ER induzieren. Intrazellulärer ER hingegen reagiert auf einen Stimulus, indem es entweder direkt die Genexpression durch Bindung an ERE-Promotorelemente (*estrogen response elements*) veranlasst oder mit anderen Transkriptionsfaktoren interagiert, um alternative Signalwege einzuleiten (Zhao, Dahlman-Wright *et al.* 2008).

Daher könnte die von Hall *et. al* beobachtete verbesserte *C. trachomatis* E Infektion unter Östrogeneinfluss nicht nur direkt abhängig vom Östrogenrezeptor, sondern auch durch gesteigerte Expression von Integrin-Rezeptoren hervorgerufen werden (Hall, Schell *et al.* 2011). Die Anzahl der zur Verfügung stehenden Rezeptoren spielt eine entscheidende Rolle in der Effizienz der Integrin-vermittelten Internalisierung (Tran van Nhieu und Isberg 1993). Eine gesteigerte Integrin-Präsentation würde sich wahrscheinlich positiv auf die EB Aufnahme auswirken, welches sich in den Infektionszahlen der Integrin- β 1-positiven Zellen (GD25+ β 1) bewahrheitete (Abbildung 4.32 C, D).

Integrine sind die am häufigsten von Bakterien genutzten Oberflächenproteine, um den Kontakt zwischen Pathogen und Wirt zu erzeugen (Hoffmann, Ohlsen *et al.* 2011, Hauck, Borisova *et al.* 2012). Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen erstmals auch eine Beteiligung von Integrin-Rezeptoren in der *C. trachomatis* E Infektion. Ihre Funktion als eine Art Meisterregulator vieler zellulärer Prozesse und die Interaktionsmöglichkeit mit anderen Rezeptoren machen sie zu überaus interessanten Zielstrukturen der chlamydialen Adhäsion und Internalisierung. Die Blockade von Integrinen mit Inhibitoren könnte neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen, um einer *C. trachomatis* Infektion vorzubeugen.

5.1.4 Ist die Interaktion zwischen Ctad1 und Integrin auch bei anderen Spezies von Bedeutung?

Da Ctad1 unter allen *C. trachomatis* Serovaren stark konserviert ist und auch eine 53 %ige Identität zum *C. pneumoniae* Homolog CPn0104 aufweist, wurde eine generelle Funktion von Ctad1 im Adhäsionsprozess vermutet. Erste Analysen zeigen tatsächlich eine signifikante, wenn auch geringe, Neutralisation der Infektion von *C. trachomatis* L2 und *C. pneumoniae* durch rekombinantes *C. trachomatis* E Ctad1 Protein (Abbildung 4.37). Ob alle *Chlamydia* eine Ctad1-abhängige Bindung an Integrin- β 1 vermitteln, bleibt spekulativ. Die Identität der Ctad1 Homologen liegt zwischen 83 % bei *C. suis* und lediglich 51 % bei *C. pecorum* (s. Abbildung A.1.7). Die Identität der SH3-Domänen übersteigt dabei die Gesamthomologie des Proteins und liegt abhängig von der jeweiligen SH3-Domäne zwischen 61 % - 98,1 % (1. SH3) und 51,5 % - 95,5 % (2. SH3). Ausgenommen sind die *C. trachomatis* Serovare, die eine 100 %ige Identität in

beiden Domänen zeigen und *C. suis*, das eine höhere Identität über das gesamte Protein aufweist. Für *C. pneumoniae* wird nur eine SH3-Domäne vorhergesagt, obwohl im Sequenzvergleich auch homologe Abschnitte zur zweiten Domäne auftreten (s. Alignment elek. Anhang). Ein genereller Kontakt zu Integrinen über die konservierten SH3-Domänen wäre daher denkbar, wobei der jeweilige Subtyp vielleicht variieren kann. Vor allem da die zweite SH3-Domäne weniger stark konserviert, jedoch stärker an der Adhäsion beteiligt ist. Zusätzlich fiel im Sequenzvergleich eine stark variable Region C-terminal der SH3-Domänen auf, Aminosäure 240 – 301 (Positionen in Ctad1 E) (Abbildung 5.1). Lediglich die nah verwandten Vertreter von *C. trachomatis*, *C. muridarum* und *C. suis* besitzen einen ähnlichen Abschnitt, der aber eine vergleichsweise geringe Homologie aufweist (s. Abbildung A.1.10). Die variable Region könnte bedingt durch eine räumliche Nähe im gefalteten Protein vielleicht die Spezifität oder auch die Affinität der Integrin-Bindung beeinflussen. Sodass Proteine mit variabler Region an Integrin adhäreren und die Internalisierung initialisieren, während Proteine ohne diese Domäne lediglich an Integrine binden können. Ferner könnte die variable Region die Spezifität für die gebundene β -Untereinheit mitbestimmen. Die Richtigkeit dieser Hypothese bleibt noch zu beweisen.

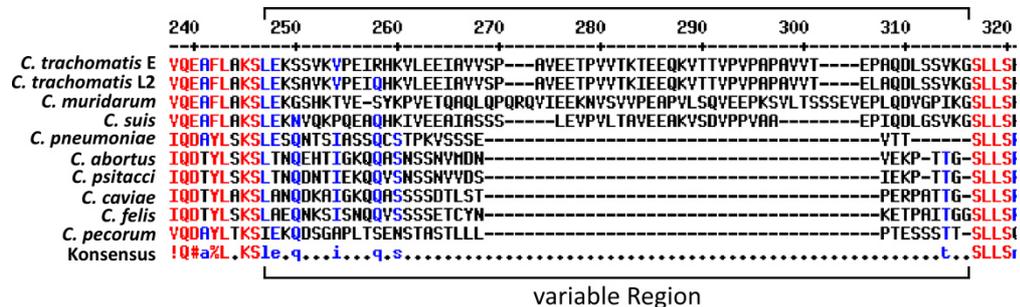


Abbildung 5.1: Sequenzvergleich von Ctad1 und seinen Homologen unter den *Chlamydiaceae*.

Sequenzvergleich durchgeführt mit *Multalin*. *C. trachomatis* (E: DK-20 Ctad1), (L2/434/Bu(i) 01440), *C. muridarum* Nigg (TC0285), *C. suis* MD56 (Q499-0024), *C. pneumoniae* CWL029 (CPn0104), *C. abortus* S26/3 (CAB638), *C. psittaci*, *C. caviae* GPIC (CCA00668), *C. felis* Fe/C-56 (CF0343), *C. pecorum* E58 (G5S_1043). Gensequenzen und vollständiger Sequenzvergleich siehe elek. Anhang.

Beim OmcB von *C. trachomatis* Serovar L und E ist eine variable Region C-terminal des Heparin-Bindemotivs verantwortlich für die Heparin-abhängige bzw. -unabhängige Adhäsion der Proteine. Der Unterschied in der variablen Region beruht lediglich auf drei Aminosäuren (Moelleken und Hegemann 2008, Fechtner, Stallmann *et al.* 2013). Kleine Variationen wie die im OmcB machen bei den verschiedenen Serovaren von *C. trachomatis* den Unterschied, der wahrscheinlich für den Gewebetropismus verantwortlich ist.

Ctad1 der Serovar E und L unterscheiden sich nur in sieben Aminosäuren, von denen vier ebenfalls in der variablen Region lokalisieren. Zwei dieser Aminosäuren beeinflussen entschei-

dend (Position Thr₂₇₃ und Pro₂₉₂) die vorhergesagte Sekundärstruktur (Abbildung 5.2). Der Austausch an Position 273 tritt jedoch bei fast allen Serovaren mit Ausnahme von D, G und K auf, sodass dieser möglicherweise der Feinabstimmung der Adhäsion dient. Der Austausch von Prolin gegen Leucin an Position 292 ist LGV-spezifisch und führt wie im OmcB zu einer veränderten Sekundärstruktur. Ob diese strukturellen Unterschiede zu einer differenziellen Adhäsion führen, oder gar das invasive Verhalten der LGV Spezies begünstigt, kann an dieser Stelle nur spekuliert werden.

Abschließend kann noch nicht genau bestimmt werden, ob Ctad1 eine speziesübergreifende Funktion in der Infektion aller chlamydialen Spezies besitzt, die Möglichkeit bleibt aber nach detaillierter Betrachtung bestehen. Erste Ergebnisse weisen bei den humanpathogenen Vertretern in diese Richtung, sollten aber aufgrund der strukturellen Unterschiede kritisch betrachtet werden. Möglicherweise vermitteln aber gerade diese strukturellen Variationen die Spezifität zum Interaktionspartner und wären daher von besonderem Interesse.

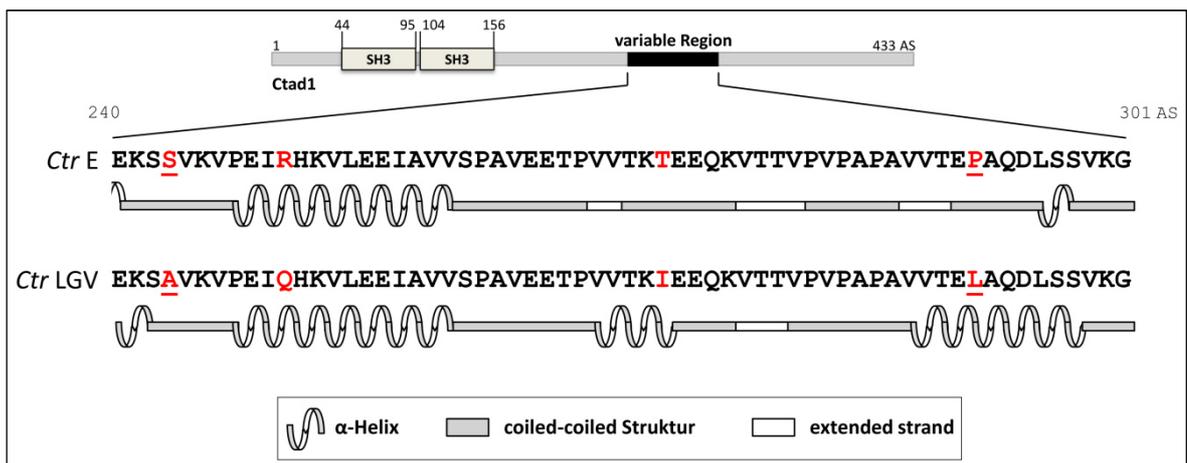


Abbildung 5.2: Sekundärstrukturanalyse von Ctad1 bei Serovar E und LGV.

Darstellung der Aminosäuresequenz und der berechneten Sekundärstruktur von Ctad1. Rot markierte Aminosäuren (AS) variieren ebenfalls in den *C. trachomatis* Serovaren A, B, C, F, I, J und LGV im Vergleich zu Serovar E, während die rot markierten und unterstrichenen AS ausschließlich in den LGV Serovaren vertreten sind. Vorhersage durchgeführt mit GOR IV.

5.1.5 Erweitertes Modell der *C. trachomatis* Adhäsion

Das bestehende Modell der *C. trachomatis* Adhäsion konnte durch die in dieser Arbeit gewonnenen Daten erweitert werden (Abbildung 5.3). Nach der reversiblen ersten Kontaktaufnahme zwischen OmcB und GAGs, erfolgt die spezifische zweite irreversible Bindung (Stephens, Koshiyama *et al.* 2001). Über eine Beteiligung von Ctad1 in diesem zweiten Prozess, durch die Bindung der β 1-Untereinheit des Integrin-Rezeptors kann spekuliert werden. Die Adhäsion von Ctad1 leitet die Signaltransduktion in die Zelle ein, welche in der Aktivierung des

ERK1/2 Signalwegs resultiert. Die Aktivierung von FAK als einem der ersten angesprochenen Signalgeber von Integrinen wird vermutet. FAK könnte anschließend durch die Aktivierung von SFK (*Src family kinases*) und/oder Cas/Crk eine Signalkaskade aktivieren, die sowohl zur Phosphorylierung von ERK als auch zur Aktivierung von Rac1 führt.

Eine Verstärkung der durch Ctad1 eingeleiteten Signalkaskade durch Effektoren wie Tarp ist sehr wahrscheinlich, denn eine Beteiligung von Tarp an der Aktivierung von Rac1 konnte bereits erfolgreich nachgewiesen werden (Lane, Mutchler *et al.* 2008). Ferner kann Tarp wahrscheinlich spezieübergreifend die Rekrutierung von FAK zur EB Bindestelle vermitteln, welches die Integrin-abhängige Signaltransduktion zusätzlich stimulieren könnte (Thwaites, Nogueira *et al.* 2014).

Die Aktivierung von Rac1 führt zur Rekrutierung von Aktinnukleatoren, die zusammen mit dem Arp2/3-Komplex zu einer lokalen Aktinremodellierung und anschließender Aufnahme des EBs führt (Carabeo, Dooley *et al.* 2007). Im Gegensatz dazu trägt die Aktivierung von ERK1/2 wahrscheinlich durch die Expression humaner Gene zur Etablierung der replikativen Nische bei.

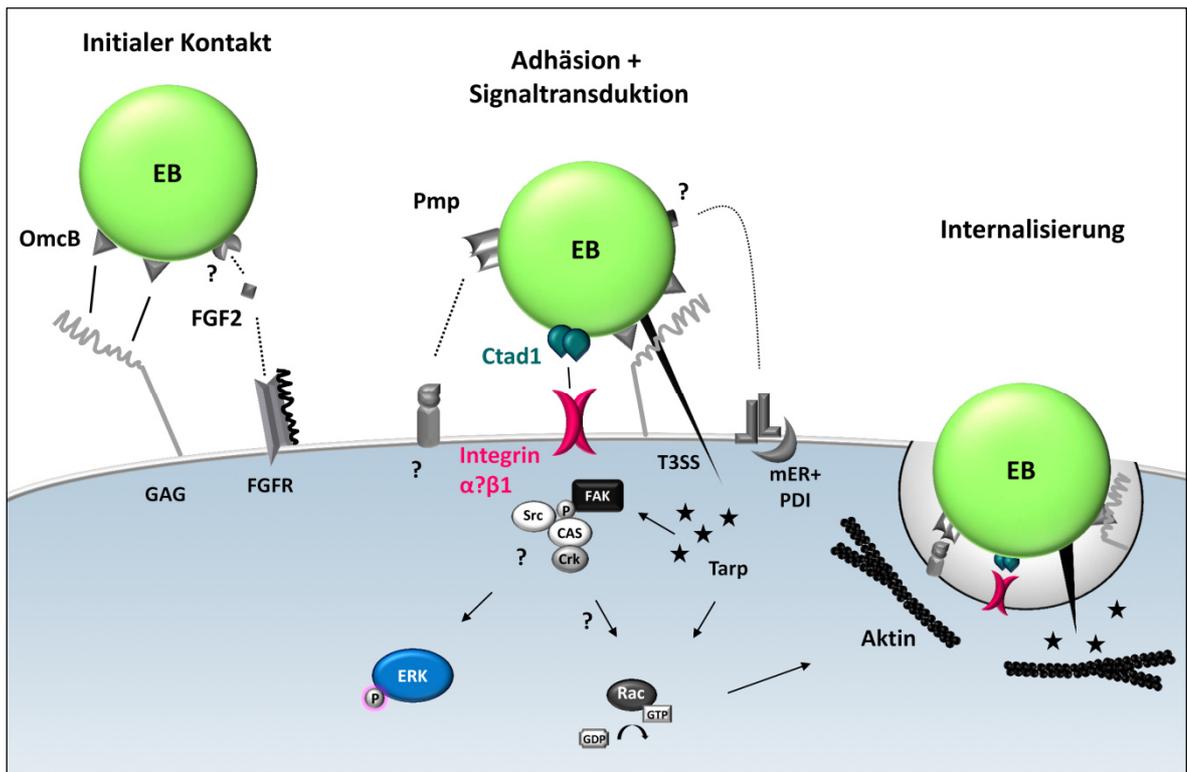


Abbildung 5.3: Erweitertes Modell der Adhäsion und Signaltransduktion bei *C. trachomatis* E.

Für farbig dargestellte Proteine konnte eine Funktion im Rahmen dieser Arbeit in der frühen Infektion gezeigt werden.

5.2 Besitzt Ctad9 weitere Funktionen als für TepP beschrieben?

Initial wurde Ctad9 in dieser Arbeit als immundominantes, putatives integrales Membranprotein, ohne bekannte Domänen, in die Kandidatenliste der zu prüfenden potentiellen Adhäsine aufgenommen (s. Tabelle 4.1). Die initialen Neutralisations- und Bindestudien verliefen positiv, denn rekombinantes Ctad9 Protein vermittelte sowohl in löslicher Form, als auch an Kügelchen gekoppelt, gute Bindung an Humanzellen (Abbildung 4.2 und 4.4). Darüber hinaus reduzierte die Vorbehandlung von HEp-2 Zellen mit rekombinantem Ctad9 die chlamydiale Infektion signifikant, nicht jedoch die Adhäsion von EBs (Abbildung 4.3 und 4.5). Die fehlende Reduktion der EB Adhäsion zeigte erste Schwächen des Kandidaten als potentielles Adhäsins. Da aber auch das Bindung vermittelnde Chaperon GroEL1 von *C. pneumoniae* keinen negativen Effekt auf die Adhäsion der EBs ausübt (Wuppermann, Molleken *et al.* 2008), wurde die Ctad9 Lokalisation in der Infektion mit dem generierten Antikörper bestimmt.

Ctad9 konnte 48 hpi eindeutig bakterienassoziiert identifiziert werden (Abbildung 4.16 B). Die PFA-Fixierung mit anschließender Permeabilisierung der Zellen deutet auf eine EB-Oberflächenzugänglichkeit von Ctad9 hin, was ebenfalls zu einem potentiellen Adhäsins passen würde. Eine frühere Expression (24 hpi) von Ctad9 ist unklar, da sowohl Inklusionen mit als auch ohne Ctad9 Signal mikroskopisch detektiert wurden (Abbildung 4.16 B). Im Westernblot trat eine Expression von Ctad9 erstmals 36 hpi auf (Abbildung 4.7). Dies deutet entweder auf unspezifische Signale in der Lokalisationsanalyse hin oder auf eine zu geringe Proteinmenge im Westernblot, die vielleicht aufgrund des asynchronen Infektionsverlaufs entsteht. Allerdings könnten die verschiedenen Signale auch ein erster Hinweis auf eine differenzielle Expression geben, wie es schon für einige Pmp Proteine beobachtet wurde (Tan, Hsia *et al.* 2010). Die Daten der serologischen Untersuchung zu Ctad9 könnte ebenfalls dahingehend interpretiert werden (Abbildung 4.6). Lediglich zwei der vier getesteten Patientenseren erkannten Ctad9 als immundominantes Antigen.

In den anfänglich herangezogenen Transkriptomdaten von Belland *et al.* wurde Ctad9 nicht geführt, aber eine weitere Transkriptomanalyse belegt, dass Ctad9 ebenfalls ein spät exprimiertes Gen ist (≥ 24 hpi) (Belland, Zhong *et al.* 2003, Nicholson, Olinger *et al.* 2003).

Die mikroskopisch ermittelte EB-Oberflächenzugänglichkeit wurde durch die Daten des Proteinlöslichkeitsexperiments unterstützt. Hierbei konnte Ctad9 bereits durch PBS- und Triton-Behandlung der EBs in geringen Mengen in den Überstand überführt werden (Abbildung 4.18). Nach Sarkoyl-Behandlung konnten etwa 60 % des Gesamtproteins im Überstand detektiert werden, welches auf eine nicht kovalente Verknüpfung mit dem cOMC hindeutet und mit vorherigen Studien übereinstimmt (Liu, Afrane *et al.* 2010).

Lokalisationsstudien der frühen Infektion (15 mpi) wiesen jedoch auf eine Sekretion des Proteins hin, da Ctad9 und Momp zum Teil assoziiert aber nicht kolokalisiert vorlagen (Abbildung 4.19). Interessanterweise wurde die Sekretion durch die bioinformatische Vorhersage als T3S Substrat unterstützt (*Effective*, (Jehl, Arnold *et al.* 2011)). Dies sprach gegen eine Funktion als Adhäsion.

Die jüngst erschienene Veröffentlichung zu Ctad9, dort als TepP bezeichnet, bestätigte die Sekretion in der frühen Infektion (2 hpi) von *C. trachomatis* L2 (Chen, Bastidas *et al.* 2014). Dort konnte eine deutlichere Sekretion, wahrscheinlich aufgrund des späteren gewählten Zeitpunkts, beschrieben werden. TepP wurde in dieser Studie als Typ-3-Sekretionssubstrat durch Immunpräzipitation mit dem T3SS Chaperon Slc1 identifiziert und durch die heterologe Expression im *Yersinia* Sekretionssystem bestätigt. Gemäß den Autoren wird TepP dabei zeitlich nach Tarp in die Wirtszelle sekretiert und dort phosphoryliert, wodurch es die Rekrutierung von CrkI und II zur Inklusion vermittelt, welches bei der Verwendung einer *tepP* Mutante ausblieb. Funktionell wird für TepP eine Rolle als Modulator der angeborenen Immunantwort favorisiert, da vergleichende Infektionen mit der *tepP* Mutante bzw. komplementierter *tepP* Mutante zu differentieller Expression diesbezüglicher Gene führte. Eine Funktion von TepP in der Endozytose des Bakteriums wird nicht ausgeschlossen, aber als nicht essentiell eingestuft, denn die Aufnahme der EBs und die Etablierung der replikativen Nische ist durch die *tepP* Mutante nicht beeinflusst (Chen, Bastidas *et al.* 2014).

Geringe Mengen an TepP sollen im EB bereits mit dem Chaperon assoziiert vorliegen, da potentiell schon auf dieser Ebene eine Hierarchie der sekretierten Effektoren festgelegt wird (Chen, Bastidas *et al.* 2014). Sollte Ctad9 (TepP) auch bereits in die Sekretionsnadel eingeführt vorliegen, könnte so vielleicht die Detektion von Ctad9 (TepP) im Überstand der Detergenzien-behandelten EBs erklärt werden (Abbildung 4.18). Auffallend ist, dass unter Triton-Behandlung eine etwa 60 kDa Ctad9 Degradationsbande im Überstand akkumulierte, die bereits in der Westernblot Analyse der Infektionskinetik auffiel und vielleicht auf eine Prozessierung des Proteins hindeutet (Abbildung 4.18, 4.7). Ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Prozessierung und damit verbundene differentielle Funktion, bietet das Homolog von Ctad9 (TepP) in *C. suis*, welches eine Identität von 66 % und eine Homologie von 79 % zu Ctad9 besitzt, jedoch nur zum C-Terminus (273-589 AS) des Proteins (Alignment s. elek. Anhang). Hierbei könnte es sich um eine Adaption des Proteins an den entsprechenden Wirtsorganismus handeln. Im Verlauf der Evolution könnte der N-Terminus deletiert worden sein, da er funktionell bei einer *C. suis* Infektion nicht von Nöten ist. Daher und aufgrund des kondensierten chlamydialen Genoms könnten Ctad9 (TepP) und/oder verschiedene Fragmente des Proteins weitere Funktionen, neben der vorgeschlagenen Regulation der Immunantwort, aus-

üben. Als Interaktionspartner von Crk ist Ctad9 (TepP) ein geeigneter Signalmodulator vieler zellulärer Prozesse. Crk vermittelt u.a. die Regulation der Zelladhäsion, Migration, Phagozytose und Zytoskelettdynamik (Birge, Kalodimos *et al.* 2009). Es konnten bereits einige Pathogene beschrieben werden, die eine Crk-vermittelte Signalgebung zu ihrem Vorteil nutzen. So wird beispielsweise bei *Y. pseudotuberculosis* durch die Invasin-Integrin Bindung ein Cas/Crk-abhängiger Signalweg induziert, der Rac1-abhängig zur Internalisierung des Bakteriums führt (Weidow, Black *et al.* 2000, Bruce-Staskal, Weidow *et al.* 2002). Ferner wird die Aufnahme von *S. flexneri* durch die Abl/Crk-abhängige Aktivierung der kleinen GTPasen Rac1 und Cdc42 unterstützt (Burton, Plattner *et al.* 2003).

Die in dieser Arbeit generierten Transfektionsdaten unterstützen eine Funktion von Ctad9 (TepP) in der frühen Infektion. So konnte transfiziert exprimiertes Ctad9-GFP sowohl an der Membran, dort u.a. potentiell an der Entstehungsstelle früher Endosomen (EE) (Abbildung 4.20 B2), als auch assoziiert mit EE und Recycling Endosomen (RE) detektiert werden (Abbildung 4.20). Somit besäße Ctad9 (TepP) potentiell die Fähigkeit an der Bindestelle der EBs zu lokalisieren und zu agieren. Ctad9 (TepP) könnte durch die Interaktion mit Crk akzessorische Proteine wie Abl, Sos, C3G oder Dock1 aktivieren, die die Aufnahme der Bakterien unterstützen. Einige dieser Proteine sind an der normalen Endozytose der Zelle beteiligt (Birge, Kalodimos *et al.* 2009). Die Aktivierung des GEFs Sos durch Tarp sowie eine Beteiligung der Abl Kinase bei der EB Internalisierung konnte bereits zuvor beschrieben werden (Elwell, Ceesay *et al.* 2008, Lane, Mutchler *et al.* 2008). Daher wäre eine Verstärkung der Rezeptor- und Tarp-induzierten Signalkaskaden durch Ctad9 (TepP)/Crk durchaus denkbar. Die Potenzierung von Signalwegen passt in das Bild anderer bakterieller Pathogene, die durch Virulenzfaktoren und Rezeptorinteraktion redundante Signalwege aktivieren, um effizienter die Wirtszelle zu manipulieren. Crk ist dabei ein geeigneter Interaktionspartner, da viele verschiedene Rezeptorklassen wie Wachstumsfaktorrezeptoren (PDGFR α), Tyrosinkinaserzeptoren (Ephrin B2), Zelladhäsine (Integrin- β 1) oder Cytokinrezeptoren eine Crk-vermittelte Signalgebung einleiten (Birge, Kalodimos *et al.* 2009).

Ferner könnte Ctad9 (TepP) aufgrund seiner Assoziation mit Rab11-positiven Vesikeln eine Funktion bei der Etablierung der replikativen Nischen besitzen. In vorherigen Arbeiten konnte bereits ab 2 hpi die Rekrutierung von Rab GTPasen, u.a. Rab11, zur Inklusionsmembran beschrieben werden (Rzomp, Scholtes *et al.* 2003, Brumell und Scidmore 2007). Neueste Studien zeigen, dass FIP2 (*family of interacting protein 2*), ein Rab11 bindendes Protein, Rab11-abhängig zur Inklusion rekrutiert wird und die Rekrutierung und Bindung von Rab14 einleitet. Transfiziert exprimiertes FIP2 konnte dabei bereits 2 hpi an der Inklusion detektiert werden (Leiva, Capmany *et al.* 2013). Rab11 und Rab14 sind an der Versorgung der Inklusion mit

Sphingolipiden beteiligt (Rejman Lipinski, Heymann *et al.* 2009, Capmany und Damiani 2010). Die Depletion von FIP2 oder Rab14 führt zu einer geringeren *C. trachomatis* L2 Nachkommenschaft. Weiterhin führt die Expression einer dominant negativen Rab14 Mutante zu einer verspäteten Inklusionsexpansion und reduzierter bakterieller Replikation, woraus eine die chlamydiale Entwicklung begünstigende Funktion von FIP2 abgeleitet wurde (Capmany und Damiani 2010, Leiva, Capmany *et al.* 2013). Ctad9 (TepP) könnte vielleicht bei der initialen Rekrutierung von Rab11 zum frühen Einschluss behilflich sein, welches anschließend die Rekrutierung von FIP2 und Rab14 ermöglicht. Da eine TepP-abhängige Rekrutierung von Crk zwischen 1 und 8 hpi beobachtet wurde (Chen, Bastidas *et al.* 2014), wäre auch zeitlich gesehen eine Ctad9-abhängige Rab11 Rekrutierung denkbar. Beide hier vorgeschlagenen Funktionen müssten mit weiteren Untersuchungen jedoch auf ihrer Wahrhaftigkeit hin untersucht werden.

Die Affinität von Ctad9-GFP zu Membranen könnte die in dieser Arbeit ermittelte Bindung von rekombinantem Protein zu Humanzellen erklären (Abbildung 4.20 A, B, 4.2 und 4.4). Zu berücksichtigen ist dabei der unterschiedliche Aufbau der zytosolischen und extrazellulären Seite der Plasmamembran. Daher wäre eine Integration in die Membran oder die Interaktion zu einem Membranlipid, das sowohl Bestandteil der innen als auch äußeren Membran ist, beispielsweise Cholesterin, denkbar. Durch die Membranaffinität von Ctad9 (TepP) könnte die Dynamik der Membran und dadurch indirekt die Endozytose beeinflusst sein, welches sich in der reduzierten Infektion widerspiegelte, die Adhäsion jedoch nicht beeinflusste (Abbildung 4.3 und 4.5).

5.3 Ctad2 – Ein potentieller neuer Effektor?

Ctad2 vermittelte sowohl im löslichen Proteinbindeversuch als auch im Bindeexperiment mit proteinbeschichteten Kügelchen eine signifikante Bindung an HEp-2 Zellen (Abbildung 4.2 und 4.4). Zusätzlich reduzierte die Vorinkubation von HEp-2 Zellen mit Ctad2 die chlamydiale Infektion leicht (Abbildung 4.3), nicht aber die Adhäsion von EBs (Abbildung 4.5). Damit erfüllte Ctad2 die Bindeeigenschaften eines Adhäsins, zeigte allerdings leichte Schwächen bei der Neutralisation. Die Lokalisationsanalyse zu Ctad2 zeigte dann schnell, dass Ctad2 sehr wahrscheinlich kein neues Adhäsins darstellt.

Die Expression von Ctad2 konnte mittels Westernblot erstmals 30 hpi nachgewiesen werden (Abbildung 4.7), obwohl eine Transkription bereits nach 8 hpi beschrieben wurde (Belland, Zhong *et al.* 2003). Mikroskopisch konnte nach 24 hpi ein Signal für Ctad2 ermittelt werden, wobei Ctad2 nur zu einem kleinen Teil mit den Bakterien assoziiert und größtenteils im Inklus-

sionslumen zu lokalisieren schien. Daher kann angenommen werden, dass der generierte Antikörper zu schwach ist, um denaturierte Ctad2 Epitope in der Westernblot Analyse der frühen Infektion zu detektieren. 48 hpi konnten überwiegend RBs mit assoziiertem Ctad2 Signal detektiert werden, die möglicherweise den Sekretionsmoment darstellten (Abbildung 4.11 C). Ob Ctad2 in der Infektion wirklich sekretiert wird, sei es nur in die Inklusion, oder auch in das Zytoplasma der Wirtszelle, konnte aufgrund des antikörperbedingten Hintergrundes nicht eindeutig bestimmt werden. Jüngst veröffentlichte Daten sprechen jedoch klar für eine Typ-3-Sekretion des Proteins, da sein Homolog in *C. trachomatis* L2 im heterologen *Y. enterocolitica* Sekretionssystem sekretiert wird (da Cunha, Milho *et al.* 2014).

Ctad2 ist daher kein neues Adhäsion, könnte aber ein neues Effektorprotein sein. In dieser Arbeit wurde Ctad2 von mehreren Patientenseren als Antigen erkannt (Abbildung 4.6). Ferner konnte ein leichter Ctad2-vermittelter Wachstumsdefekt durch die Expression in der Hefe *S. cerevisiae* ermittelt werden, ein typisches Charakteristikum von Effektoren (Sisko, Spaeth *et al.* 2006). *S. cerevisiae* ist ein beliebter Modellorganismus zur Analyse konservierter eukaryotischer Zielstrukturen, deren Modulation durch Effektoren sich schnell in einem Wachstumsdefekt äußert (Sisko, Spaeth *et al.* 2006, Zriq 2009, Herbst 2011). Außerdem wird die Transkription von *ctad2* (*ct142*), *ct143* und *ct144*, die vielleicht ein Operon bilden, durch den plasmidkodierten Virulenzfaktor Pgp4 reguliert (Song, Carlson *et al.* 2013). Dadurch zählen sie zu den virulenzassoziierten Genen, was zu einer Funktion als Effektor passen würde. Die transfizierte Expression von Ctad2-GFP in Humanzellen zeigte jedoch nur eine diffuse Verteilung des Proteins im Zytoplasma und keine spezifische Lokalisation an einer distinkten Struktur (Abbildung 4.13). Dies könnte durch die Blockade eines, bislang unerkannten, Motivs durch den GFP-Tag beeinflusst sein. So zeigen beispielsweise transfiziert exprimierte Inc-Proteine abhängig von N- oder C-terminaler Fusion mit dem Fluoreszenzprotein eine differentielle Lokalisation (Kostyukova, Korobova *et al.* 2005). Daher könnte eine N-terminale GFP-Ctad2 Fusion zu einer spezifischen Lokalisation führen.

Anfängliche Strukturvergleiche zu Ctad2 zeigten eine partielle Homologie zu TonB, einem Außenmembranrezeptor für Siderophore und Vitamine (s. Tabelle 4.1). Siderophore sind Oligopeptide, die von aeroben Bakterien und Pilzen zur Komplexierung von Eisenionen ausgeschieden und anschließend wieder aufgenommen werden (Miethke und Marahiel 2007). Neuere Strukturanalysen zum Ende dieser Arbeit mit dem bioinformatischen Programm *Phyre²* zeigten, dass Ctad2 strukturelle Ähnlichkeit mit dem calciumabhängigen Zell-Zell Adhäsionsmolekül DdCAD-1 besitzt (Wahrscheinlichkeit: 72%, Identität: 13 %, (Kelley und Sternberg 2009)). DdCAD-1 ist ein Protein der Amöbe *Dictyostelium discoideum*, das calciumabhängig Calmodulin bindet und anschließend Calmodulin-abhängig durch einen komplexen Transportme-

chanismus auf der Zelloberfläche präsentiert wird (Sriskanthadevan, Brar *et al.* 2013). DdCAD-1 besitzt z.T. Homologien mit humanen Oberflächenadhäsionsmolekülen wie E-Cadherinen und LFA-1 (Leukozyten Integrin α IIB β 3), die selbst Calcium (Ca^{2+}) binden oder calciumabhängig reguliert werden können. Charakteristisch für Ca^{2+} -bindende Proteine ist ein sogenanntes EF-Hand Motiv, wobei S- und E-Cadherine kein klassische EF-Motiv präsentieren, sondern über die Faltung des Proteins eine Bindetasche für Ca^{2+} formen (Wong, Brar *et al.* 1996).

Aufgrund der identifizierten Interaktion von Ctad1 zum Integrin-Rezeptor wurden die calciumabhängigen Integrinbindeproteine genauer betrachtet, wobei CIB-1 (*calcium- and integrin-binding protein 1*) auffiel. Ein Sequenzvergleich von Ctad2 mit CIB-1 zeigte, dass Ctad2 Homologie zu den EF-Motiven besitzt, wobei die Aminosäuren, die die Calciumbindung vermitteln nur z.T. konserviert sind (Abbildung 5.4). CIB-1 wurde initial im Hefe-zwei-Hybrid als Bindeprotein der α IIB-Untereinheit des Integrin-Rezeptors identifiziert, konnte jüngst jedoch als potentieller Bindepartner aller α -Untereinheiten beschrieben werden und besitzt darüber hinaus weitere Funktionen in der Zelle (Naik, Patel *et al.* 1997, Freeman, Black *et al.* 2013). So kann CIB-1 mit einer Reihe von Kinasen wie FAK, PAK1 (Serin/Threonin Protein Kinase), DNA-abhängige Proteinkinasen oder Polo-ähnliche Kinasen (Zellzyklusregulation), aber auch Rezeptoren wie Presenilin 2 und InsP3 (Inositol Triphosphat Rezeptor) interagieren (Wu und Lieber 1997, Kauselmann, Weiler *et al.* 1999, Stabler, Ostrowski *et al.* 1999, Naik und Naik 2003, Leisner, Liu *et al.* 2005, White, Yang *et al.* 2006).

CIB-1	101	TATPDIKSHYAFRI	FD	FDDG	TLNRE	LSR	VNCLT	GEGEDT	--RLSASE	148			
	:	: :: :				
Ctad2	6	KIINDCR	----	FDEN	----	TTIHGDI	----	TASNL	TTTECDV	VKSISAKE	43		
CIB-1	149	---	MKQLI	DNILE	ESD	DRD	CTINL	SEFQHV	ISRSPD	FASSEKIVL	----	191	
		: : :	: : :	: : :	: : :	: : :	: : :	: : :	: : :	: : :	: : :		
Ctad2	44	SFSV	KRNVD	----	VNENDI	IIVN	CF	TGAAGY	----	DLTTQ	KL	SINLNG	83

Abbildung 5.4: Sequenzvergleich von CIB-1 mit Ctad2.

Darstellung des Ergebnisses des Sequenzvergleichs der Proteine CIB-1 und Ctad2 mit *Emboss Needle*. Dunkelgrau hinterlegt: identische Aminosäuren (AS), Hellgrau hinterlegt: homologe AS, Rot: AS für Ca^{2+} Bindung nach (Gentry, Singer *et al.* 2005).

Ctad2 könnte daher aufgrund der strukturellen und sequenziellen Ähnlichkeit als Calciumbindeprotein während der Infektion fungieren und vielleicht tatsächlich ins Zytoplasma der Wirtszelle sekretiert werden. Dort könnte es die Signalgebung der Zelle beeinflussen, da Calcium ein wichtiger sekundärer Botenstoff der Zelle ist, oder vielleicht direkt bei der Integrinvermittelten Aufnahme der Bakterien auf den zytoplasmatischen Teil des Rezeptors einwirken. Diese Annahmen sind jedoch hoch spekulativ und müssen erst überprüft werden.

Cunha *et al.* postulieren aufgrund von qRT-PCR Daten eine Funktion von Ctad2 früh und/oder spät in der Infektion (da Cunha, Milho *et al.* 2014). Ctad2 könnte daher wie Tarp oder TepP (Clifton, Fields *et al.* 2004, Chen, Bastidas *et al.* 2014) in der frühen Infektion in die Wirtszelle sekretiert werden und bei der Aufnahme des EBs oder bei der Etablierung der replikativen Nische behilflich sein. Die Daten der späten Lokalisationsstudien zeigten, dass Ctad2 vermutlich intrachlamydial in EBs vorliegt, da es nicht auf EBs gefärbt werden konnte, jedoch in Westernblot detektierbar war (Abbildung 4.11, 4.7). Die gezeigte heterologe Typ-3-Sekretion des *C. trachomatis* L2 Homologs unterstützt diese Hypothese (da Cunha, Milho *et al.* 2014).

Warum Ctad2 Bindung an Humanzellen oder vielleicht zu bestimmten Strukturen der Membran vermittelt bleibt zum jetzigen Zeitpunkt unklar.

Ferner sollte in weiteren Analysen zu Ctad2 die Natur und Spezifität der mit dem Ctad2 Antikörper detektierten fädigen Strukturen bestimmt werden. (Abbildung 4.11 C). Fädige Strukturen ausgehend von der Inklusion in infizierten Zellen wurden bereits zuvor beschrieben, ihre Funktion ist jedoch noch unverstanden. Allerdings konnten schon verschiedene chlamydiale Proteine auf ihnen detektiert werden (Brown, Skeiky *et al.* 2002, Herbst 2011, Becker 2013), während die Ausbildung von Fäden in benachbarte, uninfizierte Zellen wie hier gefunden, vollkommen neuartig wäre.

5.4 Ctad4 – Noch ein neuer Effektor oder nur ein Haushaltsgen?

Ctad4 erfüllte anfänglich alle Kriterien eines potentiellen Adhäsins. Ctad4 (i) vermittelte Adhäsion an Humanzellen (Abbildung 4.2, 4.4), (ii) die Vorinkubation von Humanzellen mit rekombinanten Protein reduzierte die chlamydiale Infektion (Abbildung 4.3) und (iii) die Adhäsion der infektiösen, chlamydialen Partikel signifikant (Abbildung 4.5).

Mikroskopisch konnte Ctad4 ausschließlich spät in der Infektion (48 hpi) mit Bakterien assoziiert bzw. in räumlicher Nähe zu Bakterien detektiert werden (Abbildung 4.14 C). Allerdings besaß nur ein Bruchteil aller bakteriellen Partikel im Einschluss ein Signal für Ctad4, worunter sich sowohl RBs als auch EBs befanden. Die Signale an den RBs fielen allerdings etwas stärker aus. Auch diese Färbung wurde ausschließlich nach PFA-Fixierung durchgeführt. Daher besteht die Möglichkeit, dass das intrazellulär lokalisierte Antigen unzugänglich für den Antikörper war. Die Expression von Ctad4 konnte mittels Westernblot Analyse eindeutig erstmals nach 30 hpi beobachtet werden (Abbildung 4.7) und auch mikroskopisch konnte 24 hpi kein spezifisches Signal detektiert werden. Zu berücksichtigen ist jedoch die geringe Sensitivität des Ctad4 Antikörpers da sich die Antikörperaufreinigung aufgrund des schwachen Ausgangs-

rums als außerordentlich schwierig erwies. Eine unvollständige Erfassung aller präsentierten Epitope kann deswegen leider nicht ausgeschlossen werden.

Warum Ctad4 trotzdem Adhäsivität zeigte und neutralisierend auf die Infektion und Adhäsion wirkte, kann anhand einer generellen Affinität zu Membranen erklärt werden. So konnte transfiziert exprimiertes Ctad4-GFP nicht nur in vesikulären Strukturen, sondern auch an der Plasmamembran der Humanzelle detektiert werden (Abbildung 4.15 A). Ob dabei die Affinität zu einem Membranprotein oder zu den Lipiden selbst besteht (s. unten), kann nur spekuliert werden. Da die Zusammensetzung der inneren und äußeren Plasmamembranschicht stark variiert, ist eine Affinität zu Lipiden wahrscheinlicher, obwohl natürlich auch hier Unterschiede in der Verteilung bestehen (Zachowski 1993). Durch die Interaktion mit der Membran könnte die Zugänglichkeit zu Rezeptoren oder die Fluidität der Membran (Lipid Rafts) beeinträchtigt sein, wodurch die Adhäsion und Internalisierung der Bakterien behindert werden könnte.

Transfiziert exprimiertes Ctad4 lokalisierte hauptsächlich in vesikulären Strukturen im Zytoplasma der Humanzelle, die als Lipidtröpfchen (*lipid droplets*, LDs) identifiziert wurden (Abbildung 4.15 B). Wobei die Lokalisation an LDs nur dann auftrat, wenn Ctad4 mit dem Lda3 Homolog CPn0592 cotransfiziert exprimiert wurde. Lda3 ist ein chlamydiales Protein, das wahrscheinlich an der Rekrutierung von LDs in die Inklusion beteiligt ist und dabei das Ablösen des LD-assoziierten Proteins ADRP (*adipocyte differentiation related protein*) vermittelt. Heterolog exprimiertes Lda3-GFP lokalisiert an LDs, wohingegen endogenes Lda3 zytosolisch an der Inklusionsmembran lokalisiert (Kumar, Cocchiario *et al.* 2006, Cocchiario, Kumar *et al.* 2008). Auffallend ist, dass Ctad4-mCherry nicht an LDs lokalisiert, deren Bildung durch Ölsäurebehandlung gesteigert wurde (Abbildung 4.15 C). Ob die Lokalisation von Ctad4 an LDs CPn0592 (Lda3) bedingt ist oder die Natur der LDs durch die Zugabe von Ölsäure so beeinflusst wurde, dass Ctad4 nicht mit ihnen interagieren kann, bleibt spekulativ und benötigt weitere Aufklärung.

Hinweise auf eine mögliche Funktion von Ctad4 ergaben neuere Domänenanalysen, die zum Ende dieser Arbeit mit *CDD* (*conserved domain database* (Marchler-Bauer, Anderson *et al.* 2009) durchgeführt wurden. Hierbei fiel erstmals eine konservierte Domäne der Crotonase/Enoyl-Coenzym A Hydrolase Superfamilie im C-Terminus des Proteins (AS 84 – 149, E-value $5,31e^{-03}$) auf. Enzyme dieser Superfamilie sind am Fettsäuremetabolismus beteiligt. Generierte Fettsäuren können u.a. in der Lipidbiosynthese weiter verarbeitet oder als Triacylglycerine (TG) in LDs gespeichert werden. Die Lipidbiosynthese sowie die Generierung von TG erfolgt größtenteils im ER, wo wahrscheinlich auch die LDs entstehen (van Meer, Voelker *et al.* 2008, Krahmer, Guo *et al.* 2009, Walther und Farese 2012). Aufgrund einer ähnlichen Funktion und

einer dadurch bedingten Affinität zu lipophilen Komponenten könnte die Lokalisation von transfiziert exprimiertem Ctad4 in LDs erklärt werden.

Die Sekretion von Ctad4 als Effektorprotein ins Zytoplasma der Wirtszelle ist eher unwahrscheinlich, da es kein vorhergesagtes Typ-3-Sekretionssubstrat ist, von Patientenseren nicht als Antigen erkannt wurde (Abbildung 4.6) und bis jetzt nicht im Zytoplasma detektiert werden konnte. Natürlich besteht die Möglichkeit, dass Ctad4 zu einem früheren, als den hier untersuchten Zeitpunkten, sekretiert wird oder die Proteinmenge unterhalb des Detektionslimits liegt. Ob Ctad4 dann ggf. die humane Lipidbiosynthese direkt beeinflusst ist spekulativ. Wahrscheinlicher erscheint, dass Ctad4 in der Infektion als Haushaltsgen fungiert, vielleicht auch mit Zugang zum Inklusionslumen. Eine Beteiligung bei der Akquirierung und Modifikation humaner Lipide oder an der *de novo* Synthese von Lipiden wäre denkbar. Beide Prozesse konnten bereits für *C. trachomatis* beschrieben werden (Wylie, Hatch *et al.* 1997). Eine funktionelle Beteiligung von Ctad4 an diesen Prozessen wäre experimentell noch zu belegen.

5.5 Ctad8 – Ein Inklusionsmembranprotein

Ctad8 wurde als spät in der Infektion exprimiertes Protein, mit partieller Homologie zu einem β -Barrel Außenmembranprotein, in die Kandidatenauswahl aufgenommen (s. Tabelle 4.1). Die Expression des Proteins konnte anhand einer Infektionszeitkinetik erstmals ab 18 hpi bestätigt werden (Abbildung 4.7). In den anfänglichen Studien zur Adhäsivität und zum Neutralisationsverhalten des Proteins vermittelte Ctad8 deutlich Bindung an Humanzellen und reduzierte die Infektion effizient (Abbildung 4.2, 4.3). Weiterführende Untersuchungen der Bindeeigenschaft mit löslichem Protein ergaben lediglich eine schwache Adhäsion des Proteins bei 37 °C und keinerlei Bindung bei 4 °C (Abbildung 4.4). Des Weiteren hatte die Vorbehandlung von Humanzellen mit löslichem Protein keinen signifikanten Einfluss auf die Adhäsion CFSE-markierter EBs (Abbildung 4.5). Schlussendlich zeigte die Lokalisationsanalyse mit dem generierten spezifischen Antikörper, dass Ctad8 ab 24 hpi und bis zum Ende der Infektion an der Inklusionsmembran lokalisierte und daher kein Adhäsion repräsentiert (Abbildung 4.8 und 4.10).

Aufgrund ungenauer Annotation in den einschlägigen Datenbanken wurde erst im Verlauf der Arbeit bemerkt, dass Ctad8 bereits als ChlaDub1 (Cdu1) identifiziert wurde, da es eine Deubiquitinase- (DUB) und Deneddylasefunktion besitzt (Misaghi, Balsara *et al.* 2006). Die zuerst beobachtete Bindung des Proteins an Humanzellen könnte daher vielleicht durch unspezifische Wechselwirkung des katalytischen Zentrums zu Komponenten der Wirtszellmembran entstanden sein. Das katalytische Zentrum bei DUBs ist aus einem Cys-His-(Asp/Asn)-Motiv

aufgebaut (Komander, Clague *et al.* 2009), überwiegend geladene Aminosäuren, die elektrostatische Wechselwirkungen vermitteln können. Eine Interaktion mit einem zellulären Rezeptor könnte sich dabei direkt oder indirekt negativ auf die Internalisierung der Bakterien im Neutralisationsexperiment auswirken.

Eine weitere Studie zu Cdu1 beschrieb eine supprimierende Funktion des Proteins auf die NF κ B Aktivierung in Transfektionsexperimenten. Cdu1 inhibiert dabei spezifisch die Ubiquitinierung von I κ B α und folgend den Abbau im Proteasom, wodurch die Aktivierung von NF κ B verhindert wird (Le Negrate, Krieg *et al.* 2008). Diese Arbeit postuliert eine Sekretion des Proteins in das Zytoplasma der Wirtszelle, die in der dort präsentierten Mikroskopie schwer zu erkennen ist. Das von der Arbeitsgruppe verwendete Vollängen-Cdu1 Transfektionskonstrukt lokalisiert jedoch interessanterweise an Membranen. Wohingegen der transfizierete C-Terminus, der die DUB-Domäne beherbergt, im Zytoplasma lokalisiert. Daher wird für endogenes Cdu1 eine proteolytische Abspaltung der katalytischen Domäne von der Transmembrandomäne vorgeschlagen, wodurch die Freisetzung ins Zytoplasma gewährleistet würde (Le Negrate, Krieg *et al.* 2008).

Die in dieser Arbeit durchgeführte Lokalisationsanalyse zeigte eindeutig, dass Ctad8 (Cdu1) wenige Stunden nach seiner Expression an der Inklusionsmembran lokalisiert, wobei das Signal im Infektionsverlauf an Stärke gewann (Abbildung 3.8). Ctad8 (Cdu1) könnte durch die Transmembrandomäne im N-Terminus des Proteins (AS 40-60, Vorhersage mit *Phobius*, (Kall, Krogh *et al.* 2004), durch Typ-3-Sekretion in die Inklusionsmembran integriert werden (Vorhergesagt mit *Effective* (Jehl, Arnold *et al.* 2011)). Eine Sekretion ins Zytoplasma der Wirtszelle ist aufgrund der hier präsentierten Lokalisationsanalyse unwahrscheinlich. Potentiell Ctad8 (Cdu1) Spaltprodukte hätte der Antikörper detektiert, da er gegen einen Antigen ohne Transmembrandomäne (Δ 1-60 AS) generiert wurde. Ctad8 wurde dennoch von allen getesteten Patientenseren als Antigen detektiert (Abbildung 4.6). Daher muss es Kontakt zum Zytoplasma haben, um vom Immunsystem erkannt zu werden. Eine Integration von Ctad8 in die Inklusionsmembran ist demnach anzunehmen, wobei der C-Terminus zur Interaktion mit Wirtsproteinen ins Zytoplasma ragt.

So könnte die Interaktion mit I κ B α an der Inklusionsmembran erfolgen. Eine solche Funktion von Ctad8 (Cdu1) mit humanen Proteinen wurde jüngst diskutiert. Mcl-1 ist ein antiapoptotischer Faktor, der während der chlamydialen Infektion hochreguliert und stabilisiert wird (Rajalingam, Sharma *et al.* 2008). Die Stabilisierung erfolgt durch Ctad8 (Cdu1)-vermittelte Deubiquitinierung von Mcl-1 an der Inklusionsmembran, was zur Unterdrückung der Apoptose beiträgt (Huber 2014). Neben Mcl-1 wird, mindestens ein weiteres Protein, PTPN9,

durch Ctad8 (Cdu1) stabilisiert, dessen Rolle in der chlamydiale Infektion jedoch noch nicht entschlüsselt wurde (McBeth, Starnbach unveröffentlicht).

5.6 Modell der potentiellen Ctad-Funktionen

Im Rahmen dieser Arbeit konnten für fünf der zumeist hypothetischen Proteine eine potentielle Funktion in der Infektion beschrieben werden (Abbildung 5.5).

Darunter konnte Ctad1 erfolgreich als neues *C. trachomatis* Serovar E Adhäsion und Invasin, mit vielleicht speziesübergreifender Funktion, beschrieben werden. Ctad1 vermittelt durch die Interaktion mit Integrin- β 1 die Bindung an Wirtszellen, welche essentiell für die erfolgreiche Etablierung der Infektion ist und eine Signalgebung in die Wirtszelle auslöst (ausführliches Adhäsionsmodell s. Abbildung 5.3).

Als potentielle neue Effektoren gingen aus dieser Arbeit die Proteine Ctad2 und Ctad9 (TepP) hervor. Ctad9 wird in der frühen Infektion wahrscheinlich in die Humanzelle sekretiert. Neben der bereits publizierten potentiell immunsupprimierenden Funktion von TepP (Chen, Bastidas *et al.* 2014) weisen Daten dieser Arbeit auf weitere Funktionen hin. Aufgrund der Lokalisation an Membranen und endosomalen Vesikeln könnte Ctad9 an der Bakterienaufnahme beteiligt sein. Ferner konnte eine Assoziation von Ctad9 und Rab11 beobachtet werden. Daher könnte eine Ctad9-abhängige Rekrutierung von Rab11 an die frühe Inklusion erfolgen, die zur Etablierung der replikativen Nische beiträgt. Indem beispielsweise die Abkehr vom endosomalen Weg und/oder die Rab11-abhängige Akquise von Sphingolipiden eingeleitet werden.

Ctad2 konnte erstmals 24 hpi in der Infektion detektiert werden, wobei es überwiegend im Inklusionslumen lokalisierte. Ob Ctad2 über das Typ-3-Sekretionssystem ins Zytoplasma der Wirtszelle sekretiert wird, ist unklar, könnte aber aufgrund der gezeigten heterologen Sekretion des *C. trachomatis* L2 Homologes spekuliert werden (da Cunha, Milho *et al.* 2014). Dort könnte es durch die Komplexierung mit Calcium verschiedene Signalwege beeinflussen.

Für Ctad8 (Cdu1) konnte ab 24 hpi eine Lokalisation an der Inklusionsmembran bestimmt werden. An der Membran kann die C-terminal lokalisierte katalytische Deubiquitinase-Domäne mit einer Reihe an Wirtsproteinen interagieren. Beispielsweise vermittelt Ctad8 die Deubiquitinierung von Mcl-1 wodurch Apoptosewege unterdrückt werden (Huber 2014).

Ctad4 wurde bis jetzt ausschließlich spät in der Infektion an/in der Nähe von einigen EBs und verstärkt an RBs detektiert. Eine Funktion als Haushaltsprotein des Lipidmetabolismus wird aufgrund einer konservierten Domäne der Crotonase/Enoyl-Coenzym A Hydrolase Superfamilie im C-Terminus und der Affinität von transkribiert exprimiertem Ctad4 zu lipophilen Struk-

turen favorisiert. Hierbei könnte es entweder an der Akquirierung und Modifikation von Lipiden oder an der *de novo* Synthese beteiligt sein.

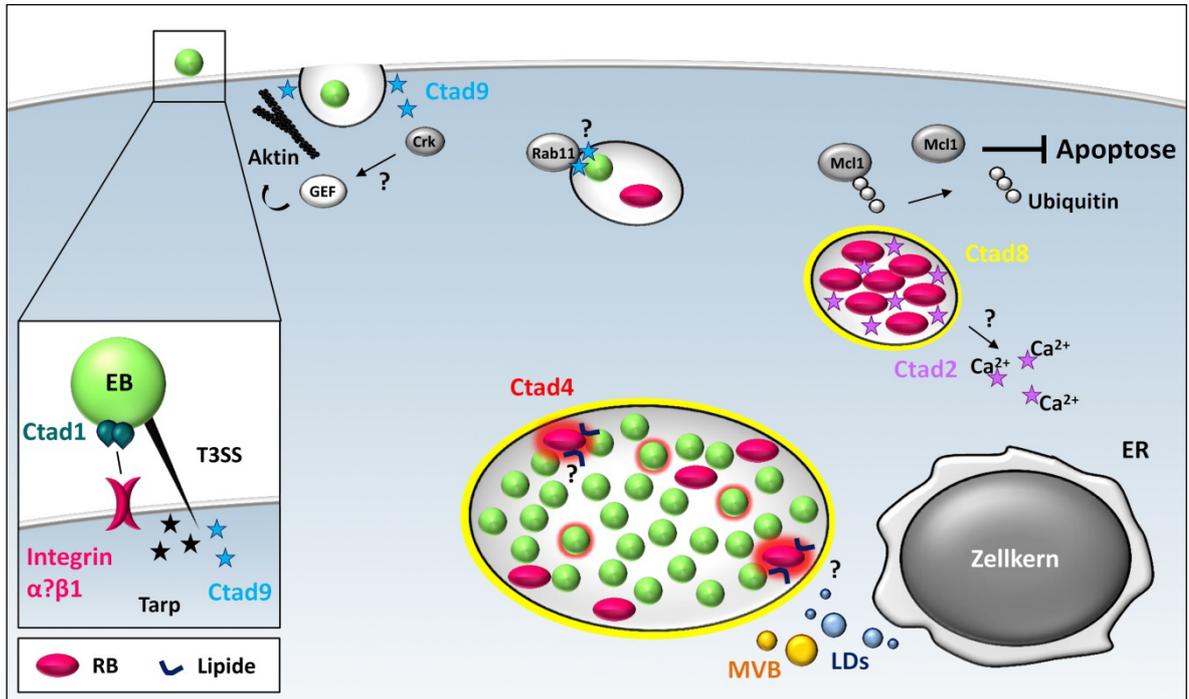


Abbildung 5.5: Modell der ermittelten und potentiellen Funktionen der Ctad Proteine.

GEF (*guanine nucleotide exchange factor*), MVB (*multivesicular body*), LD: Lipidtröpfchen, ER: endoplasmatisches Retikulum

Anhang

A.1 Ergänzende Abbildungen zu Ergebnisteil und Diskussion

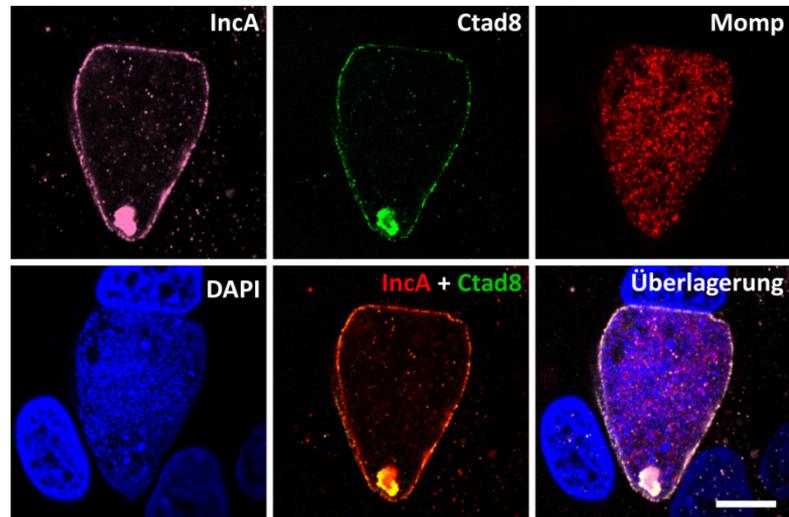


Abbildung A.1.1: Kofärbung von Ctad8 und IncA 48 hpi.

Durchführung siehe Abbildung 4.10 IncA + Ctad8: IncA fehlfarbent in rot dargestellt. Größenstandard: 10 μ m

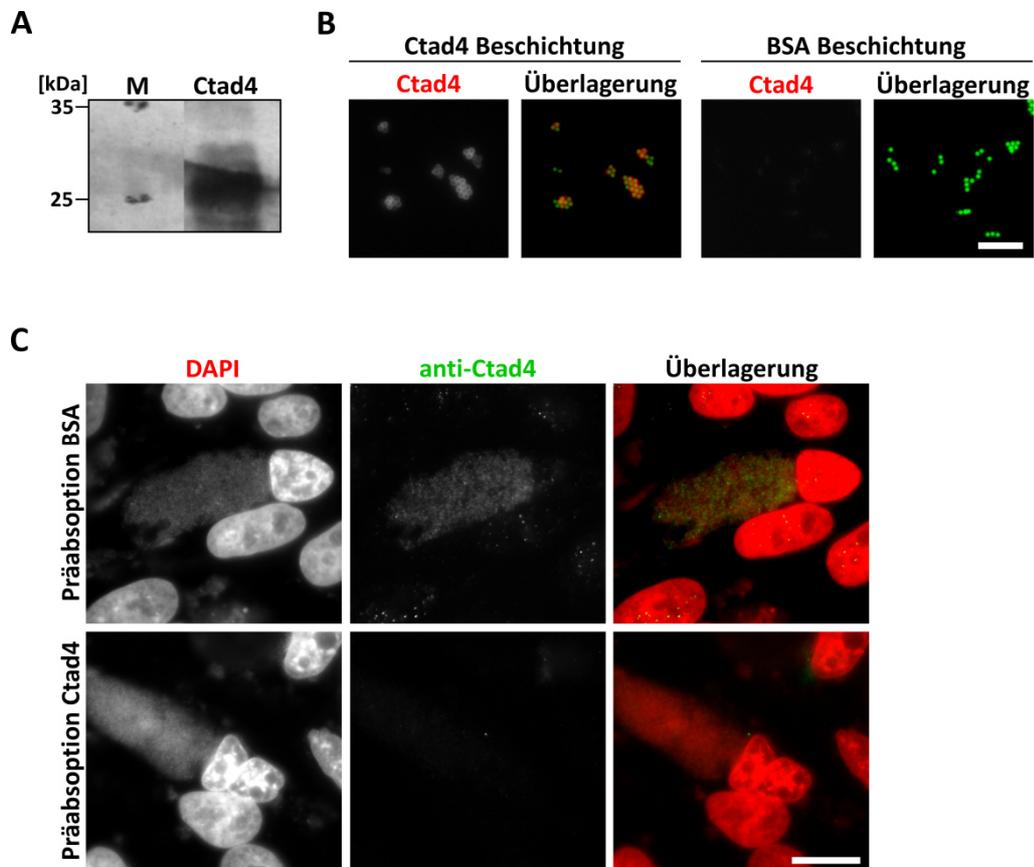


Abbildung A.1.2: Bestimmung der Spezifität des Anti-Ctad4 Antikörpers durch Präabsorption.

- A)** Ermittlung der Beschichtungsqualität rCtad4 gekoppelter Kügelchen für die Antikörper Absorption. Durchführung s. Abbildung 4.9. Die Detektion erfolgte mit α -His (1:2500) und AP- α -Maus Antikörper (1:7500). Ctad4: 23 kDa
- B)** Färbung der Kügelchen nach der Absorption mit Alexa594- α -Kaninchen Antikörper (1:200). Größenstandard: 10 μ m
- C)** 48 hpi 3 % PFA-Fixierung und 0,2 % Triton Permeabilisierung. Die Färbung erfolgte mit BSA oder Ctad4 präabsorbiertem α -Ctad4 Antikörper (1:1), sekundärem Alexa488- α -Maus Antikörper (1:200) und DAPI (1:1000). Größenstandard: 10 μ m.

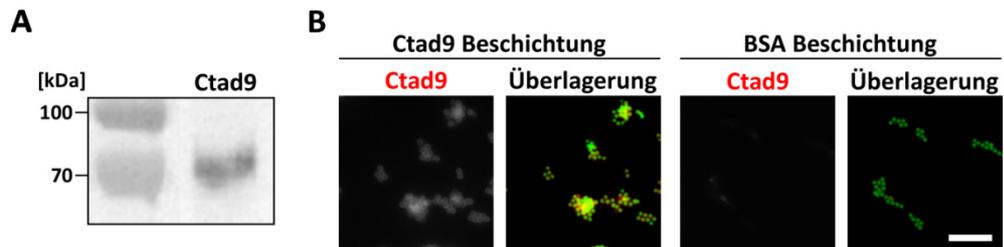


Abbildung A.1.3: Kontrolle der Präabsorption von α -Ctad9 Antikörper.

- A)** Bestimmung der Beschichtungsqualität mittels Westernblot. Die Detektion erfolgte mittels α -His (1:2500) und AP-konjugiertem α -Maus Antikörper (1:7500). Ctad9: 67 kDa.
- B)** Färbung der Kügelchen nach der Präabsorption mit Alexa594- α -Kaninchen Antikörper (1:200).

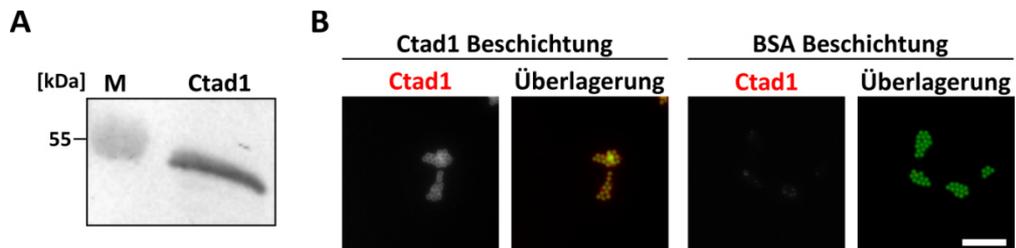


Abbildung A.1.4: Kontrolle der Präabsorption von α -Ctad1 Antikörper.

- A)** Bestimmung der Proteinbeschichtung rCtad1 gekoppelter Kügelchen für die Antikörper Absorption. Durchführung s. Abbildung 4.9. Detektion erfolgte mit α -His (1:2500) und AP- α -Maus Antikörper (1:7500). Ctad1: 49 kDa. M: Proteinstandard.
- B)** Färbung der Kügelchen nach der Antikörper Präabsorption mit Alexa594- α -Kaninchen Antikörper (1:200). Größenstandard: 10 μ m.

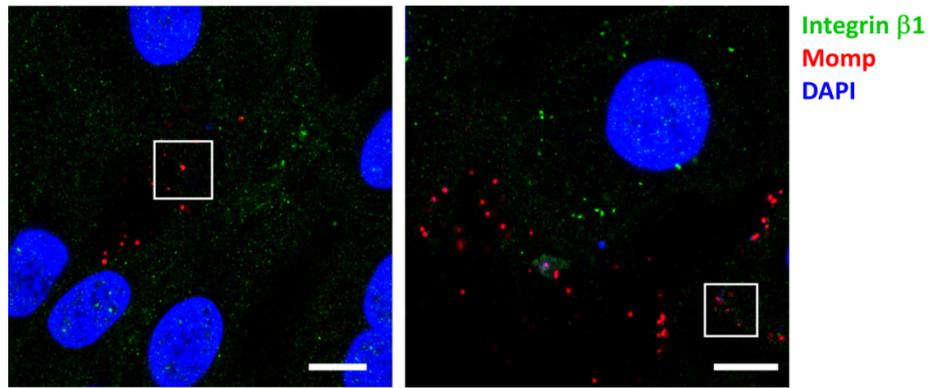


Abbildung A.1.5: Vollbild zur *C. trachomatis* Infektion auf primären Eileiterzellen.

Ergänzende Abbildung zu den Vergrößerungen (weiß gerahmt) aus Abbildung 4.30. Größenstandard: 5 µm.

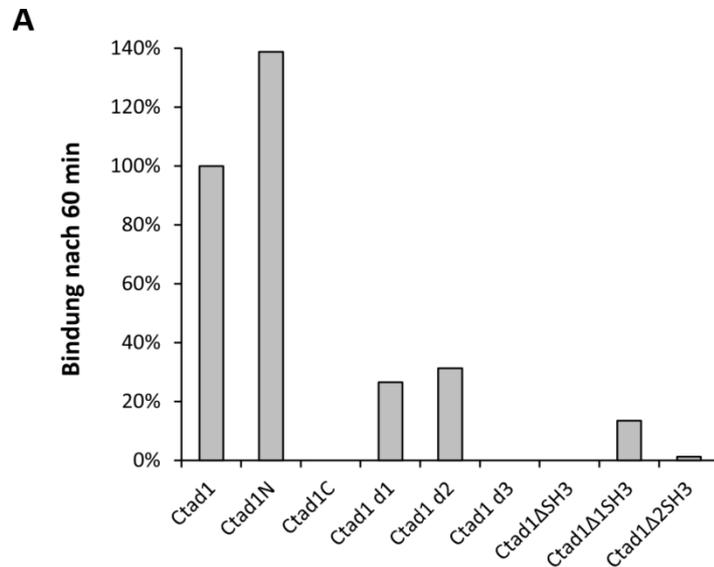


Abbildung A.1.6: Details zur Bindedomänenanalyse von Ctad1.

A) Quantifizierung der Adhäsion des löslichen Proteins an HEp-2 Zellen Abbildung 4.34 zum Endzeitpunkt (60 min) durch Bestimmung der Bandenintensität mit dem Programm ImageJ. Normierung auf den Input.

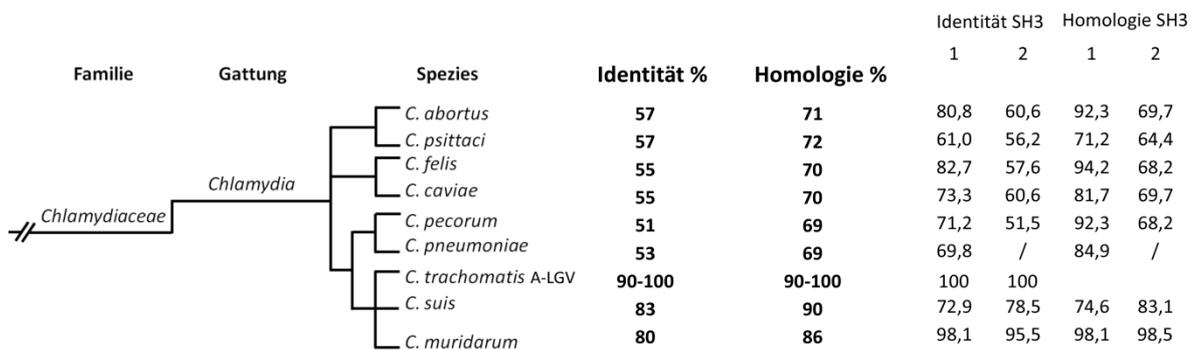


Abbildung A.1.7: Ctad1 Sequenzvergleich zu Vertretern der Gattung *Chlamydia*.

Ermittlung der Sequenzidentität und -homologie von Ctad1 aus *C. trachomatis* Serovar E Stamm DK-20 mit seinen Homologen der Gattung *Chlamydia* mit dem Programm *Emboss Needle*. Die geringste und höchste Identitäten bzw. Homologien der verschiedenen *C. trachomatis* Serovare wurden zusammengefasst abgebildet. Anordnung im verwandtschaftlichen Verhältnis. Die Positionen der SH3-Domänen (1+2) in den verschiedenen Ctad1 Homologen wurden mittels Pfam Search vorhergesagt, dabei wichen die Positionen der zweiten SH3-Domäne von Ctad1 leicht von der durch NCBI vorhergesagten Position ab. Für den Sequenzvergleich wurden daher einheitlich die mit Pfam Search ermittelten Positionen zugrundegelegt.

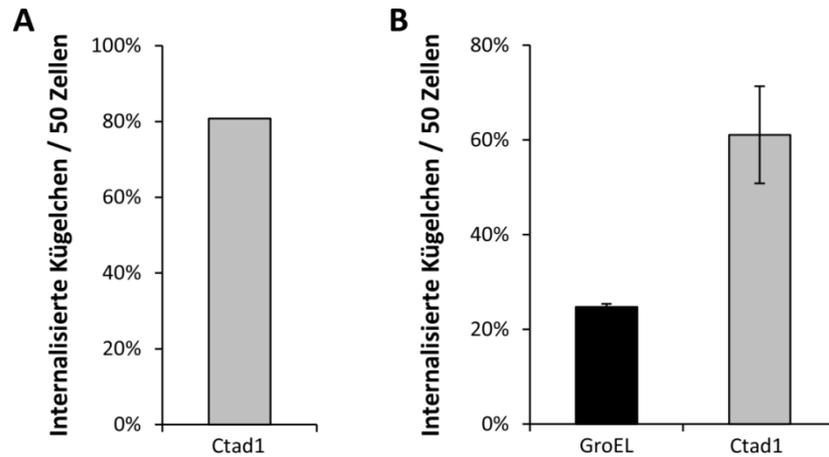


Abbildung A.1.8: Internalisierung Ctad1 gekoppelter Kügelchen auf Hec-1B Zellen.

Darstellung der Rate internalisierter Kügelchen bezogen auf die Gesamtheit aller adherierten und internalisierten Kügelchen.

A) Internalisierungsexperiment auf Hec-1B Zellen. Durchführung siehe Abbildung 4.31. (n=1).

B) Internalisierungsexperiment mit α -Integrin- β 1 Antikörper (1:10) vorbehandelten Hec-1B Zellen. (n=2).

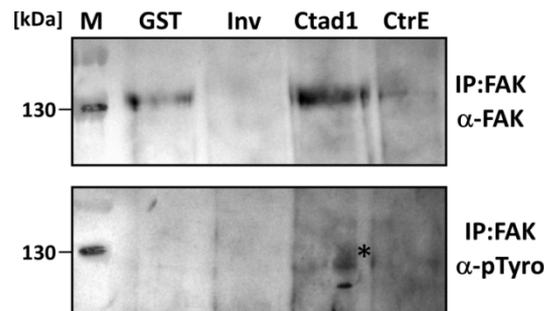


Abbildung A.1.9: Ctad1-vermittelte Aktivierung von FAK.

Konfluente HEp-2 Zellen wurden 24 h in serumfreiem Medium kultiviert. 100 μ g/ml Protein bzw. gradienten gereinigte EBs (CtrE) (MOI: 0,5) wurden 15 min bei 37 °C mit den Zellen inkubiert. Zellen wurden mit TBS gewaschen, mit Phospho-Lysispuffer + 0,1 mM PMSF + 0,3 % SDS lysiert und FAK mit α -FAK Antikörper gekoppelt an Protein G-Agarose immunopräzipitiert. Die Analyse des Lysats erfolgte mit α -FAK Antikörper (1:500) bzw. mit α -phosphoTyrosin Antikörper (1:200) gefolgt von α -Maus-AP Antikörper (1:7500). M: Proteinstandard. Stern markiert schwache phosphoFAK Bande. FAK: 121 kDa.

```

      230      240      250      260      270      280      290      300      310      320      330
CtrE  QSLVQKALERVQEAFLAKSLEKSSVKVPEIRHKVLEETIAVVSPT--AYEETPVVTKTEEQKVTTPVPAPAVYT---EPAQDLSSVKGSLLSHYIRKKGFVKAS
CtrL  QSLVQKALERVQEAFLAKSLEKSAVKVPEIQHKVLEETIAVVSPT--AYEETPVVTKIEEQKVTTPVPAPAVYT---ELAQDLSSVKGSLLSHYIRKKGFVKAS
Cmuri QPLVQKALERVQEAFLAKSLEKSHKTVESYKPYETQAQLPQRQVIEEKVSVVPEAPVLSQVEEPKSVLTSSSEVEPLQDVGPVKGSLLSHYIRKKGFVKAS
Csuis QPHVQKALERVQEAFLAKSLEKNVQKQEAQHKIVEETIASSS----LEVPVLTAVEEAKVSDVPPYAA-----EPIQDLGSVKGSLLSHYIRKKECVKAS
Consensus QP$VQKALERVQEAFLAKSLEKssvKvpEiqhKvLEeiavvsp...aveEtpVtk.EeqkvstVvpapavvt.....EpaQDLgs!KGSLLSHYIRKKgfVKAS

```

Abbildung A.1.10: Ctad1 Sequenzvergleich der verwandten Spezies *C. trachomatis*, *C. muridarum*, *C. suis*.

Durchgeführt wie in Abbildung 5.1 beschrieben, zur Verdeutlichung der Unterschiede in der variablen Region.

Literaturverzeichnis

- Abdelrahman, Y. M. und Belland, R. J.** (2005). "The chlamydial developmental cycle." *FEMS Microbiol Rev* 29(5): 949-959.
- Abromaitis, S. und Stephens, R. S.** (2009). "Attachment and entry of *Chlamydia* have distinct requirements for host protein disulfide isomerase." *PLoS Pathog* 5(4): e1000357.
- Albrecht, M., Sharma, C. M., et al.** (2010). "Deep sequencing-based discovery of the *Chlamydia trachomatis* transcriptome." *Nucleic Acids Res* 38(3): 868-877.
- Alonso, A. und Garcia-del Portillo, F.** (2004). "Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens." *Int Microbiol* 7(3): 181-191.
- Alrutz, M. A. und Isberg, R. R.** (1998). "Involvement of focal adhesion kinase in invasion-mediated uptake." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(23): 13658-13663.
- Alrutz, M. A., Srivastava, A., et al.** (2001). "Efficient uptake of *Yersinia pseudotuberculosis* via integrin receptors involves a Rac1-Arp 2/3 pathway that bypasses N-WASP function." *Mol Microbiol* 42(3): 689-703.
- Balañá, M. E., Niedergang, F., et al.** (2005). "ARF6 GTPase controls bacterial invasion by actin remodelling." *J Cell Sci* 118(Pt 10): 2201-2210.
- Barbour, A. G., Amano, K., et al.** (1982). "*Chlamydia trachomatis* has penicillin-binding proteins but not detectable muramic acid." *J Bacteriol* 151(1): 420-428.
- Bastidas, R. J., Elwell, C. A., et al.** (2013). "Chlamydial intracellular survival strategies." *Cold Spring Harb Perspect Med* 3(5): a010256.
- Baumann, D.** (2013). Bachelorarbeit "Identifizierung der Bindedomäne des chlamydialen Adhäsins Ctad1." Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen, Heinrich-Heine-Universität.
- Bebear, C. und de Barbeyrac, B.** (2009). "Genital *Chlamydia trachomatis* infections." *Clin Microbiol Infect* 15(1): 4-10.
- Becker, E.** (2013). Dissertation "Charakterisierung der chlamydialen Pmp Adhäsin Familie." Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Becker, E. und Hegemann, J. H.** (2014). "All subtypes of the Pmp adhesin family are implicated in chlamydial virulence and show species-specific function." *Microbiologyopen* 3(4): 544-556.
- Belland, R. J., Zhong, G., et al.** (2003). "Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(14): 8478-8483.
- Beswick, E. J., Travelstead, A., et al.** (2003). "Comparative studies of glycosaminoglycan involvement in *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis* invasion of host cells." *J Infect Dis* 187(8): 1291-1300.
- Birge, R. B., Kalodimos, C., et al.** (2009). "Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling." *Cell Commun Signal* 7: 13.
- Blasi, F., Tarsia, P., et al.** (2009). "*Chlamydia pneumoniae*." *Clin Microbiol Infect* 15(1): 29-35.
- Blood, P. D. und Voth, G. A.** (2006). "Direct observation of Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-induced membrane curvature by means of molecular dynamics simulations." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(41): 15068-15072.
- Brown, D. A. und London, E.** (1998). "Functions of lipid rafts in biological membranes." *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 111-136.
- Brown, W. J., Skeiky, Y. A., et al.** (2002). "Chlamydial antigens colocalize within IncA-laden fibers extending from the inclusion membrane into the host cytosol." *Infect Immun* 70(10): 5860-5864.

- Bruce-Staskal, P. J., Weidow, C. L., et al.** (2002). "Cas, Fak and Pyk2 function in diverse signaling cascades to promote *Yersinia* uptake." *J Cell Sci* 115(Pt 13): 2689-2700.
- Brumell, J. H. und Scidmore, M. A.** (2007). "Manipulation of rab GTPase function by intracellular bacterial pathogens." *Microbiol Mol Biol Rev* 71(4): 636-652.
- Bullock, H. D., Hower, S., et al.** (2012). "Domain analyses reveal that *Chlamydia trachomatis* CT694 protein belongs to the membrane-localized family of type III effector proteins." *J Biol Chem* 287(33): 28078-28086.
- Burton, E. A., Plattner, R., et al.** (2003). "Abl tyrosine kinases are required for infection by *Shigella flexneri*." *Embo J* 22(20): 5471-5479.
- Caldwell, H. D., Kromhout, J., et al.** (1981). "Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*." *Infect Immun* 31(3): 1161-1176.
- Caliskan, M.** (2014). Bachelorarbeit "Funktionsstudien am *Chlamydia trachomatis* Adhäsion Ctd1." Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen, Heinrich-Heine-Universität.
- Campbell, L. und Kuo, C.** (2006). "Interactions of *Chlamydia* with the host cells that mediate attachment and uptake." *Chlamydia: Genomics and Pathogenesis*: 505-522.
- Campbell, L. A., Puolakkainen, M., et al.** (2012). "*Chlamydia pneumoniae* binds to the lectin-like oxidized LDL receptor for infection of endothelial cells." *Microbes Infect* 14(1): 43-49.
- Capmany, A. und Damiani, M. T.** (2010). "*Chlamydia trachomatis* intercepts Golgi-derived sphingolipids through a Rab14-mediated transport required for bacterial development and replication." *PLoS One* 5(11): e14084.
- Carabeo, R. A., Dooley, C. A., et al.** (2007). "Rac interacts with Abi-1 and WAVE2 to promote an Arp2/3-dependent actin recruitment during chlamydial invasion." *Cell Microbiol* 9(9): 2278-2288.
- Carabeo, R. A., Grieshaber, S. S., et al.** (2002). "*Chlamydia trachomatis* induces remodeling of the actin cytoskeleton during attachment and entry into HeLa cells." *Infect Immun* 70(7): 3793-3803.
- Carabeo, R. A., Grieshaber, S. S., et al.** (2004). "Requirement for the Rac GTPase in *Chlamydia trachomatis* invasion of non-phagocytic cells." *Traffic* 5(6): 418-425.
- Carabeo, R. A. und Hackstadt, T.** (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): 5899-5904.
- Carabeo, R. A., Mead, D. J., et al.** (2003). "Golgi-dependent transport of cholesterol to the *Chlamydia trachomatis* inclusion." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(11): 6771-6776.
- Caswell, P. T., Vadrevu, S., et al.** (2009). "Integrins: masters and slaves of endocytic transport." *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(12): 843-853.
- Chen, Y. S., Bastidas, R. J., et al.** (2014). "The *Chlamydia trachomatis* type III secretion chaperone Slc1 engages multiple early effectors, including TepP, a tyrosine-phosphorylated protein required for the recruitment of CrkI-II to nascent inclusions and innate immune signaling." *PLoS Pathog* 10(2): e1003954.
- Cid, M. C., Esparza, J., et al.** (1999). "Estradiol enhances endothelial cell interactions with extracellular matrix proteins via an increase in integrin expression and function." *Angiogenesis* 3(3): 271-280.
- Clausen, J. D., Christiansen, G., et al.** (1997). "*Chlamydia trachomatis* utilizes the host cell microtubule network during early events of infection." *Mol Microbiol* 25(3): 441-449.
- Clifton, D. R., Fields, K. A., et al.** (2004). "A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(27): 10166-10171.

- Cocchiaro, J. L., Kumar, Y., *et al.* (2008). "Cytoplasmic lipid droplets are translocated into the lumen of the *Chlamydia trachomatis* parasitophorous vacuole." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(27): 9379-9384.
- Collingro, A., Tischler, P., *et al.* (2011). "Unity in variety--the pan-genome of the *Chlamydiae*." *Mol Biol Evol* 28(12): 3253-3270.
- Collo, G. und Pepper, M. S. (1999). "Endothelial cell integrin alpha5beta1 expression is modulated by cytokines and during migration in vitro." *J Cell Sci* 112 (Pt 4): 569-578.
- Conant, C. G. und Stephens, R. S. (2007). "*Chlamydia* attachment to mammalian cells requires protein disulfide isomerase." *Cell Microbiol* 9(1): 222-232.
- Coombes, B. K. und Mahony, J. B. (2002). "Identification of MEK- and phosphoinositide 3-kinase-dependent signalling as essential events during *Chlamydia pneumoniae* invasion of HEP2 cells." *Cell Microbiol* 4(7): 447-460.
- Cossart, P. und Sansonetti, P. J. (2004). "Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens." *Science* 304(5668): 242-248.
- Cruz-Fisher, M. I., Cheng, C., *et al.* (2011). "Identification of immunodominant antigens by probing a whole *Chlamydia trachomatis* open reading frame proteome microarray using sera from immunized mice." *Infection and immunity* 79(1): 246-257.
- da Cunha, M., Milho, C., *et al.* (2014). "Identification of type III secretion substrates of *Chlamydia trachomatis* using *Yersinia enterocolitica* as a heterologous system." *BMC Microbiol* 14: 40.
- Davis, C. H., Raulston, J. E., *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): 3413-3418.
- Davis, C. H. und Wyrick, P. B. (1997). "Differences in the association of *Chlamydia trachomatis* serovar E and serovar L2 with epithelial cells *in vitro* may reflect biological differences *in vivo*." *Infect Immun* 65(7): 2914-2924.
- Davis, T. A., Loos, B., *et al.* (2014). "AHNAK: the giant jack of all trades." *Cell Signal* 26(12): 2683-2693.
- Dersch, P. und Isberg, R. R. (1999). "A region of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self-association." *Embo J* 18(5): 1199-1213.
- Detels, R., Green, A. M., *et al.* (2011). "The incidence and correlates of symptomatic and asymptomatic *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections in selected populations in five countries." *Sex Transm Dis* 38(6): 503-509.
- Di Nardo, A. A., Larson, S. M., *et al.* (2003). "The relationship between conservation, thermodynamic stability, and function in the SH3 domain hydrophobic core." *J Mol Biol* 333(3): 641-655.
- Doherty, G. J. und McMahon, H. T. (2009). "Mechanisms of endocytosis." *Annu Rev Biochem* 78: 857-902.
- Elwell, C. A., Ceesay, A., *et al.* (2008). "RNA interference screen identifies Abl kinase and PDGFR signaling in *Chlamydia trachomatis* entry." *PLoS Pathog* 4(3): e1000021.
- Elwell, C. A., Ceesay, A., *et al.* (2013). "Correction: RNA Interference Screen Identifies Abl Kinase and PDGFR Signaling in *Chlamydia trachomatis* Entry." *PLoS pathogens* 9(8).
- Entian, K. D., Schuster, T., *et al.* (1999). "Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach." *Mol Gen Genet* 262(4-5): 683-702.
- Everett, K. D., Bush, R. M., *et al.* (1999). "Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms." *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 2: 415-440.

- Fadel, S. und Eley, A. (2007). "*Chlamydia trachomatis* OmcB protein is a surface-exposed glycosaminoglycan-dependent adhesin." J Med Microbiol 56(Pt 1): 15-22.
- Fadel, S. und Eley, A. (2008). "Is lipopolysaccharide a factor in infectivity of *Chlamydia trachomatis*?" J Med Microbiol 57(Pt 3): 261-266.
- Fassler, R., Pfaff, M., et al. (1995). "Lack of beta 1 integrin gene in embryonic stem cells affects morphology, adhesion, and migration but not integration into the inner cell mass of blastocysts." J Cell Biol 128(5): 979-988.
- Fechtner, T. (2009). Diplomarbeit "Funktionelle Analyse des chlamydialen Adhäsins OmcB und Identifizierung neuer, potentieller Adhäsine." Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Fechtner, T. (2012). Dissertation "Charakterisierung der neuen, potentiellen Adhäsine Yaa1, Yaa2 und Yaa3 von *Chlamydia pneumoniae*." Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Fechtner, T., Stallmann, S., et al. (2013). "Characterization of the interaction between the chlamydial adhesin OmcB and the human host cell." J Bacteriol 195(23): 5323-5333.
- Finco, O., Bonci, A., et al. (2005). "Identification of new potential vaccine candidates against *Chlamydia pneumoniae* by multiple screenings." Vaccine 23(9): 1178-1188.
- Fink, G. R., Hicks, J.B., Sherman, F. (1983). Methods in yeast genetics, laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Fotheringham, S., Levanon, K., et al. (2011). "Ex vivo culture of primary human fallopian tube epithelial cells." J Vis Exp(51).
- Freeman, T. C., Jr., Black, J. L., et al. (2013). "Identification of novel integrin binding partners for calcium and integrin binding protein 1 (CIB1): structural and thermodynamic basis of CIB1 promiscuity." Biochemistry 52(40): 7082-7090.
- Fudyk, T., Olinger, L., et al. (2002). "Selection of mutant cell lines resistant to infection by *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*." Infect Immun 70(11): 6444-6447.
- Gaballah, A., Kloeckner, A., et al. (2011). "Functional analysis of the cytoskeleton protein MreB from *Chlamydomonas reinhardtii*." PLoS One 6(10): e25129.
- Gabel, B. R., Elwell, C., et al. (2004). "Lipid raft-mediated entry is not required for *Chlamydia trachomatis* infection of cultured epithelial cells." Infect Immun 72(12): 7367-7373.
- García-Olivas, R., Hoebeke, J., et al. (2003). "Differential binding of platelet-derived growth factor isoforms to glycosaminoglycans." Histochemistry and cell biology 120(5): 371-382.
- Gentry, H. R., Singer, A. U., et al. (2005). "Structural and biochemical characterization of CIB1 delineates a new family of EF-hand-containing proteins." J Biol Chem 280(9): 8407-8415.
- Gerard, H. C., Fomicheva, E., et al. (2008). "Apolipoprotein E4 enhances attachment of *Chlamydomonas reinhardtii* (*Chlamydia*) *pneumoniae* elementary bodies to host cells." Microb Pathog 44(4): 279-285.
- Giancotti, F. G. und Ruoslahti, E. (1999). "Integrin signaling." Science 285(5430): 1028-1032.
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., et al. (1995). "Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure." Yeast 11(4): 355-360.
- Grassart, A., Dujancourt, A., et al. (2008). "Clathrin-independent endocytosis used by the IL-2 receptor is regulated by Rac1, Pak1 and Pak2." EMBO Rep 9(4): 356-362.
- Grayston, J. T., Kuo, C. C., et al. (1989). "*Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. Strain TWAR." IJSEM 39(1).
- Grieshaber, N. A., Fischer, E. R., et al. (2004). "Chlamydial histone-DNA interactions are disrupted by a metabolite in the methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(19): 7451-7456.

- Grieshaber, S. S., Grieshaber, N. A., *et al.* (2003). "*Chlamydia trachomatis* uses host cell dynein to traffic to the microtubule-organizing center in a p50 dynamitin-independent process." *J Cell Sci* 116(Pt 18): 3793-3802.
- Grimwood, J. und Stephens, R. S. (1999). "Computational analysis of the polymorphic membrane protein superfamily of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*." *Microb Comp Genomics* 4(3): 187-201.
- Hackstadt, T., Rockey, D. D., *et al.* (1996). "*Chlamydia trachomatis* interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane." *Embo J* 15(5): 964-977.
- Hahn, D. L., Azenabor, A. A., *et al.* (2002). "*Chlamydia pneumoniae* as a respiratory pathogen." *Front Biosci* 7: e66-76.
- Halberstädter, L. P., S. (1907). "Über Zelleinschlüsse parasitärer Natur beim Trachom." *Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte* 26: 44-47.
- Halet, G. (2005). "Imaging phosphoinositide dynamics using GFP-tagged protein domains." *Biol Cell* 97(7): 501-518.
- Hall, J. V., Schell, M., *et al.* (2011). "The multifaceted role of oestrogen in enhancing *Chlamydia trachomatis* infection in polarized human endometrial epithelial cells." *Cell Microbiol* 13(8): 1183-1199.
- Hamburger, Z. A., Brown, M. S., *et al.* (1999). "Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein." *Science* 286(5438): 291-295.
- Hammerschlag, M. R. (1999). "Community-Acquired Pneumonia Due To Atypical Organisms in Adults: Diagnosis and Treatment." *Infectious Diseases in Clinical Practice* 8(5): 232-240.
- Hardt, W. D., Chen, L. M., *et al.* (1998). "*S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells." *Cell* 93(5): 815-826.
- Harlow, E. und Lane, D., Eds. (1999). *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. CHSL Press.
- Harris, R. L. und Williams, T. W., Jr. (1985). "'Contribution to the Question of Pneumotyphus': a discussion of the original article by J. Ritter in 1880." *Rev Infect Dis* 7(1): 119-122.
- Harris, S. R., Clarke, I. N., *et al.* (2012). "Whole-genome analysis of diverse *Chlamydia trachomatis* strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing." *Nat Genet* 44(4): 413-419, S411.
- Hatch, T. P. (1996). "Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in chlamydiae?" *J Bacteriol* 178(1): 1-5.
- Hauck, C. R., Agerer, F., *et al.* (2006). "Cellular adhesion molecules as targets for bacterial infection." *Eur J Cell Biol* 85(3-4): 235-242.
- Hauck, C. R., Borisova, M., *et al.* (2012). "Exploitation of integrin function by pathogenic microbes." *Curr Opin Cell Biol* 24(5): 637-644.
- Hayward, R. D. und Koronakis, V. (1999). "Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*." *Embo J* 18(18): 4926-4934.
- Heinz, E., Tischler, P., *et al.* (2009). "Comprehensive in silico prediction and analysis of chlamydial outer membrane proteins reflects evolution and life style of the Chlamydiae." *BMC Genomics* 10: 634.
- Henderson, I. R. und Lam, A. C. (2001). "Polymorphic proteins of *Chlamydia* spp.--autotransporters beyond the Proteobacteria." *Trends Microbiol* 9(12): 573-578.
- Henrichfreise, B., Schiefer, A., *et al.* (2009). "Functional conservation of the lipid II biosynthesis pathway in the cell wall-less bacteria *Chlamydia* and *Wolbachia*: why is lipid II needed?" *Molecular microbiology* 73(5): 913-923.

- Herbst, F.** (2011). Dissertation "Identifizierung und Charakterisierung potentieller neuer Effektorproteine aus *Chlamydia pneumoniae*." Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Heuer, D., Rejman Lipinski, A., et al.** (2009). "*Chlamydia* causes fragmentation of the Golgi compartment to ensure reproduction." *Nature* 457(7230): 731-735.
- Heuer, K., Sylvester, M., et al.** (2006). "Lipid-binding hSH3 domains in immune cell adapter proteins." *J Mol Biol* 361(1): 94-104.
- Higashi, N.** (1965). "Electron microscopic studies on the mode of reproduction of trachoma virus and psittacosis virus in cell cultures." *Experimental and molecular pathology* 4(1): 24-39.
- Hoffmann, C., Ohlsen, K., et al.** (2011). "Integrin-mediated uptake of fibronectin-binding bacteria." *Eur J Cell Biol* 90(11): 891-896.
- Hogan, R. J., Mathews, S. A., et al.** (2004). "Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm." *Infect Immun* 72(4): 1843-1855.
- Horn, M.** (2008). "*Chlamydiae* as symbionts in eukaryotes." *Annu Rev Microbiol* 62: 113-131.
- Horton, A. C. und Ehlers, M. D.** (2003). "Dual modes of endoplasmic reticulum-to-Golgi transport in dendrites revealed by live-cell imaging." *J Neurosci* 23(15): 6188-6199.
- Hower, S., Wolf, K., et al.** (2009). "Evidence that CT694 is a novel *Chlamydia trachomatis* T3S substrate capable of functioning during invasion or early cycle development." *Mol Microbiol* 72(6): 1423-1437.
- Howes, M. T., Mayor, S., et al.** (2010). "Molecules, mechanisms, and cellular roles of clathrin-independent endocytosis." *Curr Opin Cell Biol* 22(4): 519-527.
- Hu, V. H., Harding-Esch, E. M., et al.** (2010). "Epidemiology and control of trachoma: systematic review." *Trop Med Int Health* 15(6): 673-691.
- Huber, A.** (2014). "Chlamydial deubiquitinase ChlaDUB1 as regulator of host cell apoptosis and new target for anti-chlamydial therapy." Lehrstuhl für Mikrobiologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Hybiske, K. und Stephens, R. S.** (2007). "Mechanisms of *Chlamydia trachomatis* entry into nonphagocytic cells." *Infect Immun* 75(8): 3925-3934.
- Hybiske, K. und Stephens, R. S.** (2007). "Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(27): 11430-11435.
- Ireton, K., Payrastra, B., et al.** (1996). "A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion." *Science* 274(5288): 780-782.
- Isberg, R. R. und Leong, J. M.** (1990). "Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells." *Cell* 60(5): 861-871.
- Isberg, R. R., Voorhis, D. L., et al.** (1987). "Identification of invasins: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells." *Cell* 50(5): 769-778.
- Jacquier, N., Frandi, A., et al.** (2014). "Cell wall precursors are required to organize the chlamydial division septum." *Nat Commun* 5: 3578.
- Jehl, M. A., Arnold, R., et al.** (2011). "Effective--a database of predicted secreted bacterial proteins." *Nucleic Acids Res* 39(Database issue): D591-595.
- Jewett, T. J., Dooley, C. A., et al.** (2008). "*Chlamydia trachomatis* tarp is phosphorylated by src family tyrosine kinases." *Biochem Biophys Res Commun* 371(2): 339-344.
- Jewett, T. J., Fischer, E. R., et al.** (2006). "Chlamydial TARP is a bacterial nucleator of actin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(42): 15599-15604.
- Jimenez-Soto, L. F., Kutter, S., et al.** (2009). "*Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus exploits beta1 integrin in a novel RGD-independent manner." *PLoS Pathog* 5(12): e1000684.
- Kall, L., Krogh, A., et al.** (2004). "A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method." *J Mol Biol* 338(5): 1027-1036.

- Kalman, S., Mitchell, W., *et al.* (1999). "Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*." *Nat Genet* 21(4): 385-389.
- Kami, K., Takeya, R., *et al.* (2002). "Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67(phox), Grb2 and Pex13p." *Embo J* 21(16): 4268-4276.
- Kari, L., Southern, T. R., *et al.* (2014). "*Chlamydia trachomatis* polymorphic membrane protein D is a virulence factor involved in early host-cell interactions." *Infect Immun* 82(7): 2756-2762.
- Kauselmann, G., Weiler, M., *et al.* (1999). "The polo-like protein kinases Fnk and Snk associate with a Ca(2+)- and integrin-binding protein and are regulated dynamically with synaptic plasticity." *Embo J* 18(20): 5528-5539.
- Kelley, L. A. und Sternberg, M. J. (2009). "Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server." *Nat Protoc* 4(3): 363-371.
- Kim, J. H., Jiang, S., *et al.* (2011). "*Chlamydia trachomatis* co-opts the FGF2 signaling pathway to enhance infection." *PLoS Pathog* 7(10): e1002285.
- Kirkham, M. und Parton, R. G. (2005). "Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers." *Biochim Biophys Acta* 1746(3): 349-363.
- Klockner, A., Otten, C., *et al.* (2014). "AmiA is a penicillin target enzyme with dual activity in the intracellular pathogen *Chlamydia pneumoniae*." *Nat Commun* 5: 4201.
- Knudsen, K., Madsen, A. S., *et al.* (1999). "Identification of two novel genes encoding 97- to 99-kilodalton outer membrane proteins of *Chlamydia pneumoniae*." *Infect Immun* 67(1): 375-383.
- Komander, D., Clague, M. J., *et al.* (2009). "Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases." *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(8): 550-563.
- Korhonen, J. T., Puolakkainen, M., *et al.* (2012). "*Chlamydia pneumoniae* entry into epithelial cells by clathrin-independent endocytosis." *Microb Pathog* 52(3): 157-164.
- Kostyukova, E. S., Korobova, F. V., *et al.* (2005). "Location of *C. trachomatis* Inc proteins during expression of their genes in HeLa cell culture." *Bull Exp Biol Med* 139(5): 600-604.
- Krahmer, N., Guo, Y., *et al.* (2009). "SnapShot: Lipid Droplets." *Cell* 139(5): 1024-1024 e1021.
- Kubo, A. und Stephens, R. S. (2000). "Characterization and functional analysis of PorB, a *Chlamydia* porin and neutralizing target." *Mol Microbiol* 38(4): 772-780.
- Kumar, Y., Cocchiari, J., *et al.* (2006). "The obligate intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis* targets host lipid droplets." *Curr Biol* 16(16): 1646-1651.
- Kuo, C. C., Jackson, L. A., *et al.* (1995). "*Chlamydia pneumoniae* (TWAR)." *Clin Microbiol Rev* 8(4): 451-461.
- Kuo, C. C., Takahashi, N., *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.
- Kwok, T., Zabler, D., *et al.* (2007). "*Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation." *Nature* 449(7164): 862-866.
- Lane, B. J., Mutchler, C., *et al.* (2008). "Chlamydial entry involves TARP binding of guanine nucleotide exchange factors." *PLoS Pathog* 4(3): e1000014.
- Le Negrata, G., Krieg, A., *et al.* (2008). "ChlaDub1 of *Chlamydia trachomatis* suppresses NF-kappaB activation and inhibits IkappaBalpha ubiquitination and degradation." *Cell Microbiol* 10(9): 1879-1892.
- Le Roy, C. und Wrana, J. L. (2005). "Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(2): 112-126.
- Lecuit, M., Hurme, R., *et al.* (2000). "A role for alpha-and beta-catenins in bacterial uptake." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(18): 10008-10013.

- Legate, K. R. und Fassler, R.** (2009). "Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails." *J Cell Sci* 122(Pt 2): 187-198.
- Legendre-Guillemain, V., Wasiak, S., et al.** (2004). "ENTH/ANTH proteins and clathrin-mediated membrane budding." *J Cell Sci* 117(Pt 1): 9-18.
- Leisner, T. M., Liu, M., et al.** (2005). "Essential role of CIB1 in regulating PAK1 activation and cell migration." *J Cell Biol* 170(3): 465-476.
- Leiva, N., Capmany, A., et al.** (2013). "Rab11-family of interacting protein 2 associates with chlamydial inclusions through its Rab-binding domain and promotes bacterial multiplication." *Cell Microbiol* 15(1): 114-129.
- Leong, J. M., Fournier, R. S., et al.** (1990). "Identification of the integrin binding domain of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein." *Embo J* 9(6): 1979-1989.
- Leong, J. M., Morrissey, P. E., et al.** (1993). "A 76-amino acid disulfide loop in the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein is required for integrin receptor recognition." *J Biol Chem* 268(27): 20524-20532.
- Leong, J. M., Morrissey, P. E., et al.** (1995). "An aspartate residue of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein that is critical for integrin binding." *Embo J* 14(3): 422-431.
- Levin, E. R.** (2002). "Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors." *Steroids* 67(6): 471-475.
- Liechti, G. W., Kuru, E., et al.** (2014). "A new metabolic cell-wall labelling method reveals peptidoglycan in *Chlamydia trachomatis*." *Nature* 506(7489): 507-510.
- Lindberg, K., Strom, A., et al.** (2010). "Expression of estrogen receptor beta increases integrin alpha1 and integrin beta1 levels and enhances adhesion of breast cancer cells." *J Cell Physiol* 222(1): 156-167.
- Liu, X., Afrane, M., et al.** (2010). "Identification of *Chlamydia trachomatis* outer membrane complex proteins by differential proteomics." *J Bacteriol* 192(11): 2852-2860.
- Longbottom, D. und Coulter, L. J.** (2003). "Animal chlamydioses and zoonotic implications." *J Comp Pathol* 128(4): 217-244.
- Lysen, M., Osterlund, A., et al.** (2004). "Characterization of ompA genotypes by sequence analysis of DNA from all detected cases of *Chlamydia trachomatis* infections during 1 year of contact tracing in a Swedish County." *J Clin Microbiol* 42(4): 1641-1647.
- Maldonado-Baez, L., Williamson, C., et al.** (2013). "Clathrin-independent endocytosis: a cargo-centric view." *Exp Cell Res* 319(18): 2759-2769.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., et al.** (2009). "CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database." *Nucleic Acids Res* 37(Database issue): D205-210.
- Marino, M., Banerjee, M., et al.** (2002). "GW domains of the *Listeria monocytogenes* invasion protein InlB are SH3-like and mediate binding to host ligands." *Embo J* 21(21): 5623-5634.
- Matsumoto, A.** (1973). "Fine structures of cell envelopes of *Chlamydia* organisms as revealed by freeze-etching and negative staining techniques." *J Bacteriol* 116(3): 1355-1363.
- Matsumoto, A.** (1982). "Electron microscopic observations of surface projections on *Chlamydia psittaci* reticulate bodies." *J Bacteriol* 150(1): 358-364.
- McCoy, A. J. und Maurelli, A. T.** (2006). "Building the invisible wall: updating the chlamydial peptidoglycan anomaly." *Trends Microbiol* 14(2): 70-77.
- McMahon, H. T. und Boucrot, E.** (2011). "Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(8): 517-533.
- Miethke, M. und Marahiel, M. A.** (2007). "Siderophore-based iron acquisition and pathogen control." *Microbiol Mol Biol Rev* 71(3): 413-451.
- Misaghi, S., Balsara, Z. R., et al.** (2006). "*Chlamydia trachomatis*-derived deubiquitinating enzymes in mammalian cells during infection." *Mol Microbiol* 61(1): 142-150.

- Miyairi, I., Mahdi, O. S., *et al.* (2006). "Different growth rates of *Chlamydia trachomatis* biovars reflect pathotype." *Journal of Infectious Diseases* 194(3): 350-357.
- Moelleken, K. und Hegemann, J. H. (2008). "The *Chlamydia* outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding." *Mol Microbiol* 67(2): 403-419.
- Moelleken, K. und Hegemann, J. H. (2012). "Chlamydial adhesion and adhesins." Tan M, Bavoil P, editors. In *Intracellular Pathogens I: Chlamydiales*, Washington DC: ASM Press pp. 97-125.
- Mölleken, K., Becker, E., *et al.* (2013). "The *Chlamydia pneumoniae* invasin protein Pmp21 recruits the EGF receptor for host cell entry." *PLoS Pathog* 9(4): e1003325.
- Mölleken, K., Schmidt, E., *et al.* (2010). "Members of the Pmp protein family of *Chlamydia pneumoniae* mediate adhesion to human cells via short repetitive peptide motifs." *Mol Microbiol*.
- Morre, S. A., Rozendaal, L., *et al.* (2000). "Urogenital *Chlamydia trachomatis* serovars in men and women with a symptomatic or asymptomatic infection: an association with clinical manifestations?" *J Clin Microbiol* 38(6): 2292-2296.
- Moulder, J. W. (1966). "The relation of the psittacosis group (*Chlamydiae*) to bacteria and viruses." *Annu Rev Microbiol* 20: 107-130.
- Mygind, P., Christiansen, G., *et al.* (1998). "Topological analysis of *Chlamydia trachomatis* L2 outer membrane protein 2." *J Bacteriol* 180(21): 5784-5787.
- Mygind, P. H., Christiansen, G., *et al.* (2000). "Membrane proteins PmpG and PmpH are major constituents of *Chlamydia trachomatis* L2 outer membrane complex." *FEMS Microbiol Lett* 186(2): 163-169.
- Naik, M. U. und Naik, U. P. (2003). "Calcium-and integrin-binding protein regulates focal adhesion kinase activity during platelet spreading on immobilized fibrinogen." *Blood* 102(10): 3629-3636.
- Naik, U. P., Patel, P. M., *et al.* (1997). "Identification of a novel calcium-binding protein that interacts with the integrin alphaIIb cytoplasmic domain." *J Biol Chem* 272(8): 4651-4654.
- Newhall, W. J., Batteiger, B., *et al.* (1982). "Analysis of the human serological response to proteins of *Chlamydia trachomatis*." *Infect Immun* 38(3): 1181-1189.
- Nichols, B. A., Setzer, P. Y., *et al.* (1985). "New view of the surface projections of *Chlamydia trachomatis*." *J Bacteriol* 164(1): 344-349.
- Nicholson, T. L., Olinger, L., *et al.* (2003). "Global stage-specific gene regulation during the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*." *J Bacteriol* 185(10): 3179-3189.
- Ojcius, D. M., Darville, T., *et al.* (2005). "Can chlamydia be stopped?" *Sci Am* 292(5): 72-79.
- Parsot, C. (2005). "*Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors." *FEMS Microbiol Lett* 252(1): 11-18.
- Patel, A. L., Chen, X., *et al.* (2014). "Activation of epidermal growth factor receptor is required for *Chlamydia trachomatis* development." *BMC Microbiol* 14(1): 277.
- Peacock, S. J., Day, N. P., *et al.* (2000). "Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit diversity in *fnb* genes and adhesion to human fibronectin." *J Infect* 41(1): 23-31.
- Petersen, T. N., Brunak, S., *et al.* (2011). "SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions." *Nat Methods* 8(10): 785-786.
- Peterson, E. M., de la Maza, L. M., *et al.* (1998). "Characterization of a neutralizing monoclonal antibody directed at the lipopolysaccharide of *Chlamydia pneumoniae*." *Infect Immun* 66(8): 3848-3855.
- Pizarro-Cerda, J. und Cossart, P. (2006). "Bacterial adhesion and entry into host cells." *Cell* 124(4): 715-727.
- Popova, N. V., Deyev, I. E., *et al.* (2013). "Clathrin-mediated endocytosis and adaptor proteins." *Acta Naturae* 5(3): 62-73.

- Portig, I., Goodall, J. C., *et al.* (2003). "Characterization of the humoral immune response to *Chlamydia* outer membrane protein 2 in chlamydial infection." *Clin Diagn Lab Immunol* 10(1): 103-107.
- Puolakkainen, M., Kuo, C. C., *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): 4620-4625.
- Puolakkainen, M., Lee, A., *et al.* (2008). "Retinoic acid inhibits the infectivity and growth of *Chlamydia pneumoniae* in epithelial and endothelial cells through different receptors." *Microb Pathog* 44(5): 410-416.
- Rajalingam, K., Sharma, M., *et al.* (2008). "Mcl-1 is a key regulator of apoptosis resistance in *Chlamydia trachomatis*-infected cells." *PLoS One* 3(9): e3102.
- Rake, G. und Jones, H. P. (1942). "Studies on Lymphogranuloma Venereum : I. Development of the Agent in the Yolk Sac of the Chicken Embryo." *J Exp Med* 75(3): 323-338.
- Rejman Lipinski, A., Heymann, J., *et al.* (2009). "Rab6 and Rab11 regulate *Chlamydia trachomatis* development and golgin-84-dependent Golgi fragmentation." *PLoS Pathog* 5(10): e1000615.
- Ritter, J. (1880). "Beitrag zur Frage des Pneumotyphus (Eine Hausepidemie in Uster [Schweiz] betreffend)." *Deutsches Archiv für Klinische Medizin* 25(53-96).
- Robertson, D. K., Gu, L., *et al.* (2009). "Inclusion biogenesis and reactivation of persistent *Chlamydia trachomatis* requires host cell sphingolipid biosynthesis." *PLoS Pathog* 5(11): e1000664.
- Rohde, G., Straube, E., *et al.* (2010). "Chlamydial zoonoses." *Dtsch Arztebl Int* 107(10): 174-180.
- Rurangirwa, F. R., Dilbeck, P. M., *et al.* (1999). "Analysis of the 16S rRNA gene of microorganism WSU 86-1044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order *Chlamydiales*: proposal of *Waddliaceae* fam. nov., *Waddlia chondrophila* gen. nov., sp. nov." *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 2: 577-581.
- Rzomp, K. A., Scholtes, L. D., *et al.* (2003). "Rab GTPases are recruited to chlamydial inclusions in both a species-dependent and species-independent manner." *Infect Immun* 71(10): 5855-5870.
- Saka, H. A. und Valdivia, R. H. (2010). "Acquisition of nutrients by *Chlamydiae*: unique challenges of living in an intracellular compartment." *Curr Opin Microbiol* 13(1): 4-10.
- Sakai, T., Jove, R., *et al.* (2001). "Role of the cytoplasmic tyrosines of beta 1A integrins in transformation by v-src." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(7): 3808-3813.
- Saksela, K. und Permi, P. (2012). "SH3 domain ligand binding: What's the consensus and where's the specificity?" *FEBS Lett* 586(17): 2609-2614.
- Saltman, L. H., Lu, Y., *et al.* (1996). "A region of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein that contributes to high affinity binding to integrin receptors." *J Biol Chem* 271(38): 23438-23444.
- Sambrook, J., Maniatis, T., *et al.* (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor laboratory.
- Sandvig, K., Pust, S., *et al.* (2011). "Clathrin-independent endocytosis: mechanisms and function." *Curr Opin Cell Biol* 23(4): 413-420.
- Schachter, J., Stephens, R. S., *et al.* (2001). "Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet." *Int J Syst Evol Microbiol* 51(Pt 1): 249; author reply 251-243.
- Scibelli, A., Roperto, S., *et al.* (2007). "Engagement of integrins as a cellular route of invasion by bacterial pathogens." *Vet J* 173(3): 482-491.
- Shen, Y., Naujokas, M., *et al.* (2000). "InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase." *Cell* 103(3): 501-510.

- Sigismund, S., Argenzio, E., et al.** (2008). "Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation." *Developmental cell* 15(2): 209-219.
- Simons, K. und Toomre, D.** (2000). "Lipid rafts and signal transduction." *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1): 31-39.
- Sisko, J. L., Spaeth, K., et al.** (2006). "Multifunctional analysis of Chlamydia-specific genes in a yeast expression system." *Mol Microbiol* 60(1): 51-66.
- Song, L., Carlson, J. H., et al.** (2013). "*Chlamydia trachomatis* plasmid-encoded Pgp4 is a transcriptional regulator of virulence-associated genes." *Infect Immun* 81(3): 636-644.
- Soriani, M., Petit, P., et al.** (2010). "Exploiting antigenic diversity for vaccine design: the chlamydia ArtJ paradigm." *J Biol Chem* 285(39): 30126-30138.
- Sorkin, A.** (2004). "Cargo recognition during clathrin-mediated endocytosis: a team effort." *Curr Opin Cell Biol* 16(4): 392-399.
- Soulet, F., Yarar, D., et al.** (2005). "SNX9 regulates dynamin assembly and is required for efficient clathrin-mediated endocytosis." *Mol Biol Cell* 16(4): 2058-2067.
- Sriskanthadevan, S., Brar, S. K., et al.** (2013). "Ca(2+) -calmodulin interacts with DdCAD-1 and promotes DdCAD-1 transport by contractile vacuoles in Dictyostelium cells." *FEBS J* 280(8): 1795-1806.
- Stabler, S. M., Ostrowski, L. L., et al.** (1999). "A myristoylated calcium-binding protein that preferentially interacts with the Alzheimer's disease presenilin 2 protein." *J Cell Biol* 145(6): 1277-1292.
- Stenmark, H.** (2009). "Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic." *Nature reviews Molecular cell biology* 10(8): 513-525.
- Stephens, R. S., Kalman, S., et al.** (1998). "Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*." *Science* 282(5389): 754-759.
- Stephens, R. S., Koshiyama, K., et al.** (2001). "Heparin-binding outer membrane protein of chlamydiae." *Mol Microbiol* 40(3): 691-699.
- Stephens, R. S., Myers, G., et al.** (2009). "Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of *Chlamydia* resolved." *FEMS Immunol Med Microbiol* 55(2): 115-119.
- Storz, J. und Page, L. A.** (1971). "Taxonomy of the *Chlamydiae*: Reasons for Classifying Organisms of the Genus *Chlamydia*, Family *Chlamydiaceae*, in a Separate Order, *Chlamydiales* ord. nov." *Int J Syst Bacteriol* 21(4): 332-334.
- Streuli, C. H. und Akhtar, N.** (2009). "Signal co-operation between integrins and other receptor systems." *Biochem J* 418(3): 491-506.
- Stuart, E. S., Webley, W. C., et al.** (2003). "Lipid rafts, caveolae, caveolin-1, and entry by *Chlamydiae* into host cells." *Exp Cell Res* 287(1): 67-78.
- Su, H., Raymond, L., 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.
- Subtil, A., Wyplosz, B., et al.** (2004). "Analysis of *Chlamydia caviae* entry sites and involvement of Cdc42 and Rac activity." *J Cell Sci* 117(Pt 17): 3923-3933.
- Swanson, A. F. und Kuo, C. C.** (1991). "The characterization of lectin-binding proteins of *Chlamydia trachomatis* as glycoproteins." *Microb Pathog* 10(6): 465-473.
- Swanson, A. F. und Kuo, C. C.** (1994). "Binding of the glycan of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* to HeLa cells." *Infect Immun* 62(1): 24-28.
- Tan, C., Hsia, R. C., et al.** (2010). "Variable expression of surface-exposed polymorphic membrane proteins in in vitro-grown *Chlamydia trachomatis*." *Cell Microbiol* 12(2): 174-187.
- Tanzer, R. J. und Hatch, T. P.** (2001). "Characterization of outer membrane proteins in *Chlamydia trachomatis* LGV serovar L2." *J Bacteriol* 183(8): 2686-2690.

- Taraktchoglou, M., Pacey, A. A., et al.** (2001). "Infectivity of *Chlamydia trachomatis* serovar LGV but not E is dependent on host cell heparan sulfate." *Infect Immun* 69(2): 968-976.
- Terebiznik, M. R., Vieira, O. V., et al.** (2002). "Elimination of host cell PtdIns(4,5)P(2) by bacterial SigD promotes membrane fission during invasion by *Salmonella*." *Nat Cell Biol* 4(10): 766-773.
- Thwaites, T., Nogueira, A. T., et al.** (2014). "The Chlamydia Effector TarP Mimics the Mammalian Leucine-Aspartic Acid Motif of Paxillin to Subvert the Focal Adhesion Kinase during Invasion." *J Biol Chem* 289(44): 30426-30442.
- Tran van Nhieu, G. und Isberg, R. R.** (1993). "Bacterial internalization mediated by beta 1 chain integrins is determined by ligand affinity and receptor density." *Embo J* 12(5): 1887-1895.
- Tsirigos, K. D., Bagos, P. G., et al.** (2011). "OMPdb: a database of {beta}-barrel outer membrane proteins from Gram-negative bacteria." *Nucleic Acids Res* 39(Database issue): D324-331.
- van der Flier, A. und Sonnenberg, A.** (2001). "Function and interactions of integrins." *Cell Tissue Res* 305(3): 285-298.
- van Meer, G., Voelker, D. R., et al.** (2008). "Membrane lipids: where they are and how they behave." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(2): 112-124.
- Van Nhieu, G. T. und Isberg, R. R.** (1991). "The *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein and human fibronectin bind to mutually exclusive sites on the alpha 5 beta 1 integrin receptor." *J Biol Chem* 266(36): 24367-24375.
- Walther, T. C. und Farese, R. V., Jr.** (2012). "Lipid droplets and cellular lipid metabolism." *Annu Rev Biochem* 81: 687-714.
- Wang, A., Johnston, S. C., et al.** (2010). "A systemic network for *Chlamydia pneumoniae* entry into human cells." *J Bacteriol* 192(11): 2809-2815.
- Wang, Y., Kahane, S., et al.** (2011). "Development of a transformation system for *Chlamydia trachomatis*: restoration of glycogen biosynthesis by acquisition of a plasmid shuttle vector." *PLoS pathogens* 7(9): e1002258.
- Wehrl, W., Brinkmann, V., et al.** (2004). "From the inside out--processing of the Chlamydial autotransporter PmpD and its role in bacterial adhesion and activation of human host cells." *Mol Microbiol* 51(2): 319-334.
- Weidow, C. L., Black, D. S., et al.** (2000). "CAS/Crk signalling mediates uptake of *Yersinia* into human epithelial cells." *Cell Microbiol* 2(6): 549-560.
- Wennerberg, K., Lohikangas, L., et al.** (1996). "Beta 1 integrin-dependent and -independent polymerization of fibronectin." *J Cell Biol* 132(1-2): 227-238.
- Wheelhouse, N. und Longbottom, D.** (2012). "Endemic and emerging chlamydial infections of animals and their zoonotic implications." *Transbound Emerg Dis* 59(4): 283-291.
- White, C., Yang, J., et al.** (2006). "CIB1, a ubiquitously expressed Ca²⁺-binding protein ligand of the InsP₃ receptor Ca²⁺ release channel." *J Biol Chem* 281(30): 20825-20833.
- Wiener, M. C.** (2004). "A pedestrian guide to membrane protein crystallization." *Methods* 34(3): 364-372.
- Wilson, D. P., Whittum-Hudson, J. A., et al.** (2009). "Kinematics of intracellular chlamydiae provide evidence for contact-dependent development." *J Bacteriol* 191(18): 5734-5742.
- Wolf, K., Fischer, E., et al.** (2000). "Ultrastructural analysis of developmental events in *Chlamydia pneumoniae*-infected cells." *Infection and immunity* 68(4): 2379-2385.
- Wong, E. F., Brar, S. K., et al.** (1996). "Molecular cloning and characterization of DdCAD-1, a Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion molecule, in *Dictyostelium discoideum*." *J Biol Chem* 271(27): 16399-16408.

- Wong, K. W. und Isberg, R. R.** (2003). "Arf6 and phosphoinositol-4-phosphate-5-kinase activities permit bypass of the Rac1 requirement for beta1 integrin-mediated bacterial uptake." *J Exp Med* 198(4): 603-614.
- Wu, X. und Lieber, M. R.** (1997). "Interaction between DNA-dependent protein kinase and a novel protein, KIP." *Mutat Res* 385(1): 13-20.
- Wu, Y., Li, Q., et al.** (2007). "Detecting protein-protein interactions by Far western blotting." *Nat Protoc* 2(12): 3278-3284.
- Wuppermann, F. N., Hegemann, J. H., et al.** (2001). "Heparan sulfate-like glycosaminoglycan is a cellular receptor for *Chlamydia pneumoniae*." *J Infect Dis* 184(2): 181-187.
- Wuppermann, F. N., Molleken, K., et al.** (2008). "*Chlamydia pneumoniae* GroEL1 protein is cell surface associated and required for infection of HEP-2 cells." *J Bacteriol* 190(10): 3757-3767.
- Wylie, J. L., Hatch, G. M., et al.** (1997). "Host cell phospholipids are trafficked to and then modified by *Chlamydia trachomatis*." *J Bacteriol* 179(23): 7233-7242.
- Wyrick, P. B.** (2000). "Intracellular survival by *Chlamydia*." *Cell Microbiol* 2(4): 275-282.
- Wyrick, P. B., Davis, C. H., et al.** (1994). "*Chlamydia trachomatis* Does Not Bind to Alpha Beta 1 Integrins to Colonize a Human Endometrial Epithelial Cell Line Cultured in Vitro." *Microbial Pathogenesis* 17 (3): 159-166.
- Yabushita, H., Noguchi, Y., et al.** (2002). "Effects of chemically modified heparin on *Chlamydia trachomatis* serovar L2 infection of eukaryotic cells in culture." *Glycobiology* 12(5): 345-351.
- Yang, B., Zheng, H. P., et al.** (2010). "The prevalence and distribution of *Chlamydia trachomatis* genotypes among sexually transmitted disease clinic patients in Guangzhou, China, 2005-2008." *Jpn J Infect Dis* 63(5): 342-345.
- Yeh, C. R., Chiu, J. J., et al.** (2010). "Estrogen augments shear stress-induced signaling and gene expression in osteoblast-like cells via estrogen receptor-mediated expression of beta1-integrin." *J Bone Miner Res* 25(3): 627-639.
- Zachowski, A.** (1993). "Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement." *Biochem J* 294 (Pt 1): 1-14.
- Zambruno, G., Marchisio, P. C., et al.** (1995). "Transforming growth factor-beta 1 modulates beta 1 and beta 5 integrin receptors and induces the de novo expression of the alpha v beta 6 heterodimer in normal human keratinocytes: implications for wound healing." *J Cell Biol* 129(3): 853-865.
- Zhang, J. P. und Stephens, R. S.** (1992). "Mechanism of *C. trachomatis* attachment to eukaryotic host cells." *Cell* 69(5): 861-869.
- Zhao, C., Dahlman-Wright, K., et al.** (2008). "Estrogen receptor beta: an overview and update." *Nucl Recept Signal* 6: e003.
- Zrieq, R.** (2009). Dissertation "The dual function of the *Chlamydia pneumoniae* Cpn0572 in modulating the host actin cytoskeleton." Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Zutter, M. M., Mazoujian, G., et al.** (1990). "Decreased expression of integrin adhesive protein receptors in adenocarcinoma of the breast." *Am J Pathol* 137(4): 863-870.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Taxonomie der Ordnung <i>Chlamydiales</i>	1
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des chlamydialen Entwicklungszyklus.....	7
Abbildung 1.3: Zusammenfassung der Endozytosemechanismen der eukaryotischen Zelle mit anschließendem intrazellulären Vesikeltransport.	9
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Adhäsion und Internalisierung von EBs.	18
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Hefe-zwei-Hybrid-Systems.....	47
Abbildung 4.1: Aufreinigung der zehn Kandidatenproteine Ctad1 bis Ctad10.	79
Abbildung 4.2: Adhäsionstest von Ctad-beschichteten Latexkügelchen an HEp-2 Zellen.	81
Abbildung 4.3: Alle rekombinanten Ctad-Proteine reduzieren die chlamydiale Infektion signifikant. ...	83
Abbildung 4.4: Protein Bindeexperiment mit löslichem Protein.....	85
Abbildung 4.5: Adhäsion von CFSE-markierten EBs an proteinvorbehandelten HEp-2 Zellen.	87
Abbildung 4.6: Ermittlung der Immunreaktivität der fünf Ctad-Proteine mit Patientenseren.	88
Abbildung 4.7: Analyse der Ctad-Proteinexpression im chlamydialen Entwicklungszyklus.	90
Abbildung 4.8: Lokalisationsanalyse von Ctad8.	92
Abbildung 4.9: Die Präabsorption des α -Ctad8 Antikörper mit Ctad8 Antigen bestätigte seine Spezifität.	93
Abbildung 4.10: Ctad8 kolokalisiert mit IncA.....	94
Abbildung 4.11: Ctad2 lokalisiert spät in der Infektion hauptsächlich an RBs.	96
Abbildung 4.12: Bestimmung der Spezifität des anti-Ctad2 Antikörpers.	98
Abbildung 4.13: Transfiziert exprimiertes Ctad2-GFP lokalisiert im Zytoplasma der Zelle.	99
Abbildung 4.14: Ctad4 konnte spät in der Infektion an RBs und EBs detektiert werden.	100
Abbildung 4.15: Transfiziert exprimiertes Ctad4-GFP kolokalisiert mit CPn0592, aber nicht an Bodipy gefärbten LDs.....	102
Abbildung 4.16: Ctad9 wird spät in der Infektion auf EBs präsentiert.	104
Abbildung 4.17: Präabsorption des anti-Ctad9 Antikörpers bestätigt seine Spezifität.	105
Abbildung 4.18: Ctad9 kann von der EB-Oberfläche gelöst werden.	106
Abbildung 4.19: Ctad9 wird früh in der Infektion potentiell sekretiert.....	107
Abbildung 4.20: Ctad9-GFP lokalisiert an Endosomen verschiedener Herkunft.....	108
Abbildung 4.21: Ctad1 liegt in der Infektion bakterienassoziiert und oberflächenpräsentiert vor.....	111
Abbildung 4.22: Kontrolle der Spezifität des anti-Ctad1 Antikörpers durch Präabsorption.	112
Abbildung 4.23: Ctad1 konnte spät und früh in der Infektion auf EBs detektiert werden.	113
Abbildung 4.24: Rekombinantes Ctad1 Protein bindet dosisabhängig an Humanzellen.	115
Abbildung 4.25: Untersuchung der neutralisierenden Wirkung von rekombinanten Ctad1 bzw. anti- Ctad1 Antikörper auf die chlamydiale Infektion.	117
Abbildung 4.26: Rezeptor-Pulldown für Ctad1.	119
Abbildung 4.27: Analyse der Interaktion von Ctad1 mit verschiedenen Rezeptoren im Hefe-zwei- Hybrid-System.	120
Abbildung 4.28: Analyse der Interaktion von rCtad1 und Integrin- β 1 im Far-Westernblot.....	122
Abbildung 4.29: Integrin- β 1 lokalisiert an der Bindestelle von <i>C. trachomatis</i> Serovar E.	124
Abbildung 4.30: Frühe <i>C. trachomatis</i> Infektion von primären Eileiterepithelzellen.	125

Abbildung 4.31: rCtad1 proteinbeschichtete Latexkugeln werden in HEp-2 Zellen internalisiert. ...	126
Abbildung 4.32: GD25 Zellen verringern die Bindung von rCtad1 und die <i>C. trachomatis</i> Infektion....	128
Abbildung 4.33: Aktivierung von ERK1/2 durch <i>Chlamydia trachomatis</i> und rekombinantes Ctad1. ..	129
Abbildung 4.34: Analyse einer Bindedomäne von Ctad1.	131
Abbildung 4.35: Der N-Terminus von Ctad1 vermittelt die Adhäsion und Neutralisation.	133
Abbildung 4.36: Analyse der Selbstinteraktion von Ctad1.	135
Abbildung 4.37: rCtad1 neutralisiert die <i>C. trachomatis</i> L2 und <i>C. pneumoniae</i> Infektion.	137
Abbildung 5.1: Sequenzvergleich von Ctad1 und seinen Homologen unter den <i>Chlamydiaceae</i>	154
Abbildung 5.2: Sekundärstrukturanalyse von Ctad1 bei Serovar E und LGV.	155
Abbildung 5.3: Erweitertes Modell der Adhäsion und Signaltransduktion bei <i>C. trachomatis</i> E.	156
Abbildung 5.4: Sequenzvergleich von CIB-1 mit Ctad2.	162
Abbildung 5.5: Modell der ermittelten und potentiellen Funktionen der Ctad Proteine.	168
Abbildung A.1.1: Kofärbung von Ctad8 und InCA 48 hpi.	I
Abbildung A.1.2: Bestimmung der Spezifität des Anti-Ctad4 Antikörpers durch Präabsorption.	I
Abbildung A.1.3: Kontrolle der Präabsorption von α -Ctad9 Antikörper.	II
Abbildung A.1.4: Kontrolle der Präabsorption von α -Ctad1 Antikörper.	II
Abbildung A.1.5: Vollbild zur <i>C. trachomatis</i> Infektion auf primären Eileiterzellen.	III
Abbildung A.1.6: Details zur Bindedomänenanalyse von Ctad1.	III
Abbildung A.1.7: Ctad1 Sequenzvergleich zu Vertretern der Gattung <i>Chlamydia</i>	III
Abbildung A.1.8: Internalisierung Ctad1 gekoppelter Kugeln auf Hec-1B Zellen.	IV
Abbildung A.1.9: Ctad1-vermittelte Aktivierung von FAK.	IV
Abbildung A.1.10: Ctad1 Sequenzvergleich der verwandten Spezies <i>C. trachomatis</i> , <i>C. muridarum</i> , <i>C. suis</i>	V

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: Übersicht der ausgewählten Kandidaten.	77
--	----

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit auf unterschiedliche Art und Weise unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. J. H. Hegemann für die Überlassung des Themas und der Möglichkeit an seinem Lehrstuhl zu promovieren bedanken. Die mir entgegengebrachte Diskussionsbereitschaft regte mich zum eigenständigen, wissenschaftlichen Denken an und trug maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

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

Dr. Katja Mölleken gilt ein besonderer Dank dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für Fragen und Probleme jeglicher Art und fast immer eine Lösung parat hatte. Unsere Diskussionen ergaben immer neue Ideen und Anregungen, die erheblich zum Gelingen nicht nur dieser Arbeit beitrugen. Für die experimentelle Unterstützung im Labor möchte ich mich herzlich bei Stefanie Kobus bedanken.

Ein ganz großes Dankeschön gilt der gesamten Arbeitsgruppe (Katja, Jan, Alison, Coco, Astrid, Sebastian, Sören und Irina) den „Pombes“ (Visnja, Natascha, Marina, Anand und Eva) sowie den ehemaligen Mitstreitern (Tim, Elli, Sandra, Boris, Frauke, Rafat, Markus und Boris) für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die vielen außeruniversitären Unternehmungen. Seien es die Kino-, Cocktail-, Koch- oder Spieleabende, Radtouren, Feiern oder Urlaube. Es hat immer sehr viel Spaß gemacht und war eine tolle Zeit, für die ich mich bei euch bedanken möchte. Ich wünsche euch alles Gute für die Zukunft. Klaus Meyer danke ich für die Unterstützung am FACS und Gabi dafür, dass sie die gute Fee des Labors ist. Nicht zu vergessen ein Dank an die Ladies des Sekretariats; Ulrike deine Kekse sind großartig.

Ein riesengroßer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für die Aufmunterung, das Verständnis und den Rückhalt während der gesamten Zeit. Ihr habt immer an mich geglaubt und mich bedingungslos unterstützt. Danke euch dafür! Zudem möchte ich mich bei meinem Freund Sebastian bedanken für die unendliche Geduld, das Verständnis, die Motivation und Unterstützung. Danke, dass du während dieser Zeit an meiner Seite warst.

Eidesstattliche Erklärung

Düsseldorf, 26. März 2015

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Alle Stellen, die aus anderen Werken im Wortlauf oder dem Sinn entsprechend übernommen wurden, habe ich mit Quellenangaben kenntlich gemacht.

Diese Dissertation hat weder in der gleichen noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich habe fürher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Sonja Stallmann

Elektronischer Anhang

A.1 Informationen zu den ausgewählten Kandidaten

Gene	Description	Motive BLAST	TMHMM	Pfam	OMP DB	Sekretion ChlamydiaeDB	pCOMP	SignalIP
CT017	unknown, hypothetical protein, Cluster Cell wall associated proteins, most proteins hypotheticals (pCOMP)	SH3_superf.	nein	SH3	nichts	nein	integral (putativ)	nein
CT142	unknown, hypothetical protein		nein		BLAST: Homologie zu OMP-TonB (outer membran hemin receptor)	nein	integral	nein
CT503	hypothetical protein (86%) TC0790	hsdR	nein	nichts	The Autotransporter-2 (AT-2) Family, Adhesin yadA	nein	nichts	nein
CT568	unknown		1, AS 43-151 außerhalb	nichts	nichts	nein	nichts	nein
CT620	unknown, hypothetical protein, Cluster: Cell surface proteins (pCOMP)	DUF582	nein	DUF582	nichts	nein	integral (putativ)	nein
CT759, nlpD	muramidase, invasin repeat family	LysM, Peptidoglycan-binding lysin domain	1 TM, ab AS 26 außen	LysM	BLAST: Putative outer membrane fimbrial usher protein	nein	nichts	nein
CT849	unknown, hypothetical protein	DUF720	nein	DUF720	nichts	ja	integral	nein
CT868	membrane thiol protease	Peptidase Superf.	ja, ab AS61 Rest des Protein potentiell außerelementär	Ulp1 protease family, C-terminal catalytic domain	BLAST: unbekanntes Intim/Invasin, Putative autotransporter protein (43%)	ja	nichts	nein
CT875	hypothetical protein (49%) zu TC0268		nein	nichts, außen	nichts	ja	integral (putativ)	vielleicht ersten 46 AS, pcs: 46-47

A.2 Ergebnisse der Massenspektrometrie des Rezeptor-Pulldowns

Protein	Score	Sequence Coverage [%]	No. Unique Peptides	gefunden (gesamt)	MW [kDa]	Accession
Keratin, type II cytoskeletal	1703,9	39,0	29	6	66	K2C1_HUMAN
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	1487,9	49,4	26	3	61	CH60_HUMAN
Clathrin heavy chain 1	1461,8	18,4	28	1	191,5	CLH1_HUMAN
Keratin, type I cytoskeletal	1178,5	36,0	25	6	62	K1C9_HUMAN
Alkaline phosphatase, placental type	1133,8	39,3	21	1	57,9	PPB1_HUMAN
Prelamin-A/C	1132,9	30,7	20	1	74,1	LMNA_HUMAN
Keratin, type I cytoskeletal	981,0	26,0	15	5	58,8	K1C10_HUMAN

Elektronischer Anhang

Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	971,9	32,2	19	1	69,1	DDX5_HUMAN
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	896,6	19,2	13	4	65,4	K22E_HUMAN
Keratin, type II cytoskeletal	831,7	23,9	15	6	66	K2C1_HUMAN
Heat shock protein HSP 90-beta	815,8	24,4	17	2	83,2	HS90B_HUMAN
Splicing factor, proline- and glutamine-rich	805,6	23,1	17	2	76,1	SFPQ_HUMAN
Keratin, type II cytoskeletal	769,8	21,0	14	6	66	K2C1_HUMAN
Keratin, type II cytoskeletal	696,9	23,8	12	6	66	K2C1_HUMAN
Keratin, type II cytoskeletal	691,2	16,6	11	6	66	K2C1_HUMAN
Heat shock protein HSP 90-alpha	683,1	6,6	5	1	84,6	HS90A_HUMAN
Myb-binding protein 1A	667,3	9,0	11	1	148,8	MBB1A_HUMAN
Keratin, type II cytoskeletal	637,0	22,0	12	6	66	K2C1_HUMAN
Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	617,1	13,5	9	1	87,2	P5CS_HUMAN
Calnexin	585,5	23,1	12	1	67,5	CALX_HUMAN
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	527,4	8,5	11	1	166,5	EIF3A_HUMAN
Putative ribosomal RNA methyltransferase NOP2	517,3	14,0	9	1	89,2	NOP2_HUMAN
UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1	504,1	6,7	9	1	177,1	UGGG1_HUMAN
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	468,1	15,7	8	2	68,5	RPN1_HUMAN
DNA topoisomerase 2-alpha	454,8	5,7	7	1	174,3	TOP2A_HUMAN
Keratin, type I cytoskeletal	424,1	22,9	10	1	48,1	K1C17_HUMAN
Keratin, type II cytoskeletal	415,1	12,2	6	2	53,7	K2C8_HUMAN
Glucosidase 2 subunit beta	405,2	12,5	6	1	59,4	GLU2B_HUMAN
Keratin, type II cytoskeletal	387,1	1,8	1	3	60	K2C6B_HUMAN
Alpha-actinin-4	376,0	8,3	6	1	104,8	ACTN4_HUMAN
Keratin, type I cytoskeletal	375,2	10,3	6	5	58,8	K1C10_HUMAN
Keratin, type I cytoskeletal	363,3	10,1	6	5	58,8	K1C10_HUMAN
Epidermal growth factor receptor	362,7	7,0	7	1	134,2	EGFR_HUMAN
Cytoskeleton-associated protein 4	361,7	15,0	7	1	66	CKAP4_HUMAN
Exportin-1	355,3	7,6	6	2	123,3	XPO1_HUMAN
Keratin, type I cytoskeletal	350,9	7,8	3	1	51,5	K1C14_HUMAN
Keratin, type I cytoskeletal	347,4	10,0	6	6	62	K1C9_HUMAN
Actin, cytoplasmic 1	345,7	20,5	7	2	41,7	ACTB_HUMAN
Endoplasmic reticulum chaperone	344,6	9,6	7	1	92,4	ENPL_HUMAN
Actin, cytoplasmic 1	335,5	22,4	7	2	41,7	ACTB_HUMAN

Elektronischer Anhang

Pyruvate carboxylase, mitochondrial	329,3	11,0	7	2	129,6	PYC_HUMAN
Poly [ADP-ribose] polymerase 1	313,2	8,0	6	2	113	PARP1_HUMAN
Keratin, type I cytoskeletal	310,0	11,1	5	6	62	K1C9_HUMAN
Heat shock protein HSP 90-beta	305,7	6,2	4	2	83,2	HS90B_HUMAN
Ribosomal L1 domain-containing protein 1	302,2	11,6	6	1	115,9	RL1D1_HUMAN
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	299,9	11,7	6	1	70,9	HNRPR_HUMAN
Poly [ADP-ribose] polymerase 1	297,0	6,7	5	2	113	PARP1_HUMAN
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	293,9	10,9	5	1	90,5	HNRPU_HUMAN
Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic	292,6	9,5	7	1	9,5	SYTC_HUMAN
Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	283,3	4,0	5	2	164,8	CPSM_HUMAN
Keratin, type II cytoskeletal 6B	268,7	2,1	1	3	60	K2C6B_HUMAN
Keratin, type I cytoskeletal	268,7	2,1	1	6	62	K1C9_HUMAN
Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	268,0	6,3	5	1	90	RIR1_HUMAN
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	260,3	6,6	3	1	69,6	HNRPQ_HUMAN
Ezrin	259,3	10,4	6	1	69,4	EZRI_HUMAN
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	254,8	3,3	2	4	65,4	K22E_HUMAN
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	244,1	4,0	1	1	51,2	K1C16_HUMAN
4F2 cell-surface antigen heavy chain	243,5	8,9	4	2	68	4F2_HUMAN
AP-1 complex subunit beta-1	241,6	5,0	4	1	104,6	AP1B1_HUMAN
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	241,3	1,9	1	4	65,4	K22E_HUMAN
Splicing factor 3B subunit 3	239,9	4,7	5	1	135,5	SF3B3_HUMAN
Serum albumin	208,4	8,2	5	2	69,3	ALBU_HUMAN
Isoleucine--tRNA ligase, mitochondrial	207,6	5,9	5	1	113,7	SYIM_HUMAN
Keratin, type II cytoskeletal	207,5	3,9	2	3	60	K2C6B_HUMAN
DNA replication licensing factor MCM7	202,0	9,6	5	1	81,3	MCM7_HUMAN
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase	188,0	4,7	4	1	84,7	PLOD3_HUMAN
Aconitate hydratase, mitochondrial	184,8	6,7	4	1	85,4	ACON_HUMAN
Alpha-actinin-4	181,8	3,7	3	1	104,8	FABP5_HUMAN

Elektronischer Anhang

Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	181,1	5,4	3	1	82,5	PLOD1_HUMAN
Keratin, type I cytoskeletal	180,3	2,3	1	1	44,1	K1C19_HUMAN
Intron-binding protein aquarius	177,0	3,0	4	1	176,99	AQR_HUMAN
Keratin, type I cytoskeleta	173,6	5,5	4	6	62	K1C9_HUMAN
Keratin, type I cytoskeletal	172,9	4,5	2	5	58,8	K1C10_HUMAN
Keratin, type II cytoskeletal 8	170,0	5,0	2	2	53,7	K2C8_HUMAN
Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase	169,6	2,6	4	1	170,5	SYEP_HUMAN
78 kDa glucose-regulated protein	168,5	6,4	3	1	72,3	GRP78_HUMAN
C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	167,8	4,7	4	2	101,5	C1TC_HUMAN
Heat shock cognate 71 kDa protein	166,4	4,5	2	2	70,9	HSP7C_HUMAN
Stress-70 protein, mitochondrial	165,6	3,5	2	3	73,6	GRP75_HUMAN
Transketolase	164,9	7,9	3	1	67,8	TKT_HUMAN
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	162,7	6,9	3	1	60	HNRPK_HUMAN
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	162,2	1,9	1	4	65,4	K22E_HUMAN
Ribosome biogenesis protein BMS1 homolog	156,0	3,1	3	1	145,7	BMS1_HUMAN
Keratin, type II cytoskeletal	154,3	1,6	1	1	60	K2C6A_HUMAN
Unconventional myosin-1c	153,3	3,3	3	1	121,6	MYO1C_HUMAN
Stress-70 protein, mitochondrial	149,9	3,8	2	3	149,87	GRP75_HUMAN
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	147,2	6,8	3	1	64,1	HNRPL_HUMAN
Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	143,0	1,4	1	1	80,1	TRAP1_HUMAN
DNA replication licensing factor MCM5	140,6	6,4	4	1	82,2	MCM5_HUMAN
Keratin, type I cytoskeletal	139,1	4,3	3	6	62	K1C9_HUMAN
Heat shock 70 kDa protein 4	137,7	3,2	2	1	94,3	HSP74_HUMAN
Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	137,6	4,4	2	1	66,9	AIFM1_HUMAN
Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	135,6	5,2	2	1	70,3	ACADV_HUMAN
Nucleolin	130,9	4,1	3	1	76,6	NUCL_HUMAN
DNA damage-binding protein 1	127,6	3,3	3	1	126,9	DDB1_HUMAN

Elektronischer Anhang

Lon protease homolog, mitochondrial	124,7	3,5	3	1	124,74	LONM_HUMAN
4F2 cell-surface antigen heavy chain	124,5	5,7	3	2	68	4F2_HUMAN
Stress-70 protein, mitochondrial	121,6	3,8	2	3	73,6	GRP75_HUMAN
T-complex protein 1 subunit gamma	119,3	4,0	2	1	60,5	TCPG_HUMAN
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	116,5	4,3	3	1	117,8	UBA1_HUMAN
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	112,3	3,5	2	2	105,8	PSMD1_HUMAN
Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	111,1	2,5	3	2	164,8	CPSM_HUMAN
Kinectin	108,0	2,1	3	1	156,2	KTN1_HUMAN
GPI transamidase component PIG-S	103,5	3,8	2	1	61,6	PIGS_HUMAN
Histone H1.2	102,6	10,8	2	1	21,4	H12_HUMAN
Interleukin enhancer-binding factor 3	102,5	2,7	2	1	95,3	ILF3_HUMAN
Elongation factor G, mitochondrial	102,2	2,8	2	1	83,4	EFGM_HUMAN
Keratin, type I cytoskeletal	100,6	2,1	1	5	58,8	K1C10_HUMAN
Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	99,2	2,5	2	1	106,7	SYAC_HUMAN
Importin-5	96,5	2,2	2	1	123,5	IPO5_HUMAN
Nucleolar protein 56	95,1	2,2	1	1	66	NOP56_HUMAN
RNA-binding protein FUS	94,3	6,3	2	1	53,4	FUS_HUMAN
C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	90,9	2,5	2	2	101,5	C1TC_HUMAN
Transferrin receptor protein 1	87,3	3,0	2	3	101,9	TFR1_HUMAN
RNA-binding protein 28	85,7	3,0	2	1	85,7	RBM28_HUMAN
Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha	85,5	3,5	2	1	75,4	LAP2A_HUMAN
X-ray repair cross-complementing protein 5	85,5	3,0	2	1	82,7	XRCC5_HUMAN
Neutral amino acid transporter B(0)	84,1	2,0	1	3	56,6	AAAT_HUMAN
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	83,3	3,8	3	1	101,9	SND1_HUMAN
Melanoma-associated antigen D2	81,6	1,8	1	1	81,57	MAGD2_HUMAN
DNA ligase 3	80,7	1,0	1	1	112,8	DNLI3_HUMAN
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	80,2	1,9	1	1	85,1	HNRL2_HUMAN

Elektronischer Anhang

Pyruvate carboxylase, mitochondrial	79,8	3,2	3	2	129,6	PYC_HUMAN
Far upstream element-binding protein 2	79,4	1,5	1	1	73,1	FUBP2_HUMAN
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	77,8	2,3	2	2	105,8	PSMD1_HUMAN
ATP-citrate synthase	77,8	1,4	1	1	120,8	ACLY_HUMAN
Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	77,2	1,2	1	2	136	DSRAD_HUMAN
T-complex protein 1 subunit zeta	77,1	2,3	1	1	58	TCPZ_HUMAN
Neutral amino acid transporter B(0)	77,0	2,0	1	3	56,6	AAAT_HUMAN
Nucleolar protein 9	76,8	2,2	1	1	69,4	NOP9_HUMAN
Niban-like protein 1	76,4	1,5	1	1	84,1	NIBL1_HUMAN
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	76,0	7,5	2	3	61	CH60_HUMAN
Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase, mitochondrial	75,3	2,2	2	1	105,7	C1TM_HUMAN
Filamin-A	74,6	1,0	2	1	280,6	FLNA_HUMAN
Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	71,3	16,0	2	3	18	RS27A_HUMAN
CD44 antigen	70,1	2,7	2	1	81,5	CD44_HUMAN
ATPase WRNIP1	70,1	2,0	1	1	72,1	WRIP1_HUMAN
Transferrin receptor protein 1	69,5	1,7	1	3	84,8	TFR1_HUMAN
Coiled-coil domain-containing protein 25	68,7	4,3	1	1	24,5	CCD25_HUMAN
Transcription intermediary factor 1-beta	68,7	3,7	2	1	88,5	TIF1B_HUMAN
Kinesin-like protein KIF23	68,5	1,4	1	1	110	KIF23_HUMAN
Protein SCAF8	68,5	0,9	1	1	140,4	SCAF8_HUMAN
E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25	68,0	1,6	1	1	70,9	TRIM25_HUMAN
Nuclear cap-binding protein subunit 1	66,8	2,7	1	1	91,98	NCBP1_HUMAN
Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	66,7	1,2	1	2	136	DSRAD_HUMAN
Protein disulfide-isomerase A3	66,6	2,2	1	2	56,7	PDIA3_HUMAN
Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	66,5	1,4	1	1	91,9	MOGS_HUMAN
KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1	65,7	3,6	2	1	48,2	KHDR1_HUMAN

Elektronischer Anhang

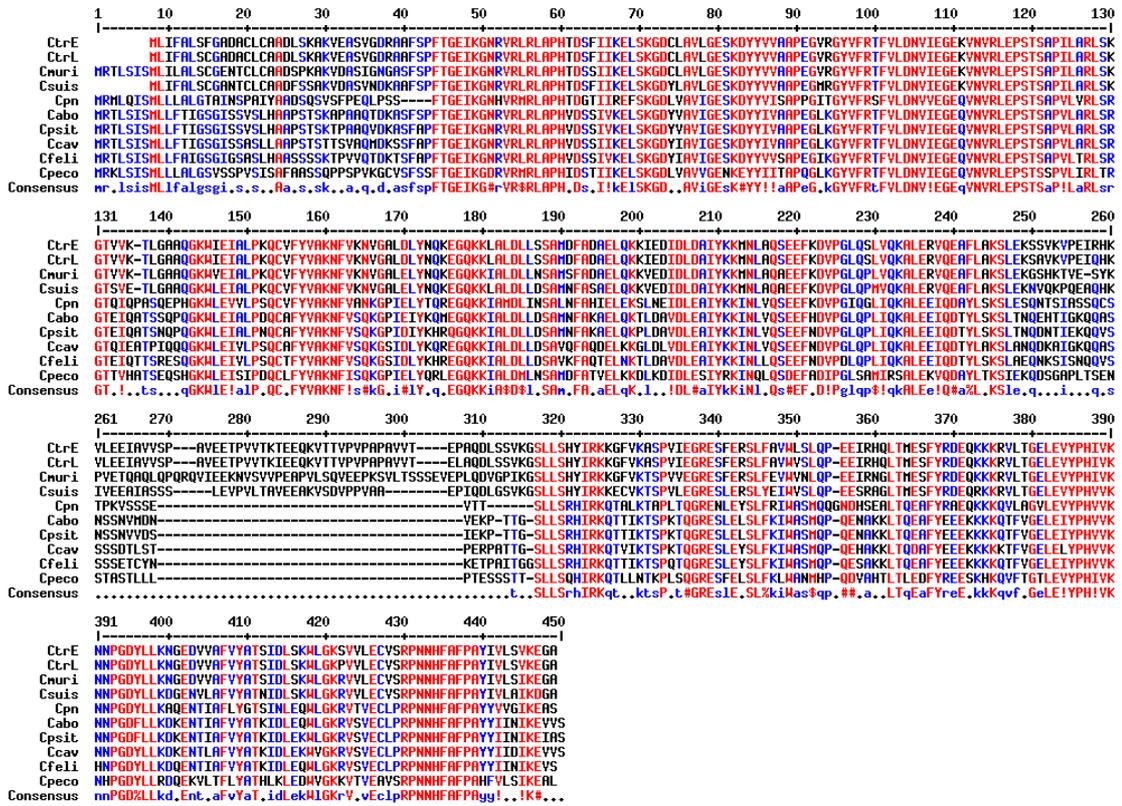
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	65,2	1,6	1	1	92,4	EIF3B_HUMAN
Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial	64,3	2,5	1	1	70,7	PCKGM_HUMAN
Protein disulfide-isomerase A3	62,3	2,2	1	2	56,7	PDIA3_HUMAN
Protein disulfide-isomerase A6	61,7	3,4	1	1	48,1	PDIA6_HUMAN
Myoferlin	60,4	0,6	1	1	234,6	MYOF_HUMAN
Clathrin coat assembly protein AP180	60,4	1,3	1	1	92,4	AP180_HUMAN
Polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1, mitochondrial	60,3	1,8	1	1	85,9	PNPT1_HUMAN
Serum albumin	60,3	3,6	2	2	69,3	ALBU_HUMAN
Neutral amino acid transporter B(0)	60,2	2,0	1	3	56,6	AAAT_HUMAN
Periodic tryptophan protein 2 homolog	59,0	3,2	2	1	102,4	PWP2_HUMAN
Protein LYRIC	57,3	1,9	1	1	63,8	LYRIC_HUMAN
Exosome complex exonuclease RRP44	57,1	1,4	1	1	108,9	RRP44_HUMAN
DNA replication licensing factor MCM3	56,6	1,9	1	1	90,9	MCM3_HUMAN
FACT complex subunit SSRP1	56,2	1,6	1	1	81	SSRP1_HUMAN
Ran GTPase-activating protein 1	55,9	2,2	1	1	63,5	RAGP1_HUMAN
Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	54,8	10,3	1	3	18	RS27A_HUMAN
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	51,8	1,6	1	3	61	CH60_HUMAN
U3 small nucleolar RNA-associated protein 18 homolog	50,3	2,0	1	1	62	UTP18_HUMAN
Alkaline phosphatase, placental-like	49,7	1,9	1	1	57,3	PPBN_HUMAN
Exportin-1	49,6	1,5	1	2	123	XPO1_HUMAN
6-phosphofructokinase type C	49,1	1,7	1	1	85,5	K6PP_HUMAN
Heat shock cognate 71 kDa protein	47,9	2,0	1	2	70,9	HSP7C_HUMAN
General vesicular transport factor p115	46,8	1,2	1	1	107,8	USO1_HUMAN
Splicing factor, proline- and glutamine-rich	46,6	1,6	1	2	16,1	SFPQ_HUMAN
AP-2 complex subunit alpha-1 OS	46,6	3,0	2	1	107,5	AP2A1_HUMAN

Elektronischer Anhang

Transitional endoplasmic reticulum ATPase	46,2	1,6	1	2	89,3	TERA_HUMAN
Caprin-1	45,4	1,6	1	1	78,3	CAPR1_HUMAN
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	45,1	2,3	1	1	72,6	DHSA_HUMAN
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	45,0	2,4	1	1	63,4	IF2B1_HUMAN
Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	44,8	10,3	1	3	18	RS27A_HUMAN
Inverted formin-2	44,5	1,0	1	1	135,5	INF2_HUMAN
Threonine--tRNA ligase, mitochondrial	44,4	1,4	1	1	81	SYTM_HUMAN
Transferrin receptor protein 1	44,3	1,7	1	3	84,8	TFR1_HUMAN
Cullin-4A	43,8	1,1	1	1	87,6	CUL4A_HUMAN
2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	43,6	1,2	1	1	115,9	ODO1_HUMAN
Integrin alpha-10	43,4	0,9	1	1	127,5	ITA10_HUMAN
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	42,9	1,6	1	2	89,3	TERA_HUMAN
Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	42,3	0,6	1	1	138,7	AT2B1_HUMAN
Catenin alpha-1	41,6	1,3	1	1	100	CTNA1_HUMAN
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	41,5	1,8	1	2	68,5	RPN1_HUMAN
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	41,5	1,8	1	1	53,9	GTR3_HUMAN
DNA replication licensing factor MCM2	41,0	0,9	1	1	101,8	MCM2_HUMAN
Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial	40,9	0,5	1	1	73,7	CPT2_HUMAN
Glutamine-rich protein 2	40,9	0,5	1	3	180,7	QRIC2_HUMAN
80 kDa MCM3-associated protein	40,8	0,4	1	1	218,3	MCM3A_HUMAN
Glutamine-rich protein 2	40,7	0,5	1	3	180,7	QRIC2_HUMAN
Glutamine-rich protein 2	40,7	0,5	1	3	180,7	QRIC2_HUMAN

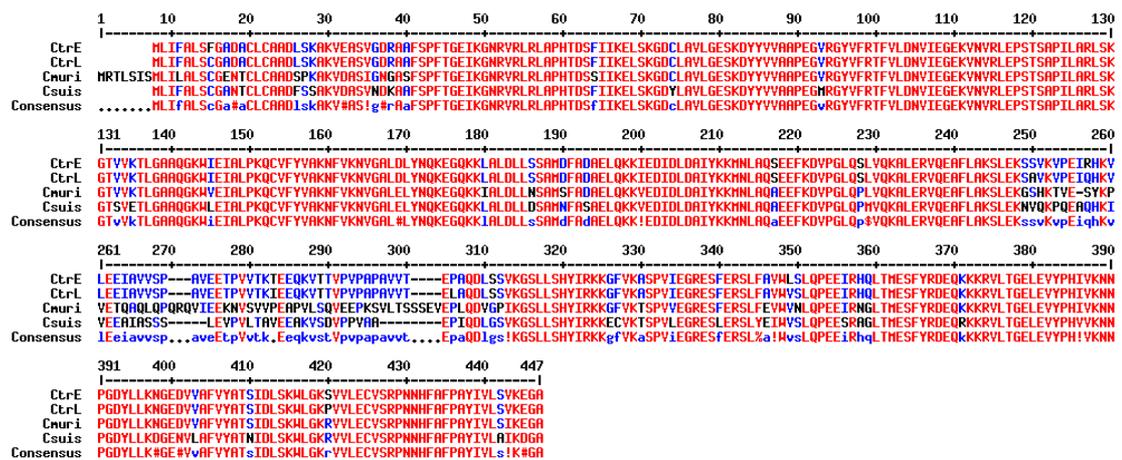
A.3 Ctd1 Alignments und Sequenzen der Homologe

A.3.1 Vergleich Ctd1 mit seinen Homologen unter den *Chlamydiaceae*



A.3.2 Vergleich von Ctd1 mit seinen Homologen in *C. muridarum* und

C. suis



A.3.3 Proteinsequenzen von Ctad1 und seinen Homologen

Ctad1 *Chlamydia trachomatis* E

MLIFALSFGADACLCAADLSKAKVEASVGDRAAFSPFTGEIKGNRVRLRLAPHTDSFIIKELSKGDCLAVLGESKDYVVAAPPEGVIRGYVFRFTFVLDNVIEGEKVNVRLEPSTSAPIARLSKGTVVKTLGAAQGWIEIALPKQCVFYVAKNFVKNVNGALDLYNQKEGQKKLALDLLSSAMDFADAELQKKIEDIDLDAIYKMNLAQSEEFKDVPGLQSLVQKALERVQEAFLAKSLEKSSVKVPEIRHKVLEEIAVVSPAEEETPVVTKTEEQKVTTVPVPAPAVVTEPAQDLSSVKGSLLSHYIRKKGFKVKAASPIEGRESFERSLFAVWLSLQPEEIRHQLTMESFYRDEQKKRVLVTGELEVYPHIVKNNPGDYLLKNGEDVVAFFVYATSIDLSKWLKGSVVLECVSRPNNHFAFPAYIVLSVKEGA

***Chlamydia trachomatis* A/AHR (CTA_0018)**

>gi|76167259|gb|AA50267.1| hypothetical protein CTA_0018 [Chlamydia trachomatis A/HAR-13]

MLIFALSFCGADACLCAADLSKAKVEASVGDRAAFSPFTGEIKGNRVRLRLAPHTDSFIIKELSKGDCLAVLGESKDYVVAAPPEGVIRGYVFRFTFVLDNVIEGEKVNVRLEPSTSAPIARLSKGTVVKTLGAAQGWIEIALPKQCVFYVAKNFVKNVNGALDLYNQKEGQKKLALDLLSSAMDFADAELQKKIEDIDLDAIYKMNLAQSEEFKDVPGLQSLVQKALERVQEAFLAKSLEKSSVKVPEIQHKVLEEIAVVSPAEEETPVVTKIEEQKVTTVPVPAPAVVTEPAQDLSSVKGSLLSHYIRKKGFKVKAASPIEGRESFERSLFAVWVSLQPEEIQHQLTMESFYRDEQKKRVLVTGELEVYPHIVKNNPGDYLLKNGEDVVAFFVYATSIDLSKWLKGSVVLECVSRPNNHFAFPAYIVLSVKEGA

Identität: 98,6 % Homologie: 99,3 %

***Chlamydia trachomatis* B (B/TZ1A828/OT) CTB_0171**

>gi|237804366|ref|YP_002888520.1| hypothetical protein CTB_0171 [Chlamydia trachomatis B/TZ1A828/OT]

MLIFALSFCGADACLCAADLSKAKVEASVGDRAAFSPFTGEIKGNRVRLRLAPHTDSFIIKELSKGDCLAVLGESKDYVVAAPPEGVIRGYVFRFTFVLDNVIEGEKVNVRLEPSTSAPIARLSKGTVVKTLGAAQGWIEIALPKQCVFYVAKNFVKNVNGALDLYNQKEGQKKLALDLLSSAMDFADAELQKKIEDIDLDAIYKMNLAQSEEFKDVPGLQSLVQKALERVQEAFLAKSLEKSSVKVPEIQHEVLEEIAVVSPAEEETPVVTKIEEQKVTTVPVPAPAVVTEPAQDLSSVKGSLLSHYIRKKGFKVKAASPIEGRESFERSLFAVWVSLQPEEIQHQLTMESFYRDEQKKRVLVTGELEVYPHIVKNNPGDYLLKNGEDVVAFFVYATSIDLSKWLKGSVVLECVSRPNNHFAFPAYIVLSVKEGA

Identität: 98,4 % Homologie: 99,5 %

***Chlamydia trachomatis* D/UW-3/CX**

>gi|15604735|ref|NP_219519.1| hypothetical protein CT_017 [Chlamydia trachomatis D/UW-3/CX]

MLIFALSFGADACLCAADLSKAKVEASVGDRAAFSPFTGEIKGNRVRLRLAPHTDSFIIKELSKGDCLAVLGESKDYVVAAPPEGVIRGYVFRFTFVLDNVIEGEKVNVRLEPSTSAPIARLSKGTVVKTLGAAQGWIEIALPKQCVFYVAKNFVKNVNGALDLYNQKEGQKKLALDLLSSAMDFADAELQKKIEDIDLDAIYKMNLAQSEEFKDVPGLQSLVQKALERVQEAFLAKSLEKSSVKVPEIRHKVLEEIAVVSPAEEETPVVTKTEEQKVTTVPVPAPAVVTEPAQDLSSVKGSLLSHYIRKKGFKVKAASPIEGRESFERSLFAVWLSLQPEEIRHQLTMESFYRDEQKKRVLVTGELEVYPHIVKNNPGDYLLKNGEDVVAFFVYATSIDLSKWLKGSVVLECVSRPNNHFAFPAYIVLSVKEGA

Identität: 100 % Homologie: 100 %

***Chlamydia trachomatis* F SOTONF3_00018**

>gi|478473885|ref|YP_007729961.1| putative carboxyl-terminal-processing protease, deltaproteobacterial [Chlamydia trachomatis F/SotonF3]

MRTLSISMLIFALSFCGADACLCAADLSKAKVEASVGDRAAFSPFTGEIKGNRVRLRLAPHTDSFIIKELSKGDCLAVLGESKDYVVAAPPEGVIRGYVFRFTFVLDNVIEGEKVNVRLEPSTSAPIARLSKGTVVKTLGAAQGWIEIALPKQCVFYVAKNFVKNVNGALDLYNQKEGQKKLALDLLSSAMDFADAELQKKIEDIDLDAIYKMNLAQSEEFKDVPGLQSLVQKALERVQEAFLAKSLEKSSVKVPEIQHKVLEEIAVVSPAEEETPVVTKIEEQKVTTVPVPAPAVVTEPAQDLSSVKGSLLSHYIRKKGFKVKAASPIEGRESFERSLFAVWVSLQPEEIRHHTMESFYRDEQKKRVLVTGELEVYPHIVKNNPGDYLLKNGEDVVAFFVYATSIDLSKWLKGSVVLECVSRPNNHFAFPAYIVLSVKEGA

Identität: 97,3 % Homologie: 97,7 %

***Chlamydia trachomatis* L2/434/Bu(i)**

>gi|482545372|ref|YP_007851290.1| SH3 domain-containing protein
[Chlamydia trachomatis L2/434/Bu(i)]
MLIFALSCGADACLCAADLSKAKVEASVGDRAAFSPFTGEIKGNRVRRLAPHTDSFIIKELSKGDCCLAV
LGESKDYYVVAAPPEGVGRGYVFRFTFVLDNVIEGEKVNVRLEPSTSAPILARLSKGTVVVKTLGAAQGWIEI
ALPKQCVFYVAKNFVKNVNGALDLYNQKEGQKKLALDLLSSAMDFADAELQKKIEDIDLDAIYKMNLAQS
EEFKDVPGLQSLVQKALERVQEAFLAKSLEKSAVKVPEIQHKVLEEIAVVSPAEEETPVVTKIEEQKVT
VPVPAPAVVTELAQDLSSVKGSLLSHYIRKKGFKVSPVIEGRESFERSLFAVWVSLQPEEIRHQLTMES
FYRDEQKKRVLGTGELEVYPHIVKNNPGDYLLKNGEDVFAFVYATSIDLSKWLKGPVVLECVSRPNNHFA
FPAYIVLSVKEGA

Identität: 98,4 % Homologie: 99,1 %

***Chlamydia trachomatis* C/TW-2**

>gi|568111271|ref|YP_008920868.1| hypothetical protein CTW3_00095
[Chlamydia trachomatis C/TW-3]
MRTLSISMLIFALSFGADACLCAADLSKAKVEASVGDRAAFSPFTGEIKGNRVRRLAPHTDSFIIKELS
KGDCLAVLGESKDYYVVAAPPEGVGRGYVFRFTFVLDNVIEGEKVNVRLEPSTSAPILARLSKGTVVVKTLGAA
QGWIEIAPLPKQCVFYVAKNFVKNVNGALDLYNQKEGQKKLALDLLSSAMHFAGAELQKKIEDIDLDAIYK
KMNLAQSEEFKDVPGLQSLVQKALERVQEAFLAKSLEKSSVKVPEIQHKVLEEIAVVSPAEEETPVVTKI
EEQKVTTPVPAPAVVTEPAQDLSSVKGSLLSHYIRKKGFKVSPVIEGRESFERSLFAVWVSLQPEEIQ
HQLTMESFYRDEQKKRVLGTGELEVYPHIVKNNPGDYLLKNGEDVFAFVYATSIDLSKWLKGSVVLECVS
RPNNHFAFPAYIVLSVKEGA

Identität: 96,8 % Homologie: 97,5 %

***Chlamydia trachomatis* K/Soston-K1**

>gi|478457668|ref|YP_007730853.1| putative carboxyl-terminal-processing
protease, deltaproteobacterial [Chlamydia trachomatis K/SostonK1]
MRTLSISMLIFALSFGADACLCAADLSKAKVEASVGDRAAFSPFTGEIKGNRVRRLAPHTDSFIIKELS
KGDCLAVLGESKDYYVVAAPPEGVGRGYVFRFTFVLDNVIEGEKVNVRLEPSTSAPILARLSKGTVVVKTLGAA
QGWIEIAPLPKQCVFYVAKNFVKNVNGALDLYNQKEGQKKLALDLLSSAMDFADAELQKKIEDIDLDAIYK
KMNLAQSEEFKDVPGLQSLVQKALERVQEAFLAKSLEKSSVKVPEIRHKVLEEIAVVSPAEEETPVVTKI
EEQKVTTPVPAPAVVTEPAQDLSSVKGSLLSHYIRKKGFKVSPVIEGRESFERSLFAVWVSLQPEEIR
HQLTMESFYRDEQKKRVLGTGELEVYPHIVKNNPGDYLLKNGEDVFAFVYATSIDLSKWLKGSVVLECVS
RPNNHFAFPAYIVLSVKEGA

Identität: 98,4 % Homologie: 98,4 %

***Chlamydia pneumoniae* (CWL029) Cpn0104**

>gi|4376365|gb|AAD18257.1| CT017 hypothetical protein [Chlamydia pneumoniae
pneumoniae CWL029]
MRMLQISMLLALGTAINSPAIYAADSQSVSFPEQLPSSFTGEIKGNHVRMLAPHTDGTIIREFSKGDL
VAVIGESKDYYVISAPPGITGYVFRSFVLDNVIEGEQVNVRLEPSTSAPVLRVLRSGTQIQPASQEPHGK
WLEVVLPSQCVFYVAKNFVANKGPIELYTQREGQKKIAMDLINSALNFAHIELEKSLNEIDLEAIYKKN
LVQSEEFKDVPGLQGLIQKALEEIQDAYLSKSLESQNTSIASSQCSTPKVSSSEVTTSLSRHIRKQTAL
KTAPLTQGRENLEYSLFRIWASMQGNDHSEALTQEAIFYRAEQKKKQVLAGVLEVPVHVKNNPGDYLLK
AQENTIAFLYGTINLEQWLKRVTVCECLRPNNHFAFPAYIVVGIKEAS

Identität: 53 % Homologie: 69 %

1SH3: ID: 69,8 %, HO: 84,9 % 2SH3: nicht vorhergesagt

***C. abortus* (CAB638)**

>gi|62148318|emb|CAH64085.1| conserved hypothetical exported protein
[Chlamydia abortus S26/3]
MRTLSISMLLFTIGSGISSVSLHAAPSTSKAPAAQTDKASFSPFTGEIKGNRVRRLAPHVDSIVKELS
KGDYVAVIGESKDYYIVAAPPEGLKGYVFRFTFVLDNVIEGEQVNVRLEPSTSAPVLRVLRSGTEIQATSSQ
PQGWLEIAPDQCAFYVAKNFVSKGPIEIKYQMEGQKKIALDLLSSAMNFAKAELQKTLDAVDLEAIY
KKINLVQSEEFHDVPLQPLIQKALEEIQDTYLSKSLTNQEHTIGKQQASNSSVMNDVVEKPTTGSLLSR
HIRKQTTIKTSPKTQGRESLESLFKIWASMQPQENAKKLTQEAIFYEEEEKKKKQTFVGELEIYPHVKNN
PGDFLLKDKENTIAFVYATKIDLEQWLKRVSVCECLRPNNHFAFPAYIINIKEVVS

Identität: 56,8 % Homologie: 71,3 %

1SH3: ID: 80,8 %, HO: 92,3 %

2SH3: ID: 60,6 %, HO: 69,7 %

***Chlamydomophila caviae* GPIC CCA00668**

>gi|29840426|ref|NP_829532.1| hypothetical protein CCA00668

[Chlamydomophila caviae GPIC]

MRTLISISMLLFTIGSGISSASLLAAPSTSTTSVAQMDKSSFAPFTGEIKGNRVRLRLAPHVDSSIIKELS
KGDYIAVIGESKDYIIVAPEGLKGYVFRFTFLVDNVEIGEQVNVRLPSTAPVRLARLSRGTEIQIEATPIQ
QQGKWLIVLPSQCAFYVAKNFVSQKGSIDLYKQREGQKKIALDLLDSAVQFAQDELKKGLDLVDLEAIY
KKINLVQSEEFNDVPLQPLIQKALEEIQDTYLAKSLANQDKAIGKQQASSSDTLSTPERPATTGSLLS
RHIRKQTVIKTSPKTQGRESLEYSLFKIWASMQPQEHAKKLTQDAFYEEEEKTKKTFVGELELYPHVVK
NPGDYLLKDKENTLAFVYATKIDLEKWVGKRVSVCECLPRPNNHFAFPAYYIIDIKEVVS

Identität: 55,4 % Homologie: 69,9 %

1SH3: ID: 73,3 %, HO: 81,7 %

2SH3: ID: 60,6 %, HO: 69,7 %

***C. muridarum* (TC0285)**

>gi|7190327|gb|AAF39153.1| conserved hypothetical protein [Chlamydia muridarum str. Nigg]

MRTLISISMLILALSCGENTCLCAADSPKAKVDASIGNGASFSPFTGEIKGNRVRLRLAPHTDSSIIKELS
KGDCLAVLGESKDYIIVAAPEGVGRGYVFRFTFLVDNVEIGEKVNVRLPSTAPILARLSKGTVVKTLGAA
QGWVEIALPKQCVFYVAKNFVKNVGALELYNQKEGQKKIALDLLNSAMSFADAELQKKVEDIDLDAIYK
KMNLAQAEFKDVPGLQPLVQKALERVQEAFLAKSLEKGSHTKVEYKPVETQAQLQPQRQVIEEKNVSV
VPEAPVLSQVEPKSVLTSSSEVEPLQDVGP IKGSLLSHYIRKKGFVKTSPPVEGRESFERSLFEVWVNL
QPEEIRNGLTMSFYRDEQKKRVLGTGELEVYPHIVKNNPGDYLLKNGEDVVAFFVYATSIDLSKWLKRV
VLECVSRPNNHFAFPAYIVLSIKEGA

Identität: 80 % Homologie: 85,7 %

1SH3: ID: 98,1 %, HO: 98,1 %

2SH3: ID: 95,5 %, HO: 98,5 %

***C. felis* (CF0343)**

>gi|89898150|ref|YP_515260.1| cell wall-associated hydrolases

[Chlamydomophila felis Fe/C-56]

MRTLISISMLLFAIGSGIGSASLHAASSSSKTPVQTDKTSFAPFTGEIKGNRVRLRLAPHVDSSIVKELS
KGDYIAVIGESKDYIIVSAPEGIKGYVFRFTFLVDNVEIGEQVNVRLPSTAPVRLRLSRGTEIQTTSSRE
SQGKWLIVLPSQCTFYVAKNFVSQKGSIDLYKHREGQKKIALDLLDSAVKFAQTELNKTLDVAVDLEAIY
KKINLLQSEEFNDVPLQPLIQKALEEIQDTYLSKSLAEQNKISINQQVSSSSETCYNKETPAITGGSL
SRHIRKQTTIKTSPQTQGRESLEYSLFKIWASMQPQESAKKLTQEAFFEEEEKTKKQTFVGELEIYPHVVK
HNP GDYLLKQDENTIAFVYATKIDLEQWLKRVSVCECLPRPNNHFAFPAYYIINIKEVS

Identität: 54,6 % Homologie: 70,4 %

1SH3: ID: 82,7 %, HO: 94,2 %

2SH3: ID: 57,6 %, HO: 68,2 %

***Chlamydomophila pecorum* E58**

>gi|330444677|ref|YP_004377663.1| hypothetical protein G5S_1043

[Chlamydomophila pecorum E58]

MRKLSISMLLLLALGSVSSPVSISAFSAASSQPPSPVKGCVSFSSTGEIKGDRVMRLAPHIDSTIIKELS
KGDLVAVVGENKEYYIITAPQGLKGYVFRFTFLVDNVEIGEQVNVRLPSTSSPVLIRLTRGTTVHATSEQ
SHGKWLIVLPSQCLFYVAKNFISQKGP IELYQRLEGQKKIALDMLNSAMDFATVELKKDLKIDLESY
RKINQLQSDEFADIPGLSAMIRSALEKVQDAYLTKSIEKQDSGAPLTSNSTASTLLLPTESSSTSLLS
QHIRKQTLNLTKPLSQGRESFELSLFKLWANMHPQDVAHTLTLEDIFYREESKHKQVFTGTLEVYPHIVKN
HPGDYLLRDQEKVLTFLYATHLKLLEDWVGKVTVEAVSRPNNHFAFPAHFVLSIKEAL

Identität: 51 % Homologie: 69 %

1SH3: ID: 71,2 %, HO: 92,3 %

2SH3: ID: 51,5 %, HO: 68,2 %

C. psittaci

>gi|504759679|ref|WP_014946781.1| hypothetical protein [Chlamydia psittaci]

[Chlamydia psittaci]

MRTLISISMLLFTIGSGISSVSLHAAPSTSKTPAAQVDKASFAPFTGEIKGNRVRLRLAPHVDSSIVKELS
KGDYVAVIGESKDYIIVAPEGLKGYVFRFTFLVDNVEIGEQVNVRLPSTAPVRLARLSRGTEIQATSNQ
PQGKWLIVLPSQCAFYVAKNFVSQKGP IDIYKHRQGQKKIALDLLDSAMNFAKAELOKPLDAVDLEAIY
KKINLVQSEEFNDVPLQPLIQKALEEIQDTYLSKSLTNQDNTIEKQQVSNSSNVVDSIEKPTTGSLLSR
HIRKQTTIKTSPKTQGRESLELSLFKIWASMQPQENAKKLTQEAFFEEEEKTKKQTFVGELEIYPHVVKNN

PGDFLLKDKENTIAFVYATKIDLEKWLGKRVSVECLPRPNNHFAPPAYIINIKEIAS

Identität: 56,3 % Homologie: 71,7 %

1SH3: ID: 61,0 %, HO: 71,2 % 2SH3: ID: 56,2 %, HO: 64,4 %

C. suis

>gi|555686575|gb|ESN89809.1| cell wall-associated hydrolase [Chlamydia suis MD56]

MLIFALSCGANTCLCAADFSSAKVDASVNDKAAFSPFTGEIKGNRVRRLRLAPHTDSFIIKELSKGDYLAV
LGESKDYYVVAPEGMGRGYVFRFTVLDNVIEGKVNVRLEPSTSAPILARLSKGTSVETLGAAQGWLEI
ALPKQCVFYVAKNFVKNVGALELYNQKEGQKLLDLDLDSAMNFASAELQKKVEDIDLDAIYKMNLAQA
EEFKDVPGLQPMVQKALERVQEAFLAKSLEKNVQKQEAQHKIVEEAIASSSLEVPVLTAVEEAKVSDVP
PVAEEP IQDLGSKVGSLLSHYIRKKECVKTSPLVLEGRESLERSLYEIVVSLQPEESRAGLTMSFYRDEQ
RKKRVLGTGELEVYPHVVKNNPGDYLLKDGENVLAFVYATNIDLKWLKGRVVLECVSRPNNHFAPPAYIV
LAIKDGA

Identität: 82,7 % Homologie: 90,3 %

1SH3: ID: 72,9 %, HO: 74,6 % 2SH3: ID: 78,5 %, HO: 83,1 %

Parachlamydia acanthamoebae

>gi|493384815|ref|WP_006341052.1| hypothetical protein [Parachlamydia acanthamoebae]

MSKISTLLLLFCSTLIGTIPSPMAANPPGLSTNAFFAFTGKVIKVRIRLEPSMESMILKEIVNGDMV
VVTGETDEFYAILPPEETKAYIFRTFVLDDIVEGHKVNVRVLSLESPVIAQLNTGDRVNGSVSTSNKW
LEITPPNHVRFYIAKDYIEKIGPPDLMAKIEKRKQEAQSTFSQTTLALQTELQKPFENMHVDHLFQSLNQ
MAKEYTDLPDVSAQAKDFLKHSEIYLHKKVAYLENKTQDHSQNWQAKHYELTSELEEKQNKLAQLEKEL
AAKAQAQQSHVATPTTPPKAKTPSLQWASIEQQRFEEWIAKRGEGTFDEFYEEQEVNHTVLTGIIIEPYS
RPVKNKPGDFVLINQVTHLPIAYLYTTIGSIQDKIGQPVTIHASPRPNNHFAYPAYIILSFE

Identität: 30 % Homologie: 51 %

***Waddlia chondrophila* WSU 86-1044**

>gi|297620741|ref|YP_003708878.1| hypothetical protein wcu_0501 [Waddlia chondrophila WSU 86-1044]

MLKASSYLFIASTLFSAPVFSDBGSPDSECGFNKAAHHNSKAFTGRVSRDRVRLRLSASTDSPIIKELNR
GDMFLVTGEEDDFYAIKPLNGTKAYVYRTYILDGVVEGNKVNVRVIEPHLEAPVIGQLNMGERIKGKISDK
NSKWLEIDPPEMTRFYVSADDFVEKIGDADYLAHFEKRENDVNDLLNGTYLISQQELQKPFSEIQPEKVVK
NYQKIIIEEYTEFPREVKQAKDSLAKFQETYLHKKVNYLEDKASKADTDWKHRGQSETAMQDHOQPSANSS
QADASQVYKKWVHEQAASDVNARMALWIPVEIAYYEKWKADNQNRP IQEFYKEQRGHAMALRGIVEPYDR
PIRNKPGDYLLVNRGNRLPIAYIYSTQVNLQDYVVGQEVSLAVLRPNNNFAYPAYIILKAE

Identität: 30 % Homologie: 49 %

Simkania negevensis

>gi|503709914|ref|WP_013943990.1| hypothetical protein [Simkania negevensis]

MFKPFAYALAVLAFVSVSSLQAEQTEAKATSARSGSSFKSFTGKVLGNNVRMRTSPDLDSHIVSELLKDD
YVVVTAEKGEFYAVEPPSEMKAIFRQFVDDVVEGDRVNVRLAPDRDAPIVGHHSTGDKIAGKICDNP
KWLEINVPAATCXVYSKEYIEYAGKPEMKVVHDKRKDAVKQLFEATELLTQKEMLKPFNEIDSDRIVHNL
QTIINDYADFSTYVDQSTKALAQFQEDYLHRKIAYLEAKASKLDHSGSKHEIYEIANKSTHEYVSPTRDM
KIWEPVEEALYLSWSAMHHAKTMDDFYQDQKLGQTI SGILEAYKDP IKS RPDYIILKERDVPVGVYVST
HVNLEDLVGKRVNLIVSPRENNNFAYPAYVLDAAE

Identität: 28 % Homologie: 46 %

Elektronischer Anhang

Ctad9	592 --	591
Q499	329 RK	330