



**Funktionelle Charakterisierung der
Chlamydia pneumoniae Effektorproteine
CPn0809 und CPn0147**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Astrid Corinna Engel
aus Berlin

Düsseldorf, Mai 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 Hegemann

Koreferent: Prof. Dr. Hermann Aberle

Tag der Mündlichen Prüfung: 19.06.2015

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
ZUSAMMENFASSUNG	IX
SUMMARY	XII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Taxonomie der <i>Chlamydiae</i>	1
1.2 Chlamydien als Krankheitserreger	3
1.2.1 <i>Chlamydia trachomatis</i>	3
1.2.2 <i>Chlamydia pneumoniae</i>	4
1.3 Die Biologie der Chlamydien	6
1.3.1 Der Aufbau der Chlamydien	6
1.3.2 Die genetische Manipulation von Chlamydien	7
1.3.3 Der chlamydiale Entwicklungszyklus	8
1.4 Bakterielle Protein-Sekretionssysteme	12
1.4.1 Das Typ-III-Sekretionssystem	13
1.4.2 Verschiedene Typ-III-Sekretionssysteme sind unterscheidbar	14
1.4.3 T3SS-assoziierte Chaperone und das Sekretionssignal	14
1.4.4 Der Aufbau des T3SS	16
1.4.4.1 Aufbau von Basalkörper und Nadelkomplex	16
1.4.4.2 Aufbau des Translokons	18
1.4.5 Besonderheiten des chlamydialen T3SS	21
1.4.5.1 Die zwei chlamydialen Translokon-Operons	22
1.5 Die Manipulation der Wirtszelle durch Effektoren	22
1.5.1 Chlamydien interagieren mit der eukaryotischen Wirtszelle	23
1.5.1.1 Die Inklusionsmembran-Proteine	25
1.5.1.2 Chlamydien interagieren mit dem Zytoskelett der Wirtszelle	26
1.5.1.3 Chlamydien akquirieren Nährstoffe von der Humanzelle	28
1.5.2 Methoden zur Identifizierung neuer chlamydialer Effektorproteine	30
1.6 Das CPn0809, Effektor oder Translokator?	31
1.7 Das Inc-Protein CPn0147	34
1.8 Zielsetzung	37
2 MATERIALIEN	38
2.1 Chemikalien	38
2.2 Agarosen	40
2.3 Materialien	40

2.4	Geräte und Maschinen	41
2.5	Lösungen und Puffer	42
2.6	Enzyme	45
2.6.1	Restriktionsenzyme	45
2.6.2	DNS-Polymerasen	45
2.6.3	Andere Enzyme	45
2.7	Antikörper	45
2.7.1	Primäre Antikörper	45
2.7.2	Sekundäre Antikörper	46
2.8	Fluoreszenzfarbstoffe	47
2.9	Kits	47
2.10	Größenstandards	47
2.10.1	DNS-Größenstandards	47
2.10.2	Protein-Größenstandards	47
2.11	Oligonukleotide	47
2.11.1	Oligonukleotide zur Amplifikation von DNS-Abschnitten	47
2.11.2	Oligonukleotide zur Verifikation von DNS-Insertionen	49
2.11.3	Oligonukleotide für Sequenzierungen	50
2.12	Plasmide	50
2.13	Zellen und Zelllinien	54
2.13.1	Prokaryotische Zelllinien	54
2.13.2	Eukaryotische Zelllinien	54
2.14	Medien und Medienzusätze	54
2.14.1	Medien für <i>Escherichia coli</i>	54
2.14.2	Medien für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
2.14.3	Humanzellkultur Medium	56
3	METHODEN	57
3.1	Arbeitstechniken für <i>Escherichia coli</i>	57
3.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	57
3.1.2	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	57
3.1.3	Induktion der Genexpression in <i>E. coli</i>	57
3.2	Arbeitstechniken für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
3.2.1	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
3.2.2	Proteinexpression in <i>S. cerevisiae</i>	58
3.2.2.1	Aufarbeitung von <i>S. cerevisiae</i> für die Schnellanalyse	58
3.2.2.2	Herstellung von Proteinrohextrakten aus <i>S. cerevisiae</i>	58
3.2.3	Serielle Verdünnungstropftests von <i>S. cerevisiae</i>	59
3.2.4	Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse	59
3.3	Kultivierung von adhärennten Humanzellen	60

3.3.1	Passagieren von adhärenenten Zellen durch Trypsinbehandlung	60
3.3.2	Einfrieren von Humanzellen	60
3.3.3	Auftauen von Humanzellen	61
3.4	Chlamydienkultur	61
3.4.1	Infektion von Humanzellen mit <i>C. pneumoniae</i>	61
3.4.2	Passage von Chlamydien in 25-cm ² -Zellkulturflaschen	61
3.4.2.1	Herstellung von Proteinproben infizierter Humanzellen	62
3.4.3	Reinigung von Chlamydien mittels Gastrografin-Gradient	62
3.4.4	Einfrieren von Chlamydien	63
3.4.5	Bestimmung der Infektiosität von Chlamydien suspensionen	63
3.4.6	Infektion von Humanzellen ohne Zentrifugation	63
3.4.7	Kurze Infektion zur Betrachtung der frühen Infektionszeitpunkte	64
3.5	Molekularbiologische Methoden	64
3.5.1	DNS-Präparation aus <i>C. pneumoniae</i>	64
3.5.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	65
3.5.2.1	PCR zur Amplifikation von DNS-Fragmenten für die homologe Rekombination	65
3.5.2.2	PCR auf Hefezellen zur Identifizierung positiver Transformanden	66
3.5.3	Transformation und homologe Rekombination in <i>S. cerevisiae</i>	67
3.5.4	Präparation von Plasmid-DNS aus <i>S. cerevisiae</i>	67
3.5.5	Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i>	68
3.5.5.1	Ein-Minuten-Transformation	68
3.5.5.2	Plasmidtransformation durch Elektroporation	68
3.5.6	Plasmid-DNS-Präparation aus <i>E. coli</i>	69
3.5.6.1	Midi-Maßstab	69
3.5.6.2	Mini-Maßstab	69
3.5.7	Hydrolytische Spaltung von DNS durch Restriktionsendonukleasen	69
3.5.8	Auftrennung von DNS mittels Agarose-Gelelektrophorese	70
3.5.9	Reinigung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	70
3.5.10	Reinigung von PCR-Proben	71
3.5.11	Deletion von DNS-Fragmenten aus Plasmiden	71
3.5.12	Photometrische Bestimmung der DNS-Konzentration	71
3.5.13	DNS-Sequenzierung	71
3.6	Zellbiologische Methoden	72
3.6.1	Transfektion von Humanzellen mittels TurboFect™	72
3.7	Biochemische Methoden	72
3.7.1	Affinitätschromatographische Reinigung von Proteinen	72
3.7.1.1	Manuelle Proteinreinigung unter denaturierenden Bedingungen	72
3.7.1.2	Manuelle Proteinreinigung unter nativen Bedingungen	73
3.7.2	Dialyse von Proteinen	74
3.7.3	Aufkonzentrierung von Proteinen über Größenausschlussröhrchen	74
3.7.4	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford-Reagenz	74
3.7.5	Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	75
3.7.5.1	Proteinproben-Aufarbeitung für die SDS-Gelelektrophorese	75
3.7.5.2	Herstellung des Trenngels	75
3.7.5.3	Herstellung des Sammelgels	76
3.7.5.4	SDS-Gelelektrophorese	76
3.7.6	Färbung von Proteingelen mittels Coomassie-Brillant-Blau	77

3.7.7	Westernblot-Analyse von Proteinproben	77
3.7.7.1	Proteintransfer auf eine PVDF-Membran	77
3.7.7.2	Entfärben von PVDF-Membranen	77
3.7.7.3	Antikörperreaktion auf einer PVDF-Membran	78
3.7.7.4	Farbentwicklung mittels alkalischer Phosphatase	78
3.7.7.5	Ablösen eines Antikörpers von der PVDF-Membran	78
3.7.8	Protein-Protein-Interaktionsstudie mittels Far-Westernblot	79
3.7.9	Antigenreinigung polyklonaler Antikörper	79
3.7.9.1	Antikörperreinigung mittels NHS-Sepharose	80
3.7.9.2	Antikörperreinigung mittels Westernblot	81
3.7.9.3	Abreicherung von Antikörpergemischen gegen fixierte Humanzellen	81
3.7.9.4	Abreicherung von Antikörpergemischen gegen Humanzellessat	82
3.7.10	Beschichtung von Latexkügelchen mit rekombinantem Protein	82
3.7.10.1	Präadsorptionsversuch zum Nachweis der Antikörperspezifität	82
3.7.10.2	Nachweis der Proteinbeschichtung mittels Immunfluoreszenz	83
3.7.11	Fraktionierung von infizierten Humanzellen	83
3.7.12	Behandlung von <i>C. pneumoniae</i> EBs mit Detergenzien	84
3.7.13	Markierung von Proteinen mit Biotin	85
3.7.14	Bindung von Proteinen an Phospholipide	85
3.8	Immunfluoreszenz-Mikroskopie von Humanzellen	86
3.8.1.1	Fixierung von Humanzellen	86
3.8.1.2	Permeabilisierung von PFA-fixierten Humanzellen	86
3.8.1.3	Direkte Immunfluoreszenz	87
3.8.1.4	Indirekte Immunfluoreszenz	87
3.8.1.5	Lebendzell-Mikroskopie	87
3.9	Propidiumiodid-Färbung von <i>E. coli</i>	88
3.10	Quantifizierung von CPn0147-Fäden	88
3.11	Programme und Bildbearbeitung	89
4	ERGEBNISSE	90
4.1	Charakterisierung von CPn0809	90
4.1.1	CPn0811 weist Ähnlichkeiten zu T3SS-assoziierten Klasse II-Chaperonen auf	90
4.1.2	Bioinformatische Charakterisierung der Proteine des CPn0811- und CPn01021-Operons	91
4.1.3	CPn0809 spielt eine Rolle in der frühen Infektion	96
4.1.3.1	CPn0809 ist ein spät exprimiertes Protein	97
4.1.3.2	Die Immunfluoreszenzmikroskopie zeigt CPn0809 assoziiert mit der Inklusion	99
4.1.3.3	CPn0809 ist während der Internalisierung mit EBs assoziiert	104
4.1.4	Die Expression von CPn0809 ist toxisch für <i>E. coli</i>	109
4.1.5	Der C-terminale Teil von CPn0809 vermittelt Bindung an Phospholipide	113
4.1.6	Im N-terminalen Teil von CPn0809 befinden sich Protein-Protein-Interaktionsdomänen	116
4.1.7	CPn0809 wird durch Waschen von EBs gelöst	118
4.1.8	CPn0809 oft assoziiert mit Lipidtröpfchen gefunden	120
4.2	Charakterisierung des Inc-Proteins CPn0147	123
4.2.1	Überprüfung der Spezifität des anti-CPn0147-Antikörpers	123
4.2.2	Fadenartige IncA- und CPn0147-Strukturen sind identisch	124
4.2.3	CPn0147-Fäden weisen bevorzugt in Richtung Zellkern	127

4.2.4	Die CPn0147-Fäden besitzen die Identität membranöser Strukturen -----	129
4.2.4.1	Die membranhaltigen CPn0147-Strukturen kolokalisieren mit Recycling-Endosomen -----	132
4.2.4.2	CPn0147-Fäden kolokalisieren mit verschiedenen Membranmarkern der humanen Wirtszelle -----	134
4.2.4.3	Die fädigen CPn0147-Strukturen kolokalisieren vereinzelt mit Zytoskelett-Komponenten der Humanzelle -----	137
4.2.5	Ektopisch in Humanzellen exprimiertes CPn0147 bildet fadenartige Strukturen-----	139
4.2.6	Die fadenartige Lokalisation von CPn0147GFP ist von den Transmembrandomänen und dem C-Terminus abhängig -----	142
4.2.7	Die CPn0147GFP-Fäden besitzen eine membranöse Identität -----	144
4.2.7.1	CPn0147GFP-Fäden kolokalisieren mit Rab11-positiven Recycling-Endosomen-----	147
4.2.7.2	Die Expression von CPn0147GFP verändert das Zytoskelett der Humanzelle -----	148
4.2.7.3	CPn0147-Fäden sind mit endo- oder exozytotischen Vesikeln assoziiert -----	150
4.2.8	Die CPn0147-Fäden sind mit dem ER der Humanzelle assoziiert -----	153
4.2.9	STIM-1GFP lokalisiert in der Infektion teilweise auf IncA-positiven Fäden-----	157
4.2.10	Ektopisch exprimiertes CPn0147 lokalisiert partiell an der Inklusion -----	159
4.2.11	Lipidtröpfchen sind in der Infektion mit CPn0147-positiven Fäden assoziiert-----	161
4.2.12	Lipidtröpfchen sind in der Transfektion teilweise mit CPn0147GFP-Fäden assoziiert-----	164
4.2.13	Die Bildung von CPn0147-Fäden ist abhängig vom Mikrotubuli-Zytoskelett und ER-Stress -----	166
5	DISKUSSION -----	170
5.1	CPn0809, das große Translokationspore-Protein -----	170
5.1.1	Die Translokation-Operons von Chlamydien zeigen Unterschiede zu Translokation-Operons anderer Bakterien -----	170
5.1.2	CPn0809 kann in der frühen Infektion als Translokator fungieren -----	172
5.1.3	CPn0809 zeigt Eigenschaften hydrophober Translokatoren -----	175
5.1.3.1	Der C-Terminus von CPn0809 erkennt distinkte Lipide-----	179
5.1.4	Agiert CPn0809 neben der Translokator-Funktion als Effektor? -----	180
5.2	CPn0147 und seine Assoziation mit fädigen Strukturen -----	185
5.2.1	Durch die <i>C. pneumoniae</i> -Infektion hervorgerufene Fäden könnten Infektionsphasen-abhängige Funktionen haben-----	185
5.2.2	CPn0147 kolokalisiert in der Infektion und in der Transfektion mit Membranstrukturen -----	188
5.2.3	CPn0147 bildet durch Interaktion mit Membranen fädige Strukturen -----	190
5.2.4	Ist die Assoziation des ERs mit den CPn0147-positiven Strukturen für die Kolokalisierung mit Lipidtröpfchen verantwortlich? -----	193
5.2.5	Das Zytoskelett und die Verfügbarkeit von Membranmaterial haben Bedeutung bei der Entstehung von CIPF-----	197
5.2.6	Die mögliche Funktion von CPn0147 in der Infektion -----	200
6	ANHANG -----	205
	LITERATURVERZEICHNIS-----	213
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS-----	230
	TABELLENVERZEICHNIS -----	232
	DANKSAGUNG -----	233
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG-----	234

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström	Cds	<u>C</u> ontact- <u>d</u> ependent <u>s</u> ecretion
%	Prozent	CERT	ER-to-Golgi <u>c</u> eramid <u>e</u> <u>t</u> ransfer protein
°C	Grad Celsius	CHO	chinese hamster ovarian
μ	mikro	CIPF	<u>c</u> hlamydiale <u>I</u> nc- <u>p</u> ositive <u>F</u> äden
μg	Mikrogramm	cm	Zentimeter
μl	Mikroliter	cm ²	Quadratcentimeter
μm	Mikrometer	cOMC	<u>C</u> hlamydia <u>O</u> uter <u>M</u> embrane <u>C</u> omplex
μM	Mikromolar	Cop	<u>C</u> hlamydia <u>o</u> uter proteins
∞	unendlich	COPD	<u>C</u> hronic <u>O</u> bstructive <u>P</u> ulmonary <u>D</u> isease
Abb.	Abbildung	CPAF	chlamydial protease-like activity factor
Abi-1	Abl interactor 1	<i>C. pn</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
Abl	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog	<i>C. tr</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
AD	Aktivierungsdomäne	Cy3	Cyanine 3
Ade	Adenin	Da	Dalton
ADH	Alkoholdehydrogenase	DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
AK	Antikörper	deion.	deionisiert
Amp	Ampicillin	dest.	destilliert
AP	alkalische Phosphatase	dtMT	De-tyrosinierte Mikrotubuli
APC	<u>a</u> naphase- <u>p</u> romoting <u>c</u> omplex/ <u>c</u> yclosome	ddH ₂ O	doppelt destiliertes Wasser
APS	Ammoniumpersulfat	DMF	Dimethylformamid
aRNS	antisense-RNS	DMSO	Dimethylsulfoxid
As	Aminosäure(n)	DNS	Desoxyribonukleinsäure
ATP	Adenosintriphosphat	DNS	Desoxyribonukleinsäure
ATPase	Adenosintriphosphatasen	dNTP	Desoxynukleosid-5'-Triphosphat
BAD	Bcl-2-Antagonist of Cell Death	DOX	Doxycyclin
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat	DTT	Dithiothreitol
BD	Binde-Domäne	DUF	Domäne unbekannter Funktion
BFA	Brefeldin A	EB	Elementarkörperchen (von engl. elementary body)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
bp	Basenpaar(e)	EGF	<u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
BSA	Rinderserum Albumin	EGFR	<u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor <u>R</u> eceptor
BTK	Burton-Tyrosinkinase	engl.	englisch
bzw.	beziehungsweise	ER	Endoplasmatisches Retikulum
CADD	chlamydia protein associating with death domains	ERK	extracellular-signal-regulated kinases
CAP	<u>C</u> ommunity- <u>A</u> cquired <u>P</u> neumonia	<i>et al.</i>	und andere
CBD	<u>C</u> haperon- <u>B</u> inde- <u>D</u> omäne	evtl.	eventuell
CC	Coiled-Coil-Domäne(n)	FAK	focal adhesion kinase
Cdc42	Cell division control protein 42		
cDNA	complementary DNA		

FKS	fötales Kälberserum	Lda	<u>L</u> ipid- <u>D</u> roplet <u>a</u> ssociated
g	Gramm	LGV	Lymphogranuloma venereum
GAAP	<u>G</u> olgi- <u>A</u> nti- <u>A</u> poptose- <u>P</u> rotein	LiAc	Litiumacetat
GAG	Glykosaminoglykan	LNT	LAMP1- <u>n</u> egative <u>t</u> ubules
GFP	grün fluoreszierendes Protein	LPS	Lipopolysaccharid
g	Normalbeschleunigung	M	Molar
GFP	grünfluoreszierendes Protein	mA	Milliampere
ggf.	gegebenenfalls	mAB	Monoklonaler Antikörper
GPI	Glycosylphosphatidylinositol	max.	maximal
GST	Glutathion-S-Transferase	Mbp	Megabasenpaar(e)
GTP	Guanosintriphosphat	MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
GTPasen	Guanosintriphosphatasen	MeOH	Methanol
h	Stunde	Met	Methionin
H2H	Hefe-Zwei-Hybrid	MFP	membrane fusion proteins
HA	Hemagglutinin	mg	Milligramm
HBSS	Hanks Salzlösung	MIF4GD	<u>M</u> IF4 <u>G</u> <u>d</u> omain-containing protein
Hc1/2	chlamydiales Histon-Homolog 1 bzw. 2	min	Minute(n)
HeLa	humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms	ml	Milliliter
HEp-2	human epidermoid cancer cells	mM	Millimolar
His	Histidin	mm	Millimeter
hpl	Stunden nach Infektionsbeginn (<u>h</u> ours <u>p</u> ost <u>i</u> nfection)	MOI	<u>M</u> ultiplicity of <u>i</u> nfection
HSP	<u>H</u> igh- <u>S</u> peed- <u>P</u> ellet	MOMP	<u>M</u> ajor <u>O</u> uter <u>M</u> embrane <u>P</u> rotein
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein	mRNS	boten RNS (<u>m</u> essenger RNA)
IB	Zwischenkörperchen (engl. <u>I</u> ntermediate <u>B</u> ody)	MT	Mikrotubuli
IF	Immunfluoreszenz	MTOC	<u>M</u> icrotubule <u>O</u> rganizing <u>C</u> enter
IFU	inklusionsbildender Anteil (von engl. Inclusion forming unit)	MVB	multivesikulären Körperchen (engl. <u>m</u> ultivesicular <u>b</u> odies)
Inc	engl.: inclusion associated protein	NCAPH2	non-SMC condensin II complex, subunit H2
INF- γ	Interferon-gamma	NCBI	National Center for Biotechnology Information
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid	NBT	Nitro Blue Tetrazolium
k	Kilo	NHS	N-Hydroxysuccinimid
kDa	Kilo-Dalton	n. i.	nicht infiziert
Ko-IP	Ko-Immunopräzipitation	NLS	Nuclear Localisation Signal
l	Liter	nm	Nanometer
LactC2	C2-Domäne des Lactadherin	NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
Lam	Lamin	Nr.	Nummer
LAMP1	<u>l</u> ysosome- <u>a</u> ssociated <u>m</u> embrane protein 1	Nt	Nukleotid(e)
LB	lysogeny broth	OD	optische Dichte
LD	Lipidtröpfchen (engl. <u>l</u> ipid- <u>d</u> roplets)	OmcB	outer membrane complex protein B
		OMF	outer membrane factors
		ORF	open reading frame
		PA	Phosphatidsäure

pAB	polyklonaler Antikörper	SPI	<u>S</u> almonella <u>p</u> athogenicity <u>i</u> slands
PBS	phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline)	SseC	<u>S</u> ecretion <u>s</u> ystem <u>e</u> ffector <u>C</u> like
PC	Phosphatidylcholin	STIM-1	Stromal interaction molecule 1
pCMV	Zytomegalievirus-Promotor	Strep	Streptavidin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)	Tab.	Tabelle
PDGFR β	platelet-derived growth factor receptor β	Tarp	<u>T</u> ranslocated <u>a</u> ctin- <u>r</u> ecruiting <u>p</u> hosphoprotein
PDI	Protein Disulfid Isomerase	TBE	Tris-Borat-EDTA
PEG	Polyethylenglycol	TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd	TEMED	Tetramethylethylendiamin
Pfam	Protein Families	Tir	translocated intimin receptor
PH	Pleckstein-Homologie	TM	Transmembrandomäne(n)
PiP	Phosphatidylinositolphosphat	TNF	Tumornekrosefaktor
PI	Propidiumiodid	TPR	Tetratricopeptid- Wiederholungen
PI3-K	Phosphoinositol-3-Kinase	Tris	Trishydroxymethylamino- methan
PKC δ	Protein Kinase C delta	Trp	Tryptophan
PM	Proteingrößenstandard	T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
pmol	picomol	U	Einheiten (Units)
Pmp	polymorphes Membranprotein	u.a.	unter anderem
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	ü/N	über Nacht
PS	Phosphatidylserin	UpM	Umdrehungen pro Minute
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	Ura	Uracil
RB	Retikularkörperchen (von engl. reticulate body)	USF-1	upstream transcription factor 1
RFX-5	regulatory factor X, 5	UTP	Uridintriphosphat
RHBDL2	<u>R</u> homboid-like <u>2</u>	UV	ultraviolett
RNS	<u>R</u> ibonukleinsäure	V	Volt
RNase	<u>R</u> ibonuclease	vgl.	vergleiche
RNF2	<u>R</u> ingfinger Protein <u>2</u>	WAVE2	Wiskott-Aldrich syndrome related protein 2
rRNS	ribosomale RNS	WB	Westernblot
RT	Raumtemperatur	WGA	<u>W</u> heat germ agglutinin
s.	siehe	WH2	Wiskott-Aldrich syndrome protein-Homology-2
S.	Seite	WHO	World Health Organisation
Scc	engl. <u>S</u> pecific <u>c</u> hlamydia <u>c</u> haperones	w/v	Masse (Weight) pro Volumen
SCV	<u>S</u> almonella-containing <u>y</u> acuole	X- α -Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-galactopyranosid
SDS	Sodiumdodecylsulfat	x g	x-fache Erdbeschleunigung
sek	Sekunden	YPDA	yeast peptone dextrose adenine
SIST	-induced <u>s</u> ecretory carrier membrane protein 3 (SCAMP3) <u>t</u> ubules	z. B.	zum Beispiel
SNARE	soluble NSF-sensitive attachment receptor		
SNX	Sorting nexin		
SPG	Saccharose-Phosphat- Glutaminsäure		

Zusammenfassung

Chlamydia pneumoniae ist ein obligat intrazelluläres, gramnegatives Bakterium, das mit akuten und chronischen Erkrankungen der oberen und unteren Atemwege in Verbindung gebracht wird. Chlamydien weisen einen einzigartigen, biphasischen Lebenszyklus auf, der sich durch den Wechsel zwischen zwei Zellformen auszeichnet: den gegen extrazelluläre Einflüsse stabilen und infektiösen Elementarkörperchen (EBs) und den intrazellulären, metabolisch aktiven Retikularkörperchen (RBs). Während der intrazellulären Phase der Infektion verbleiben die Bakterien in einer Vakuole, die als Inklusion bezeichnet wird. Zur Etablierung und Erhaltung dieser Nische modulieren die Bakterien die Wirtszelle auf vielfältige Weise durch sogenannte Effektorproteine. Viele dieser Effektoren werden durch einen Multiprotein-Komplex in die Wirtszelle transportiert, der als Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) bezeichnet wird. Zur Überbrückung der Plasmamembran der Zielzelle wird das Translokon, ein heterooligomerer Komplex aus drei Proteinen, an der Nadelspitze des T3SS aufgebaut.

Durch die Expression einer genomischen *C. pneumoniae* Bibliothek im eukaryotischen Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae*, in welchem grundlegende eukaryotische Strukturen und Mechanismen konserviert sind, waren in unserem Labor mögliche neue Effektoren identifiziert worden. Dabei war gezielt nach Proteinen gesucht worden, die einen Wachstumsdefekt auslösen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die beiden putativen Effektoren mit den Bezeichnungen CPn0147 und CPn0809 zu charakterisieren.

Durch bioinformatische Analysen wurden in CPn0809 Strukturmerkmale von hydrophoben Translokationsporen-Proteinen des T3SS identifiziert. Kofärbungen des CPn0809 mit dem *C. pneumoniae* Lipopolysaccharid oder dem intra-chlamydialen Chaperon DnaK zeigten, dass CPn0809 während der Adhäsion und Internalisierung mit EBs assoziiert ist. Durch Behandlung mit PBS (phosphatgepufferter Salzlösung) wird eine distinkte Menge des CPn0809 von infektiösen EBs gelöst. Die leichte Zugänglichkeit des CPn0809 könnte auf eine Assoziation mit der Sekretionsmaschinerie des T3SS hindeuten. Zudem wies CPn0809 in Interaktionsstudien funktionelle Charakteristika bereits untersuchter Translokationsporen-Proteine anderer pathogener Bakterien auf, wie Selbstinteraktion und die Interaktion mit dem T3SS-assoziierten *C. pneumoniae* Chaperon CPn0811 (LcrH_1). Bei der heterologen Expression in *Escherichia coli* zeigte sich, dass die Expression von CPn0809 zur Lyse der Zellen führt, was als Hinweis auf eine Porenbildung interpretiert wurde. Zudem zeigte der C-

Terminus des CPn0809 eine Affinität zu bestimmten Phospholipiden, die auf der zytosolischen Seite der Wirtszellmembran an der Eintrittsstelle der EBs lokalisiert sein könnten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass CPn0809 eines der *C. pneumoniae* Translokation-Proteine ist.

Das *C. pneumoniae* Protein CPn0147 war als Inklusionsmembran-Protein (Inc) charakterisiert worden, welches in der Inklusionsmembran und auf fädigen Strukturen im Wirtszellzytosol lokalisiert. Die Lokalisationsanalyse verschiedener Marker von Wirtszellorganellen zeigte, dass die CPn0147-positiven Fäden eine membranöse Identität aufweisen. Interessanterweise generiert CPn0147 nach Transfektion in der Humanzelle selbst fädige Strukturen, die ebenfalls mit verschiedenen Membranmarkern koloalisieren. Die CPn0147-Fäden der Infektion sowie der Transfektion waren mit Rab11, einem Marker für Recycling-Endosomen, assoziiert. Zudem zeigte die Kotransfektion von CPn0147 und STIM-1, einem Protein, das die Interaktion des Endoplasmatischen Retikulums (ER) mit Mikrotubuli vermittelt, eine Verbindung der CPn0147-Fäden mit dem ER. Weitere Färbungen zeigten keine eindeutige Assoziation der Fäden mit dem Zytoskelett der infizierten Zelle. Allerdings ist das Mikrotubuli-Zytoskelett für die Bildung von CPn0147-positiven Fäden in der Infektion essenziell, wie durch Behandlung infizierter Zellen mit der Mikrotubuli-depolymerisierenden Chemikalie Nocodazol gezeigt wurde. Auch die Behandlung mit Brefeldin A bewirkte eine starke Reduktion der Fadenzahl. Brefeldin A inhibiert die Exozytose durch Blockierung des anterograden Transports vom ER zum Golgi-Apparat und Induktion des retrograden Transports von Membranmaterial des Golgi-Apparates zum ER, was zu einer Akkumulation von Proteinen im ER und somit zu ER-Stress führt. Ein Hinweis darauf, dass nicht die Blockierung der Exozytose die Bildung der CPn0147-Fäden reduziert, sondern die Induktion von ER-Stress eine entscheidende Rolle spielt, gab die Wirkung von Ölsäure auf Brefeldin A behandelte Zellen, die hiernach ebenso viele CPn0147-Fäden aufwiesen wie nicht behandelte Zellen. Ölsäure fördert die Bildung von Lipidtröpfchen, Lipid-Speicherorganellen der Humanzelle, die vom ER gebildet werden und mit der Regulation von ER-Stress und der Degradation von Proteinen in Zusammenhang gebracht werden. Die Beobachtung, dass die Fäden mit Lipidtröpfchen und Rab11-Vesikeln assoziiert sind und wahrscheinlich mit dem ER in engem Kontakt stehen, deutet auf eine Funktion der Fäden bei der Interaktion mit Wirtszellorganellen hin.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei für die Infektion von *C. pneumoniae* wichtige Proteine untersucht. CPn0809 ist ein Teil der T3SS-Translokationspore und spielt eine wichtige Rolle

bei der Sekretion von Effektorproteinen in das Zytosol der Wirtszelle zu Beginn und in den ersten Stunden der Infektion. CPn0147 moduliert die Topologie von Membranen und ist möglicherweise an der Bildung von membranösen Fäden beteiligt, die die Oberfläche der Inklusionsmembran vergrößern.

Summary

Chlamydia pneumoniae is an obligate intracellular, Gram-negative bacterium, which is linked to acute and chronic diseases of the upper and lower respiratory tract. Chlamydia show a unique biphasic life cycle, during which they differentiate between two distinct forms: the infectious elementary bodies (EBs) adapted to survive in the hostile extracellular environment and the intracellular, metabolically active reticulate bodies (RBs). During the intracellular phase of the infection cycle the bacteria reside within a membrane bound vacuole called the inclusion. To establish and maintain this intracellular niche the bacteria modulate the host cell via so-called effector proteins. Many of these effectors are translocated by a multi-protein complex, which is called the Type-III-Secretion System (T3SS). The translocon, a hetero-oligomeric complex of three proteins, is located at the top of the T3SS needle and spans the host plasma membrane.

In our lab new potential effector proteins had been identified by expressing a shot gun library of the *C. pneumoniae* genome in the eukaryotic model organism *Saccharomyces cerevisiae*, in which eukaryotic structures and mechanisms are conserved. Potential candidates were identified by screening for proteins that caused a growth defect phenotype. The aim of this study was to further investigate the function of the two putative effector proteins CPn0147 and CPn0809.

Bioinformatic analyses revealed that CPn0809 harbors structural features of known hydrophobic translocation pore proteins of the T3SS. Co-staining of the *C. pneumoniae* lipopolysaccharide or the intra-chlamydial chaperone DnaK shows that CPn0809 is associated with the EBs during adhesion and internalization. Treatment of infectious EBs with PBS (phosphate buffered saline) removed a distinct portion of CPn0809. This demonstrates the easy accessibility of CPn0809 and is a hint for an association with the secretion machinery of the T3SS. Moreover, in interaction studies CPn0809 shows functional characteristics of known translocon proteins of other pathogenic bacteria, for example the ability to self-interact and interaction with the T3SS-associated chaperone CPn0811 (LcrH_1). The heterologous expression of CPn0809 in *Escherichia coli* causes cell lysis, which was interpreted as a hint for pore formation in an *E. coli* membrane. Additionally, the C-terminus of the protein shows affinity to specific phospholipids that are possibly part of the cytosolic face of the host cell membrane at the entry side of EBs. It is likely that CPn0809 is one of the *C. pneumoniae* translocon-proteins.

The *C. pneumoniae* protein CPn0147 had been identified as an inclusion membrane protein (Inc), which is located in the inclusion membrane and also on fibers spanning the host cell cytosol. The analysis of the localization of different host cell organelle markers revealed a membranous identity of the CPn0147-positive fibers. Remarkably, transfected CPn0147 showed the ability to generate fibers in human cells on its own and these fibers also co-localized with membrane markers. CPn0147-fibers in infection and transfection associated with the recycling endosome marker Rab11. Furthermore, co-transfection of CPn0147 and STIM-1, a protein that mediates interaction of the endoplasmic reticulum (ER) with microtubules, suggested an interaction of CPn0147-fibers with the ER. Additional stainings revealed no clear connection of the fibers with the cytoskeleton of the infected cell. However, treatment of infected cells with the microtubule depolymerizing drug nocodazole demonstrated an essential role of the microtubule cytoskeleton for CPn0147-fiber formation. The treatment of infected cells with the drug Brefeldin A also causes a severe reduction of the fiber count. Brefeldin A inhibits exocytosis by blocking the anterograde transport from the ER to the Golgi apparatus and induces retrograde transport of membrane material of the Golgi apparatus to the ER, which leads to accumulation of proteins in the ER and thus causes ER-stress. Addition of oleic acid reversed the inhibiting effect of Brefeldin A on CPn0147-fiber formation, which is a hint that not blocking of exocytosis but ER-stress causes the reduction of fibers. Oleic acid is known to stimulate the production of lipid droplets, lipid-storage organelles of the human cell, which are produced at the ER and have been connected with the regulation of ER-stress and protein degradation. The associations of CPn0147-fibers with lipid droplets and Rab11-vesicles as well as the close contact with the ER indicate a function in interaction with different host cell organelles.

Within the scope of this work two important proteins for *C. pneumoniae* infection were examined. CPn0809 likely is a part of the T3SS translocon and plays a role in the secretion of effector proteins into the host cell cytosol at the beginning and first hours of the infection. CPn0147 is able to modulate membrane topologies and could be involved in the production of membraneous fibers that possibly contribute to an enlargement of the inclusion membrane surface.

1 Einleitung

Chlamydia pneumoniae ist ein humanpathogener Vertreter der Familie der *Chlamydiaceae*. Diese sind obligat intrazelluläre, gramnegative Bakterien, die einen einzigartigen zweiphasigen Lebenszyklus aufweisen.

Chlamydiaceae sind Parasiten eukaryotischer Zellen. Ihre intrazelluläre Lebensweise macht intensive Wechselwirkungen mit der Wirtszelle nötig, die u.a. durch Effektorproteine vermittelt werden. Bisher sind nur einige Effektorproteine der *Chlamydiaceae* bekannt und wenige von ihnen sind eingehender untersucht worden. Es ist wichtig, die Wechselwirkung der Bakterien mit ihren Wirtszellen zu charakterisieren und die Funktion von Effektorproteinen zu identifizieren, um wirkungsvolle Behandlungsmethoden zu entwickeln.

1.1 Die Taxonomie der *Chlamydiae*

Die *Chlamydiaceae* gehören zu den *Chlamydiae*, einem Phylum der Bakterien, das wiederum zum *Planctomycetes-Chlamydiae-Verrucomicrobia*-Superphylum gehört, welches Bakterien der unterschiedlichsten Habitate und Lebensweisen und interessanterweise auch obligate Endosymbionten zusammenfasst (Wolf *et al.* 2000; Wagner & Horn 2006). Das Phylum der *Chlamydiae* ist damit phylogenetisch weit entfernt von anderen gramnegativen, humanpathogenen Bakterien, wie den zu dem Phylum der Proteobakterien gehörenden *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* und *E. coli*. Allen bekannten Vertretern der *Chlamydiae* ist gemein, dass ihre Replikation obligat in einer eukaryotischen Wirtszelle abläuft (Horn 2008). Davon abgesehen sind sie in der Lage, ein sehr breites Spektrum von Wirtsorganismen zu infizieren. Insbesondere die *Chlamydiaceae*, die nur eine Gattung aufweisen, die *Chlamydia* (im Folgenden auch unter dem Sammelbegriff Chlamydien zusammengefasst), stellen bedeutende Krankheitserreger verschiedenster Wirbeltiere (vgl. Abbildung 1.1). Im Gesundheitswesen stellen sie einen bedeutenden Faktor als humanpathogene Krankheitserreger dar und verursachen zudem große wirtschaftliche Schäden durch die Infektion von Nutztieren.

Die Entdeckung der Chlamydien erfolgte bereits vor über einem Jahrhundert, doch aufgrund ihrer einzigartigen Lebensweise und Physiologie war ihre taxonomische Einordnung schwierig und erst 1966 wurden die *Chlamydiae* den Bakterien zugeordnet (Moulder 1966; Nunes & Gomes 2014). Die Identifikation neuer Familien und Gattungen der *Chlamydiae* ist nach wie vor schwierig, da sich die Bakterien nicht in zellfreien Systemen kultivieren lassen.

Es wurde lange angenommen, dass das Phylum der *Chlamydiae* nur eine Familie (*Chlamydiaceae*) mit einer Gattung (*Chlamydia*) und zwei Spezies (*C. trachomatis* und *C. psittaci*) aufweist (Longbottom & Coulter 2003). Erst nach der Entwicklung serologischer und molekularer Analyseverfahren wurde klar, dass die Gattung um verschiedene Spezies, wie *C. pneumoniae* und *C. pecorum*, erweitert werden musste (Longbottom & Coulter 2003). Mit der Entdeckung sogenannter Umweltchlamydien, die vor allem Endosymbionten von ubiquitär vorkommenden Amöben darstellen, wurde auch das Phylum um die Familien der *Parachlamydiaceae* und der *Simkaniaceae* erweitert (Everett *et al.* 1999). Neueste Erkenntnisse, die aufgrund von Sequenzvergleichen ausgewählter Protein- und 16 S rRNS-Gene gemacht wurden, lieferten Hinweise, dass es sich bei den *Chlamydiae* mit voraussichtlich mehr als 180 Familien um ein sehr großes Phylum der Bakterien handelt, die nahezu omnipräsent phylogenetisch weit voneinander entfernte Wirte besiedeln (Lagkouvardos *et al.* 2014). Bis heute sind 10 Familien der *Chlamydiae* beschrieben worden (siehe Abbildung 1.1).

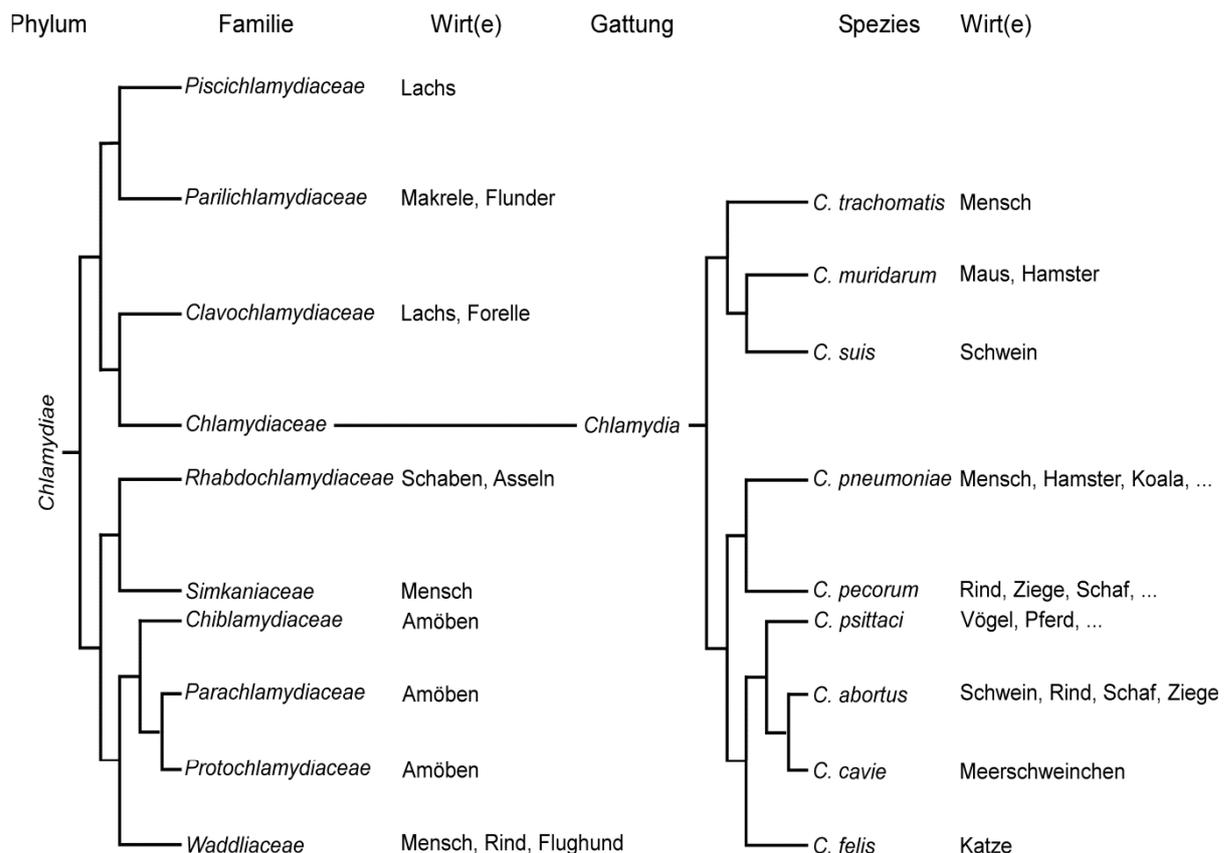


Abbildung 1.1: Taxonomie der *Chlamydiae*

Darstellung der taxonomischen Einordnung der 10 beschriebenen *Chlamydiae*-Familien, welche anhand von Sequenzvergleichen der Gene der 16S rRNS und ausgewählter Proteine vorgenommen wurde. Die Taxonomie der neun bekannten Spezies der Familie *Chlamydiaceae* wurde detailliert aufgeschlüsselt (Horn 2008; Stephens *et al.* 2009; Collingro *et al.* 2011; Lagkouvardos *et al.* 2014;

Nunes & Gomes 2014). Die Angabe typischer Wirte erfolgte rechts der Stammbäume. Die Länge der Linien stellt keine phylogenetischen Abstände dar.

1.2 Chlamydien als Krankheitserreger

Die *Chlamydiaceae* sind weltweit verbreitete Spezies. Sie spalteten sich vermutlich vor ca. 700 Millionen Jahren von ihren Schwesterfamilien ab, koevolvieren seitdem mit ihren Wirten und stellen einige der erfolgreichsten pathogenen Bakterienarten (Horn *et al.* 2004). Verschiedene Spezies der *Chlamydiaceae* befallen Haus-, Nage- und Nutztiere (siehe Abbildung 1.1) und verursachen Konjunktivitis (Entzündung der Bindehaut), respiratorische Erkrankungen (z. B. Pneumonien) sowie Entzündungen des Urogenitaltraktes, welche zur Infertilität führen und Früh- und Totgeburten auslösen können (Longbottom & Coulter 2003; Kerr *et al.* 2005; Rohde *et al.* 2010).

Einige der tierpathogenen Arten sind auf den Menschen übertragbar; die sogenannten Zoonosen werden von *C. psittaci*, *C. abortus* und in seltenen Fällen von *C. felis* verursacht. Die typischen Wirte für *C. psittaci* sind verschiedenste wildlebende und domestizierte Vogelarten. Eine *C. psittaci*-Infektion verursacht beim Menschen grippeähnliche Symptome, verbunden mit hohem Fieber, und verläuft in seltenen Fällen tödlich (Petrovay & Balla 2008; Beeckman & Vanrompay 2009). *C. abortus* infiziert vor allem Rinder und löst Früh- und Totgeburten aus. Es wurde zudem über Krankheitsfälle bei Ziegen, Schafen und Schweinen und auch Menschen berichtet (Pospischil *et al.* 2002). *C. felis* verursacht Konjunktivitis und Pneumonien bei Katzen und löst beim Menschen wahrscheinlich ähnliche Symptome aus (Hartley *et al.* 2001). Das zoonotische Potential der anderen chlamydialen Vertreter ist bis heute nicht bekannt, da Chlamydien-Infektionen meist asymptomatisch verlaufen und häufig nicht als solche erkannt werden. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigt, dass verschiedene vermutlich zoonotisch übertragene *Chlamydiaceae*-Spezies, darunter *C. psittaci*, *C. suis* und *C. pecorum*, als Auslöser des Trachoms beim Menschen in Frage kommen (Dean *et al.* 2013).

Zu den wichtigsten humanpathogenen Spezies gehören *C. trachomatis* und *C. pneumoniae*, deren Epidemiologie und Krankheitsbilder im Folgenden eingehender beschrieben werden.

1.2.1 *Chlamydia trachomatis*

Die mit Abstand bedeutendste humanpathogene chlamydiale Spezies ist *Chlamydia trachomatis*. *C. trachomatis* infiziert ausschließlich den Menschen und bedingt okuläre Entzündungen und sexuell übertragbare Erkrankungen des Urogenitaltraktes. Die Spezies *C. trachomatis* wird in verschiedene Untergruppen oder Serovare eingeteilt. Die

verschiedenen Serovare zeigen unterschiedliche Präferenzen bei der Infektion verschiedener Organe.

Die Serovare A bis C verursachen unter schlechten hygienischen Bedingungen Konjunktivitis, was zum Trachom, einer Vernarbung der Bindehäute und der krankhaften Veränderungen der Augenlider, führt (Mabey *et al.* 2003). Das Trachom führt unbehandelt zu Erblindung und stellt ein großes Problem der öffentlichen Gesundheit in den ärmsten Ländern der Welt dar. *C. trachomatis* ist der Hauptgrund für vermeidbare, durch Infektionen hervorgerufene Blindheit (Polack *et al.* 2005; Smith *et al.* 2011; Pascolini & Mariotti 2012).

Die *C. trachomatis* Serovare D bis K sind die häufigsten Ursachen für sexuell übertragbare, bakterielle Krankheiten. Diese Serovare lösen nicht invasive, urogenitale Erkrankungen aus. Für das Jahr 2008 wurden von der WHO weltweit 105,7 Millionen Neuansteckungen mit *C. trachomatis* bei Erwachsenen (15 bis 49 Jahre) geschätzt (WHO 2012). Entzündliche *C. trachomatis*-Infektionen der Gebärmutter Schleimhaut sind bei Frauen meist asymptomatisch und können zur Entzündung der Eileiter (Salpingitis) führen. Unbehandelt führt die Infektion zu einer Vernarbung des Eileitergewebes und ist somit eine Hauptursache für sekundäre Sterilität bei Frauen (Bebear & de Barbeyrac 2009; Haggerty *et al.* 2010; Mania-Pramanik *et al.* 2012).

Die *C. trachomatis* Serovare Lymphogranuloma venereum (LGV) Serovare L1 bis L3 sind ebenfalls auf sexuellem Wege übertragbar. Die LGV-Serovare infizieren vor allem Makrophagen und werden zu den Lymphknoten transportiert, wo sie schmerzhaft Entzündungen hervorrufen und schwerwiegende systemische Infektionen verursachen können (Mabey & Peeling 2002).

1.2.2 *Chlamydia pneumoniae*

Die zweite bedeutende humanpathogene Chlamydien-Spezies ist *Chlamydia pneumoniae*. *C. pneumoniae* tritt auch bei anderen Wirbeltieren, wie Beuteltieren oder Fröschen, auf (Bodetti *et al.* 2002). Trotz der intensiven Erforschung von *C. pneumoniae*-Infektionen ist die klinische Relevanz dieser Chlamydienart nicht vollkommen klar (Hahn 1999; Senn *et al.* 2011). *C. pneumoniae* wurde erstmals 1965 im Rahmen einer Trachom-Impfstoff-Studie aus dem Auge eines Kindes isoliert, 1983 mit respiratorischen Krankheiten in Verbindung gebracht und 1989 als Erreger von Lungenentzündungen (Pneumonien) identifiziert. Daraufhin wurde die Spezies *C. pneumoniae* erstmalig beschrieben (Grayston *et al.* 1989; Kuo *et al.* 1995; Roulis *et al.* 2012).

C. pneumoniae wird mit verschiedenen Erkrankungen des Respirationstraktes, wie ambulant erworbene Lungenentzündung (Pneumonie) (engl. community-acquired pneumonia = CAP), Bronchitis, Entzündungen der Nasennebenhöhlen (Sinusitis) und Rachenentzündung (Pharyngitis), in Verbindung gebracht (Grayston *et al.* 1990). Der Übertragungsweg ist nicht vollkommen aufgeklärt, es wird jedoch eine Verbreitung durch aerosolische, respiratorische Sekrete vermutet (Kuo *et al.* 1995). Zudem wird *C. pneumoniae* als Ursache für chronische Krankheiten des Respirationstraktes, wie Asthma und chronisch obstruktive Lungenerkrankungen (engl. chronic obstructive pulmonary disease = COPD), vermutet. *C. pneumoniae* wird seit den 1980iger Jahren zusätzlich mit Lungenkrebs und nicht-respiratorischen Erkrankungen, wie Arteriosklerose, die Alzheimersche Krankheit, Multiple Sklerose, Arthritis und Diabetes, in Verbindung gebracht; die Relevanz von *C. pneumoniae* bei der Entstehung dieser Krankheiten ist jedoch umstritten (von Hertzen 2002; West *et al.* 2009; Burillo & Bouza 2010; Chaturvedi *et al.* 2010; Shima *et al.* 2010; Roulis *et al.* 2012).

Da *C. pneumoniae*-Infektionen häufig asymptomatisch und sogar ohne jegliche Symptome verlaufen können und verschiedene Detektionsmethoden unterschiedliche Sensitivität aufweisen, sind wenige aussagekräftige epidemiologische Erhebungen verfügbar. Ein Nachweis von Antikörpern gegen *C. pneumoniae* bei Kindern unter 5 ist selten, bei Kinder im Vor- und Grundschulalter beträgt sie 5 bis 10 %, bei Erwachsenen zwischen 20 % und 50 % und steigt im Laufe des Lebens weiter an bis ca. 80 % bei älteren Personen (Grayston *et al.* 1990; Benitez *et al.* 2012). Eine Assoziation von *C. pneumoniae* mit ambulant erworbenen Lungenentzündungen wird je nach Studie, verwendeten Detektionsmethoden und geographischer Lage in 0 % bis 44 % aller Fälle hergestellt (Kumar & Hammerschlag 2007).

Vier Genomsequenzen von humanpathogenen *C. pneumoniae*-Isolaten sind veröffentlicht worden. Diese sind 99 % identisch zueinander in Bezug auf Gengehalt und Genreihenfolge im genomischen Kontext (Vandahl *et al.* 2004; Roulis *et al.* 2012). Die meisten Erkenntnisse über die Interaktion von Chlamydien mit ihren Wirtszellen stammen von Untersuchungen an *C. trachomatis*. Interessanterweise haben von den 1074 annotierten Protein-codierenden Genen der sequenzierten *C. pneumoniae*-Isolate 214 keine Homologen in *C. trachomatis* (Kalman *et al.* 1999; Read *et al.* 2000; Shirai *et al.* 2000). Allein dieser Unterschied macht die Notwendigkeit deutlich, die Interaktion von *C. pneumoniae* mit der Wirtszelle ebenfalls zu untersuchen.

1.3 Die Biologie der Chlamydien

C. pneumoniae durchläuft wie alle *Chlamydiae* einen Entwicklungszyklus, welcher zwei funktionell und morphologisch unterscheidbare Formen des Bakteriums aufweist. Hierbei werden die infektiösen, 0,2 µm bis 0,4 µm großen, auf extrazelluläres Überleben spezialisierten, metabolisch nahezu inerten Elementarkörperchen (EBs von engl. Elementary Bodies) von den intrazellulären, 0,4 µm bis 1,5 µm großen, zur vegetativen Vermehrung fähigen Retikularkörperchen (RBs von engl. Reticulate Bodies) unterschieden (Chi *et al.* 1987; Popov *et al.* 1991).

1.3.1 Der Aufbau der Chlamydien

Die *C. pneumoniae* EBs erscheinen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als elektronenundurchlässige, kugel- bis birnenförmige Gebilde (Chi *et al.* 1987; Wolf *et al.* 2000). Sie weisen ein exzentrisch vorliegendes, durch histonartige Proteine stark kondensiertes Chromosom auf (Wagar & Stephens 1988; Miyashita *et al.* 1993).

Chlamydien besitzt ebenso wie andere gramnegative Bakterien zwei Phospholipidmembranen. Erst kürzlich wurde Peptidoglycan im periplasmatischen Raum nachgewiesen, welches vor allem in sich teilenden RBs synthetisiert wird (Barbour *et al.* 1982; Liechti *et al.* 2014). Die äußerst widerstandsfähige, Sarkosyl-unlösliche Hülle der EBs besteht aus Cysteinereichen Proteinen, die stark über Disulfidbrücken vernetzt sind und als chlamydialer Außenmembrankomplex (cOMC von engl. Chlamydia Outer Membrane Complex) bezeichnet werden (Caldwell *et al.* 1981). Der cOMC setzt sich aus dem hauptsächlich vorkommenden Außenmembrankomplex-Proteinen MOMP (von engl. Major Outer Membrane Protein) und OmcA und OmcB zusammen (Caldwell *et al.* 1981; Newhall & Jones 1983; Hatch *et al.* 1984). Bei der Differenzierung der EBs zu RBs werden die Disulfidbrücken des cOMC gelöst, was mit der Expansion des chlamydialen Partikels und der Dekondensation des Chromosoms einhergeht, wodurch die kugeligen RBs im elektronenmikroskopischen Bild weniger kompakt und deutlich größer wirken (Wolf *et al.* 2000).

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind auf der Oberfläche von EBs und RBs charakteristisch rosettenartig hervorstehende Strukturen zu erkennen, die in frühen Arbeiten bereits mit einem möglichen Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) in Verbindung gebracht wurden (Nichols *et al.* 1985; Miyashita *et al.* 1993; Bavoil & Hsia 1998). Obwohl bis heute kein funktionsfähiges T3SS in Chlamydien experimentell direkt nachgewiesen wurde, zeigen genomische Analysen, dass Chlamydien Proteine codieren, die Homologe zu T3SS-

Komponenten anderer gramnegativer Bakterien sind (Hsia *et al.* 1997; Kalman *et al.* 1999). Das T3SS ermöglicht die Translokation von Effektorproteinen, welche durch Manipulation der Wirtszelle die intrazelluläre Nische der Bakterien etablieren, vom Zytosol des Bakteriums in die Wirtszelle. Das T3SS wird in Kapitel 1.4 ausführlich beschrieben.

Die Größe und genetische Zusammensetzung chlamydialer Genome spiegelt die lange Adaption der Chlamydien an ihre eukaryotischen Wirte wider. Während die in Amöben vorkommenden, sogenannten Umweltchlamydien wie *Parachlamydia acanthamoebae* mit ~3 Megabasenpaaren (Mbp) vergleichsweise große Genome besitzen, sind die der *Chlamydiaceae* nur 1 bis 1,2 Mbp groß (Stephens *et al.* 1998; Kalman *et al.* 1999; Collingro *et al.* 2011). Einige Gene, die für die Herstellung grundlegender Metaboliten benötigt werden, fehlen (Stephens *et al.* 1998; Kalman *et al.* 1999). Wahrscheinlich werden essenzielle Metabolite direkt von der Wirtszelle bezogen. Eine Auswahl der bekannten Interaktionen der Chlamydien mit der Wirtszelle zur Nutzung von Wirtszellressourcen werden in Kapitel 1.5.1.3 beschrieben. Darüber hinaus besitzen Chlamydien im Gegensatz zu anderen pathogenen Bakterien keine Pathogenitätsplasmide oder -inseln, in denen die für die Pathogenität essenziellen Proteine codiert werden. Dies erschwert die Suche nach Effektorproteinen stark (Peters *et al.* 2007). Allerdings weist beispielsweise *C. trachomatis* ein extrachromosomales Plasmid auf, welches eine Relevanz für die Virulenz besitzt (Carlson *et al.* 2008; O'Connell *et al.* 2011; Russell *et al.* 2011). Die Existenz von plasmidfreien *C. trachomatis*-Stämmen weist jedoch darauf hin, dass das Plasmid für die Infektion nicht-essenziell ist sondern einen Selektionsvorteil bieten (Farencena *et al.* 1997; Matsumoto *et al.* 1998; Rockey 2011).

1.3.2 Die genetische Manipulation von Chlamydien

Die Untersuchung der Mechanismen, die zur Veränderung des Genoms der Chlamydien führen, ist von großer Wichtigkeit, da zuverlässige Werkzeuge zur genetischen Manipulation von Chlamydien noch immer rar sind. Die intrazellulär lebenden, metabolisch aktiven RBs sind durch vier Membranen von extrazellulären Einflüssen abgeschirmt. Diese sind die beiden Membranen des Bakteriums, die Membran des Bakterien-enthaltenden Einschlusses (vgl. Kapitel 1.3.3) und die Membran der Wirtszelle. Die extrazelluläre Form ist von einem rigiden Außenmembrankomplex umgeben und metabolisch kaum aktiv (Caldwell *et al.* 1981; Bavoil *et al.* 1984). Deshalb wurde lange angenommen, dass nur sehr selten ein genetischer Austausch mit anderen chlamydialen Stämmen stattfindet und auch die genetische Manipulation schwierig oder sogar unmöglich ist. Gestützt wurde diese Theorie durch einen

geringen GC-Gehalt des gesamten chlamydialen Chromosoms und nur wenige bekannte Beispiele für Transposons und Bakteriophagen (Read *et al.* 2000; Peters *et al.* 2007).

Seit 2011 wurden große Fortschritte in Richtung genetischer Manipulation von Chlamydien gemacht. Es ist möglich, stabil Plasmide in einige *C. trachomatis*-Stämme und somit gezielt Gene oder antisense-RNS (aRNS) in diesen Organismus einzubringen, wobei die Selektion der Transformanten mittels Antibiotikaresistenz erfolgt (Wang *et al.* 2011; Kannan *et al.* 2013). Des Weiteren wurde kürzlich erstmalig für *C. trachomatis* gezeigt, dass gezielte Deletionen von Genen mittels Introns möglich sind (Johnson & Fisher 2013).

Bei der Transformation von *C. pneumoniae* mit Plasmiden wurden erste Erfolge erzielt, wobei die Transformation nur über wenige Passagen stabil ist (Gérard *et al.* 2013). Bisher konnte die neue Technik jedoch von anderen Arbeitsgruppen nicht erfolgreich eingesetzt werden.

1.3.3 Der chlamydiale Entwicklungszyklus

Der Entwicklungszyklus der Chlamydien beginnt mit der Adhäsion der Elementarkörperchen (EBs) an eine eukaryotische Wirtszelle (Abbildung 1.2). Die Adhäsion ist ein zweistufiger Prozess, der sich aus (i) der wahrscheinlich reversiblen, elektrostatischen Wechselwirkung des EBs mit Glykosaminoglykan (GAG) und (ii) einer anschließenden irreversiblen Bindung an Rezeptoren zusammensetzt (Carabeo & Hackstadt 2001).

Das *C. pneumoniae* Außenmembrankomplex-Protein OmcB besitzt ein GAG-Bindemotiv und ist in der Lage durch Bindung an Heparansulfat-ähnliche GAGs die erste Interaktion zwischen EB und Wirtszelle zu vermitteln (Moelleken & Hegemann 2008). Die Mechanismen der irreversiblen Bindung und der anschließenden Internalisierung von EBs sind erst ansatzweise aufgeklärt und werden zum Teil kontrovers diskutiert. Allerdings wurde für *C. pneumoniae* gezeigt, dass Pmp21, ein Mitglied der auf der Oberfläche der Bakterien lokalisierten polymorphen Membranproteine (Pmps), mit dem Epidermalen-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR = engl. epidermal growth factor receptor) interagiert (Moelleken *et al.* 2013). Die Pmp21-Bindung führt zur Aktivierung des EGFR und ist notwendig für die Internalisierung infektiöser EBs (Moelleken *et al.* 2013). Damit ist die Interaktion des Pmp21 mit EGFR die erste Adhäsion/Invasin-Rezeptor-Interaktion, die bei Chlamydien identifiziert wurde. Weitere mögliche Wirtszell-Rezeptoren, die mit der Bindung und Internalisierung der Chlamydien in Zusammenhang gebracht werden, sind unter anderem der Mannose-Rezeptor, der Mannose-6-phosphat-Rezeptor und die Protein-Disulfid-Isomerase (Kuo *et al.* 2002; Puolakkainen *et al.* 2005; Abromaitis & Stephens 2009). Auf der Seite der Chlamydien fungieren ebenfalls

weitere Proteine wie beispielsweise MOMP, GroEL1 und andere polymorphe Membranproteine (Pmps) als Adhäsine (Su *et al.* 1996; Wuppermann *et al.* 2008; Moelleken *et al.* 2010).

Es wurden Hinweise auf mehrere Internalisierungs-Mechanismen gefunden wie rezeptorvermittelte Clathrin-abhängige Endozytose oder Clathrin-unabhängige Aufnahme der Bakterien über einen „Zipper“-Mechanismus an Cholesterol-reichen Mikrodomänen, sogenannten Lipid Rafts (Ward & Murray 1984; Hodinka *et al.* 1988; Stuart *et al.* 2003; Gabel *et al.* 2004; Hybiske & Stephens 2007a). Kurze Zeit nachdem die EBs an die Plasmamembran der Wirtszelle adhärirt sind, wird Aktin zur Bindestelle rekrutiert und sockelartigen Strukturen werden unterhalb der Bakterien gebildet, wodurch die Aufnahme der EBs unterstützt wird (Carabeo *et al.* 2002; Coombes & Mahony 2002). An diesem Prozess ist das frühe Effektorprotein Tarp (translocated actin-recruiting phosphoprotein) beteiligt, welches vermutlich mittels T3SS in das Zytosol der Wirtszelle sekretiert wird und eine Signalkaskade aktiviert, die zur Reorganisation des Aktins führt (Clifton *et al.* 2004). Das *C. trachomatis* Tarp wird dabei von Wirtszellkinasen phosphoryliert, was zur Rekrutierung und Bindung von Sos1 und Vav2 führt. Diese zwei Rac Guanosinnukleotid-Austauschfaktoren aktivieren über eine Signalkaskade den Arp2/3-Komplex, wodurch Aktin zur Bindestelle der Chlamydien rekrutiert wird (Carabeo *et al.* 2007; Lane *et al.* 2008). Interessanterweise zeigten siRNS-Experimente, dass Sos1 und Vav2 wahrscheinlich zwei funktionell redundante Signalwege zur Aktivierung von Rac1 darstellen, die durch verschiedene Faktoren angesprochen werden. Die Rekrutierung von Vav2 ist beispielsweise abhängig von der Tarp-Phosphorylierung und der Anwesenheit der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3-K) und somit Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (Pi3,4,5P₃) in der Wirtszellmembran (Lane *et al.* 2008).

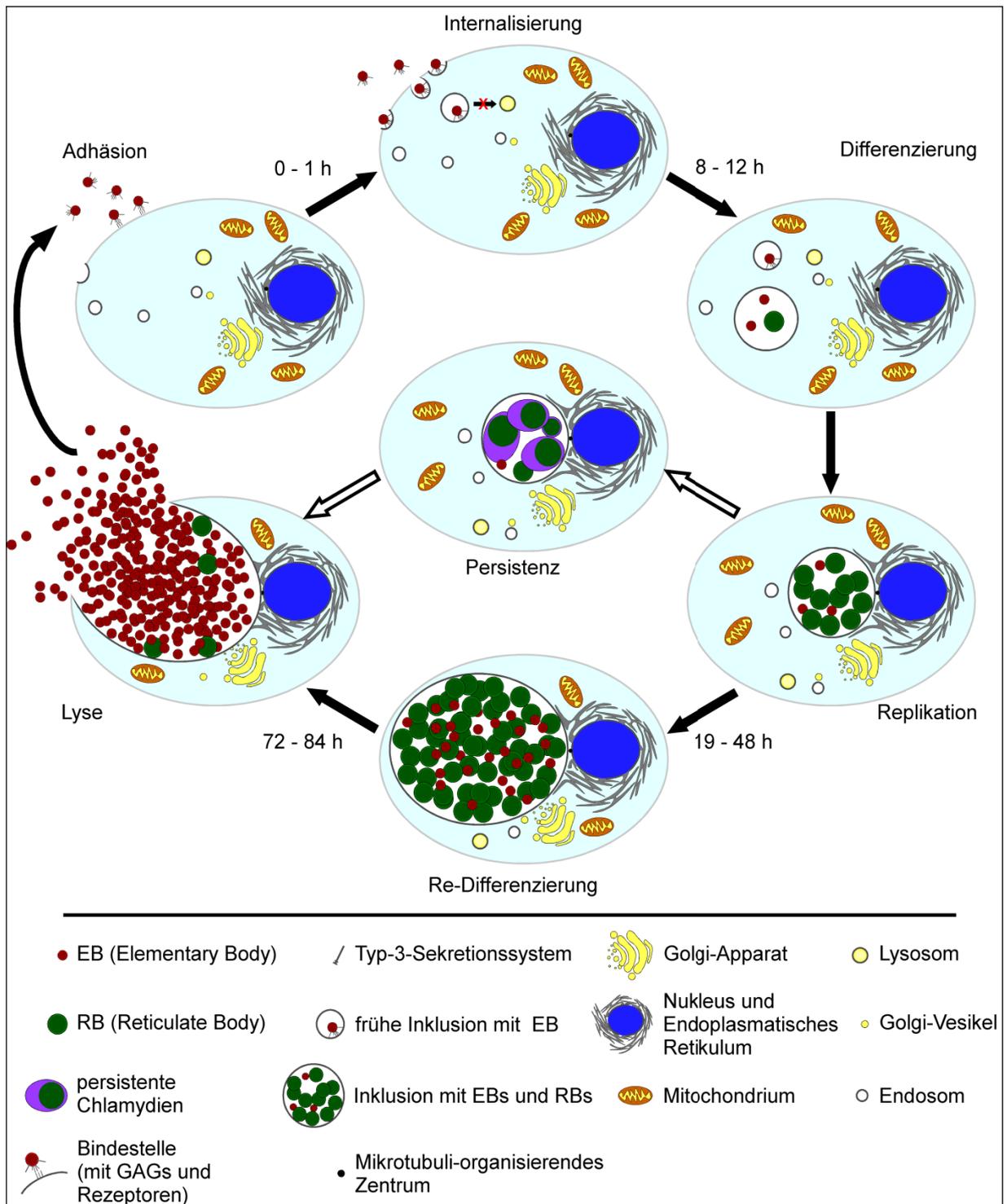


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von *C. pneumoniae*

Dargestellt sind die Phasen des Entwicklungszyklus von *C. pneumoniae* während der Infektion einer Wirtszelle. Die Abbildung ist modifiziert nach Beckman und Kollegen, mit Angaben des zeitlichen Verlaufs nach elektronenmikroskopischen Analysen von Wolf und Kollegen (Wolf *et al.* 2000; Beckman *et al.* 2014).

Während der intrazellulären Phase des Infektionszyklus verbleiben die Chlamydien innerhalb eines membranumschlossenen Kompartiments, das als Inklusion bezeichnet wird. Die Membran stammt von der Plasmamembran der Wirtszelle und wird durch Insertion chlamydialer Inklusionsmembran-Proteine (Inc = engl. Inclusion membrane protein) stark modifiziert (Rockey *et al.* 2002) (Kapitel 1.5.1.1). Diese Modifikationen sind entscheidend für die Interaktion der Chlamydien mit der Wirtszelle. Beispielsweise wird eine Fusion der Inklusion mit Wirtszell-Lysosomen verhindert, wodurch die Chlamydien dem enzymatischen Abbau entgehen, was wahrscheinlich auf die Funktion von Inc-Proteinen zurückzuführen ist (Eissenberg & Wyrick 1981; Hackstadt 2000; Fields & Hackstadt 2002). Die frühe Inklusion wird Dynein-abhängig an Mikrotubuli entlang zum Mikrotubuli-Organisierenden-Zentrum (MTOC = engl. Microtubule-Organizing Center) in die Peripherie des Zellkerns transportiert und bleibt dort während des Zellzyklus der Wirtszelle Dynein-abhängig gebunden (Clausen *et al.* 1997; Grieshaber *et al.* 2003; Grieshaber *et al.* 2006).

Bei *C. pneumoniae* findet die Differenzierung von EBs zu RBs etwa 8 bis 12 h nach Infektionsbeginn statt. Dabei wird die rigide Zellwand der EBs aufgelöst, wodurch die Größe der Bakterien zunimmt (Newhall & Jones 1983; Hackstadt *et al.* 1985) (vgl. Abbildung 1.2). Das Chromosom dekondensiert, woraufhin Transkription und Translation früher Gene beginnen und die ersten Proteine synthetisiert werden, die vor allem bei der Bereitstellung von Nährstoffen und bei der Modifikation der Inklusionsmembran eine Rolle spielen (Belland *et al.* 2003).

Verbunden mit einer Größenzunahme der Inklusion vermehren sich die RBs durch Zweiteilung. Bei *C. pneumoniae* füllen die RBs die gesamte Inklusion aus, wohingegen die RBs von *C. trachomatis* mit der Inklusionsmembran assoziiert sind (Hackstadt *et al.* 1997; Peters *et al.* 2007). Zwischen 24 und 48 h nach Infektionsbeginn befinden sich fast ausschließlich RBs in der Inklusion. Dann beginnt asynchron die zweite Differenzierung, im Zuge derer die ersten RBs wieder zu EBs re-differenzieren. Während der Re-Differenzierungsphase werden späte Gene exprimiert. Diese codieren einige Proteine des cOMC und histonartigen Proteine für die Kondensation des Chromosoms sowie Proteine, die für die frühe Infektion der nächsten Infektionsrunde benötigt werden (Belland *et al.* 2003; Mäurer *et al.* 2007). Während der Re-Differenzierungsphase sind neben den EBs in typischer Größe und mit kondensierter DNS Zwischenformen erkennbar, die schon eine kondensierte DNS zeigen, jedoch noch deutlich größer als typische EBs sind. Diese sogenannten

Zwischenkörperchen (IB = engl. Intermediate Body) sind *in vitro* bereits infektiös (Beeckman *et al.* 2014).

Im Zeitraum von 60 bis 72 h ist, neben sich teilenden RBs, eine zunehmende Zahl von EBs zu beobachten. Zwischen 72 und 84 h werden die EBs freigesetzt und können anschließend weitere Zellen infizieren (Wolf *et al.* 2000). Die Freisetzung ist Spezies- und Serovar-abhängig und kann durch Lyse der Wirtszelle oder Extrusion geschehen. Die Lyse ist ein Prozess, bei dem die Membran der Inklusion und die Plasmamembran der Wirtszelle geordnet durch Cystein-Proteasen zerstört und so die EBs freigesetzt werden (vgl. Abbildung 1.2). Die Extrusion ist ein komplexer, vermutlich von den Chlamydien kontrollierter Vorgang, bei dem viele oder sogar alle EBs die Wirtszelle in einem membranumschlossenen Vesikel verlassen, wobei die Wirtszelle intakt bleibt (Hybiske & Stephens 2007b) (vgl. Kapitel 1.5.1.2).

Unter ungünstigen Bedingungen können die Bakterien in die Persistenz übergehen. Als Persistenz-auslösende Bedingungen wurden der Einfluss von Antibiotika, Mangel an verschiedenen Nährstoffen (z.B. Aminosäuren, Glukose und Eisen) und die Wirkung verschiedener Cytokine, vor allem Interferon-gamma (INF- γ), identifiziert. In der Persistenz teilen sich die RBs selten oder gar nicht, re-differenzieren nicht zu EBs und wachsen, da die Replikation der DNS weiter abläuft, zu anormaler Größe an. Dieser Vorgang ist bei Verbesserung der äußeren Bedingungen reversibel (Hogan *et al.* 2004).

1.4 Bakterielle Protein-Sekretionssysteme

Um mit ihrer Umwelt zu interagieren und mögliche Wirte gezielt zu manipulieren, produzieren Bakterien Proteine, die eine Funktion außerhalb der prokaryotischen Zelle ausüben. Für den Transport dieser Proteine aus dem bakteriellen Zytoplasma in das umgebende Medium oder das Zytoplasma der Wirtszelle haben gramnegative Bakterien spezialisierte Sekretionssysteme entwickelt. Zwei Gruppen von Sekretionswegen werden unterschieden: (i) In einem zweistufigen Prozess werden Proteine über das sogenannte Sec- (ungefaltete Proteine) oder Tat-System (gefaltete Proteine) in den periplasmatischen Raum exportiert und anschließend durch weitere Komplexe über die äußere Membran transportiert. (ii) Bakterielle Proteine werden in einem einzigen Schritt über die beiden Membranen des Bakteriums in den extrazellulären Raum oder sogar direkt in die Wirtszelle transportiert. Dieser einstufige Prozess wird Translokation genannt.

Bisher sind sieben Sekretionswege bekannt, von denen vier zweistufig ablaufen und drei einstufig. Zu den zweistufigen bzw. Sec-abhängigen Sekretionswegen gehören das Typ-II-

Sekretionssystem (T2SS), das Typ-IV-Sekretionssystem (T4SS), das Typ-V-Sekretionssystem (T5SS) und der sogenannte „chaperone/usher“ Sekretionsweg. Proteine, die mittels zweistufiger Mechanismen sekretiert werden, besitzen entweder eine aminoterminal (N-terminale) Signalsequenz, die vor allem aus hydrophoben Aminosäuren besteht (Sec-abhängiger Transport), oder ein carboxyterminales (C-terminales) Signalpeptid, das zwei Arginine beinhaltet (Tat-abhängiger Transport). Zu den Sec-unabhängigen, einstufigen Sekretionswegen gehören das Typ-I-Sekretionssystem (T1SS), das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) und das Typ-VI-Sekretionssystem (T6SS). Interessante Übersichten verschiedener bakterieller Protein-Sekretionssysteme wurden von Beekman und Vanrompay und Tseng und Kollegen zusammengestellt (Beekman & Vanrompay 2009; Tseng *et al.* 2009). Das T3SS ist das komplexeste Proteinsekretionssystem und wird im Folgenden detaillierter beschrieben.

1.4.1 Das Typ-III-Sekretionssystem

Das T3SS wurde bisher ausschließlich bei gramnegativen Bakterien nachgewiesen, wo es Proteine über die zwei bakteriellen Membranen, den extrazellulären Raum und die eukaryotische Plasmamembran in das Zytoplasma einer Wirtszelle transloziert (Cornelis 2006). Es besteht aus über 20 strukturellen Proteinen, die größtenteils der Überbrückung der Bakterienhülle dienen (Burkinshaw & Strynadka 2014). Der extrazelluläre Raum wird von einer hohlen Nadel überbrückt, die eine spezifisch regulierte Länge aufweist (Marlovits *et al.* 2004; Mota *et al.* 2005). Bei Kontakt mit einer Wirtszelle wird ein heterooligomerer Komplex in die eukaryotische Plasmamembran inseriert, der als Translokationspore oder Translokon bezeichnet wird und sich aus einem hydrophilen und zwei hydrophoben Translokon-Proteinen zusammensetzt. Das Translokon wird in Kapitel 1.4.4.2 ausführlich beschrieben.

Gene, die strukturelle T3SS-Proteine und durch das T3SS translozierte Effektoren codieren, sind meist in sogenannten Pathogenitätsinseln organisiert, die sich im Genom der Bakterien oder auf extrachromosomalen Plasmiden befinden. Es wird daher angenommen, dass diese Pathogenitätsinseln von verschiedenen Bakterienarten über horizontalen Gentransfer erworben wurden (Gophna *et al.* 2003). Hier bilden Chlamydien eine Ausnahme, ihre T3SS-Strukturproteine sind in vier Clustern von zehn Operons in verschiedenen Bereichen des bakteriellen Chromosoms codiert und organisiert (Hefty & Stephens 2007; Peters *et al.* 2007; Beekman & Vanrompay 2010). Interessanterweise ist das Phylum der *Chlamydiae* neben dem der *Proteobacteria* das einzige, welches Bakterienarten mit T3SS aufweist (Cornelis 2006).

1.4.2 Verschiedene Typ-III-Sekretionssysteme sind unterscheidbar

Aufgrund phylogenetischer Analysen der Aminosäuresequenz von vier konservierten Strukturproteinen verschiedener T3SS werden sieben Familien unterschieden: Bei freilebenden, tierpathogenen Bakterienarten kommen T3S-Systeme aus drei Familien vor, zwei Familien kommen bei Pflanzenpathogenen vor und je eine Familie ist ausschließlich bei den Chlamydien- und Rhizobien-Arten zu finden (Gophna *et al.* 2003; Troisfontaines & Cornelis 2005; Beeckman & Vanrompay 2010).

Es kommt nicht selten vor, dass eine Bakterienart zwei oder mehrere T3SS aufweist, die verschiedenen Familien zugeordnet werden. Das bestuntersuchte Beispiel dafür ist *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, welches zwei Pathogenitätsinseln aufweist, die Gene für zwei vollständige T3S-Systeme und einige Effektorproteine codieren und als „*Salmonella pathogenicity islands*“ (SPIs) bezeichnet werden (Knodler & Steele-Mortimer 2003). Sie bilden die Archetypen der SPI-1 (Inv-Mxi-Spa) und SPI-2 (Ssa-Esc) T3SS-Familien. Das Vorhandensein verschiedener T3SS-Familien bei einer gegebenen Bakterienart erhärtet die These, dass die Gene für T3S-Systeme über horizontalen Gentransfer als genetische Einheit aufgenommen wurden (Troisfontaines & Cornelis 2005).

Für *S. Typhimurium* wurde gezeigt, dass die beiden T3S-Systeme zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion eine Rolle spielen. Das in der SPI-1 codierte T3SS hat eine Funktion in der frühen Infektion während der Anheftung und des Eintritts in die Epithelzellen des Darms. Das in der SPI-2 codierte T3SS dagegen wird während der intrazellulären Phase der Infektion benötigt. Auch die in diesen Phasen der Infektion benötigten Effektorproteine werden teilweise innerhalb der jeweiligen SPI codiert (Waterman & Holden 2003).

1.4.3 T3SS-assozierte Chaperone und das Sekretionssignal

Für den T3SS-Aufbau und die Sekretion von Effektorproteinen sind spezielle, zytosolische Chaperone der Bakterienzelle unerlässlich. Den an der Typ-III-Sekretion beteiligten Chaperone sind Eigenschaften wie eine relativ kleine Molekülmasse, ein niedriger isoelektrischer Punkt und Funktionalität als Dimer gemein. Sie werden in drei Klassen unterteilt, die im Folgenden kurz zusammengefasst werden (Page & Parsot 2002; Cornelis 2006; Beeckman & Vanrompay 2010; Burkinshaw & Strynadka 2014).

Chaperone der Klasse I binden Effektorproteine, welche durch das T3SS sekretiert werden. Die Klasse I lässt sich in zwei Untergruppen aufteilen: (a) Chaperone, die mit einem spezifischen Effektorprotein interagieren (Uni-Effektor Chaperon) und (b) Chaperone, die

verschiedene Effektorproteine binden können (Multi-Effektor Chaperon). Meist sind Chaperone der Klasse I im genomischen Kontext benachbart zu ihrem Substrat codiert und die Expression der Gene wird koreguliert (Page & Parsot 2002; Pallen *et al.* 2005; Button & Galan 2011). In den ersten 50 bis 100 aminoterminalen (N-terminalen) Aminosäuren des Effektorproteins befindet sich die Chaperon-Binde-Domäne (CBD), mit der das Effektorprotein um ein Chaperon-Dimer gewickelt wird. Diese Interaktion mit den Klasse I-Chaperonen erhöht die Stabilität der Effektoren und erhält sie in einer partiell ungefalteten Konformation, sodass sie im Zytosol der Bakterien bis zur Sekretion in einem transportfähigen Zustand gespeichert werden (Stebbins & Galan 2001; Cornelis 2006; Lilic *et al.* 2006). Die Chaperon-Effektorprotein-Interaktion ist vermutlich für die Etablierung einer Sekretionsreihenfolge und für den Transport der Effektorproteine zur Basis des T3SS wichtig (Lara-Tejero *et al.* 2011).

Chaperone der Klasse II interagieren mit den beiden hydrophoben Translokon-Proteinen, um die Bakterien vor deren toxischer Wirkung zu schützen (Menard *et al.* 1994; Neyt & Cornelis 1999). Die Klasse II-Chaperone weisen Tetratricopeptid-Wiederholungen (TPR = engl. tetratricopeptide repeat) auf, die typischerweise aus 34 Aminosäuren langen, unvollkommenen Wiederholungen bestehen und Chaperon-Substrat-Interaktion vermitteln (Pallen *et al.* 2003). Translokon-Proteine und ihre korrespondierenden Klasse II-Chaperone wurden bei verschiedenen enteropathogenen Bakterien eingehend untersucht. Die archetypischen Beispiele bilden die beiden hydrophoben Translokatoren von *Yersinia* YopB und YopD, die von dem Klasse II-Chaperon LcrH (bzw. SycD) gebunden werden (Neyt & Cornelis 1999). Weitere gut untersuchte Beispiele sind PopB/ D und PcrH aus *Pseudomonas aeruginosa*, IpaB/ C und IpgC (bzw. SpgC) aus *Shigella flexneri* und SipB/ C und SicA aus der *Salmonella enterica* SPI-1 (Allmond *et al.* 2003; Birket *et al.* 2007). Im Gegensatz dazu scheinen die hydrophoben Translokon-Proteine SseC/ D der SPI-2 von *Salmonella enterica* mit verschiedenen Klasse II-Chaperonen zu interagieren, da das Chaperon SscA zwar SseC, aber nicht SseD, bindet (Cooper *et al.* 2013).

Chaperone der Klasse III binden Untereinheiten der T3SS-Nadel, welche den extrazellulären Raum überbrückt. Diese Interaktion verhindert eine Interaktion der Untereinheiten und unterbindet eine vorzeitige Polymerisation im Zytosol der Bakterien (Cornelis 2006).

Kurz vor der eigentlichen Sekretion der Proteine durch das T3SS werden die Chaperone von ihrem Substrat gelöst und verbleiben im Zytoplasma der Bakterienzelle (Akedo & Galan 2005). Neben der CBD der sekretierten Substrate des T3SS ist ein zweites N-terminales

Signal bekannt, das innerhalb der ersten 15 bis 25 Aminosäuren der sekretierten Proteine liegt und für die Sekretion der Proteine notwendig ist (Beeckman & Vanrompay 2010). Die Art des Signals wurde lange kontrovers diskutiert, da die bekannten T3SS-Substrate kaum Homologien in diesem Bereich aufwiesen. Es wird vermutet, dass das Sekretionssignal keine spezifische Nukleotidsequenz, sondern eine definierte Abfolge von Aminosäuren mit bestimmten Eigenschaften darstellt (Samudrala *et al.* 2009; McDermott *et al.* 2010). Basierend auf der Annahme, dass das Signal für eine Sekretion durch das T3SS innerhalb der ersten 15 N-terminalen Aminosäuren eines Proteins codiert wird und universell ist, wurden Experimente zur Identifizierung unbekannter *C. pneumoniae*-Effektorproteine durchgeführt. Chimären der 15 N-terminalen Aminosäuren und einem Reporterprotein wurden auf eine heterologe Sekretion durch das T3SS von *Shigella flexneri* untersucht, wobei 24 Proteine als sekretiert identifiziert wurden (Subtil *et al.* 2005).

1.4.4 Der Aufbau des T3SS

Das T3SS wird häufig mit einer Spritze verglichen, die bei Kontakt mit der Membran einer Wirtszelle mit der Sekretion verschiedener Proteine beginnt. Es ist aus Proteinen zusammengesetzt, die multimere, zylindrische Strukturen aufbauen. Die globale Struktur des T3SS wird in drei Komponenten eingeteilt: (i) der Basalkörper, (ii) der Nadelkomplex und (iii) die Translokon-Proteine (vgl. Abbildung 1.3). Im folgenden Kapitel wird kurz der Aufbau der ersten beiden Komponenten am Beispiel des gut charakterisierten T3SS von *Yersinia* beschrieben. Der Aufbau und die Funktion des Translokons verschiedener Spezies wird ausführlich im Kapitel 1.4.4.2 dargestellt.

1.4.4.1 Aufbau von Basalkörper und Nadelkomplex

Der Basalkörper setzt sich aus einer großen Zahl von Proteinen zusammen, die in den Membranen des Bakteriums verankert sind und meist Homomultimere mit radiärer Symmetrie bilden (siehe Abbildung 1.3) (Cornelis 2006). In der äußeren Membran des Bakteriums befindet sich ein Ring aus Proteinen der YscC-Familie (Hueck 1998). Dieser wird über ein Protein der YscJ-Familie, welches in der periplasmatischen Seite der inneren Membran verankert ist und den periplasmatischen Raum durchspannt, mit der inneren Membran des Bakteriums verbunden (Hueck 1998; Silva-Herzog *et al.* 2008). In der inneren Membran wird zusammen mit YscJ von einem Protein der YscD-Familie ein Ring gebildet (Diepold *et al.* 2010). Die integralen Membranproteine YscR, S, T, U und V bilden schließlich den sogenannten Exportkanal in der inneren Membran und sind möglicherweise

an der Erkennung von Substraten für den Export beteiligt (Sorg *et al.* 2007; Diepold *et al.* 2010).

Auf der zytosolischen Seite des T3SS befindet sich die ATPase YscN, welche durch Oligomerisierung aktiviert wird und wahrscheinlich die Energie für den Transport durch die Hydrolyse von ATP bereitstellt (Woestyn *et al.* 1994; Blaylock *et al.* 2006; Diepold *et al.* 2010). Die Interaktion des YscL-Proteins mit YscN inhibiert dessen ATPase-Aktivität, weshalb für YscL eine regulatorische Funktion bei der Typ-III-Sekretion vermutet wird (Jackson & Plano 2000; Blaylock *et al.* 2006). YscQ gehört in die Familie der C-Ring-Proteine des T3SS, für die bei *Shigella* und *Salmonella* Hinweise auf eine Beteiligung bei der Rekrutierung und Sortierung von Substrat-Chaperon-Komplexen gefunden wurden (Morita-Ishihara *et al.* 2006; Diepold *et al.* 2010; Lara-Tejero *et al.* 2011; Stamm & Goldberg 2011).

Der extrazelluläre Raum wird von einer hohlen Nadel überbrückt, welche ein homomultimeres Konstrukt aus helikal angeordneten Proteinen der YscF-Familie ist. Bei *Yersinia* ist die Nadel aus 100 bis 150 Molekülen des 9 kDa Proteins aufgebaut und der innere Durchmesser beträgt nur etwa 3 nm (Cornelis 2006; Deane *et al.* 2006). Um diesen schmalen Kanal passieren zu können, müssen sich die translozierten Proteine in einem nicht- oder nur partiell gefalteten Zustand befinden. Die Nadellänge stellt eine Anpassung an die spezifische Wirtszelle dar und kann je nach Bakterienspezies zwischen 40 bis 80 nm, bei pflanzenpathogenen Arten auch bis zu mehreren µm betragen (Beeckman & Vanrompay 2010). Am Ende der Nadel des T3SS befindet sich das Translokon, bestehend aus LcrV, YopB und YopD (Kapitel 1.4.4.2).

Viele der strukturgebenden Proteine des T3SS-Basalkörpers besitzen ein N-terminales Sec-Signalpeptid und werden Sec-abhängig in die Membranen des Bakteriums inseriert. Ist der erste Sec-abhängige Einbau abgeschlossen, werden das Nadelprotein YscF und die Translokon-Proteine T3SS-abhängig transportiert (Cornelis 2006; Diepold *et al.* 2011).

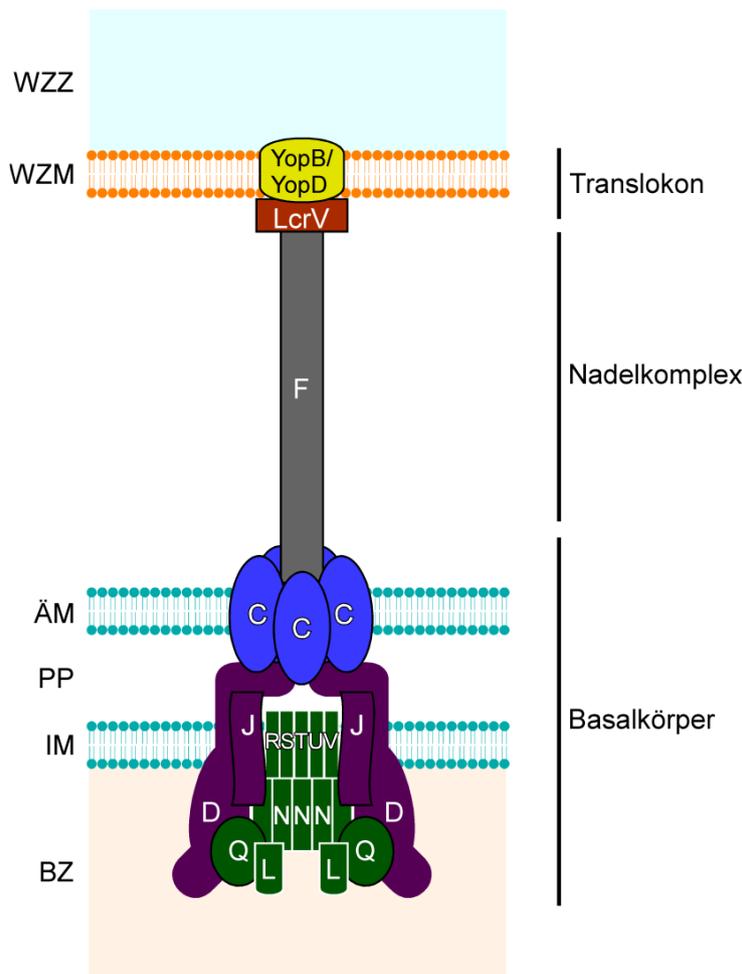


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Typ-III-Sekretions-systems

Die Nomenklatur der am Aufbau des T3SS beteiligten Proteine wird von Yersinia für Chlamydien übernommen, die Buchstaben geben somit die Proteinbestandteile der einzelnen Komponenten wieder. Die multimeren Proteinuntereinheiten sind schematisch und mit korrekter stöchiometrischen Verteilung angegeben.

Der Basalkörper hat Kontakt zum Zytoplasma der Bakterienzelle (BZ) und durchspannt die innere Membran (IM), den periplasmatischen Raum (PP) und die äußere Membran (ÄM). Der Nadelkomplex verbindet den Basalkörper und das Translokon miteinander und durchspannt den Raum zwischen Bakterium und Wirtszelle.

Das Translokon besteht aus dem beiden Translokationsporenen-Proteinen (YopB und YopD). Die Translokationspore wird in die Wirtszellmembran (WZM) inseriert und ermöglicht dem T3SS Effektorproteine in das Wirtszellzytosol (WZZ) zu translozieren. Die Abbildung wurde modifiziert nach Diepold und Kollegen und Betts-Hampikian und Fields (Betts-Hampikian & Fields 2010; Diepold *et al.* 2010).

1.4.4.2 Aufbau des Translokons

Das Translokon besteht aus drei Proteinen, welche eine heterooligomere Pore in der Zytoplasmamembran der Zielzelle assemblieren und so die Translokation von Effektoren in das Zytosol dieser Zelle ermöglichen (Abbildung 1.3). In den bisher untersuchten T3SS werden die drei Translokon-Proteine zusammen als Operon codiert (siehe Abbildung 4.1) (Mueller *et al.* 2008; Mattei *et al.* 2011). Die drei Translokon-Proteine werden aufgrund vorhergesagter hydrophober Domänen in drei Gruppen eingeordnet: (i) Der hydrophile Translokator befindet sich an der Spitze der T3SS-Nadel und ist die Plattform zur Polymerisierung der Translokationspore. Er weist meist keine hydrophoben Domänen auf. (ii) Das große Translokationsporenen-Protein weist zwischen zwei und drei Transmembrandomänen auf. (iii) Das kleine Translokationsporenen-Protein besitzt meist nur eine Transmembrandomäne. Die Translokon-Proteine der letzten beiden Gruppen werden

aufgrund der Transmembrandomänen auch als hydrophobe Translokatoren bezeichnet (Mattei *et al.* 2011).

Innerhalb der in Kapitel 1.4.2 besprochenen Familien von T3S-Systemen sind die Translokon-Proteine konserviert und zeigen signifikante Homologien zueinander. Einige der besser untersuchten Translokon-Proteine sind in Tabelle 1.4.1 aufgeführt. Zwischen den T3SS-Familien sind Sequenz-Ähnlichkeiten der Translokon-Proteine kaum vorhanden, während funktionelle und strukturelle Eigenschaften konserviert sind.

Tabelle 1.4.1: Nadelspitzenkomplexe und Translokationsporen-Proteine (TPP) pathogener Bakterien

Bakterium	Nadelspitzenkomplex	großes TPP	kleines TPP
<i>Yersinia</i>	LcrV	YopB	YopD
<i>Shigella</i>	IpaD	IpaB	IpaC
<i>Salmonella</i> (SPI-1)	SipD	SipB	SipC
<i>Salmonella</i> (SPI-2)	SseB	SseC	SseD
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PcrV	PopB	PopD
<i>Escherichia coli</i>	EspA	EspD	EspB

Der hydrophile Translokator bildet eine Struktur an der Spitze der Nadel des T3S-Systems, die häufig als Nadelspitzenkomplex bezeichnet wird. Die Proteine der Nadelspitzenkomplexe verschiedener Spezies wie LcrV, PcrV und EspA wurden elektronenmikroskopisch an der Spitze isolierter T3SS-Nadeln detektiert, während die hydrophoben Translokatoren meist erst nach Kontakt mit der Wirtszelle sekretiert werden (Mueller *et al.* 2005; Broz *et al.* 2007; Gebus *et al.* 2008). Dagegen bildet IpaD aus *Shigella* zusammen mit dem hydrophoben Translokator IpaB ein Heteropentamer, welches bei Kontakt mit einer Wirtszelle seine Konformation ändert und die Sekretion von Effektorproteinen zulässt (Johnson *et al.* 2007; Veenendaal *et al.* 2007; Roehrich *et al.* 2013). EspA aus *E. coli* bildet eine elongierte Struktur, die eine Länge von bis zu 680 nm aufweist (Sekiya *et al.* 2001). Es wird vermutet, dass Unterschiede im Aufbau der Nadelspitzenkomplexe Anpassungen an die Anforderungen darstellen, unter denen die T3SS verschiedener Organismen funktionsfähig sein müssen (Cornelis 2006). Mutationsanalysen und Neutralisations-Experimente mit Antikörpern gegen die hydrophilen Translokatoren zeigen, dass sie für die korrekte Assemblierung der Translokationspore an der Nadelspitze des T3SS und in der Membran der Zielzelle essenziell sind (Goure *et al.* 2004; Goure *et al.* 2005; Broz *et al.* 2007; Veenendaal *et al.* 2007; Thanassi *et al.* 2012).

Die Struktur und die stöchiometrische Zusammensetzung der Translokationspore sind nicht vollkommen aufgeklärt. Es ist beispielsweise bekannt, dass die großen hydrophoben Translokatoren SipB aus *Salmonella* und IpaB aus *Shigella* Homotrimere bilden, wobei die Interaktion durch eine Coiled-Coil Domäne im N-terminalen Bereich der Proteine vermittelt wird (Hume *et al.* 2003). Dagegen bildet der N-Terminus (As 1-107) von EspD Homodimere, was hier von einer amphipathischen Domäne vermittelt wird (Dasanayake *et al.* 2011). Die heterolog in *E. coli* exprimierten hydrophoben Translokatoren PopB und PopD assemblieren bei Inkubation mit Liposomen spontan heterooligomere Poren, welche die beiden Proteine in einem Verhältnis von 1:1 enthalten (Romano *et al.* 2011).

Neben der Funktion als Porenbildner fungieren einige hydrophobe Translokatoren selbst als Effektoren. So sind die kleinen Translokatoren mehrerer Bakterien in der Lage Aktin zu polymerisieren (Mattei *et al.* 2011). SipC und IpaC binden und nuklearisieren Aktin, wodurch die Internalisierung der Bakterien begünstigt wird (Hayward & Koronakis 1999; Nhieu *et al.* 1999). Zudem ist eine 63 Aminosäuren lange Domäne im C-Terminus des IpaC ausreichend, um die Tyrosinkinase Src zu rekrutieren und zu aktivieren, wodurch Aktin zur Kontaktstelle des Bakteriums rekrutiert wird. Innerhalb dieses Bereiches befindet sich eine Coiled-Coil Domäne, die wahrscheinlich bei dieser Interaktion eine Rolle spielt (Mounier *et al.* 2009). Auch EspB zeigt eine Funktion bei der Reorganisation des Zytoskeletts, welche durch eine Rekrutierung von α -Catenin durch EspB induziert wird (Mattei *et al.* 2011).

Interessanterweise ist die Insertion von SipB und SipC aus *Salmonella* für die irreversible Bindung des Bakteriums an die Wirtszelle notwendig. Die Verankerung des Bakteriums ist somit ein weiterer wichtiger Aspekt ihrer Funktion (Misselwitz *et al.* 2011; Thanassi *et al.* 2012). Für die Bindung der Translokationsporen-Proteine und für die Translokation von Effektoren ist die Zusammensetzung der Zielmembran von großer Bedeutung. Durch die Extraktion von Cholesterol aus der Plasmamembran von Humanzellen wurde dessen essenzielle Rolle für die Sekretion von Effektoren durch die T3SS von *Salmonella*, *Shigella* und *E. coli* demonstriert (Hayward *et al.* 2005). *In vitro* Bindungsstudien zeigten, dass SipB und IpaB Cholesterol binden und ihre Insertion in die Zytoplasmamembran der Wirtszelle von Cholesterol abhängt. Auch die Insertion von PopB/D-Poren in artifizielle Membranen wird durch Cholesterol und Phosphatidylserin begünstigt (Hayward *et al.* 2005; Romano *et al.* 2011).

1.4.5 Besonderheiten des chlamydialen T3SS

Das Vorhandensein eines funktionellen T3SS in Spezies der *Chlamydiaceae* konnte bisher nur auf indirektem Wege gezeigt werden. Durch Genomsequenzierungen und bioinformatische Analysen ist ein vollständiges Set von Genen in Chlamydien identifiziert worden, die Komponenten für ein T3SS codieren. Bemerkenswert ist dabei, dass das Genom von *C. trachomatis* Serovar D 894 offene Leserahmen aufweist. Somit wird in diesem stark kondensierten Genom eine erhebliche Codierungskapazität genutzt, um die 20 bis 30 T3SS-Komponenten zu codieren. Dies deutet darauf hin, dass das T3SS unerlässlich für die erfolgreiche Chlamydien-Infektion ist (Betts-Hampikian & Fields 2010).

Im Gegensatz zu anderen pathogenen Bakterien werden bei Chlamydien die Gene für die T3SS-Strukturproteine in verschiedenen Clustern codiert, die über das gesamte Genom verteilt sind. Sie sind an ihrem GC-Gehalt, der über das gesamte Chromosom mit etwa 40 % sehr niedrig ist, nicht vom Rest des Chromosoms unterscheidbar (Peters *et al.* 2007). Ferner zeigen die Cluster keine Anzeichen einer in evolutionären Zeiträumen jüngerer Integration, was eine weitere Besonderheit darstellt (Beeckman & Vanrompay 2010).

In elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden schon vor über 30 Jahren rosettenartige, hervorstehende Strukturen auf der Oberfläche von RBs und EBs entdeckt, die als Strukturen des T3S-Systems der Chlamydien interpretiert wurden (Nichols *et al.* 1985; Miyashita *et al.* 1993; Bavoil & Hsia 1998). In jüngeren Publikationen werden röhrenartige Verbindungen zwischen EBs und der Membran gebundener Humanzellen sowie zwischen RBs und der Inklusionsmembran beschrieben. Die Verankerung dieser Röhren in der inneren und äußeren Membran der Bakterien, ähnelt stark dem Basalkörper der T3S-Systeme anderer enteropathogener Bakterien (Dumoux *et al.* 2012; Nans *et al.* 2014).

Neben genetischen und mikroskopischen Anhaltspunkten wurden indirekte Hinweise auf die Funktionalität des T3SS gefunden. So wurden mögliche T3SS-Substrate mittels heterologer Sekretion durch das T3SS von *Yersinia* und *Shigella* identifiziert (Subtil *et al.* 2001; Subtil *et al.* 2005; da Cunha *et al.* 2014). Werden diese Proteine anschließend auch in der Chlamydien-Infektion sekretiert, wird angenommen, dass sie T3SS-abhängig transloziert werden. Beispiele für solche Proteine sind unter anderem Tarp, CopN und verschiedene Proteine, die in die Inklusionsmembran inseriert werden (Fields & Hackstadt 2000; Fields *et al.* 2003; Clifton *et al.* 2004). Ein anderer Ansatz zeigt die negative Auswirkung von bekannten Inhibitoren der Typ-III-Sekretion von *Yersinia* auf die Entwicklung von Chlamydien und

demonstriert die Inhibition der Sekretion verschiedener chlamydialer T3SS-Substrate (Wolf *et al.* 2006; Muschiol *et al.* 2009).

Die Nomenklatur für die putativen T3SS-Strukturproteine der Chlamydien lehnt sich an die des gut charakterisierten *Yersinia* T3SS an. Danach werden Proteine des Basalkörpers als Komponenten der kontaktabhängigen Sekretion (Cds = engl. Contact-dependent secretion), translozierte und mobile Proteine als äußere chlamydiale Proteine (Cop = engl. Chlamylidia outer proteins) und die zytoplasmatischen Chaperone des T3SS als spezifische chlamydiale Chaperone (Scc = engl. Specific chlamylidia chaperones) bezeichnet (Betts-Hampikian & Fields 2010). Soweit die Komponenten des T3SS in Chlamydien identifiziert sind, wird diese Nomenklatur auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Sollte die Funktion eines Proteins kontrovers sein, wird zur eindeutigen Identifizierung die Lokus-Nummer verwendet.

1.4.5.1 Die zwei chlamydialen Translokation-Operons

In den Genomen der humanpathogenen Chlamydien wurden zwei Kopien der T3SS-assoziierten Klasse II-Chaperone identifiziert. In *C. trachomatis* werden diese als Scc2 (CT_576) und Scc3 (CT_862) und in *C. pneumoniae* als CPn0811 (LcrH_1) und CPn1021 (LcrH_2) bezeichnet (siehe Abbildung 4.1) (Subtil *et al.* 2000; Fields *et al.* 2005). Die Chaperone werden in Operons codiert, die möglicherweise die Translokation-Proteine der Chlamydien codieren (Abbildung 1.6) (vgl. Kapitel 1.6). Die beiden Operons werden in unterschiedlichen Phasen der Infektion transkribiert, was zu der Hypothese führte, dass die beiden Translokation, analog zu den T3SS der SPI-1 und SPI-2 von *Salmonella enterica*, in unterschiedlichen Phasen der Infektion eine Rolle spielen (Subtil *et al.* 2000; Slepkin *et al.* 2003; Ouellette *et al.* 2005; Chellas-Gery *et al.* 2011).

Erstaunlicherweise wurden für *C. trachomatis* das CT_584 und für *C. pneumoniae* das CPn0803 als mögliche hydrophile Translokation identifiziert, da sie mit dem Nadelprotein CdsF interagieren (Markham *et al.* 2009). Dies ist ungewöhnlich, da bei anderen pathogenen Bakterien alle Translokation-Proteine zusammen in einem Operon codiert sind. Dies trifft für CT_584 und CPn0803 nicht zu. Des Weiteren zeigen die Kristallstrukturanalysen von CT_584 und CPn0803 keine strukturellen Ähnlichkeiten zu anderen hydrophilen Translokation (Stone *et al.* 2012; Barta *et al.* 2013).

1.5 Die Manipulation der Wirtszelle durch Effektoren

Für die Virulenz vieler pathogener Bakterien sind translozierte Effektoren essenziell. Effektoren sind meist multifunktionelle Proteine, die nicht selten eukaryotische Proteine in

Struktur und Funktion nachahmen, um bestimmte Vorgänge in der Wirtszelle zu manipulieren. Die sekretierten Effektoren spielen somit eine wichtige Rolle in der Etablierung der Nische, die das Überleben und die Vermehrung der Bakterien ermöglicht. Die bekannten Effektorproteine verschiedener Bakterienarten decken einen großen Bereich an Interaktionen mit der Wirtszelle ab. Es gibt Beispiele für die Veränderung des Zytoskeletts und der Manipulation verschiedener Signalwege, der Interaktion mit Zellorganellen und der Modifizierung von Wirtszellproteinen durch Ubiquitinierung, Phosphorylierung oder Dephosphorylierung und Prozessierung durch Protease-Aktivität (Dean 2011). Allerdings gestaltet sich die Identifizierung von Effektorproteinen besonders schwierig, da diese durch die Anpassung der Bakterien an ihre jeweilige Lebensweise zwischen verschiedenen Spezies kaum konserviert sind. Die Identifizierung von Effektoren der Chlamydien wird zusätzlich erschwert, da diese nicht mit den anderen Teilen des T3SS oder in Pathogenitätsinseln codiert sind.

1.5.1 Chlamydien interagieren mit der eukaryotischen Wirtszelle

Trotz der verschiedenen Schwierigkeiten, die sich bei der Identifikation von chlamydialen Effektoren ergeben, ist heute eine Vielzahl von Veränderungen in der Wirtszelle bekannt, die durch die Chlamydien-Infektion ausgelöst werden (Abbildung 1.4). Allerdings ist meist ungeklärt, welche Effektoren für die Manipulation von Signaltransduktionswegen oder Wirtszell-Faktoren verantwortlich sind. Umgekehrt sind hypothetische Effektorproteine bekannt, deren Interaktionspartner entweder bisher nicht identifiziert wurden oder für die zwar ein humaner Interaktionspartner bekannt ist, deren Interaktion jedoch funktionell nicht vollständig charakterisiert worden ist und deren Bedeutung somit unklar bleibt.

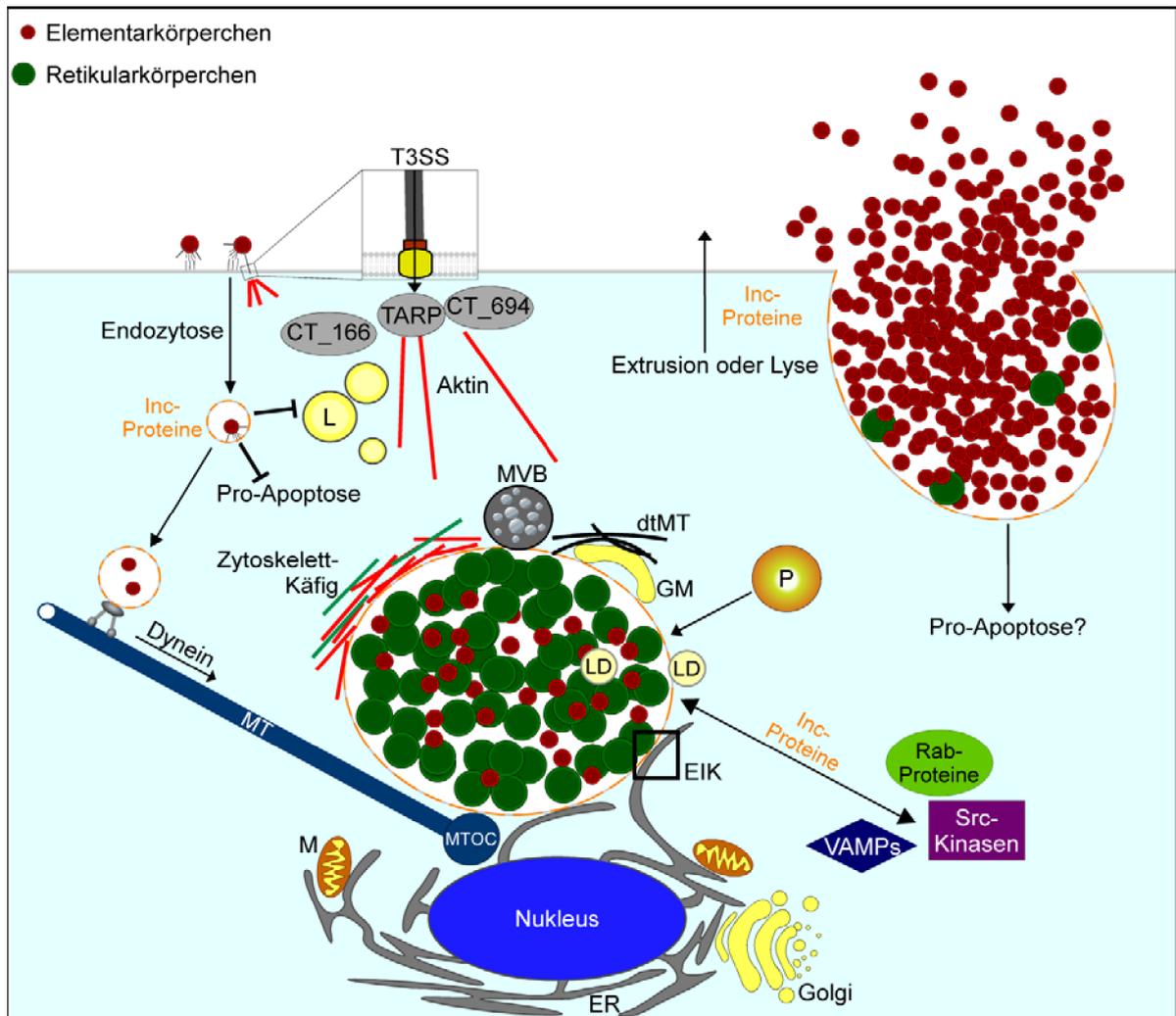


Abbildung 1.4: Interaktionen der Chlamydien mit der Wirtszelle

Nach der Adhäsion der Bakterien werden Effektoren wie Tarp, CT₁₆₆ und CT₆₉₄ sekretiert, was zu einer Akkumulation von Aktin führt und so die Aufnahme der EBs unterstützt. Anschließend blockieren Chlamydien pro-apoptotische Signalwege und die Fusion der frühen Inklusion mit Lysosomen (L). Die Inklusionsmembran wird durch die Insertion von Inklusionsmembran-Proteinen (**Inc-Proteine**) stark modifiziert. *C. trachomatis* wird Dynein-abhängig an Mikrotubuli (MT) zum Mikrotubuli-organisierenden-Zentrum (MTOC) in die Peripherie des Zellkerns transportiert. Hier wechselwirkt die Inklusion mit verschiedenen Wirtszellorganellen wie multivesikulären Körperchen (MVB), Lipidtröpfchen (LD), Golgi-Ministapel (GM), Peroxisomen (P) und mit verschiedenen Vesikeltransport-Wegen, was durch die Interaktion mit Rab-GTPasen oder VAMP3/4 vermittelt wird. Die wachsende Inklusion wird mit einem Käfig aus Filamenten des Vimentin- und Aktin-Zytoskeletts stabilisiert. De-tyrosinierte Mikrotubuli (dtMT) dienen der Bindung von Golgi-Ministapeln an die Inklusion. An Kontaktstellen zwischen Endoplasmatischem Retikulum (ER) und der Inklusionsmembran (EIK) werden Lipide in einem Vesikel-unabhängigen Transportmechanismus zur Inklusion transportiert. Das Verlassen der Wirtszelle geschieht entweder durch Lyse der Wirtszelle, wobei möglicherweise die Aktivierung pro-apoptotischer Mechanismen eine Rolle spielt, oder durch Extrusion, an der Inc₂₂₈ beteiligt ist.

In den folgenden Kapiteln werden zunächst die strukturellen Besonderheiten der größten Gruppe von chlamydialen Effektorproteinen, den Inklusionsmembran-Proteinen, beschrieben.

Anschließend wird ein Überblick über einige bekannte Interaktionen der Chlamydien mit der Wirtszelle gegeben, wobei die Schwerpunkte auf der Manipulation des Zytoskeletts und der Rekrutierung von Vesikeln zur Aneignung von Nährstoffen liegen.

1.5.1.1 Die Inklusionsmembran-Proteine

Die Membran der Inklusion stellt eine Barriere dar, welche die Chlamydien vor der Immunantwort des Organismus verbirgt. Sie ist für Moleküle mit einem Molekulargewicht über 520 Da unpassierbar, also auch für die meisten der von den Chlamydien benötigten Nährstoffe (Heinzen & Hackstadt 1997). Allerdings wird die Inklusionsmembran während der Infektion von Chlamydien stark modifiziert, um mit der Wirtszelle zu interagieren (vgl. Abbildung 1.4). Es werden vor allem Inklusionsmembran-Proteine (Inc = engl. Inclusion membrane protein) inseriert, von denen die meisten bereits 2 h nach Infektionsbeginn oder sogar früher exprimiert werden (Scidmore-Carlson *et al.* 1999; Hackstadt 2000). Die Inc-Proteine können in der Inklusionsmembran unterschiedliche Lokalisationsphänotypen aufweisen. Einige markieren die gesamte Inklusionsmembran, während andere distinkte Mikrodomänen bilden, die zum Teil mit Proteinen der Wirtszelle assoziiert sind (siehe Kapitel 1.5.1.2 und 1.5.1.3) (Scidmore-Carlson *et al.* 1999; Mital *et al.* 2010).

Inc-Proteine kommen fast ausschließlich bei Chlamydien vor und zeigen in der Primärsequenz kaum Ähnlichkeiten untereinander. Ihnen ist jedoch ein großer hydrophober Bereich gemein, der aus 40 bis 60 Aminosäuren besteht und durch einen kurzen hydrophilen Bereich unterbrochen wird. Die Inc-Proteine weisen in das Zytosol der Wirtszelle, während die charakteristische, doppel-lappige hydrophobe Domäne in der Membran der Inklusion verankert ist (Rockey *et al.* 1997; Bannantine *et al.* 2000; Toh *et al.* 2003). Durch heterologe Sekretion wurde gezeigt, dass die N-terminalen Abschnitte der *C. pneumoniae* Inc-Proteine T3SS-Substrate darstellen (Subtil *et al.* 2001). Dagegen ist jedoch immer noch unklar, wie die Insertion der Inc-Proteine in die Inklusionsmembran im Detail abläuft. Kürzlich wurde die Hypothese entwickelt, dass die Inc-Proteine in das Endoplasmatische Retikulum (ER) der Wirtszelle sekretiert und anschließend mit Teilen der ER-Membran zurück zur Inklusionsmembran transportiert werden (Dumoux *et al.* 2015). Nach der Identifikation der ersten Inc-Proteine wurden verschiedene *in silico* Analysen sequenzierter chlamydialer Genome durchgeführt, um putative Inc-Proteine zu identifizieren. Für *C. pneumoniae* werden 92 Inc-Proteine vorhergesagt, während *C. caviae* 79, *C. felis* 68, *C. trachomatis* 55 und *C. muridarum* 54 vorhergesagte Inc-Proteine aufweisen (Lutter *et al.* 2012). Mittels spezifischer Antikörper wurden rund 30 der potentielle *C. trachomatis* Inc-Proteine in der

Inklusionsmembran nachgewiesen (Li *et al.* 2008). Nur wenige der vorhergesagten Inc-Proteine sind in den verschiedenen *Chlamydiaceae* konserviert, wodurch sich möglicherweise Wirtsspezifität und Gewebetropismus der einzelnen Spezies erklären lassen (Lutter *et al.* 2012).

Zu den bestuntersuchten Inc-Proteinen gehört IncA, welches als erstes Inc-Protein bereits vor 20 Jahren in *C. caviae* (vormals *C. psittaci* GPIC Isolat) gefunden wurde. IncA ist eines der wenigen Inc-Proteine, das in fast allen *Chlamydiaceae* konserviert ist (Rockey *et al.* 1995). Es besitzt zwei SNARE (von engl. soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor) -ähnliche Motive, welche in Proteinen eukaryotischer Zellen eine Rolle bei der Fusion von Kompartimenten spielen und in Chlamydien die homotypische Fusion von Inklusionen in mehrfach infizierten Zellen vermittelt (Delevoye *et al.* 2004; Delevoye *et al.* 2008). Des Weiteren wurde gezeigt, dass IncA SNARE-Proteine der Wirtszelle, wie VAMP3 und VAMP4, zur Inklusionsmembran rekrutiert (Delevoye *et al.* 2008) (Abbildung 1.4). Bei *C. trachomatis*-Isolaten, denen das Gen für IncA fehlt, fusionieren Inklusionen multipel infizierter Zellen nicht mehr, entwickeln sich jedoch scheinbar normal weiter (Suchland *et al.* 2000; Johnson & Fisher 2013). Allerdings zeigen die IncA-negativen *C. trachomatis*-Stämme eine reduzierte Virulenz und eine verminderte Bildung infektiöser EBs (Geisler *et al.* 2001; Suchland *et al.* 2008). Interessanterweise werden die IncA-Proteine von *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* und *C. psittaci* zusätzlich auf von der Inklusion ausgehenden, fadenartigen Strukturen im Zytoplasma der Wirtszellen detektiert. Wie die Fäden entstehen und welche Funktion sie haben ist ungeklärt. Es wurde aber vermutet, dass sie in *C. trachomatis* bei der Entstehung von Sekundärinklusionen beteiligt sind oder eine Rolle bei der Präsentation von chlamydialen Antigenen spielen (Brown *et al.* 2002; Suchland *et al.* 2005).

1.5.1.2 Chlamydien interagieren mit dem Zytoskelett der Wirtszelle

Chlamydien interagieren in jeder Phase der Infektion mit den Komponenten des eukaryotischen Zytoskeletts. Nach der Adhäsion der EBs wird Aktin an der Eintrittsstelle akkumuliert und so die Internalisierung der Bakterien begünstigt. Der durch das T3SS translozierte Effektor Tarp (translocated actin-recruiting phosphoprotein) wurde als Aktin-bindendes und -bündelndes Protein identifiziert, das eine wichtige Rolle bei der Aktin-abhängigen Internalisierung spielt (Carabeo *et al.* 2002; Clifton *et al.* 2004; Jewett *et al.* 2006; Jewett *et al.* 2010). Tarp ist ein spät in der Infektion exprimierter Effektor, welcher für die nächste Infektion in den EBs gespeichert wird, um in den ersten Minuten der Infektion sekretiert zu werden (Clifton *et al.* 2004). Bei *C. trachomatis* wurden zwei weitere früh in der

Infektion sekretierte Effektorproteine identifiziert, CT694 und CT166 (Abbildung 1.4). Diese sind ebenfalls in der Lage, das Aktinzytoskelett zu modulieren und unterstützen möglicherweise die Internalisierung der EBs (Hower *et al.* 2009; Thalmann *et al.* 2010).

In den ersten Stunden der Infektion werden die Inklusionen von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* an Mikrotubuli entlang zum Mikrotubuli-Organisierenden-Zentrum (MTOC) transportiert (Grieshaber *et al.* 2003; Mital *et al.* 2010) (Abbildung 1.4). Bisher ist nur bekannt, dass hierfür eine *de novo* Produktion von chlamydialen Proteinen notwendig ist (Scidmore *et al.* 1996). Interessante Kandidaten für die Regulation der Interaktion von Inklusion und Mikrotubuli oder MTOC sind verschiedene Src-Kinasen, die an Mikrodomänen der Inklusionsmembran mit verschiedenen Inc-Proteine kolokalisieren (Mital *et al.* 2010). Ein weiterer interessanter Mikrotubuli-Interaktionspartner ist das sekretierte *C. pneumoniae* Effektorprotein CopN, welches durch eine Sequenzhomologie zum *Yersinia* T3SS-Effektor YopN identifiziert wurde (Hsia *et al.* 1997). *C. pneumoniae* CopN ist im Gegensatz zu seinen Homologe bei *C. trachomatis*, *Yersinia* oder *Pseudomonas* in der Lage β -Tubulin direkt zu binden und die Polymerisierung von Mikrotubuli zu verhindern (Archuleta *et al.* 2011; Nawrotek *et al.* 2014). Bei der Expression in Hefe- und Säugerzellen löst CopN Brüche der mitotischen Spindel und Defekte in der Zellteilung aus (Huang *et al.* 2008). Welche Funktion die Mikrotubuli-destabilisierende Wirkung von CopN während der Infektion hat, ist jedoch nicht geklärt.

Neben einer Funktion beim Transport der Inklusion zum MTOC wurden vor kurzem Hinweise auf eine Beteiligung von Mikrotubuli bei der Verankerung von Wirtszellorganellen an die Inklusionsmembran nachgewiesen (Al-Zeer *et al.* 2014). Al-Zeer und Kollegen zeigten, dass die *C. trachomatis*-Inklusion mit acetylierten und stabilen, post-translational de-tyrosinierten Mikrotubuli assoziiert sind, wobei die De-Tyrosinierung durch die Chlamydien-Infektion ausgelöst wird. Dynamische (acetylierte) Mikrotubuli werden zur Inklusion rekrutiert, was eine Re-Lokalisierung des Golgi verursacht. Anschließend werden die Mikrotubuli an der Inklusion durch De-Tyrosinierung stabilisiert, wodurch sie die Golgi-Ministapel an die Inklusionsmembran binden (Al-Zeer *et al.* 2014) (Abbildung 1.4).

Auch Aktin- und Vimentin-Filamente spielen während der *C. trachomatis*-Infektion eine bedeutende Rolle. Sie bilden eine käfigartige Struktur um die Inklusion und tragen so zur Erhaltung der Integrität der wachsenden Inklusionen bei (Kumar & Valdivia 2008) (Abbildung 1.4). Dieser Prozess ist abhängig von bisher nicht identifizierten Effektoren, für deren Sekretion die Funktion des T3SS benötigt wird (Chin *et al.* 2012). Kürzlich wurde eine

Rolle von Septinen, einer Gruppe von filamentösen GTPasen und Bestandteile des Zytoskeletts von Eukaryoten, identifiziert. Sie sind an der Bildung des Aktin-Käfigs um die *C. trachomatis*-Inklusion und der Extrusion zum Verlassen der Wirtszelle beteiligt (Volceanov *et al.* 2014). Zudem wurde das Inc-Protein CT_228 identifiziert, welches mit MYPT1, einer Untereinheit der Myosin-Phosphatase, interagiert und so das Verlassen der Wirtszelle koordiniert (Lutter *et al.* 2013).

1.5.1.3 Chlamydien akquirieren Nährstoffe von der Humanzelle

Chlamydien besitzen ein stark reduziertes Genom, wodurch essenzielle Biosynthesewege unvollständig sind oder ganz fehlen (Stephens *et al.* 1998; Kalman *et al.* 1999). Sie haben viele Gene für metabolische Enzyme verloren und sich vollkommen darauf spezialisiert Nährstoffe stattdessen von der Wirtszelle zu annektieren. So werden Chlamydien beispielsweise häufig als Energieparasiten bezeichnet, da sie Nukleotide wie ATP, GTP und UTP der Wirtszelle beziehen (Tipples & McClarty 1993). Es wurden Gene für Transporter identifiziert, die verschiedene Nährstoffe aus dem Inklusionslumen in die Bakterien transportieren, aber es ist nur im Einzelfall verstanden, wie diese die Inklusionsmembran passieren.

Chlamydien sind stark auf die Lipide der Wirtszelle angewiesen. Bereits in frühen Studien konnte gezeigt werden, dass die Lipid-Komposition der Chlamydien davon abhängig ist, welche Lipide in der infizierten Zelle zur Verfügung stehen und eher der von eukaryotischen Zellen gleicht (Hatch & McClarty 1998). Lipide erreichen die Inklusion über verschiedenste Wege. Der Golgi-Apparat stellt für Chlamydien eine der wichtigsten Quellen zur Akquirierung von Lipiden wie Sphingomyelin und Cholesterol dar (Hackstadt *et al.* 1995; Hackstadt *et al.* 1996; Carabeo *et al.* 2003). Während der *C. trachomatis*-Infektion ist eine Fragmentierung des Golgi-Apparats zu beobachten, die durch die Spaltung oder Reduktion der Expression des Golgin-84 hervorgerufen wird. Anschließend werden die resultierenden Golgi-Ministapel an die Inklusionsmembran rekrutiert, wodurch für die Replikation der Bakterien essenzielle Lipide zur Inklusion gelangen (Heuer *et al.* 2009; Zhu *et al.* 2014). Zudem werden während der Infektion von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* Sphingomyeline der Wirtszelle zur Inklusion umgeleitet (Hackstadt *et al.* 1996; Wolf & Hackstadt 2001). Diese Lipide werden durch Deeeinflussung exozytotischer, Brefeldin A-sensitiver Golgi-Vesikel zur Inklusion transportiert (Hackstadt *et al.* 1995; Carabeo *et al.* 2003). Brefeldin A inhibiert die Exozytose durch Interaktion mit Aktivatoren des Arf1, welches wiederum an der Vesikelbildung essenziell beteiligt ist (Bastidas *et al.* 2013).

Weitere Lipid-Quellen sind CD63-positive multivesikuläre Körperchen (MVB = engl. multivesicular bodies) des späten Endozytose-Transportwegs sowie Lipidtröpfchen (LD = engl. Lipid Droplets), die an und in die Inklusion transportiert werden (Beatty 2006; Kumar *et al.* 2006) (Abbildung 1.4). Lipidtröpfchen sind Organellen der Humanzelle, die der Speicherung von Neutral-Lipiden, wie Triacylglyceriden und Sterolestern, dienen und durch Akkumulierung dieser Neutral-Lipide zwischen den Phospholipid-Schichten der ER-Membran und anschließender Knospung vom ER entstehen (Krahmer *et al.* 2009). Bei *C. trachomatis* wurden drei chlamydiale Proteine identifiziert, die Lipidtröpfchen der Humanzelle markieren, daher werden sie als Lipid-Droplet-associated proteins (Lda) bezeichnet (Kumar *et al.* 2006; Cocchiario *et al.* 2008). Für Lda3 konnte auch in der Infektion eine Lokalisierung auf Lipidtröpfchen gezeigt werden, die möglicherweise bei der Rekrutierung dieser Wirtszellorganellen eine Rolle spielt (Cocchiario *et al.* 2008). Daneben wurde kürzlich die Möglichkeit des Transports von Peroxysomen in die *C. trachomatis* Inklusion beschrieben. Wahrscheinlich gelangen Enzyme der Wirtszelle auf diesem Wege zur Inklusion und werden anschließend zur Produktion von Bakterien-spezifischen Fettsäuren genutzt (Boncompain *et al.* 2014).

Auch Vesikel-unabhängige Mechanismen zur Lipid-Akquirierung von Chlamydien sind bekannt. IncD aus *C. muridarum* interagiert direkt mit dem Wirtszellprotein CERT (engl. ER-to-Golgi ceramide transfer protein) und rekrutiert es an die Inklusionsmembran. Hier transportiert CERT Vesikel-unabhängig Ceramid in die Membran der Inklusion (Derré *et al.* 2011). Die Sphingomyelin-Synthetase Sms2, welche ebenfalls an der Inklusion detektiert wird, synthetisiert aus Ceramid anschließend Sphingomyelin, welches in die Inklusionsmembran und RBs eingebaut wird (Elwell *et al.* 2011).

Fluoreszenzmikroskopisch wurden interessante Assoziationen der Inklusion mit Rab-GTPasen beobachtet, die eine mögliche Strategie der Interaktion zwischen Inklusionsmembran und Wirtszellorganellen darstellen. Rab-Proteine markieren sehr spezifisch bestimmte Vesikel innerhalb der Humanzelle und sind daran beteiligt, den Vesikeltransport innerhalb der Zelle zu koordinieren. Die Spezies-spezifische und Spezies-unspezifische Lokalisation verschiedener Rab-GTPasen an der Inklusionsmembran wurde festgestellt (Rzomp *et al.* 2003; Damiani *et al.* 2014). Beispielsweise werden Rab1 (ER-Golgi- und Intra-Golgi-Vesikel-Transport), Rab4 und Rab11 (beide schneller und langsamer Recyclingvesikel-Transport) an die Inklusionsmembranen von *C. trachomatis* Serovar L2 und D, *C. pneumoniae* und *C. muridarum* rekrutiert. Dagegen wird Rab6 (Retrograder-Golgi-ER-

und Endosom-Trans-Golgi-Transport) nur an der *C. trachomatis*-Inklusionsmembran gefunden, und Rab10 (Regulation der ER-Dynamik und Post-Golgi-Transport) ist ausschließlich an Inklusionen von *C. pneumoniae* und *C. muridarum* erkennbar. Andere Rab-Proteine, die zum Beispiel bei der Phagozytose eine Rolle spielen, sind nicht an den Inklusionen der oben genannten *Chlamydiaceae* detektierbar (Rzomp *et al.* 2003). Warum die Rekrutierung teilweise Spezies-spezifisch ist und welche Unterschiede in der Infektion sich dadurch für die verschiedenen Chlamydien-Spezies ergeben ist noch unklar. Für einige Rab-Proteine wurden bereits chlamydiale Interaktionspartner identifiziert. So interagiert das *C. pneumoniae* Inc-Protein CPn0585 mit den Proteinen Rab1, Rab10 und Rab11 und das *C. trachomatis* Inc CT_229 mit Rab4 (Rzomp *et al.* 2006; Cortes *et al.* 2007).

1.5.2 Methoden zur Identifizierung neuer chlamydialer Effektorproteine

Da eine gezielte genetische Manipulation von Chlamydien immer noch auf einige wenige Chlamydien-Stämme beschränkt ist (vgl. Kapitel 1.3.2), wurden verschiedene indirekte Methoden zur Identifikation möglicher Effektoren der Chlamydien entwickelt. Bioinformatische Ansätze dienen vor allem der Identifizierung von N-terminalen Sekretionssignalen für das T3SS oder dem Aufspüren von allgemeinen Strukturmerkmalen, wie am Beispiel der Inc-Proteinen erläutert wurde (Bannantine *et al.* 2000; Toh *et al.* 2003; Arnold *et al.* 2009; Lutter *et al.* 2012) (vgl. Kapitel 1.5.1.1). Die Identifizierung von T3SS-Substraten mittels heterologer Sekretionssysteme in *Yersinia*, *Shigella* und *Salmonella* ist gebräuchlich und wurde inzwischen für verschiedene Chlamydien-Spezies angewandt (Fields & Hackstadt 2000; Subtil *et al.* 2001; Fields *et al.* 2003; Ho & Starnbach 2005; Subtil *et al.* 2005; da Cunha *et al.* 2014).

Ein ganz anderer Ansatz zur Identifikation von chlamydialen Effektoren geht davon aus, dass Seren infizierter Patienten Antikörper gegen sekretierte Proteine und Proteine auf der Oberfläche der Chlamydien aufweisen. Werden mittels Antiserum unbekannte Proteine identifiziert, könnte es sich hierbei um einen sekretierten Effektor handeln (Gupta *et al.* 2009; Wang *et al.* 2009; Yasui *et al.* 2012).

Des Weiteren wurde die in Kapitel 1.4.3 beschriebene Tatsache genutzt, dass T3SS-assoziierte Chaperone mit mehreren Effektoren interagieren können. Die T3SS-assoziierten Chaperone lassen sich anhand von Sequenzhomologie-Analysen identifizieren, da sie unter den verschiedenen Bakterienarten, im Unterschied zu den sehr diversen Effektoren, eher konserviert sind. Mit den identifizierten Chaperonen werden anschließend Kopräzipitations-

Experimente oder Hefe-zwei-Hybrid Analysen durchgeführt, um mögliche Interaktionspartner zu identifizieren (Fields *et al.* 2005; Chen *et al.* 2014).

Zur Identifikation von unbekanntem Effektoren wurde in der Vergangenheit auch der eukaryotische Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* herangezogen, da grundlegende zelluläre Abläufe und Strukturen zwischen diesem Einzeller und höheren Eukaryoten konserviert sind. Bei diesen experimentellen Ansätzen wird davon ausgegangen, dass Effektorproteine mit den konservierten Strukturen der Hefe interagieren und so anhand ihrer subzellulären Lokalisation oder durch das Auslösen von Wachstums-Phänotypen identifiziert werden können (Sisko *et al.* 2006; Siggers & Lesser 2008; Salomon & Sessa 2010). Auf diese Weise konnten beispielsweise die Lipidtröpfchen-bindenden chlamydialen Proteine Lda1 bis Lda3 identifiziert werden (Kumar *et al.* 2006; Cocchiario *et al.* 2008).

In einer vorangegangenen Arbeit wurde eine genomische *C. pneumoniae*-Expressionsbibliothek genutzt, um neue mögliche Effektoren von *C. pneumoniae* zu identifizieren, die bei Expression in der Hefe einen Wachstumsdefekt auslösen (Herbst 2011). In den folgenden Kapiteln werden zwei der dort identifizierten und im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehenden Effektoren eingeführt.

1.6 Das CPn0809, Effektor oder Translokator?

Die Expression von CPn0809 verursacht in der Hefe *S. cerevisiae* einen starken Wachstumsdefekt, weshalb es zunächst als putatives Effektorprotein untersucht wurde (Engel 2010; Herbst 2011). Interessanterweise zeigten Sequenzierungen des verwendeten *C. pneumoniae* Isolats GiD, dass CPn0809 im Vergleich zum *C. pneumoniae* Isolat CWL029 eine Deletion von fünf Aminosäuren am C-terminalen Ende des Proteins aufweist. Es ist somit 488 anstatt 493 Aminosäuren lang. Weitere Recherchen ergaben, dass Homologe von CPn0809 in anderen *C. pneumoniae* Isolaten (TW183, J138, AR39) ebenfalls 488 Aminosäuren lang sind und vor allem die CPn0809 Homologe der tierpathogenen *Chlamydiaceae* länger sind (KEGG-Datenbank). Ob die unterschiedlichen C-Termini funktionelle Relevanz besitzen, ist bisher unklar.

Mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System wurden zwei mögliche humane Interaktionspartner des putativen Effektors CPn0809 identifiziert, die mit der N-terminalen Hälfte des Proteins interagierten (Engel 2010). Es handelte sich dabei um MIF4GD, das bei der Translation von Histonen eine Rolle spielt, und NCAPH2, das maßgeblich an der korrekten Kondensation der Chromosomen beteiligt ist. Eine Assoziation dieser Proteine mit CPn0809 während der

Infektion konnte nicht gezeigt werden. Mit einem vergleichbaren experimentellen Ansatz wurde das Golgi-Anti-Apoptose-Protein (GAAP) identifiziert, das in Humanzellen anti-apoptotisch wirkt und bei der Regulation der Aufnahme und Abgabe von Calcium-Ionen eine Rolle spielt (Markkula *et al.* 2013). Die Repression der Translation von GAAP durch siRNS führt zu einer Verringerung der Produktion von Chlamydien-Genomen in infizierten Zellen. Eine Interaktion von CPn0809 und GAAD in der Infektion wurde dagegen nicht nachgewiesen.

Die ektopische Expression von CPn0809 in Hefen führt zu einer im Zytosol der Zellen verteilten punktierten Lokalisation von Signalen, die als Lipidtröpfchen identifiziert wurden (Engel 2010; Herbst 2011). Bei der ektopischen Expression des *C. trachomatis* Homologen von CPn0809 (CT_578/CopB) in Humanzellen wird eine vergleichbare punktierte Lokalisation beobachtet, die jedoch nicht mit Organellen der Zelle in Verbindung gebracht werden konnte (Chellas-Gery *et al.* 2011). Mikroskopisch wurde CPn0809 innerhalb der Inklusion detektiert, wo es eine punktierte Lokalisierung zeigt (Engel 2010; Herbst 2011). Dagegen wurde CPn0809 von einer anderen Arbeitsgruppe 55 h nach Infektionsbeginn mikroskopisch im Zytosol der Wirtszelle detektiert (Lugert *et al.* 2004).

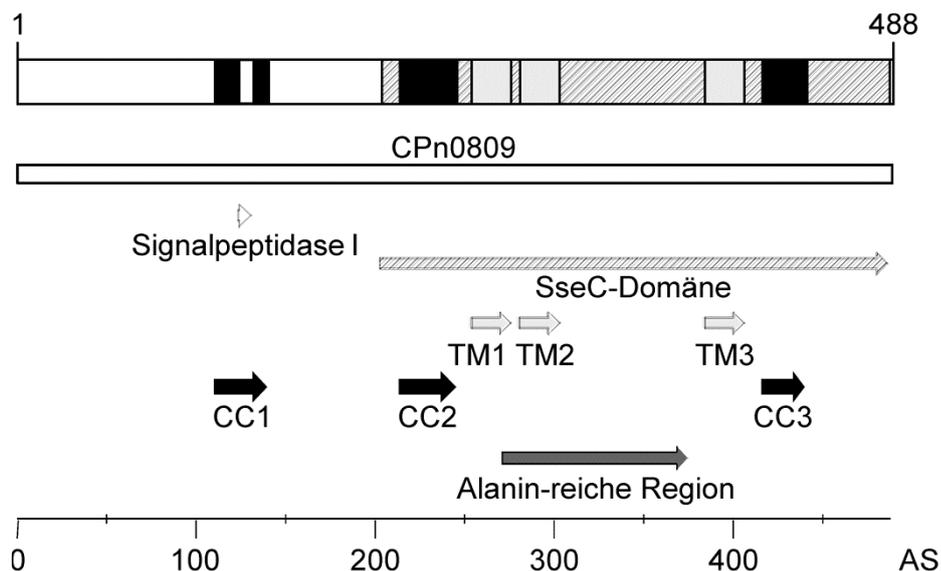


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des CPn0809

Schematische Darstellung der für CPn0809 vorhergesagten Domänen innerhalb des 488 Aminosäuren (As) langen Proteins. Je nach verwendeten bioinformatischen Programmen beinhaltet es zwei oder drei Transmembrandomänen (TM) und drei Coiled-Coil-Domänen (CC).

Innerhalb der ersten Coiled-Coil-Domäne (CC1) im N-Terminus wird das aktive Zentrum einer Signalpeptidase (Signalpeptidase I) vorhergesagt. Im C-terminalen Bereich des Proteins liegt eine Alanin-reiche Region, die im oben abgebildeten Schema zwecks Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet ist. Für die gesamte C-terminale Hälfte ist eine Homologie zur sogenannten SseC-Domäne vorhergesagt.

Interessanterweise wurde für CPn0809 neben einer möglichen Funktion als Effektor eine Aufgabe als Bestandteil des T3SS-Translokons postuliert (vgl. Kapitel 1.4.4.2). Das *cpn0809*-Gen wird in einem Operon exprimiert, das drei weitere Gene codiert (vgl. Abbildung 1.6) (Ouellette *et al.* 2005). Eines der anderen Proteine ist CPn0811 (LcrH_1), welches durch Sequenzanalysen als Homolog des *Yersinia* T3SS-assoziierten Klasse II-Chaperons LcrH identifiziert wurde (Subtil *et al.* 2000). Chlamydien besitzen zwei Operons in denen vermeintliche Klasse II-Chaperone des T3SS codiert sind, die zu verschiedenen Zeitpunkten exprimiert werden (vgl. Kapitel 1.4.5.1). Diese Tatsache führte zu der Hypothese, dass Chlamydien verschiedene Translokons exprimieren, die in unterschiedlichen Phasen der Infektion eine Funktion erfüllen (Ouellette *et al.* 2005; Mäurer *et al.* 2007). Bioinformatische Analysen des CPn0809 identifizierten eine SseC-Domäne (As 203-487), wie sie in den großen hydrophoben Translokatoren anderer Bakterien mit T3SS zu detektieren ist, was auf eine Funktion als Translokator hinweist (Engel 2010) (vgl. Kapitel 4.1.2). Interessanterweise wird CPn0808, welches im selben Operon direkt stromabwärts von CPn0809 codiert ist (Abbildung 1.6), mikroskopisch während des Infektionszyklus innerhalb der Inklusion detektiert (Herrmann *et al.* 2006). Dagegen zeigt das *C. trachomatis* Homolog CT_578 (CopB) eine Lokalisierung in der Inklusionsmembran (Fields *et al.* 2005). Westernblot-Analysen zeigen zudem, dass CPn0809 wie sein *C. trachomatis* Homolog CT_578 (CopB) stärker in EBs als in RBs detektierbar ist (Fields *et al.* 2005; Herbst 2011). Dies passt zu mRNA-Analysen, die zeigen, dass CPn0809 ein sehr spät exprimiertes Protein ist, das in EBs gespeichert wird und eine Rolle zu Beginn der nächsten Infektionsrunde spielt (Ouellette *et al.* 2005; Mäurer *et al.* 2007).

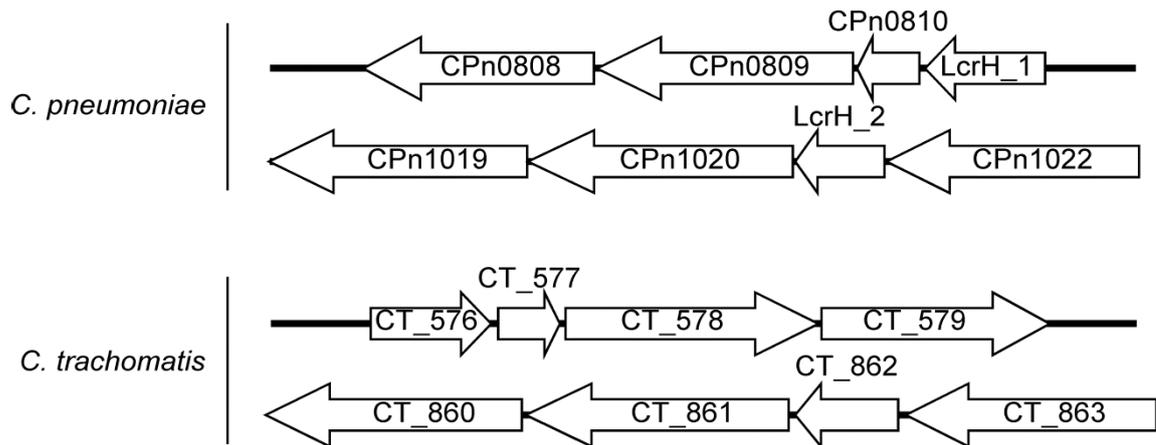


Abbildung 1.6: Darstellung der putativen *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* Translokon Operons

Die vermeintlichen Translokon-Operons der humanpathogenen Chlamydien-Spezies codieren je vier Proteine. Die Proteine LcrH_1/LcrH_2 und CT_577/CT_862 besitzen Sequenzhomologien zu T3SS-assoziierten Klasse II-Chaperonen anderer pathogener Bakterien (vgl. Kapitel 1.4.5.1). Die Darstellung gibt die Größen der codierten Proteine relativ zueinander und die 5'→3' Orientierung ihrer Gene auf dem bakteriellen Chromosom wieder. Die Abbildung wurde nach Ouellette und Kollegen modifiziert (Ouellette *et al.* 2005).

An dieser Stelle ist unklar, ob CPn0809 in EBs gespeichert wird, um eine Funktion in den ersten Minuten der Infektion zu erfüllen. Des Weiteren ist die Art der Funktion nicht klar, einerseits könnte es sich um einen früh sekretierten Effektor handeln, der in der frühen Infektion mit Mechanismen der Wirtszelle interagiert und so beispielsweise die Internalisierung begünstigt. Andererseits könnte CPn0809 in der frühen Infektion als Teil des Translokons sekretiert werden, um eine Pore in der Membran der Zielzelle zu bilden und die Sekretion von frühen Effektoren zu ermöglichen. Da auch Hinweise auf eine Sekretion von CPn0809 in der intrazellulären Phase der Infektion existieren, wäre eine Funktion als später Effektor ebenfalls möglich.

1.7 Das Inc-Protein CPn0147

Auch CPn0147 wurde durch Verursachen eines Wachstumsdefekts in Hefe als putatives *C. pneumoniae* Effektorprotein identifiziert (Herbst 2011). Zu diesem bis dato uncharakterisierten Protein wurden bereits verschiedene Untersuchungen durchgeführt, von denen die wichtigsten Ergebnisse im Folgenden zusammengefasst werden.

In allen *C. pneumoniae* Isolaten sowie in *C. psittaci* und *C. caviae* konnten Homologe zu CPn0147 identifiziert werden. Interessanterweise gibt es dagegen kein CPn0147-Homolog in *C. trachomatis* (KEGG-Datenbank). Bioinformatischen Analysen identifizierten in CPn0147 zwei Transmembrandomänen (As 42-64 und 69-91), die durch nur vier Aminosäuren

voneinander getrennt sind und damit an das gemeinsame Strukturmerkmal der Inc-Proteine erinnern (siehe Kapitel 1.5.1.1 und Abbildung 1.7). In diesem Bereich wurde auch eine IncA-ähnliche Domäne (As 32-85) identifiziert, die beide Transmembrandomänen abdeckt. Mikroskopische Analysen bestätigten eine Assoziation des CPn0147 mit der Inklusionsmembran (Luo *et al.* 2007b; Herbst 2011). CPn0147 wird bereits 6 h nach Infektionsbeginn mikroskopisch detektiert und bleibt bis zum Ende der Infektion in der Inklusionsmembran lokalisiert (Luo *et al.* 2007). CPn0147 markiert wie IncA durchgängig die Inklusionsmembran und ist auch auf fädigen Strukturen erkennbar, die von der Inklusionsmembran in das Zytosol der Wirtszelle reichen (Luo *et al.* 2007b; Herbst 2011). Solche fadenartige Strukturen wurden bereits in früheren Arbeiten zum Inklusionsmembranprotein IncA identifiziert (Bannantine *et al.* 1998). Verschiedene chlamydiale Antigene, wie MOMP-, DnaK-Signale oder vermutlich bakterielle DNS-Signale, wurden auf den fadenartigen Strukturen nachgewiesen (Brown *et al.* 2002). Zudem wird Pmp21 auf den fädigen CPn0147-Strukturen präsentiert (Becker 2013). Den IncA-positiven, fadenartigen Strukturen wurde eine Rolle bei der Bildung von Sekundärinklusionen zugeschrieben (vgl. Kapitel 1.5.1.1) (Suchland *et al.* 2005). Untersuchungen durch Herbst zeigten jedoch, dass ein signifikanter Anteil der CPn0147-Fäden keinen Kontakt zu anderen Inklusionen oder vesikulären Kompartimenten aufweist (Herbst 2011). Interessanterweise ist nicht jede Inklusion mit Fäden assoziiert. Es wurden einige Faktoren identifiziert, die die Entstehung von Fäden fördern. Beispielsweise führt die Zugabe von Ölsäure, eine Vervielfachung der Infektion (MOI = engl. Multiplicity of infection) und der Verzicht auf Cycloheximid zu einer Erhöhung der Faden-Anzahl je Inklusion. Dazu erhöht sich mit fortschreitender Infektionszeit die Wahrscheinlichkeit, dass die Inklusionen mit Fäden assoziiert sind. Werden infizierte Humanzellen mit Triacsin C behandelt, einem Inhibitor der Fettsäure-CoA-Ligase, welche langkettige Fettsäuren mit dem Coenzym A verbindet und so die Produktion von Lipidtröpfchen inhibiert, so weisen Inklusionen dieser Zellen weniger CPn0147-positive Fäden auf (Herbst 2011).

Für CPn0147 konnte daneben eine Zugänglichkeit zum Zytosol der Wirtszelle durch Antikörpertransfektion nachgewiesen werden, somit kann es als Effektorprotein während der Infektion mit Strukturen der Humanzelle interagieren (Herbst 2011). Bei der ektopischen Expression des Proteins in Hefe und humanen HEK293-Zellen wurde, wie für Inc-Proteine typisch, eine ER-Assoziation festgestellt (Kostyukova *et al.* 2005; Shkarupeta *et al.* 2008; Herbst 2011).

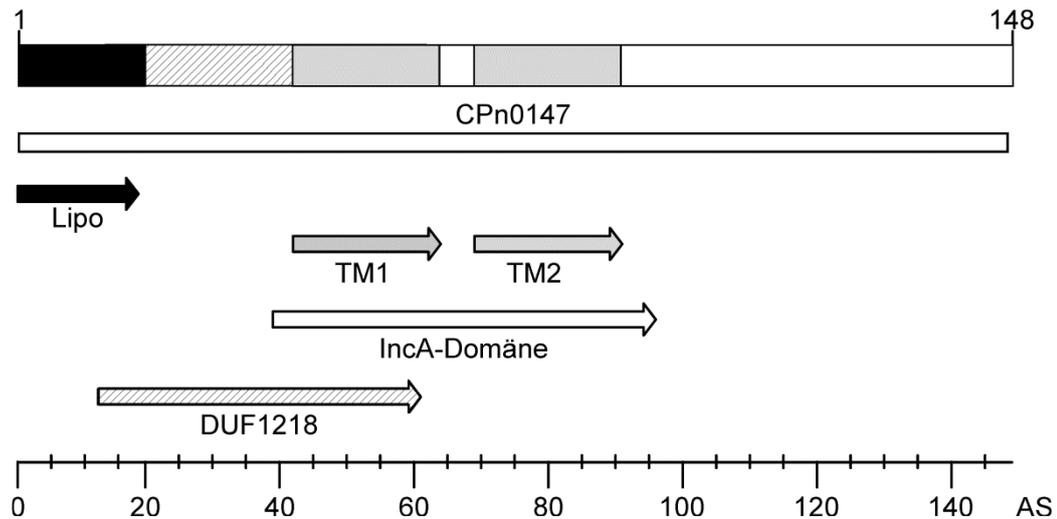


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung des Inc-Proteins CPn0147

Das CPn0147-Protein ist 148 Aminosäuren (As) lang. Es weist zwei Transmembrandomänen (TM) auf, die durch vier Aminosäuren voneinander getrennt sind. Somit weist CPn0147 eine Ähnlichkeit zu Inc-Domänen auf (IncA-Domäne), wie sie in Kapitel 1.5.1.1 beschrieben wurden. Im N-terminalen Bereich des Proteins liegt eine sogenannte „Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site“ (Lipo)-Domäne. Des Weiteren wurde eine Domäne mit unbekannter Funktion identifiziert (DUF1218).

In einigen Fällen wurden mikroskopisch um die Inklusionsmembran kreisförmige Signale detektiert, die als CPn0147-markierte Lipidtröpfchen identifiziert wurden. Interessanterweise wurde im N-Terminus des Proteins eine „Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site“ (Lipo)-Domäne (As 1-19) gefunden, bei der es sich um ein Signalpeptid handelt. Diese kommt bei Membran-Lipid-Proteinen von Prokaryoten vor und wird von einer Signalpeptidase erkannt und gespalten, um das Protein anschließend an eine Glycerin-Fettsäure anzuheften. Es wurde vermutet, dass die Lipo-Domäne des CPn0147 bei der Anheftung an Lipidtröpfchen eine Rolle spielt und dass CPn0147 bei der Rekrutierung von Lipidtröpfchen eine essenzielle Funktion besitzt. Es konnten keine Interaktionspartner auf Lipidtröpfchen gefunden werden, die mit CPn0147 interagieren und so wird vermutet, dass das Protein mit der Lipo-Domäne direkt mit diesen Lipid-Speicherorganellen interagiert (Herbst 2011). Auch die von der Inklusion ausgehenden Fäden wiesen eine Kollokalisierung mit Lipidtröpfchen auf.

Die Ergebnisse werfen Fragen nach der Natur und Identität der während einer *C. pneumoniae*-Infektion induzierten Fäden auf. Aus welchem Material werden die Fäden aufgebaut und sind Faktoren der Wirtszelle beteiligt? Die Beobachtung, dass Fäden mehrere Inklusionen verbinden, allerdings auch häufig ohne Verbindung in das Zytosol der infizierten Zelle

reichen und unterschiedliche Antigene aufweisen, wirft die Frage auf, ob sich verschiedene Fadentypen unterscheiden lassen. Des Weiteren ist nicht klar, ob CPn0147 ausreichend ist, um mit Lipidtröpfchen der Wirtszelle zu interagieren und ob die CPn0147-positiven Fäden eine generelle Rolle bei der Interaktion mit Wirtszellorganellen aufweisen.

1.8 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die beiden zunächst als mögliche Effektoren identifizierten Proteine CPn0809 und CPn0147 eingehender zu charakterisieren.

Für CPn0809 war zu Beginn dieser Arbeit unklar, ob es ein sekretiertes Effektorprotein oder eines der Translokonproteine ist. Im ersten Schritt sollten mittels detaillierter bioinformatischer Analysen Domänen identifiziert werden, die auf die Funktion des Proteins hinweisen. Durch Analyse des zeitlichen Verlaufs der Expression und der subzellulären Lokalisation des CPn0809 im *C. pneumoniae*-Infektionszyklus sollten Wirkungszeitraum und Wirkungsort weiter eingegrenzt werden. Mikroskopische Untersuchungen und Fraktionierungs-Experimente sollten mögliche Assoziationen des Proteins mit Wirtszellkomponenten aufdecken. Um die Hypothese einer Funktion als Translokationsporen-Protein zu überprüfen, sollte das CPn0809-Protein rekombinant dargestellt werden und dessen Interaktion mit biologischen und artifiziellen Membranen untersucht werden.

Für CPn0147 waren die von der chlamydialen Inklusion ausgehenden fädigen Strukturen bisher nicht im Detail untersucht worden. Insbesondere waren weder ihr genauer Aufbau noch ihre Funktion hinreichend verstanden. Daher sollte die Lokalisierung von CPn0147 und im Speziellen die Assoziation der CPn0147-positiven Fäden mit chlamydialen Antigenen und Wirtszellorganellen mikroskopisch untersucht werden. Insbesondere sollte die Natur der Fäden bestimmt und untersucht werden, ob und welche Humanzellfaktoren bei ihrem Aufbau beteiligt sind. Durch ektopische Expression von CPn0147 in Humanzellen sollten die Interaktion mit Lipidtröpfchen und eine mögliche Assoziation mit anderen Organellen der Humanzelle untersucht werden. Schließlich sollten durch Deletionsanalysen Proteindomänen identifiziert werden, welche die mögliche Interaktion mit Lipidtröpfchen vermitteln.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Tabelle 2.1.1: Verwendete Chemikalien, biologische Reagenzien und Antibiotika

Chemikalie	Hersteller
2-[2-[4-(2,4,4-Trimethylpentan-2-yl)phenoxy]ethoxy]ethanol (IGEPAL CA-630)	Sigma-Aldrich
2-Mercaptoethanol	Roth
4-(2-Hydroxyethyl)piperazinyl-1-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP)	Applichem
Acrylamid (Rodiphorese 30)	Roth
Adenin	Sigma-Aldrich
Agar	Difco
Agarose	Biozym
Alanin	AppliChem
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	AppliChem
Amphotericin B	life technologies
Ampicillin (Amp)	Sigma-Aldrich
Arginin	Merck
Asparagin	Merck
Asparaginsäure	Roth
Biofreeze	Merck Millipore
Borsäure	AppliChem
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
Bromphenolblau	AppliChem
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Grüssing
Casein Hydrolysat Pepton	Difco
Chloramphenicol	Roth
Protease-Inhibitoren Mix/ <i>Complete Protease Inhibitor Cocktail</i>	Roche
Coomassie Brilliant Blau G250	Merck
Cycloheximid (Actidione)	Sigma-Aldrich
Cystein	AppliChem
D(+)-Glucose Monohydrat	Roth
Desoxynukleosid-5'-triphosphat (dNTPs)	Thermo Scientific
Dimethylformamid (DMF)	Normapur
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	AppliChem
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	AppliChem
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem
DMEM Zellkulturmedium (<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium), GlutaMax™	life technologies
Doxycyclin (DOX)	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Normapur
Ethanol (96%)	J. T. Baker
Ethanolamin	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)	Roth
Ethylendiamintetraacetat-Tetranatriumsalz (Na ₄ EDTA)	AppliChem
EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin	Thermo Scientific
Ficoll	GE Healthcare
Fötale Kälberserum (FKS)	life technologies
Gastrographin	Bayer
Gentamycin	life technologies

Chemikalie	Hersteller
Glutamin	AppliChem
Glutaminsäure	Acros Organics
Glycerin 86%	Grüssing
Glycin	Fluka
Guanidin HCl	Serva
Hanks Salzlösung (HBSS engl. = <u>H</u> ank's <u>B</u> alanced <u>S</u> alt <u>S</u> olution)	life technologies
Harnstoff (Urea)	Sigma-Aldrich
Hefe Stickstoffbasen/ Yeast Nitrogen Base	Difco
Hefeextrakt	Difco
Histidin	Sigma-Aldrich
Imidazol	AppliChem
Inositol	AppliChem
Isoleucin	Roth
Isopropanol	Normapur
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
Kaliumacetat	Applichem
Kaliumchlorid (KCl)	Applichem
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Applichem
Kaliumhydroxid (KOH)	Grüssing
Kanamycin (Kan)	Sigma-Aldrich
Lachssperma-DNS (Carrier-DNS)	Sigma-Aldrich
Leucin	Roth
Lithiumacetat (LiAc)	Grüssing
Lysin	Sigma-Aldrich
Lysozym	Serva
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	life technologies
Methanol (98 %)	Riedel-deHaën
Methionin	AppliChem
Milchpulver	Roth
<i>N,N</i> -Bis[2-hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonat (BES)	Sigma-Aldrich
Natriumacetat (NaAc)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Fischer Chemical
Natrium-Deoxycholat	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	AppliChem
Natriumdodecylsulphat (SDS)	Roth
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	AppliChem
Natriumhydroxid (NaOH)	AppliChem
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	VWR
<i>N</i> -Hydroxysuccinimid- (NHS-) Fluorescein	Thermo Scientific
Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA-Agarose)	Qiagen
Nicht-essenzielle Aminosäuren	life technologies
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Serva
<i>N</i> -Lauroylsarcosin (Sarkosyl)	Sigma-Aldrich
Nocodazol	Sigma-Aldrich
Ölsäure	Sigma-Aldrich
Optiprep®	Sigma-Aldrich
<i>para</i> -Aminobenzoessäure	Fluka
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth
Phenylalanin	Merck
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Plasmocin™	InvivoGen
Polyethylenglycol 3350 (PEG)	Sigma-Aldrich
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich

Chemikalie	Hersteller
Pro-Ject™ Protein Transfection Reagent	Thermo Scientific
Prolin	Roth
Propidiumiodid (PI)	Roth
Proteinase K	Roche
Reduziertes L-Glutathion	Sigma-Aldrich
Rinderserumalbumin (BSA Bovines Serumalbumin)	Serva
Rinderserumalbumin (BSA Bovines Serumalbumin) fettsäurefrei	Serva
Saccharose	Roth
Salzsäure (HCl)	Normapur
Saponin	Roth
Serin	AppliChem
Tetracyclin (Tet)	Sigma-Aldrich
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck
Threonin	AppliChem
Triacsin C	Santa Cruz
Triethanolamin	Roth
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Normapur
Triton X-100	Fluka
Trypton Pepton	Difco
Tryptophan	AppliChem
TurboFect™ Transfektions-Reagenz	Thermo Scientific
TWEEN® 20	Roth
Tyrosin	AppliChem
Uracil	Sigma-Aldrich
Valin	AppliChem
Vectashield® (Anti-Verblässen-Schutz für Fluoreszenzfarbstoffe)	Linaris
Vitaminlösung für die Zellkultur	life technologies
X- α -Gal	Clontech
Xylen-Cyanol FF	Serva

2.2 Agarosen

Tabelle 2.2.1: Agarosen zur Protein- und Antikörperaufreinigung

Agarose	Hersteller
Glutathion-Agarose	Sigma-Aldrich
N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Sepharose	GE Healthcare
Nickel(II)-sulfat Hexahydrat	Sigma-Aldrich

2.3 Materialien

Tabelle 2.3.1: Verwendete Einweg-Gebrauchsartikel

Gebrauchsartikel	Hersteller
20 μ l/ 200 μ l/ 1000 μ l Pipettenspitzen	Sarstedt
1,5-ml-Reaktionsgefäß	Sarstedt
1,5-ml-Reaktionsgefäß „Savelock“	Eppendorf
2,0-ml-Reaktionsgefäß „Savelock“	Eppendorf
Amicon-Ultra (Größenausschlussröhrchen)	Millipore
Chromatographiepapier für Westernblots (100 % Baumwolle)	VWR
Deckgläschen für Zellkultur (\varnothing 12 mm)	Roth
Dialyseschlauch 12-15 kDa Ausschluss	Serva
Dialyseschlauch 3,5 kDa Ausschluss	Serva
Deckgläschen (18x18 mm)	Diagonal

Gebrauchsartikel	Hersteller
Elektroporations-Küvetten	Bio-Rad
Falcon (15 ml), steril	Sarstedt
Falcon (50 ml), steril	Sarstedt
Filteraufsatz für Sterilfiltration	Whatman
Glasperlen ($\varnothing \sim 0,5$ mm)	Braun
Immersionsöl Immersol 518 F	Zeiss
Immersionsöl Typ-A	Nikon
Kryo-Röhrchen (1,8 ml)	Nunc
Küvetten	Sarstedt
Latexkügelchen (grün fluoreszierend, $\varnothing 1,1 \mu\text{m}$)	Polysciences
Lebendzell-Mikroskopie Kammern ($\varnothing 35$ mm; pyrogenfrei)	Sarstedt
Membranlipidstreifen/ Membrane Lipid Strips TM	Echelon Biosciences Inc.
Mikro-Schraubröhrchen (2 ml)	Sarstedt
Objektträger	Diagonal
PCR-Reaktionsgefäß (0,5 ml)	Bio-Rad
Protein-Säulen mit Polyethylenfilter	Thermo Scientific
PVDF-Membran für Westernblots (Immobilon-P)	Millipore
Ultrazentrifugationsröhrchen	Beckman
Zellkulturflaschen (Polystyrol 25 cm ² /50 ml)	Nunc
Zellkulturflaschen (Polystyrol 80 cm ² /260 ml)	Nunc
Zellkulturplatte (24-Well)	Nunc
Zellkulturplatte (96-Well)	Nunc
Zellkultur-Zentrifugationsröhrchen (12 ml)	Greiner
Zellkulturschaber 23 mm	Nunc
Zellkulturschaber 12 mm	Sigma-Aldrich

2.4 Geräte und Maschinen

Tabelle 2.4.1: Verwendete Geräte und Maschinen

Geräte und Maschinen	Hersteller
Binokular Axiovert 25C	Zeiss
Blotapparatur Fastblot B33	Biometra
Blotapparatur Pierce G2 Fastblotter/ 62291	Thermo Scientific
Brutschrank der Serie 6000	Heraeus
CCD Kamera 12 Bit	Hamamatsu
CO ₂ -Brutschrank HEPA Class 100	Thermo Electron Corporation
Dounce-Homogenisator	Haeberle
Elektroporationsapparatur Gen Pulser	Bio-Rad
Feinwaage Cubis H110	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 50 + 12 Bit CCD Kamera	Zeiss
Geldokumentationssystem GelDoc TM XR	Bio-Rad
Heizblock AccuBlock TM	Labnet
Homogenisator Precellys [®] 24	bertin Technologies
Inkubator Multitron	Infors HT
Inkubator Memmert BE Modell 600	Heraeus
Isopropanol-Gefrierbox	Roth
Konfokales Mikroskop C2 + Kamera Ds-Qi1Mc	Nikon
Lebendzell-Inkubationskammer (Heating Incubator) P2000	PECON
Lebendzell-Inkubationskammer (Heating Insert) P2000	PECON
Lebendzell Objektiv-Heizung $\varnothing 29,0/32,0$ mm PT100	PECON
Lebendzell-Netzteil TempController 2000-1/2000-2	PECON
Magnetrührer	IKA
Netzgerät für Gelsysteme	GE Healthcare
PCR Thermocycler C1000	Bio-Rad

Geräte und Maschinen	Hersteller
PCR Thermocycler PTC-200	MJ Research
pH-Meter WTW Series pH 720	inoLab
Photometer BioPhotometer plus	Eppendorf
Photometer NanoDrop ND-2000C Spektrophotometer	PeqLab
Pipetten Pipetman	Gilson
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte
Proteingelsystem SE-260	Hoefer
Rollmischer (Rollordrum) TC-7	New Brunswick Scientific Co.
Schüttler Unitron	Infors
Schüttler Polymax1040	Heidolph
Sicherheitswerkbank Herasafe	Heraeus
Speed-Vac Vacuum-Konzentrator	Savant
Spinning-Disk Mikroskop Cell Observer + AxioCam MRm	Zeiss
Ultraschall-Homogenisator Sonopuls HD2200	Bandelin
Ultraschallwasserbad RK102H	Bandelin
Ultrazentrifuge Optima Max 100E, Rotor MLS50	Beckman
Ultrazentrifuge TLA100, Rotor SW40Ti	Beckman
UV-Tisch	Biometra
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage TE3102S	Sartorius
Wasserbad SUB6	Grant
Zählkammer (Faktor 78.000)	Thoma
Zentrifuge Avanti J-25, Rotoren JLA10.500 (r_{\max} 166 mm), JA-25.50 (r_{\max} 108 mm)	Beckman Coulter
Zentrifuge Beckman J2-21, Rotoren JA-20 (r_{\max} 108 mm)	Beckman Coulter
Zentrifuge Biofuge Pico, Rotor #3324 (r_{\max} 85 mm)	Heraeus
Zentrifuge Biofuge Primo R, Rotor #7593 (r_{\max} 87 mm)	Heraeus
Zentrifuge Megafuge 1.0R, Rotor #3360 (r_{\max} 155 mm)	Heraeus
Zentrifuge Multifuge 3SR+ (r_{\max} 187 mm)	Heraeus
Zentrifuge Rotanta 460R, Rotor (#4444), Einsätze (#4428) (r_{\max} 170 mm)	Hettich Zentrifugen

2.5 Lösungen und Puffer

Tabelle 2.5.1: Verwendete Lösungen und Puffer

Die beschriebenen Lösungen und Puffer wurden in destilliertem Wasser angesetzt, sofern nicht anders beschrieben. Alle Prozentangaben beziehen sich auf Masse pro Volumen (w/v), falls nicht anders beschrieben.

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
4-fach Sammelgelpuffer für Proteingele	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8) 0,4 % SDS
4-fach Trenngelpuffer für Proteingele	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) 0,4 % SDS
Blockierungslösung für Immunfluoreszenz	1 % BSA 0,5 % (v/v) TWEEN® 20 in PBS pH 7,4
Blockierungslösung für NHS-Sepharose	0,5 M Ethanolamin 0,1 M Tris/HCl pH 8,5
Blockierungslösung für Westernblot	3 % Milchpulver 0,05 % (v/v) TWEEN® 20 in PBS

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Blockierlösung für Membranlipidstreifen (Membrane Lipid Strips™)	3 % fettsäurefreies BSA 0,1 % (v/v) TWEEN® 20 in PBS
Coomassie-Färbelösung	0,008 % Coomassie-Brillant-Blau G-250 35 mM HCl
Cycloheximid-Lösung	10 µl Cycloheximid (100 mg/ml) in 10 ml Hanks-Salzlösung (HBSS)
Detektionspuffer für Westernblot	0,1 M Tris/HCl (pH 9,5) 0,1 M NaCl 50 mM MgCl ₂
DNS-Blaumarker (4-fach)	0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylen-Cyanol FF 15 % Ficoll 10 mM Tris/HCl 10 mM EDTA
Kopplungspuffer für NHS-Sepharose	0,2 M NaHCO ₃ 0,5 M NaCl pH 8,3
Kopplungspuffer für Präadsorptionsversuch	2,0 M NaHCO ₃ 0,5 M NaCl pH 8,6
Lagerpuffer für Proteine	50 mM Tris/HCl (pH 8,0) 100 mM NaCl
Laufpuffer für Proteingele	0,05 M Tris/HCl (pH 8,3) 0,2 M Glycin 0,1 % SDS
Lebendzell-Mikroskopie Puffer (Horton & 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
Lithiumacetat (LiAc)	1 M Lithiumacetat pH 8,4-8,9
Lyse-Puffer für Hefezellen	50 mM HEPES-KOH (pH 7,5) 140 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % (v/v) Triton X-100 0,1 % Natrium-Deoxycholat 1 mM PMSF <i>cOmplete Protease Inhibitor Cocktail</i>
Lysepuffer für native Proteinreinigung aus <i>E. coli</i>	1 mM PMSF 0,5 mg/ml Lysozym 1 % (v/v) Triton X-100 4 mM DTT <i>cOmplete Protease Inhibitor Cocktail</i> in PBS
Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS-Puffer = engl. phosphate buffered saline)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
Polyethylenglycol (PEG)	50 % PEG

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Phosphatpuffer nach Sørensen	8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 58,6 mM KH ₂ PO ₄ pH 6
Phospho-Lysis-Puffer	1 % (v/v) IGEPAL CA-630 1 % (v/v) Triton X-100 20 mM Tris/HCl (pH 7,5) 140 mM NaCl 2 mM EDTA 1 mM Na ₂ VO ₄
Proteinblaumarker (4-fach)	50 mM Tris/HCl (pH 6,9) 2 % SDS 0,1 % Bromphenolblau 5 % Glycerin
Plasmid-Präparations-Puffer P1	50 mM Tris/HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Plasmid-Präparations-Puffer P2	200 mM Natriumhydroxid 1 % SDS
Plasmid-Präparations-Puffer P3	3,0 M Kaliumacetat pH 5,5
Puffer A1 für die Antikörper-Reinigung	0,1 M Tris/HCl (pH 8,0)
Puffer A2 für die Antikörper-Reinigung	0,1 M Natriumacetat 0,5 M NaCl pH 4,0
Puffer B für Protein-Reinigung	8 M Harnstoff 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris/HCl (pH 8,0)
Puffer C für Protein-Reinigung	8 M Harnstoff 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris/HCl (pH 6,3)
Saponin	10 % Saponin in PBS
Saccharose-Phosphat-Glutaminsäure-Puffer (SPG-Puffer)	220 mM Saccharose 3,8 mM KH ₂ PO ₄ 10,8 mM Na ₂ HPO ₄ 4,9 mM Glutaminsäure pH 7,5
Stripping Puffer für Westernblots	0,2 M Glycin 0,5 M NaCl pH 2,8
Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)	89 mM Tris/HCl 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
Tris-gepufferter Salzlösung (TBS-Puffer = engl. tris-buffered saline)	140 mM NaCl 2,5 mM KCl 3,5 mM Tris/HCl (pH 7,4)
Transferpuffer für Westernblot	25 mM Tris/HCl 150 mM Glycin 0,05 % SDS 10 % (v/v) Methanol
Trypsin-Lösung	5 ml 10-fach Trypsin/EDTA 95 ml Hanks-Salzlösung (HBSS)

2.6 Enzyme

2.6.1 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme wurden von der Firma Thermo Scientific-Fermentas bezogen und für qualitative Analysen oder zur Öffnung von Plasmiden für Klonierungen genutzt. Folgende Enzyme wurden verwendet:

Acc651, BamHI, BseGI, DraIII, EcoRI, EcoRV, HincII, HindIII, NdeI, NotI, PvuI, PvuII, SacI, SalI, ScaI, SmaI, XhoI, XbaI

2.6.2 DNS-Polymerasen

Platinum® <i>Pfx</i> DNS-Polymerase	Invitrogen
T4 DNS-Polymerase	Thermo Scientific
<i>Taq</i> DNS-Polymerase	Laboreigene Herstellung (durch Irina Volfson)

2.6.3 Andere Enzyme

Lysozym	Sigma
Proteinase K	Roche
RNase A	Qiagen
T4 DNS-Ligase	Thermo Scientific
Trypsin/EDTA	Invitrogen

2.7 Antikörper

2.7.1 Primäre Antikörper

Tabelle 2.7.1: Verwendete Primärantikörper

mAB = monoklonale Antikörper, ohne Angabe = polyklonale Antikörper

Antikörper	Reaktivität gegen Antigen	Organismus	Verdünnung		Hersteller/Referenz
			IF	WB	
Anti-acetyliertes Tubulin (mAB)	humanes acetyliertes Tubulin	Maus	1:150	---	Sigma-Aldrich
Anti-ADFP	humanes ADFP	Huhn	1:200	1:500	Sigma-Aldrich
Anti-Aktin (mAB)	humanes β -Aktin	Maus	---	1:2000	Sigma-Aldrich
Anti-c-Myc (mAB)	c-Myc Oligopeptid	Maus	---	1:2000	Roche
Anti-C10orf118	humanes Golgi Protein C10orf118	Kaninchen	1:50	---	Sigma-Aldrich
Anti-Calnexin	humanes Calnexin (ein Lektin des ER)	Maus	1:100	1:1000	Santa Cruz
Anti-DnaK (mAB)	<i>C. pn</i> DnaK (Chaperon)	Maus	1:50	1:500	(Birkelund <i>et al.</i> 1990)
Anti-EF-Tu	<i>C. pn</i> EF-Tu (Elongationsfaktor)	Ziege	---	1:100	(Stallmann 2015)
Anti-EGFR	humaner EGFR (C-Terminus)	Maus	---	1:300	Santa Cruz

Anti-GroEL1	Chlamydiales GroEL1 (Chaperon)	Kaninchen	---	1:500	(Wuppermann <i>et al.</i> 2008)
Anti-GST (mAB)	GST (Glutathion-S-Transferase)	Kaninchen	---	1:1000	Santa Cruz
Anti-Mek1	humanes Mek1 (MAP kinase)	Maus	---	1:200	Santa Cruz
Anti-MOMP (mAB)	<i>C. pn</i> Major Outer Membrane Protein	Maus	1:10	---	(Wolf <i>et al.</i> 2001)
Anti-MOMP	Chlamydiales MOMP	Maus	1:20	1:200	(Wuppermann <i>et al.</i> 2001)
Anti-CPn0147	CPn0147 (As 1-41 und 91-149)	Kaninchen	1:50	1:100	(Herbst 2011)
Anti-CPn0186 (mAB)	<i>C. pneumoniae</i> IncA	Maus	1:100	---	(Luo <i>et al.</i> 2007a)
Anti-CPn0809	CPn0809 (As 1 bis 253)	Kaninchen	1:1	1:100	(Herbst 2011)
Anti-HA (mAB)	HA (Hämagglutinin)	Maus	---	1:80	Santa Cruz
Anti-LPS (mAB)	chlamydiales Lipopolysaccharid	Maus	1:50	---	Bio-Rad
Anti-Penta-His (mAB)	5 x Histidin-Tag	Maus	---	1:2500	Qiagen
Anti-S1 (mAB)	<i>C. tr</i> S1 (ribosomales Protein)	Maus	---	1:500	(Lundemose <i>et al.</i> 1990)
Anti-Streptavidin-AP Konjugat	Biotin	Kaninchen	---	1:1000	Sigma-Aldrich
Anti-Tip47	humanes Tip47	Kaninchen	1:600	1:2000	(Bulankina <i>et al.</i> 2009)
Anti-Tubulin (mAB)	humanes α -Tubulin	Maus	1:150	---	Acris
Anti-p84	humanes p84	Maus	---	1:1000	GeneTex
Pathfinder (mAB)	chlamydiales Lipopolysaccharid	Maus	1:6	---	US Biological
Anti-Pmp21N	<i>C. pn</i> Pmp21 N-Fragment	Kaninchen	1:150	---	(Becker 2013)
Anti-Vimentin Cy3 Konjugat (mAB)	humanes Vimentin	Maus	1:200	---	Sigma-Aldrich

2.7.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 2.7.2: Verwendete Sekundärantikörper zur Markierung von Primärantikörpern

WB = Nutzung für Westernblot-Analysen, IF = Nutzung für Immunfluoreszenz

Antikörper	Spezifität	Organismus	Verdünnung	Hersteller
Anti-Huhn-AP Konjugat	Huhn	Ziege	1:5000 WB	Santa Cruz
Anti-Maus-AP Konjugat	Maus	Ziege	1:7500 WB	Promega
Anti-Kaninchen-AP Konjugat	Kaninchen	Ziege	1:7500 WB	Promega
Anti-Ziege-AP Konjugat	Ziege	Maus	1:500 WB	Santa Cruz
Alexa Fluor 488	Kaninchen	Ziege	1:200 IF	Invitrogen
Alexa Fluor 488	Maus	Ziege	1:200 IF	Invitrogen
Alexa Fluor 594	Kaninchen	Ziege	1:200 IF	Invitrogen
Alexa Fluor 594	Maus	Ziege	1:200 IF	Invitrogen
Cy5-Anti Maus	Kaninchen	Ziege	1:200 IF	Invitrogen

2.8 Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 2.8.1: Verwendete Farbstoffe für die Mikroskopie

Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden den Herstellerangaben folgend angesetzt und verdünnt.

Fluoreszenzfarbstoff	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	AppliChem
Bodipy® 493/503	Invitrogen
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich
Rhodamine Phalloidin	Invitrogen
WGA (<u>W</u> heat <u>g</u> erm <u>a</u> gglutinin) Alexa Fluor 594	Invitrogen

2.9 Kits

Tabelle 2.9.1: Verwendete Kits

Die aufgelisteten Kits wurden nach Herstelleranweisung verwendet.

Kit	Hersteller
Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System	Clontech
μMACS™ Epitope Tag Protein Isolation Kit	Miltenyi Biotec
NucleoBond® Xtra Midi EF	Macherey-Nagel
Protease Detection Kit	Jena Bioscience
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen

2.10 Größenstandards

2.10.1 DNS-Größenstandards

Tabelle 2.10.1: Verwendete DNS-Größenstandards für Agarosegele

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

2.10.2 Protein-Größenstandards

Tabelle 2.10.2: Verwendete Protein-Größenstandards für SDS-Gele

Protein-Standard	Proteinmasse (kDa)	Hersteller
PageRuler™ Prestained	170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17, 11	Fermentas
PageRuler™ Plus Prestained	250, 130, 95, 72, 55, 36, 28, 17, 10	Fermentas

2.11 Oligonukleotide

2.11.1 Oligonukleotide zur Amplifikation von DNS-Abschnitten

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers synthetisiert. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in ddH₂O gelöst, sodass die Konzentration von 50 pmol/μl betrug.

Tabelle 2.11.1: Oligonukleotide zur Amplifikation von DNS-Abschnitten

Nummer und Bezeichnung der jeweiligen Oligonukleotide beziehen sich auf die laborinterne Oligonukleotid-Sammlung. Fett markierte Sequenzabschnitte sind homolog zur Sequenz des zu amplifizierenden DNS-Abschnitts. Nicht fett geschrieben sind hingegen die Sequenzabschnitte der Oligonukleotide, die Homologie zum Zielvektor zeigen und für die homologe Rekombination in Hefe (siehe Kapitel 3.5.3) benötigt werden.

Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
c-719	pKM32 809 hin	CCA TCA CCA TCA CCA TAC GGA TCC GCA TGC GAG CTC GGT AAT GTC TAT TTC ATC TTC TTC AG
c-1102	pGADT7-His6-s	GGG CAT CGA TAC GGG ATC CAT CGA GCT CGA GCT GCA GAT CAC CAT CAC CAT CAC CAT GAA
c-1103	pGADT7-His6-as	GTT GAA GTG AAC TTG CGG GGT TTT TCA GTA TCT ACG ATT CAT GGT GAT GGT GAT GGT GAT C
c-1144	DSRed CEN ARS TRP for	TTT TCA CTG CAT TCT AGT TGT GGT TTG TCC AAA CTC ATC AGT GCC ACC TGG GTC CTT TTC
c-1145	DSRed CEN ARS TRP rev	AGG GGT TCC GCG CAC ATT TCC CCG AAA AGT GCC ACC TGA CCT CAG TAA TAA CCT ATT TCT TAG
c-1281	Cpn0809_pGBKT7_ Fwd	GGA GCA GAA GCT GAT CTC AGA GGA GGA CCT GCA TAT GGC CAT GTC TAT TTC ATC TTC TTC AGG A
c-1282	Cpn0809_pGBKT7_ Rev	CAA GGG GTT ATG CTA GTT ATG CGG CCG CTG CAG GTC GAC GTT ATG CTG CGC CAG CGA TGG
c-1283	Cpn0809_ohneTM_ pGBKT7_Rev	CAA GGG GTT ATG CTA GTT ATG CGG CCG CTG CAG GTC GAC GTT AGA CAG TAT CCA TTG TTC CTT C
c-1299	147dsRedFw	CTC AAG CTT CGA ATT CTG CAG TCG ACG GTA CCG CGG GCC CAT GGC TGT TCA ATC TAT AAA
c-1381	809TMdel_Rev_ AA253	TAA TTT GTG TTG CTA CCG TGG TTG CAG TAT CCA TTG TTC CTT CGA GAT CT
c-1348	Cpn0811_pGADT7 fwd	GGA GTA CCC ATA CGA CGT ACC AGA TTA CGC TCA TAT GGC CAT GAG CAA GCC CTC TCC TCG
c-1349	Cpn0811_pGADT7 rev	ACG ATT CAT CTG CAG CTC GAG CTC GAT GGA TCC CGT ATC GCT AAC GTT TCT TTC CGC TTT TC
c-1382	809TMdel_Fwd_ AA303	AGA TCT CGA AGG AAC AAT GGA TAC TGC AAC CAC GGT AGC AAC ACA AAT TA
c-1383	809TMdel_Rev_ AA382	GCT GCA TTT GCA TAA TCC CTT TAC CTT TCG AGA GCT TGG GGA AGT TCT TC
c-1384	809TMdel_Fwd_ AA406	GAA GAA CTT CCC CAA GCT CTC GAA AGG TAA AGG GAT TAT GCA AAT GCA GC
c-1656	Fwd_Cpn0809_ mCherry	ATC TCG AGC TCA AGC TTC GAA TTC TGC AGT CGA CGG TAC CAT GTC TAT TTC ATC TTC TTC AGG
c-1657	Rev_Cpn0809N_ mCherry	TGG CCA TGT TAT CCT CCT CGC CCT TGC TCA CCA TGG TGG CGA CAG TAT CCA TTG TTC CTT
c-1658	Rev_Cpn0809V_ mCherry	TGG CCA TGT TAT CCT CCT CGC CCT TGC TCA CCA TGG TGG CTG CTG CGC CAG CGA TG
c-1730	809V_pKM32_rev	CAA CAG GAG TCC AAG CTC AGC TAA TTA AGC TTG GCT GCA GTT ATG CTG CGC CAG CGA
c-1874	Cpn0809_pKM55_ fwd	GAC TCC GTC CAG TAT TGA TCG GGA GAG CCG GAG CGA GCA TGT CTA TTT CAT CTT CTT CAG
c-1875	Cpn0809V_pKM55_ rev	GCA CCA CCC CGG TGA ACA GCT CCT CGC CCT TGC TCA CCA TTG CTG CGC CAG CGA TGG CT
c-1876	Cpn0809N_pKM55_ rev	GCA CCA CCC CGG TGA ACA GCT CCT CGC CCT TGC TCA CCA TGA CAG TAT CCA TTG TTC CTT
c-1887	pEB1_Cpn0809_fwd	CGC CGC CAT GGA GTA CCC ATA CGA CGT ACC AGA TTA CGC TAT GTC TAT TTC ATC TTC TTC

Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
c-1889	pEB1_Cpn0809N_rev	GGT TTT TCA GTA TCT ACG ATT CAT GGT GAT GGT GAT GGT GGA CAG TAT CCA TTG TTC CTT
c-2322	pFT8_KanR_fwd	ACC CTG ATA AAT GCT TCA ATA ATA TTG AAA AAG GAA GAG TAT GAG CCA TAT TCA ACG G
c-2323	pFT8_KanR_rev	AAT CAA TCT AAA GTA TAT ATG AGT AAA CTT GGT CTG ACA GTT AGA AAA ACT CAT CGA GC
c-2309	Cpn 0147 in pKM55 hin	GAC TCC GTC CAG TAT TGA TCG GGA GAG CCG GAG CGA GCA TGG CTG TTC AAT CTA TAA A
c-2310	Cpn 0147 in pKM55 her	GCA CCA CCC CGG TGA ACA GCT CCT CGC CCT TGC TCA CCA TAC TTC CCG CCC CTG AAT TGA
c-2403	147mCh_rev	CAT GTT ATC CTC CTC GCC CTT GCT CAC CAT GGT GGC GAC ACT TCC CGC CCC TGA ATT G
c-2475	Cpn0147ΔLipo_fwd	GAC TCC GTC CAG TAT TGA TCG GGA GAG CCG GAG CGA GCA TGG TAA ACT GTT CTA GAG A
c-2476	Cpn0147ΔN_fwd	GAC TCC GTC CAG TAT TGA TCG GGA GAG CCG GAG CGA GCA TGT CTG TTA TAG CAG CTA T
c-2477	Cpn0147ΔC_rev	GCA CCA CCC CGG TGA ACA GCT CCT CGC CCT TGC TCA CCA TAG TAA TCA GTA TTG CCC AAG
c-2478	Cpn0147N_rev	GCA CCA CCC CGG TGA ACA GCT CCT CGC CCT TGC TCA CCA TTC TAG CAA TAC TCG TTG CTC
c-2479	Cpn0147C_fwd	GAC TCC GTC CAG TAT TGA TCG GGA GAG CCG GAG CGA GCA TGA CTT TGA GAC TGC TTA A
c-2628	147_pEGFP_Fwd	CGC CGC CGG GAT CAC TCT CGG CAT GGA CGA GCT GTA CAA GAT GGC TGT TCA ATC TAT AAA
c-2629	147_pEGFP_Rev	GCT GAT TAT GAT CAG TTA TCT AGA TCC GGT GGA TCC CCT AAC TTC CCG CCC CTG AAT TGA
c-2632	pEGFP_mCherry_fwd	AGT GAA CCG TCA GAT CCG CTA GCG CTA CCG GTC GCC ACC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG
c-2633	pEGFP_mCherry_rev	GGA TCC CGG GCC CGC GGT ACC GTC GAT CGA GAT CTG AGT ACT TGT ACA GCT CGT CCA TGC
c-2642	Cpn0146_pKM55_fwd	GAC TCC GTC CAG TAT TGA TCG GGA GAG CCG GAG CGA GCA TGA GCA GTT CGG AAG TTG T
c-2643	Cpn0146_pKM55_rev	GCA CCA CCC CGG TGA ACA GCT CCT CGC CCT TGC TCA CCA TAT CAT CTG ACA TCT GAT CGA

2.11.2 Oligonukleotide zur Verifikation von DNS-Insertionen

Tabelle 2.11.2: Zur Identifizierung positiver Klone verwendete Oligonukleotide

Nummer und Bezeichnung der jeweiligen Oligonukleotide beziehen sich auf die laborinterne Oligonukleotid-Sammlung.

Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
c-673	seq pKM33 vorne	TAC TTG AAA TCC AGC AAG TAT
c-789	Cpn0809 GiD fwd	ATC TGC CTT ATC TAA CTA TGC
c-795	seq pKM32 tim her(hin)	TTT CGT CTT CAC CTC GAG AAA
c-796	seq pKM32 tim her	GGT CAT TAC TGG ATC TAT CAA
c-803	GST Protease GenX His seq her	CAA GCT GTG ACC GTC TCC G

c-1114	Seq pEB1 s	GAC TCA CTA TAG GGC GAG CG
c-1115	Seq pEB1 as	CAG TAT CTA CGA TTC ATG GTG
c-1116	Seq pEB2 s	CTC ACT ATA GGG CGA GCC GC
c-1117	Seq pEB2 as	GTT ATG CTA GTT ATG CGG CC
c-1295	SeqdsREDfw	AAC CGT CAG ATC CGC TAG CG
c-1296	SeqdsREDrev	GAG GTG TGG GAG GTT TTT TA
c-1401	seq-pKM55-s	TAT CGA TTC TAG CCG AGT CC
c-1402	seq-pKM55-as	ACA CGC TGA ACT TGT GGC CG
c-1490	Seq hin mCherry	TTT AGT GAA CCG TCA GAT CC
c-1491	Seq her mCherry	GCC ATG TTA TCC TCC TCG CC
c-2125	mGFP-forward-sequencing-primer	GGC ATG GAC GAG CTG TAC AA

2.11.3 Oligonukleotide für Sequenzierungen

Tabelle 2.11.3: Verwendete Oligonukleotide zur Sequenzierung neuer Vektorkonstrukte

Nummer und Bezeichnung der jeweiligen Oligonukleotide beziehen sich auf die laborinterne Oligonukleotid-Sammlung oder Firmen-Codierungen (Firma: GATC).

Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
c-1464	Seq_Cpn0809-TM_rev	GAA GCA CCA GCA ATA GTG
---	CMV-F (GATC Standardprimer)	CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG
---	KS (GATC Standardprimer)	TCG AGG TCG ACG GTA TC
---	M13-FP	TGTA AAA CGA CGG CCA GT
---	pACT2-FP (GATC Standardprimer)	GAT GAT GAA GAT ACC CCA C
---	pcDNA3.1-RP/1 (GATC Standardprimer)	CAA ACA ACA GAT GGC TGG C
---	pcDNA1.1-RP (GATC Standardprimer)	CTC TGT AGG TAG TTT GTCC
---	pEGFP_C2-FP (GATC Standardprimer)	GAT CAC ATG GTC CTG CTG
---	pEGFP_C2-RP (GATC Standardprimer)	TTT AAA GCA AGT AAA ACC TC
---	pEGFP-FP (GATC Standardprimer)	TTT AGT GAA CCG TCA GAT C
---	pEGFP_N (GATC Standardprimer)	CCG TCC AGC TCG ACC AG
---	pEGFP-RP (GATC Standardprimer)	AAC AGC TCC TCG CCC TTG
---	pGBT9-FP (GATC Standardprimer)	AGT GCG ACA TCA TCA TCG
---	pGBT9-RP (GATC Standardprimer)	CGT TTT AAA ACC TAA GAG TCA C

2.12 Plasmide

Tabelle 2.12.1: Verwendete Plasmide und Vektoren

Nummern und Bezeichnung beziehen sich auf die laborinterne Plasmid-Sammlung.

Nummer	Bezeichnung	Ursprungsvektor	Konstruktion/ ggf. Referenz
1301	pGBKT7	---	Clontech, Hefe-2-Hybrid System, trägt die codierende Sequenz für die DNS-Bindedomäne des <i>GAL4</i> -Proteins für das Hefe-2-Hybrid System.
1302	pGBKT7-53	pGBKT7	Clontech, Kontrolle für das Hefe-2-Hybrid System, codiert das Protein p53 fusioniert an die <i>GAL4</i> -DNS-Bindedomäne.
1502	pAF75	pFT8	pFT8 geöffnet mit <i>Sma</i> I, Integration von <i>cpn0809N</i> (As 1 – 253); Laborkollektion (Kerres und Herbst)

Nummer	Bezeichnung	Ursprungsvektor	Konstruktion/ ggf. Referenz
1612	pFT8	pKM36	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, durch Integration einer Schnittstelle mit stark verkürzter MCS und 6 x His-Markierung, Laborkollektion (Fechtner 2012)
1625	pAF94	pKM32	pKM32 geöffnet mit <i>Bam</i> HI, Integration von <i>cpn0809N</i> (As 1 – 253); Laborkollektion (Kerres und Herbst)
1662	pEB1	pGADT7	pGADT7 geöffnet mit <i>Xho</i> I, Integration einer His ₆ -Markierung, Laborkollektion (Molleken <i>et al.</i> 2013)
1663	pEB2	pGBKT7	pGBKT7 geöffnet mit <i>Eco</i> RI, Integration eines VSV-Fragments, Laborkollektion (Molleken <i>et al.</i> 2013)
1675	pGADT7	---	Clontech, 2-Hybrid System, trägt die codierende Sequenz für die Aktivierungsdomäne des <i>GAL4</i> -Proteins für das Hefe-2-Hybrid System.
1676	pGADT7-T	---	Clontech, Kontrolle für das Hefe-2-Hybrid System, codiert das große T-Antigen des SV40-Virus fusioniert an die <i>GAL4</i> -Aktivierungsdomäne.
1677	pGBKT7-Lam	---	Clontech, Kontrolle für das Hefe-2-Hybrid System, codiert das Protein Lamin C fusioniert an die <i>GAL4</i> -Aktivierungsdomäne.
1680	pAF123	pFT8	pFT8 geöffnet mit <i>Sma</i> I, Integration von <i>cpn0809C</i> (As 406-488); Laborkollektion (Kerres und Herbst)
1695	pAE1	pGBKT7	pGBKT7 geöffnet mit <i>Sma</i> I, Integration von <i>cpn0809N</i> (As 1 – 253), generiert mit den Oligonukleotiden C-1281/ C-1283
1720	mCherry <i>CEN TRP ARS</i>	mCherry	Transfektionsvektor für Humanzellen. Integration von <i>CEN</i> , <i>ARS</i> und <i>TRP1</i> in mCherry, Laborkollektion (Kerres)
1769	pAE5	pGADT7	pGADT7 geöffnet mit <i>Sma</i> I, Integration von <i>cpn0811</i> Volllänge, generiert mit den Oligonukleotiden C-1348/ C-1349
1861	pDsRed2-ER	DsRed2	Transfektionsplasmid zur Expression von Calreticulin in Humanzellen. (Ein Geschenk von Anna Akhmanova, Cell Biology Faculty of Science, Utrecht University.)
1895	pKM55	pEGFP-EGFR	Transfektionsvektor für Humanzellen. pEGFP-EGFR geöffnet mit <i>Afl</i> III, Integration von <i>CEN</i> , <i>ARS</i> und <i>TRP1</i> . EGFR mit <i>Sac</i> I entfernt und Integration eines Primer Dimer, um eine MCS zu generieren, Laborkollektion (Mölleken)
1910	pAF164	mCherry <i>CEN TRP ARS</i>	mCherry <i>CEN TRP ARS</i> geöffnet mit <i>Sma</i> I, Integration von <i>cpn0592</i> (Lda3-Homolog von <i>C. pneumoniae</i>), Laborkollektion (Herbst)
1914	pAE17	pKM55	pKM55 geöffnet mit <i>Sma</i> I, Insertion von <i>cpn0809</i> Volllänge, generiert mit den Oligonukleotiden C-1874/ C-1875

Nummer	Bezeichnung	Ursprungsvektor	Konstruktion/ ggf. Referenz
1941	pKM32	---	<i>E. coli</i> Expressionsvektor zur Produktion von N-terminal-His ₆ -markierten Proteinen, Laborkollektion (Möllenken)
1957	pAE21	mCherry <i>CEN TRP ARS</i>	mCherry <i>CEN TRP ARS</i> geöffnet mit <i>Sma</i> I, Integration von <i>cpn0809N</i> (As 1 – 253), generiert mit den Oligonukleotiden C-1656/ C-1657
1958	pAE22	mCherry <i>CEN TRP ARS</i>	mCherry <i>CEN TRP ARS</i> geöffnet mit <i>Sma</i> I, Integration von <i>cpn0809ΔTM1,2</i> , generiert mit den Oligonukleotiden C-1656/ C-1658
1959	pAE23	mCherry <i>CEN TRP ARS</i>	mCherry <i>CEN TRP ARS</i> geöffnet mit <i>Sma</i> I, Integration von <i>cpn0809ΔTM1,2,3</i> , generiert mit den Oligonukleotiden C-1656/ C-1658
1960	pAE24	pKM55	pKM55 geöffnet mit <i>Sma</i> I, Insertion <i>cpn0809ΔTM1,2,3</i> , generiert mit den Oligonukleotiden C-1874/ C-1658
1983	pAE27	pEB1	pEB1 geöffnet mit <i>Sma</i> I, Integration von <i>cpn0809N</i> (As 1 – 253), generiert mit den Oligonukleotiden C-1887/ C-1889
2011	pAE28	mCherry <i>CEN TRP ARS</i>	mCherry <i>CEN TRP ARS</i> geöffnet mit <i>Sma</i> I, Integration von <i>cpn0809</i> Volllänge, generiert mit den Oligonukleotiden C-1656/ C-1658
2015	pAE32	pKM55	pKM55 geöffnet mit <i>Sma</i> I, Insertion <i>cpn0809N</i> (As 1 – 253), generiert mit den Oligonukleotiden C-1874/ C-1876
2024	pRab11A	pEGFP-C2	Wildtypisches Rab11A fusioniert an GFP, ein Geschenk von M. Scidmore, Cornell University, Dep. of Microbiology and Immunology (Rzomp <i>et al.</i> 2003)
2025	pRab11A-CA	pEGFP-C2	Konstitutiv aktives Rab11 fusioniert an GFP, ein Geschenk von M. Scidmore, Cornell University, Dep. of Microbiology and Immunology (Rzomp <i>et al.</i> 2003)
2026	pRab11A-DN	pEGFP-C2	Dominant negatives Rab11 fusioniert an GFP, ein Geschenk von M. Scidmore, Cornell University, Dep. of Microbiology and Immunology (Rzomp <i>et al.</i> 2003)
2030	pAE41	pKM32	pKM32 geöffnet mit <i>Sma</i> I, Integration von <i>cpn0809</i> Volllänge, generiert mit den Oligonukleotiden C-719/ C-1730
2128	STIM-1 EGFP	pCMV6-XL5	Geschenk des LSRA, Lewis Labors, Department of Molecular and Cellular Physiology, Stanford University School of Medicine (Wu <i>et al.</i> 2006)
2232	pAE50	pFT8	Austausch des Ampicillin-Resistenzgens gegen ein Kanamycin-Resistenzgen, generiert mit den Oligonukleotiden C-2322/ C-2323
2233	pAE51	pAE50	pAE50 geöffnet mit <i>Sma</i> I, Integration von <i>cpn0811</i> in Volllänge, generiert mit den Oligonukleotiden C-2324/ C-2325
2234	pAE52	mCherry <i>CEN TRP ARS</i>	mCherry <i>CEN TRP ARS</i> geöffnet mit <i>Sma</i> I, Integration von <i>cpn0147</i> Volllänge, generiert mit den Oligonukleotiden C-1299/ C-2403

Nummer	Bezeichnung	Ursprungsvektor	Konstruktion/ ggf. Referenz
2241	pAE59	pKM55	pKM55 geöffnet mit <i>Sma</i> I, Insertion <i>cpn0147N</i> (As 1 – 41), generiert mit den Oligonukleotiden C-2309/ C-2478
2242	pAE60	pKM55	pKM55 geöffnet mit <i>Sma</i> I, Insertion <i>cpn0147ΔN</i> (As 42 – 149), generiert mit den Oligonukleotiden C-2476/ C-2310
2295	pAE61	pKM55	pKM55 geöffnet mit <i>Sma</i> I, Insertion <i>cpn0147ΔLipo</i> (As 20 – 149), generiert mit den Oligonukleotiden C-2475/ C-2310
2296	pAE62	pKM55	pKM55 geöffnet mit <i>Sma</i> I, Insertion <i>cpn0147ΔC</i> (As 1 – 91), generiert mit den Oligonukleotiden C-2309/ C-2477
2297	pAE63	pKM55	pKM55 geöffnet mit <i>Sma</i> I, Insertion <i>cpn0147C</i> (As 92 – 149), generiert mit den Oligonukleotiden C-2479/ C-2310
2300	pAE66	pAE67	Transfektionsvektor für Humanzellen, GFP aus pAE67 wurde durch mCherry ersetzt, generiert mit den Oligonukleotiden C-2632/ C-2633
2301	pAE67	pEGFP-FYVE	Transfektionsvektor für Humanzellen. pEGFP-FYVE geöffnet mit <i>Dra</i> III, Integration von <i>CEN</i> , <i>ARS</i> und <i>TRP1</i> , generiert mit den Oligonukleotiden C-1144/ C-1145, FYVE mit <i>Xho</i> I und <i>Sal</i> I entfernt
2302	pAE68	pAE67	pAE67 geöffnet mit <i>Sma</i> I, Insertion <i>cpn0147</i> Volllänge, generiert mit den Oligonukleotiden C-2628/ C-2629
2303	pAE69	pKM55	pKM55 geöffnet mit <i>Sma</i> I, Insertion <i>cpn0146</i> Volllänge, generiert mit den Oligonukleotiden C-2642/ C-2643
2333	GFP-Rab5A	pGreenLantern	Transfektionsplasmid zur Expression von Rab5-GFP in Humanzellen. (Rzomp <i>et al.</i> 2003)
2334	GFP-Rab7A	pGreenLantern	Transfektionsplasmid zur Expression von Rab7-GFP in Humanzellen. (Rzomp <i>et al.</i> 2003)
2373	pKM95	pKM55	Transfektionsplasmid für Humanzellen. GFP aus pKM55 wurde durch mCherry ersetzt. (Mölleken)
2388	pGPIImCherry		Transfektionsplasmid zur Expression von mCherry mit GPI-Anker in Humanzellen (Geschenk von Roland Thuenauer, AG Jun. Prof. Winfried Römer, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, BIOS - Center for Biological Signalling Studies).
2395	pGEX-lact-C2	pGEX	Transfektionsplasmid zur Expression der C2-Domäne von Lactadherin in Humanzellen. (Fairn <i>et al.</i> 2011)

2.13 Zellen und Zelllinien

2.13.1 Prokaryotische Zelllinien

Chlamydia pneumoniae:

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

Escherichia coli:

XL₁-blue: *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac- [F' proAB lacI^f ZΔM15 Tn10(Tc^R)]* (Stratagene)

BL21: *F ompT hsdSB (r_B⁻m_B⁻) gal dcm* (DE3) (Invitrogen)

2.13.2 Eukaryotische Zelllinien

Saccharomyces cerevisiae:

CEN.PK2: $\frac{MAT\alpha\ leu2-3,112\ ura3-52\ trp1-289\ his3-\Delta1\ MAL2-8^C\ SUC2}{MAT\alpha\ leu2-3,112\ ura3-52\ trp1-289\ his3-\Delta1\ MAL2-8^C\ SUC2}$
(Entian *et al.* 1999)

AH109: *MAT\alpha\ trp1-901\ leu2-3, 112\ ura3-52\ his3-200\ gal4\ gal80\ LYS2::GAL1_{UAS} - GAL1_{TATA} - HIS3\ GAL2_{UAS} - GAL2_{TATA} - ADE2\ URA3::MEL1_{UAS} - MEL1_{TATA} - LacZ\ MEL1* (Clontech)

Adhärente, immortalisierte Humanzelllinien:

HEp-2 Zelllinie: anfänglich als epitheliale Larynxkarzinom-Zelllinie menschlichen Ursprungs angenommen, ist aus HeLa-Kontamination hervorgegangen
ATCC[®] Nr.: CCL-23TM

HeLa Zelllinie: epitheliale Zervixkarzinom-Zelllinie menschlichen Ursprungs
ATCC[®] Nr.: CCL-2TM

2.14 Medien und Medienzusätze

2.14.1 Medien für *Escherichia coli*

LB (Lysogeny Broth)-Medium:

10 g Trypton Pepton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
ggf. 1 % Glucose

Für Platten mit festem Nährmedium:

13,5 g Agar

Die Zutaten wurden in einem Liter ddH₂O gelöst und autoklaviert. Die Zugabe von Antibiotika erfolgt in das handwarme Medium:

Ampicillin Zielkonzentration 50 mg/l
Kanamycin Zielkonzentration 15 mg/l
Tetracyclin Zielkonzentration 20 mg/l

2.14.2 Medien für *Saccharomyces cerevisiae*

YPD⁺-Medium:

20	g	Glucose
10	g	Hefeextrakt
20	g	Casein Hydrolysat (Pepton)
13,5	g	Agar (nur bei Platten)
4	mg	Adenin
20	mg	Tryptophan

Die Zutaten wurden in einem Liter ddH₂O gelöst und autoklaviert.

SD (Synthetic Defined)-Minimalmedium (fest):

20	g	Glucose
20	g	Agar
1,7	g	Yeast Nitrogen Base
5	g	Ammoniumsulfat
2	g	Aminosäuremischung

Die Zutaten wurden in einem Liter ddH₂O gelöst, mit 1 M Natriumhydroxid auf pH 6 eingestellt und autoklaviert. Zur Selektion wird die entsprechende Nukleobase oder Aminosäure nicht mit in die Aminosäuremischung gegeben.

SD-Minimalmedium (flüssig):

1,7	g	Hefe Stickstoffbasen
5	g	Ammoniumsulfat
2	g	Aminosäuremischung

In einem Liter ddH₂O lösen und autoklavieren. Zur Selektion wird die entsprechende Nukleobase oder Aminosäure nicht mit in die Aminosäuremischung gegeben. Die Kohlenstoffquelle Glucose wird als 20 %ige Stammlösung separat autoklaviert und nach dem Autoklavieren dem Medium hinzugefügt.

Aminosäuremischung:

Die in Tabelle 2.14.1 angegebenen Aminosäuren, Nukleobasen und Chemikalien werden gemischt und mit sterilen Mahlkugeln mindestens für 15 min gemahlen.

Tabelle 2.14.1: Quantitative Zusammensetzung der Aminosäuremischung

Aminosäuren/ Nukleobasen/ Chemikalien	Menge	Aminosäuren/ Nukleobasen/ Chemikalien	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	<i>para</i> -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

2.14.3 Humanzellkultur Medium

Zu 500 ml DMEM-GlutaMAX™ + Glucose + Pyruvat Medium wird folgendes zugegeben:

50 ml FKS (hitzeinaktiviert für 60 min/56 °C)	Zielkonzentration 10 %
5 ml Vitamine (100-fach)	Zielkonzentration 1-fach
5 ml nicht-essenzielle Aminosäuren (100-fach)	Zielkonzentration 1-fach
5 ml Amphotericin B (250 µg/ml)	Zielkonzentration 2,5 µg/ml
0,5 ml Gentamycin (50 mg/ml)	Zielkonzentration 50 µg/ml

Dem Medium wurde für die Chlamydieninfektion 15 µl einer 0,1 mg/ml Cycloheximid-Stammlösung (Zielkonzentration 1,5 µg/ml) zugegeben. Für Untersuchungen des Einflusses von Chlamydien auf den Lipidmetabolismus der Zellen wurden 100 µM Ölsäure zugegeben. Im Zuge der Untersuchungen der Mikrotubuli sowie exozytotischer Prozesse wurden 1 bis 10 µM Nocodazol bzw. 1 µg/ml Brefeldin A in das Medium gegeben.

3 Methoden

3.1 Arbeitstechniken für *Escherichia coli*

3.1.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli-Zellen einer Kolonie wurde mit einer sterilen Pipettenspitze in LB-Medium übertragen. Die Kultivierung in flüssigem Medium erfolgte in aeroben Schüttelkulturen bei 140 UpM und 37 °C (Multitron Schüttelinkubator). Das Wachstum der Flüssigkulturen wurde durch photometrische Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) beobachtet. Zur Anzucht von *E. coli* auf festem Medium wurden die Zellen gleichmäßig auf dem Medium verteilt und bei 37 °C ü/N (Brutschrank Heraeus) inkubiert. Positive *E. coli*-Transformanten wurden mittels entsprechender Antibiotikazugabe selektiert.

3.1.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

E. coli XL₁-blue Zellen wurden aufgetaut und gleichmäßig auf festem LB-Medium mit Tetracyclin (Zielkonzentration 20 mg/l) verteilt und ü/N bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 5 ml flüssiges LB-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und Kapitel 3.1.1 folgend inkubiert. Die Kulturen wurden zu 1 l LB-Medium mit 20 µg/ml Tetracyclin gegeben und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7-0,8 inkubiert. Die Kultur wurde 30 min lang auf Eis gekühlt und anschließend für 15 min bei 4000 UpM (Avanti J-25, Rotor JLA10.500) und 4 °C pelletiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit 1 l eiskaltem, sterilem ddH₂O gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 20 ml eiskaltem, sterilem, 10 %igem Glycerin gelöst und erneut 15 min lang bei 4000 UpM und 4 °C zentrifugiert (Multifuge 3SR+). Die Zellen wurden dann in je 2-3 ml 10 %igem Glycerin gelöst, aliquotiert und 1 min lang in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die elektrokompetenten Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

Wurden elektrokompetente Zellen vom *E. coli*-Stamm BL21 hergestellt, wurde dem Medium kein Tetracyclin zugesetzt.

3.1.3 Induktion der Genexpression in *E. coli*

Zur Induktion der Genexpression unter Kontrolle des *lac*-Promotors, wurden exponentiell wachsende *E. coli* XL₁-blue- oder BL21-Kulturen mit IPTG versetzt.

Hierzu wurde eine 50-ml-Vorkultur ü/N im entsprechenden LB-Selektionsmedium Kapitel 3.1.1 folgend inkubiert. Eine präparative 1-l-Induktionskultur wurde aus der Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 inkubiert. Anschließend wurde eine 1 M IPTG-Stammlösung frisch hergestellt und mit einer

Zielkonzentration von 1 mM in die Kultur gegeben, wodurch die Genexpression induziert wurde. Nach Induktionsstart wurde die Kultur bis zu 4 h inkubiert. Zur Kontrolle der Expression wurde vor Versuchsbeginn und nach Ablauf der Inkubationszeit 1 OD₆₀₀ der Zellsuspension abgenommen und Kapitel 3.7.5.1 folgend für die Analyse mittels SDS-Gel aufgearbeitet.

Nach Ende der Inkubation wurde die präparative Induktionskultur für 20 min bei 5 000 UpM und 4 °C (Avanti J-25, Rotor JLA10.500) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 40 ml PBS gelöst. Die Suspension wurde 15 min lang bei 4 600 UpM und 4 °C (Heraeus Megafuge 1.0 R) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml PBS aufgenommen. Die Isolierung von Proteinen aus *E. coli*-Pellets wird in Kapitel 3.7.1 beschrieben.

3.2 Arbeitstechniken für *Saccharomyces cerevisiae*

3.2.1 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Kultivierung in flüssigem Medium wurden Zellen einer *S. cerevisiae* Kolonie inokuliert und anschließend unter Rotieren bei 140 UpM und 30 °C inkubiert. Das Wachstum der Flüssigkulturen wurde durch photometrische Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) beobachtet. Zur Kultivierung von *S. cerevisiae* auf festem Medium wurden Zellen mit einer sterilen Pipettenspitze auf das Medium ausgestrichen. Die Selektion transformierter Zellen erfolgte durch die Wahl entsprechender Selektionsmedien, mittels derer auf die Prototrophie der Zellen getestet wurde.

3.2.2 Proteinexpression in *S. cerevisiae*

Zur Expression von Proteinen in *S. cerevisiae* wurde in der vorliegenden Arbeit der konstitutiv aktive *ADH1*-Promotor genutzt. Die von der Plasmid-DNS codierten Proteine werden unter Kontrolle dieses Promotors ohne zusätzliche Induktion überexprimiert.

3.2.2.1 Aufarbeitung von *S. cerevisiae* für die Schnellanalyse

Für die Kontrolle der Expression von Proteinen wurden 2 OD₆₀₀ der Hefezellkultur geerntet und wie in Kapitel 3.7.5.1 beschrieben aufgearbeitet. Die Probe wurde 30 min lang bei 100 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Die Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.7.5 bis 3.7.7 beschrieben.

3.2.2.2 Herstellung von Proteinrohextrakten aus *S. cerevisiae*

In einer ü/N Vorkultur wurden Hefezellen in 5 ml Medium wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben kultiviert. Anschließend wurde aus der Vorkultur eine 50-ml-Hauptkultur auf eine OD₆₀₀ von

0,1 inokuliert und bis zu einer OD_{600} von 0,6 bis 0,8 inkubiert. Die Zellen wurden bei 3 500 UpM (Heraeus Megafuge 1.0R) für 5 min pelletiert und das Pellet einmal mit 40 ml TBS-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Für die Zelllyse wurden die Zellen in 700 μ l eiskalten Hefe-Zelllyse-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden 2/3 des Volumens an Glasperlen (0,4-0,6 mm) zugegeben und die Zellen für zweimal 20 s bei 5 500 UpM aufgeschlossen (Homogenisator Precellys® 24). Der Überstand wurde auf Eis in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und zur Sedimentation der Zelltrümmer bei 15 000 UpM (Heraeus Biofuge primo R) und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der nun klare Überstand wurde erneut in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

3.2.3 Serielle Verdünnungstropftests von *S. cerevisiae*

Eine Kolonie transformierter *S. cerevisiae* Zellen wurden in einer 2-ml-Vorkultur inokuliert und ü/N wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben inkubiert. Anschließend wurde eine 2-ml-Hauptkultur von der Vorkultur inokuliert, sodass eine OD_{600} von 0,2 erreicht wurde. Die Kulturen wurden bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,8 inkubiert und die präzise Zellzahl pro Milliliter mikroskopisch unter Verwendung einer Thoma-Zählkammer ermittelt. Anschließend wurden jeweils 10 000, 1 000, 100 und 10 Zellen auf festes SD-Medium getropft, Kapitel 3.2.1 folgend für 2 bis 3 Tage inkubiert und auf ihr Wachstum hin untersucht.

3.2.4 Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse

Die Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse dient der Identifizierung einer direkten Interaktion zwischen zwei Proteinen *in vivo*. Grundlage des Systems ist der Transkriptionsfaktor Gal4p der Hefe *S. cerevisiae*. Dieser besteht aus zwei funktionellen Domänen: der DNS-Bindedomäne (BD), die an die *GAL* UAS (*GAL* Upstream-activation-sequence) bindet, und einer Aktivator-domäne (AD), die mit der basalen Transkriptionsmaschinerie interagiert und so die Transkription aktiviert. Bei einer bestehenden Interaktion zwischen zwei Proteinen kommen die DNS-Bindedomäne und die Aktivator-domäne in räumliche Nähe und bestimmte Reportergene werden nun transkribiert. Als Reportergene wurden *ADE2*, *HIS3* und *MEL1* genutzt (Hefestamm: AH109). *S. cerevisiae* Zellen, in denen die Reportergene exprimiert werden, können entsprechend auf Medium ohne die Aminosäuren Adenin sowie Histidin wachsen. Die Expression der von *MEL1* codierten alpha-Galactosidase führt zu einer Blaufärbung der Hefezellen, wenn dem Selektionsmedium das Substrat X-alpha-Gal zugegeben wurde.

Die codierende Sequenz des zu testenden Proteins wurde in ein Plasmid inseriert, welches die *GAL4*-DNS-Bindedomäne codiert. Das Gen eines auf Interaktion zu testenden Proteins wurde in ein anderes Plasmid, welches die *GAL4*-Aktivator-domäne enthält, inseriert. Die beiden Expressionsvektoren wurden anschließend Kapitel 3.5.3 folgend in *S. cerevisiae* transformiert. Positive Transformanten wurden, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, in seriellen Verdünnungstropftests auf entsprechenden Selektionsmedien auf Interaktion der Proteine geprüft. Als Positivkontrolle wurde das humane p53-Protein fusioniert an die *GAL4*-BD und das große T-Antigen des SV40 Virus fusioniert an die *GAL4*-AD, die eine sehr starke Interaktion zeigen, genutzt. Die Negativkontrolle bildet Lamin C fusioniert an die *GAL4*-BD zusammen mit dem großen T-Antigen des SV40 Virus fusioniert an *GAL4*-AD, die keine Interaktion zeigen.

3.3 Kultivierung von adhärenz zellen

3.3.1 Passagieren von adhärenz zellen durch Trypsinbehandlung

Humane Zellen wurden in einer 80-cm²-Zellkulturflasche zur Konfluenz wachsen gelassen. Nach Entfernen des Kulturmediums wurde die Zellen mit 5 ml HBSS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml 0,5-fach Trypsin/ EDTA-Lösung bei Raumtemperatur (RT) bis zum Ablösen inkubiert. Durch leichtes Schwenken der Flasche wurden alle Zellen in Suspension gebracht und mit 5 ml Zellkulturmedium gemischt. Die Suspension wurde anschließend in ein 12-ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und 10 min lang bei 500 UpM (Rotanta 460R) bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 5 ml DMEM Zellkulturmedium vorsichtig aufgenommen.

Zur Passage in 80-cm²-Zellkulturflaschen wurden 0,5 bis 1 ml Zellsuspension in 15 ml Zellkulturmedium mit 5 µg/ml Plasmocin zur Prävention von Mykoplasmen-Verunreinigung gegeben.

Zur Passage in 24-Well-Platten wurde ein steriles Deckgläschen (ø 12 mm) in jedes Well gelegt. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:20 bis 1:50 verdünnt. Von dieser Suspension wurden je 1 ml in jede Vertiefung gegeben. Die Zellen wurden nun 1 bis 4 Tage bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert.

3.3.2 Einfrieren von Humanzellen

Die Humanzellen wurden wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben geerntet. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet jedoch vorsichtig in 1 ml Einfriermedium (Biofreeze) aufgenommen und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.3.3 Auftauen von Humanzellen

Die Humanzellen wurden zügig bei RT aufgetaut. Die Zellen wurden kurz gemischt und in 10 ml Zellkulturmedium gegeben, um das Biofreeze auszuwaschen. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 12-ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und 10 min lang bei 500 UpM (Rotanta 460R) bei RT zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben in einer 80-cm²-Flasche passagiert.

3.4 Chlamydienkultur

Chlamydien sind obligat intrazelluläre Bakterien und benötigen für die Replikation eine Wirtszelle. Die Kultivierung von *Chlamydia pneumoniae* wurde daher mittels Infektion von Humanzellen in der Zellkultur durchgeführt.

3.4.1 Infektion von Humanzellen mit *C. pneumoniae*

HEp-2-Zellen wurden wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben in 24-Well-Platten ausgesät und 24 h inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde vorsichtig abgenommen und anschließend wurde je 1 ml mit gereinigten Chlamydien (siehe Kapitel 3.4.2 oder 3.4.3) versetztes Zellkulturmedium in jede Vertiefung gegeben. Die 24-Well-Platte wurde nun für 60 min bei 3 000 UpM (Rotanta 460R) und 30 °C zentrifugiert, um die Infektion durch Begünstigung der Adhäsion zu unterstützen. Nun wurden die Zellen für die Internalisierung der Chlamydien in die Humanzellen für 60 min bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert. Das Medium wurde anschließend abgenommen und die infizierten Zellen vorsichtig mit 1 ml Zellkulturmedium mit 1,5 µg/ml Cycloheximid überschichtet. Die Zellen wurden erneut bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert.

Die infizierten Zellen wurden zu gewünschten Zeitpunkten für 10 min mit -20 °C kaltem Methanol oder 37 °C warmem, 3 %igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

3.4.2 Passage von Chlamydien in 25-cm²-Zellkulturflaschen

HEp-2-Zellen wurden in 25-cm²-Zellkulturflaschen ausgesät und 24 h zur Konfluenz wachsen gelassen. Das Zellkulturmedium wurde anschließend vorsichtig von den Humanzellen abgenommen. Zur Infektion wurde 1 ml Chlamydien suspension aufgetaut und mit 30 ml Zellkulturmedium verdünnt. Die Suspension wurde gut gemischt und je 5 ml in die Zellkulturflaschen gegeben. Die Zellkulturflaschen wurden dann für 60 min bei 3 000 UpM (Rotanta 460R) und 30 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend für 60 min bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die infizierten Zellen vorsichtig mit 1 ml Zellkulturmedium mit 1,5 µg/ml Cycloheximid überschichtet. Die Zellen wurden nun bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert. Nach 72 bis 96 h wurde die Infektion

mikroskopisch (Binokular Axiovert 25C) geprüft, wobei viele Inklusionen und das Ablösen von Zellen auf eine starke Infektion hindeuten. Mit Hilfe eines sterilen Zellschabers wurden nun die Zellen abgelöst und die Suspension von bis zu 6 Flaschen in einem 50-ml-Zentrifugationsröhrchen vereint. Die Suspension wurde 60 s sonifiziert (Sonopuls HD2200, Bandelin), um die Humanzellen aufzubrechen und danach 10 min lang bei 3 000 UpM (Rotanta 460R) zentrifugiert (Differentialzentrifugation). Der Überstand wurde in ein 50-ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der geklärte Überstand wurde dann zur Infektion von anderen Humanzellen genutzt, wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben weiter verarbeitet oder wie in Kapitel 3.4.4 beschrieben gelagert.

3.4.2.1 Herstellung von Proteinproben infizierter Humanzellen

HEp-2-Zellen wurden in 25-cm²-Zellkulturflaschen wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben mit einer MOI (engl. Multiplicity of infection) von 10 infiziert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden infizierte Zellen von zwei Flaschen mit einem Zellkulturschaber in 10 ml Hanks Salzlösung (HBSS) gelöst. Die Zellsuspension wurde 20 min lang in einem 12-ml-Zentrifugationsröhrchen bei 2 700 UpM (Rotanta 460R) und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 300 µl Phospho-Lysis-Puffer, 2 % SDS und 2 % Sarkosyl gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 1:4 mit Proteinblaumarker und 1:10 mit 1 M DTT versetzt und für 30 min bei 100 °C erwärmt. Die Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.7.5 und 3.7.7 beschrieben.

3.4.3 Reinigung von Chlamydien mittels Gastrografin-Gradient

Die in Kapitel 3.4.2 erhaltene Suspension von differentialzentrifugierte Chlamydien aus bis zu 32 kleinen (25 cm²) Zellkulturflaschen wurde in sterile Ultrazentrifugationsröhrchen (Beckman) überführt und 30 min lang bei 30 000 x g (Beckman J2-21, Rotoren JA-20) und 4 °C zentrifugiert. Die Chlamydienpellets wurden mit 1 ml HBSS in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Suspension wurde dann bei 15 000 Upm (Heraeus Biofuge Primo R) und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml HBSS suspendiert und abermals zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 1 ml HBSS klümpchenfrei mit Hilfe des Ultraschallbades und Vortex-Genie 2 gelöst. In ein steriles Ultrazentrifugationsröhrchen wurden 9 ml 30 %iges Gastrografin gegeben. Das Gastrografin wurde vorsichtig mit der Chlamydien suspension überschichtet. Nun wurde 1 h bei 30 000 x g (Beckman J2-21, Rotoren JA-20) und 4 °C zentrifugiert und anschließend der Überstand mit getrüübter Humanzelltrümmer-Schicht verworfen. Das Pellet wurde nun zweimal mit HBSS in

einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß gewaschen und 20 min lang bei 15 000 Upm (Heraeus Biofuge Primo R) und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde anschließend in 500 µl HBSS aufgenommen.

3.4.4 Einfrieren von Chlamydien

Die Chlamydien suspension aus Kapitel 3.4.2 wurde 1:1 mit SPG-Puffer versetzt und anschließend in 1 ml Portionen in Kryo-Röhrchen bei -80 °C aufbewahrt.

Pelletierte Chlamydien aus Gradientenreinigungen (Kapitel 3.4.3) wurden in 500 µl SPG-Puffer mit Hilfe des Ultraschallbades und Vortex-Genies 2 gelöst. Die Suspension wurde aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Die eingefrorenen Chlamydien wurden bei Bedarf bei RT aufgetaut.

3.4.5 Bestimmung der Infektiosität von Chlamydien suspensionen

Die Infektiosität wird durch Titration die inklusionsbildenden Einheiten (IFU) pro ml Chlamydien suspension bestimmt.

In einer 96-Well-Platte wurden Humanzellen ausgesät und 24 h zur Konfluenz wachsen gelassen. Eine zu testende Chlamydien suspension wurde bis zur Verdünnung 10^{-10} schrittweise mit Zellkulturmedium verdünnt. Nun wurden die Humanzellen mit je 100 µl der verdünnten Chlamydien suspension überschichtet. Die Platte wurde anschließend für 1 h bei 3 000 UpM (Rotanta 460R) zentrifugiert und danach für 1 h bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert. Das Medium wurde dann abgenommen und die infizierten Zellen vorsichtig mit 1 ml Zellkulturmedium und 1,5 µg/ml Cycloheximid überschichtet. Die Zellen wurden nun weiter bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert.

Nach 48 h wurden die Zellen 10 min lang bei RT mit Methanol fixiert und mit einem Antikörper gegen das chlamydiale LPS (Pathfinder) 30 min lang bei RT gefärbt. Die Inklusionen pro Vertiefung wurden mittels Immunfluoreszenzmikroskopie bei 20-facher Vergrößerung (Axioskop 50) gezählt und die Zahl der Inklusionsbildenden Partikel pro ml Chlamydien suspension berechnet.

3.4.6 Infektion von Humanzellen ohne Zentrifugation

In bestimmten Experimenten, wie zum Beispiel Antikörper- oder Protein-Neutralisationsversuchen, wurde der Effekt auf die Adhäsion in der frühen Phase der Infektion betrachtet. Hierzu wurden auf die Zentrifugation verzichtet, um Veränderungen in der Adhäsionsfähigkeit der Chlamydien betrachten zu können.

Humanzellen wurden wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben in 24-Well-Platten ausgesät und 24 h lang bei 37 °C und 6 % CO₂ zur Konfluenz inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde

anschließend abgenommen und die Zellen einmal mit HBSS gewaschen. Wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben gereinigte Chlamydien wurden mit 24 ml Zellkulturmedium auf die gewünschte IFU verdünnt und je 1 ml pro Well auf die Humanzellen gegeben. Die Platte wurden 2 h lang bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen und mit Zellkulturmedium mit Cycloheximid (Zielkonzentration 1,5 µg/ml) überschichtet. Die infizierten Zellen wurden 48 h lang bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert und danach mit -20 °C kaltem Methanol fixiert.

3.4.7 Kurze Infektion zur Betrachtung der frühen Infektionszeitpunkte

Zur Betrachtung früher Ereignisse in der Infektion, welche bei der Internalisierung oder direkt danach im frühen Einschluss stattfinden, ist es notwendig, die Infektion bestmöglich zu synchronisieren. Hierzu wurden Zellen wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben in 24-Well-Platten ausgesät und 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium von den Zellen abgenommen und durch 4 °C kaltes Zellkulturmedium ersetzt. Die Platte wurde nun für 10 min bei 4 °C inkubiert. Nach Kapitel 3.4.3 gereinigte Chlamydien wurden in 12 ml 4 °C kaltem Zellkulturmedium auf die gewünschte IFU verdünnt. Je 500 µl der Suspension pro Vertiefung wurden auf die Zellen gegeben. Die Platte wurde anschließend für 10 min bei 3000 UpM (Rotanta 460R) und 4 °C zentrifugiert. Das Arbeiten bei 4 °C erlaubt die Adhäsion der Chlamydien an die Humanzellen, verhindert aber die Internalisierung (Carabeo *et al.* 2002). Danach wurde die Chlamydien suspension abgenommen und durch 1 ml auf 37 °C vorgewärmtes Zellkulturmedium je Well ersetzt. Der Zeitpunkt des Medienwechsels wird als t=0 min (bzw. 0 hpi) der Infektion bezeichnet. Sollten die Zellen noch längere Zeit inkubiert werden, geschah das bei 37 °C und 6 % CO₂. Anschließend wurden die Zellen mit 37 °C warmem, 3 %igem PFA für 10 min fixiert und wie in Kapitel 3.8 beschrieben zur Mikroskopie vorbereitet.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 DNS-Präparation aus *C. pneumoniae*

Um chlamydiale Gene direkt von chlamydialer DNS zu amplifizieren, ist eine Isolierung der Nukleinsäuren aus den Bakterien notwendig. Hierzu wurden 50 bis 100 µl der Suspension von nach Kapitel 3.4.3 gereinigte Chlamydien bei 15000 UpM und 4 °C für 20 min (Heraeus Biofuge Primo R) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zweimal mit 500 µl HBSS gewaschen und zentrifugiert. Das Chlamydienpellet wurde anschließend in 20 µl HBSS aufgenommen und mit 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) versetzt. Es folgte eine

Inkubation des Ansatzes für 1 h bei 55 °C im Heizblock (AccuBlock™). Anschließend wurde die Proteinase K für 10 min bei 100 °C im Heizblock hitzeinaktiviert. Es wurden nun 210 µl HBSS und 250 µl Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1) in die Suspension gegeben und diese gut gemischt (Vortex-Genie 2). Die Probe wurde dann 10 min lang bei 4 °C und 15 000 UpM (Heraeus Biofuge Primo R) zentrifugiert, bis zwei Phasen deutlich voneinander unterscheidbar waren. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen, ohne die trübe Grenzschicht mit zu pipettieren. Die resultierenden 200 µl wurden in ein frisches 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 20 µl 3 M Natriumacetat (pH 5) und 200 µl Isopropanol versetzt und 30 min lang bei -80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde die präzipitierte DNS bei 4 °C und 15 000 UpM für 30 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde anschließend im Vakuum-Konzentrator getrocknet und in 10 µl ddH₂O suspendiert. Für eine PCR wurden 1 bis 2 µl der gereinigten DNS genutzt.

3.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion werden gezielt spezifische DNS-Fragmente amplifiziert. In dieser Arbeit wurden hierzu synthetisierte Oligonukleotide (Primer) verwendet, die einen 20 Nukleotide langen Bereich, der komplementär zu den Randbereichen der zu amplifizierenden Sequenz war, besitzen. Oligonukleotide, die für die homologe Rekombination nach Kapitel 3.5.3 genutzt wurden, wiesen zusätzlich eine 40 Nukleotide lange Homologie zum Zielvektor auf. Die eingesetzte thermostabile DNS-Polymerase dupliziert den Bereich zwischen den Primern komplementär zum Matrizenstrang. Die exponentielle Vermehrung des DNS-Fragmentes wird schließlich durch die Wiederholung eines drei Phasen umfassenden Zyklus erreicht. Dieser setzt sich zusammen aus der Denaturierung des DNS-Doppelstranges, der Anlagerung der Primer an die Zielsequenz (Annealing) und der DNS-Synthese (Elongation).

3.5.2.1 PCR zur Amplifikation von DNS-Fragmenten für die homologe Rekombination

Als Matrize für die PCR dienten Plasmide, die das gewünschte DNS-Fragment trugen, oder nach Kapitel 3.5.1 hergestellte genomische DNS aus Chlamydien. Die Temperatur zur Anlagerung (Annealing) wurde für jedes Oligonukleotidpaar nach der folgenden Formel berechnet: $(3 \times A + 2 \times B) - 2 = \text{Anlagerungstemperatur in } ^\circ\text{C}$. Wobei A für die Gesamtzahl der Cytosin- und Guanin-Nukleobasen und B für die der Adenin- und Thymin-Nukleobasen in der komplementären Sequenz des Primers zum zu amplifizierenden DNS-Abschnitt steht.

Die optimale Temperatur für die Elongationsphase wird vom Temperaturoptimum der verwendeten thermostabilen Polymerase bestimmt. Um für Klonierungen möglichst fehlerfreie Sequenzen zu amplifizieren, wurde die *Pfx*-Polymerase mit Korrekturlesefunktion („proof-reading“) verwendet, wenn DNS-Fragmente länger als 1000 Nukleotide (Nt) waren. Das Temperaturoptimum der *Pfx*-Polymerase liegt bei 68 °C. Für alle PCR-Reaktionen, die keine Korrekturlesefunktion benötigen, wurde die *Taq*-Polymerase bei einer Elongationstemperatur von 72 °C verwendet. Die Dauer des Elongationsschritts ist abhängig von der Größe des zu amplifizierenden Fragments und wird mit 1 min pro 1000 Nt angesetzt.

Tabelle 3.5.1: Zusammensetzung verschiedener PCR-Ansätze

Pfx-Polymerase PCR	Taq-Polymerase PCR
x µl Matrizen DNS (≈100 ng)	x µl Matrizen DNS(≈100 ng)
0,75 µl Primer 1 (50 pmol/ µl)	1 µl Primer 1 (50 pmol/ µl)
0,75 µl Primer 2 (50 pmol/ µl)	1 µl Primer 2 (50 pmol/ µl)
3,75 µl dNTPs (4 mM)	2,5 µl dNTPs (4 mM)
1 µl MgSO ₄ (50 mM)	3 µl MgCl ₂ (25 mM)
5 µl <i>Pfx</i> -Puffer (10-fach)	5 µl <i>Taq</i> -Puffer (10-fach)
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

Tabelle 3.5.2: Bedingungen für die PCR mit der *Pfx*- oder *Taq*-Polymerase

Schritt	Temperatur		Dauer	Zyklen
	<i>Pfx</i>	<i>Taq</i>		
initiale Denaturierung	95 °C		5 min	
Denaturierung	95 °C		1 min	x 35
Annealing	46-60 °C		1 min	
Elongation	68 °C	72 °C	1-3 min	
finale Elongation	68 °C	72 °C	7 min	
Abkühlen	16 °C		∞	

3.5.2.2 PCR auf Hefezellen zur Identifizierung positiver Transformanden

Es wurde ein *Taq*-PCR-Protokoll genutzt, bei dem die PCR direkt auf Hefezellen durchgeführt wird. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurden hierzu Zellen einer frischen Einzelkolonie im PCR-Ansatz suspendiert und anschließend die Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt.

Tabelle 3.5.3: Ansatz und Bedingungen einer PCR auf Hefezellen

PCR Ansatz		Schritt	Temperatur	Dauer
0,3 µl	Primer 1 (50 pmol)	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
0,3 µl	Primer 2 (50 pmol)	Denaturierung	95 °C	1 min
0,24 µl	dNTPs (25 mM)	Annealing	46-56 °C	1 min
3 µl	Puffer (10-fach)	Elongation	72 °C	1-3 min
0,3 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (1 U/µl)	Finale Elongation	72 °C	7 min
1,8 µl	MgCl ₂ (25 mM)	Abkühlen	16 °C	∞
24,06 µl	ddH ₂ O			

3.5.3 Transformation und homologe Rekombination in *S. cerevisiae*

Die Transformation von Plasmid-DNS in Hefe wurden nach einem Protokoll von Gietz und Woods durchgeführt (Gietz *et al.* 1995).

Eine 5-ml-*S. cerevisiae*-Vorkultur wurde ü/N unter Rotieren bei 140 UpM und 30 °C in YPD-Medium inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur in 50 ml YPD Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,2 inokuliert und wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 inkubiert. Die Zellen wurden nun bei 3500 UpM (Heraeus Megafuge 1.0 R) für 5 min pelletiert, dann mit 25 ml ddH₂O gewaschen und anschließend in 1 ml 0,1 M Lithiumacetat (LiAc) aufgenommen. Die Suspension wurde in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt, erneut pelletiert und das Pellet mit 0,1 M LiAc auf eine Zellkonzentration von ca. 1×10^9 Zellen/ml verdünnt.

Je Transformationsansatz wurden 50 µl der Zellsuspension in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 240 µl Polyethylenglycol 3350 (PEG) (50 % w/v), 36 µl 1 M LiAc und 50 µl bei 100 °C denaturierte und auf Eis abgekühlte Lachssperma-DNS gemischt. Zu dieser Suspension wurden 34 µl in ddH₂O verdünnte Plasmid-DNS (0,1-0,4 µg) zugefügt. Die Suspension wurde mittels Vortex-Genie 2 gut durchmischt, anschließend für 30 min bei 30 °C und dann für weitere 30 min bei 42 °C im Heizblock inkubiert. Nun wurden die Zellen bei 13 000 UpM für 5 s (Heraeus Biofuge pico) pelettiert. Das Pellet wurde in 200 µl ddH₂O gelöst und auf Selektionsplatten ausgestrichen und 2 bis 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

Für eine homologe *in-vivo*-Rekombination wurde Plasmid-DNS mittels entsprechender Restriktionsenzyme geöffnet und DNS-Fragmente aus einer PCR im Verhältnis 1:3 (Plasmid : DNS-Fragment) zugegeben.

3.5.4 Präparation von Plasmid-DNS aus *S. cerevisiae*

Die DNS-Präparation erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der alkalischen Lyse (Bimboim & Doly 1979).

Transformierte *S. cerevisiae* wurden in 2 ml Selektionsmedium wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben ü/N inkubiert und anschließend bei 13 000 UpM (Heraeus Biofuge pico) für 5 s pelletiert. Das Pellet wurde einmal in 2 ml ddH₂O gewaschen und pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 0,5 ml Puffer P1 aufgenommen. Nach der Zugabe von 0,5 ml Puffer P2 und 2/3 des Volumens an Gasperlen (0,4-0,6 mm) erfolgte der Zellaufschluss mittels Homogenisator (Precellys® 24) für zweimal 20 s bei 5 500 UpM. Der Überstand (ca. 1 ml) wurde in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt und 0,3 ml Puffer P3 zugegeben. Der Ansatz wurde gut durchmischt und 15 min lang bei 13 000 UpM (Heraeus Biofuge pico) bei RT

zentrifugiert. Nun wurde 1 ml des geklärten Überstandes in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 750 µl Isopropanol versetzt und durch Invertieren gut durchmischt. Anschließend wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 13 000 UpM (Heraeus Biofuge pico) die DNS gefällt. Das Pellet wurde einmal mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen, erneut 10 min lang zentrifugiert und anschließend im Vakuum Konzentratoren getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl ddH₂O gelöst.

Für eine Elektroporation in *E. coli* wurden 2 bis 4 µl der isolierten Plasmid-DNS verwendet (Kapitel 3.5.5.2).

3.5.5 Transformation von Plasmiden in *E. coli*

3.5.5.1 Ein-Minuten-Transformation

Um Plasmid-DNS mit Ampicillin-Resistenzmarker in *E. coli* zu transformieren, wurde eine schnelle Ein-Minuten-Transformation durchgeführt. Diese Methode ist wegen der geringen Effizienz nur für die Transformation von Plasmid-DNS mit einer Konzentration von 100 ng/µl oder höher geeignet.

Es wurden 3 µl DMSO-kompetente Zellen (XL₁-blue oder BL21, hergestellt von der Arbeitsgruppe der Funktionellen Genomforschung wie von Sambrook und Maniatis beschrieben, auf Eis aufgetaut (Sambrook *et al.* 1989). Die Zellen wurden auf Eis mit 1 µl DNS gemischt und dann für 1 min auf 42 °C erhitzt. Die Probe wurde sofort in 100 µl LB-Medium aufgenommen und gleichmäßig auf festes Selektionsmedium ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.5.5.2 Plasmidtransformation durch Elektroporation

Um Suspensionen von Plasmid-DNS geringer Konzentration oder Plasmide mit Kanamycin-Resistenzmarker in *E. coli* zu transformieren, wurde eine Transformation durch Elektroporation nach einem abgewandelten, hoch effizienten Protokoll durchgeführt (Sambrook *et al.* 1989).

Für die Elektroporation wurden 10 µl elektrokompente Zellen (Kapitel 3.1.2) mit möglichst salzreicher DNS (0,01 ng-1 µg) in 40 µl ddH₂O suspendiert und in eine sterile, vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation wurde mit folgenden Geräteparametern durchgeführt: 2,1 kV, 200 Ω, 25 µF (Bio-Rad Gene Pulser und Bio-Rad Pulse Controller). Nach der Elektroporation wurde sofort 1 ml LB-Medium zugeben, der gesamte Ansatz in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und 30 min bis 1 h lang bei 37 °C unter Rotieren bei 140 UpM inkubiert.

Die Zellen wurden dann 5 s bei 13 000 UpM (Heraeus Biofuge pico) pelletiert und der Überstand grob abgenommen. In der verbleibenden Flüssigkeit wurde das Pellet suspendiert und auf festes Selektionsmedium ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.5.6 Plasmid-DNS-Präparation aus *E. coli*

3.5.6.1 Midi-Maßstab

Es wurde eine 50-ml-Kultur von *E. coli* wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben ü/N inkubiert und anschließend bei 4 600 UpM pelletiert. Das Pellet wurde zur DNS-Isolation weiter behandelt. Zur Isolation von Plasmid-DNS in großer Menge wurde das Qiagen Plasmid Midi-Kit nach Herstellerangaben verwendet.

3.5.6.2 Mini-Maßstab

Das Verfahren beruht auf einer modifizierten Methode der alkalischen Lyse (Sambrook *et al.* 1989).

Eine 2-ml-*E. coli*-Kultur wurde wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben ü/N inkubiert. Die Kultur wurde in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt, für 5 s bei 13 000 UpM (Heraeus Biofuge pico) pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 300 µl Puffer P1 aufgenommen. Anschließend wurden 300 µl Puffer P2 zugegeben und der Ansatz durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Das Lysat wurde für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 300 µl Puffer P3 hinzugegeben und durch kurzes, kräftiges Schütteln gemischt. Das Lysat wurde 5 min lang bei RT und 13 000 UpM (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert. Die Plasmid-DNS befindet sich in Lösung und die genomische DNS, Zellreste sowie denaturierte Proteine im Pellet. Der Überstand wurde in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und das Zellbruchpellet verworfen. Die Plasmid-DNS wurde durch Zugabe des 0,5-fachen Überstandsvolumens Isopropanol und Zentrifugation für 30 min bei 13 000 UpM (Heraeus Biofuge pico) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNS-Pellet mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen und 10 min lang zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend im Vakuum-Konzentrator getrocknet.

Die Plasmid-DNS wurde in 50-100 µl ddH₂O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

3.5.7 Hydrolytische Spaltung von DNS durch Restriktionsendonukleasen

Um Plasmid-DNS zu spalten oder um den korrekten Einbau von DNS-Fragmenten nach einer homologen Rekombination zu überprüfen, wurden Restriktionsendonukleasen verwendet. Jede Restriktionsendonuklease wird mit einem spezifischen Puffer verwendet, der vom

Hersteller mitgeliefert wird. Der Reaktionsansatz für die hydrolytische Spaltung setzt sich wie folgt zusammen:

1 μ l Restriktionsenzym (10 U/ μ l)	
2 μ l Puffer (10-fach)	
x μ l DNS (0,1 bis 1 μ g/ μ l)	
(17-x) μ l DNS in ddH ₂ O	
Σ 20 μ l	

Die DNS-Hydrolyse wurde unter den von der jeweiligen Restriktionsendonuklease benötigten Bedingungen für mindestens 2 h durchgeführt.

Die entstandenen Fragmente wurden wie in Kapitel 3.5.8 beschrieben über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert. Gegebenenfalls konnten die DNS-Fragmente aus dem Gel extrahiert werden (siehe Kapitel 3.5.9).

3.5.8 Auftrennung von DNS mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur präparativen oder analytischen Auftrennung von DNS-Molekülen wurden 0,2 bis 0,7 %ige Agarosegele verwendet. Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose in 100 ml TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht. Die Agaroselösung wurde mit 5 μ l Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) gemischt und in eine Gelkammer mit Kamm für die Ladetaschen gegeben. Nach Erstarren wurde das Agarosegel in Elektrophoresekammern gelegt, mit TBS-Puffer überschichtet und mit DNS-Proben beladen. Die DNS-Proben wurden hierzu mit 4-fach DNS-Blaumarker gemischt.

Die Porengröße der Gele und damit deren Trenneigenschaften hängen dabei direkt von der Agarosekonzentration ab. Das Anlegen eines elektrischen Feldes mit einer Spannung von 60-140 V in der Elektrophoresekammer bedingt die Wanderung der negativ geladenen DNS-Fragmente Richtung Anode. Aufgrund der Porengröße des Agarosegels werden DNS-Fragmente größenabhängig aufgetrennt. Kleinere Fragmente wandern dabei schneller durch das Gel als größere Fragmente. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid (1 μ g/ml), einem in die DNS interkalierender Farbstoff, wurde die DNS unter UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht. Zur Größenbestimmung der einzelnen DNS-Fragmente wurden 5 μ l eines DNS-Längenmarkers (GeneRuler™ DNA-Ladder Mix) aufgetragen.

3.5.9 Reinigung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers. Die gereinigten DNS-Fragmente konnten anschließend für die homologe Rekombinationen (siehe Kapitel 3.5.3) eingesetzt werden.

3.5.10 Reinigung von PCR-Proben

Um Amplifikate nach der PCR von Rückständen des PCR-Reaktionsansatzes zu reinigen, wurde das QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen genutzt.

3.5.11 Deletion von DNS-Fragmenten aus Plasmiden

Zur Deletion eines spezifischen DNS-Fragmentes aus einem Plasmid wurde geeignete Restriktionsendonukleasen verwendet, die den entsprechenden Bereich ausschneiden. Diese Reaktion wurde gemäß Kapitel 3.5.7 durchgeführt. Anschließend wurden überhängende Enden abgespalten oder aufgefüllt. Dazu wurde die T4 DNS-Polymerase genutzt, die eine DNS-Synthese in 5'→3'-Richtung katalysiert und eine Exonukleaseaktivität in 3'→5'-Richtung aufweist. Die Polymerase wurde den Herstellerangaben folgend eingesetzt. Das linearisierte Plasmid wurde mittels QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen gereinigt. Anschließend wurde das Plasmid unter Verwendung der T4 DNS-Ligase, den Herstellerangaben folgend, geschlossen. Dabei verknüpft die Ligase den DNS-Doppelstrangbruch des geöffneten Plasmids durch Katalyse der Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen dem 5'-Phosphat und der 3'-Hydroxylgruppe der Desoxyribose. Das Plasmid wurde nun mittels QIAquick PCR Purification Kit gereinigt und Kapitel 3.5.5.2 folgend in elektrokompente *E. coli*-Zellen eingebracht, um es durch Vermehrung der Zellen zu amplifizieren.

3.5.12 Photometrische Bestimmung der DNS-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung von DNS-Proben wurde mit einem NanoDrop (PeqLab) durchgeführt. Zur Messung wurde 1 µl der DNS-Probe eingesetzt. Der Abgleich wurde mit 1 µl des ddH₂O, welches zur Suspension der DNS eingesetzt wurde, durchgeführt.

Aus der Absorption bei 260 nm berechnet das Gerät die Konzentration der DNS-Lösung. Die Reinheit der DNS-Lösung kann durch Ermittlung des Quotienten zwischen der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt werden. Dieser Quotient sollte bei reiner DNS zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.5.13 DNS-Sequenzierung

Die generierten Plasmide wurden zur Sequenzierung an die Firma GATC-Biotech gesendet.

3.6 Zellbiologische Methoden

3.6.1 Transfektion von Humanzellen mittels TurboFect™

Zur Transfektion von Humanzellen wurden Expressionsvektoren in die Zellen eingebracht. Unter der Kontrolle des Zytomegalievirus-Promotors (pCMV) wurden dann Proteine von Interesse ektopisch in Humanzellen exprimiert. Um Plasmid-DNS in Humanzellen einzubringen wurde die DNS in 100 µl Zellkulturmedium ohne fötales Kälberserum (FKS) mit 2 µl Transfektionsreagenz für 15 min inkubiert. Dabei komplexiert die DNS mit einem kationischen Polymer aus dem Transfektionsreagenz. Der entstehende positive Komplex wird in die Zelle aufgenommen. Für eine Transfektion wurden Humanzellen in 24-Well-Platten bis zur halben Konfluenz wachsen gelassen. Unmittelbar vor der Transfektion wurden die Zellen mit 500 µl frischem Zellkulturmedium überschichtet. Die Plasmid-DNS wurde, dem Herstellerprotokoll folgend, mit dem Transfektionsreagenz gemischt und anschließend zu den Zellen gegeben. Nun wurden die so behandelten Zellen für 12 bis 31 h bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert.

3.7 Biochemische Methoden

3.7.1 Affinitätschromatographische Reinigung von Proteinen

Mittels Affinitätschromatographie wurden rekombinante Fusionsproteine aus einem Proteingemisch, wie Zelllysaten, isoliert. Die Fusionsproteine verfügen hierzu beispielsweise über eine 6-fach Histidin- (His₆-) oder Glutathion-S-Transferase (GST)-Markierung und werden aufgrund ihrer Affinität zu Nickel-NTA (Ni-NTA) bzw. zu Glutathion an entsprechend gekoppelte Agarosen gebunden. Nicht markierte Proteine werden durch waschen von Proteinen ohne Markierung entfernt. Anschließend werden die gebundenen Proteine vom Trägermaterial durch die Zugabe eines spezifischen Kompetitors (hier Imidazol bzw. reduziertes Glutathion) eluiert.

3.7.1.1 Manuelle Proteinreinigung unter denaturierenden Bedingungen

Proteine, welche mit einer His₆-Markierung fusioniert sind, wurden in dieser Arbeit unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Das Zellpellet einer 1-l-Induktionskultur (siehe Kapitel 3.1.3) wurde in 30 ml Puffer B aufgenommen. Die Zellen wurden unter Rotieren bei 150 UpM und RT über Nacht lysiert. Das Lysat wurde dann auf Eis dreimal 20 s lang mit einem Ultraschallstab (Sonopuls HD2200) sonifiziert. Anschließend wurde das Lysat 30 min lang bei 15000 UpM und 20 °C (Avanti J-25, Rotor JLA25.50) zentrifugiert. Die Proteine

befanden sich im geklärten Überstand. Das Zellbruchpellet wurde verworfen und der Überstand in ein frisches 50-ml-Reaktionsgefäß überführt.

Das geklärte Zelllysat wurde nun für die Affinitätschromatographische Reinigung verwendet. Dazu wurde es mit 2 ml Ni-NTA-Agarose gemischt und mit Puffer B auf 40 ml aufgefüllt. Anschließend wurde die Suspension mindestens 1 h unter Rotieren bei 140 UpM und RT inkubiert. In eine Protein-Säule wurde ein Polyethylenfilter eingelegt, der die Ni-NTA-Agarose daran hindert durch die Säule zu laufen. Die Protein-Säule wurde nun mit dem Proteingemisch beladen. Die Ni-NTA-Agarose mit dem gebundenen Protein wurde einmal mit 10 ml Puffer B und zweimal mit Puffer C + 20 bis 80 mM Imidazol, gewaschen. Nun wurden fünf Elutionsschritte mit 1 ml Puffer C + 500 mM Imidazol durchgeführt, wobei die Ni-NTA-Agarose zwischen den Elutionen je 5 min lang mit dem Puffer inkubiert wurde. Hierbei wird das gereinigte Protein durch Konkurrenz mit Imidazol von der Ni-NTA-Agarose gelöst. Die verschiedenen Fraktionen wurden einzeln aufgefangen.

Die Fraktionen des gereinigten Proteins wurden sowohl auf einem Coomassie gefärbten SDS-Gel als auch per Bradford-Reagenz analysiert (siehe Kapitel 3.7.4 und 3.7.5.)

3.7.1.2 Manuelle Proteinreinigung unter nativen Bedingungen

Proteine, welche mit einer GST-Markierung fusioniert sind, wurden in dieser Arbeit unter nativen Bedingungen gereinigt. Dazu wurde das Zellpellet einer 1-l-Induktionskultur (siehe Kapitel 3.1.3) in 35 ml Lysepuffer für die native Proteinreinigung aufgenommen. Die Lyse erfolgte anschließend bei 4 °C über Nacht und unter Rotieren bei 140 UpM. Das Lysat wurde dann auf Eis dreimal 20 s lang mit einem Ultraschallstab (Sonopuls HD2200) sonifiziert. Anschließend wurde das Lysat für 30 min bei 15000 UpM und 4 °C (Avanti J-25, Rotor JA-25.50) zentrifugiert. Die Proteine befanden sich im geklärten Überstand. Das Zellbruchpellet wurde verworfen und der Überstand in ein neues 50-ml-Reaktionsgefäß überführt.

Die Glutathion-Agarose wurde in der Vorbereitung mit 200 ml/g ddH₂O für 1 h bei RT aufgequollen und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Zum Überstand der Zelllyse wurden 1,5 ml aufgequollene Glutathion-Agarose gegeben und anschließend wurde das Gemisch für 3 h unter Rotieren bei 140 UpM und 4 °C inkubiert. In eine Protein-Säule wurde ein Polyethylenfilter eingelegt, der die Glutathion-Agarose daran hindert durch die Säule zu laufen. Die Säule wurde nun mit dem Proteingemisch beladen und anschließend dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Elution vom Trägermaterial erfolgte dann fünfmal mit 1 ml PBS + 10 mM reduziertem Glutathion, wobei die Agarose vor dem ersten Elutionsschritt 10 min lang mit dem Puffer inkubiert wurde. Die Fraktionen des gereinigten Proteins wurden

sowohl auf einem Coomassie gefärbten SDS-Gel als auch per Bradford-Reagenz analysiert (siehe Kapitel 3.7.4 und 3.7.5.).

3.7.2 Dialyse von Proteinen

Die Dialyse erlaubt das Entfernen von Ionen und Molekülen bestimmter Größe aus Proteinlösungen durch Verwendung einer semipermeablen Membran.

8 cm lange Dialyseschlauch-Stücke (3,5 kDa oder 12-15 kDa Ausschluss) wurden 10 min lang in ddH₂O auf 100 °C erhitzt. Nach Abkühlen des Dialyseschlauchs wurde die Proteinsuspension mittels einer sterilen Pipette in den durch eine sterile Klemme an einem Ende verschlossenen Schlauch überführt. Anschließend wurde der Dialyseschlauch am anderen Ende mit einer weiteren Klemme luftblasenfrei verschlossen.

Proteinproben aus Proteinreinigungen unter nativen Bedingungen wurden ü/N gegen 2 l PBS und unter leichtem Rühren bei 4 °C dialysiert. Proteinproben aus Reinigungen unter denaturierenden Bedingungen hingegen wurden dreimal 12 h gegen 2 l PBS dialysiert. Dann wurde die Suspension mit einer sterilen Pipette aus dem Dialyseschlauch abgenommen und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt.

3.7.3 Aufkonzentrierung von Proteinen über Größenausschlussröhrchen

Um Proteinsuspensionen aufzukonzentrieren wurden Amicon Größenausschlussröhrchen der Firma Millipore verwendet. Die Zentrifugationsdauer bei 3 000 UpM (Heraeus Megafuge 1.0) und 4 °C war sowohl abhängig vom Füllstand als auch davon, wieviel Rest-Flüssigkeit auf der Membran stehen sollte. Das Protein wurde nach dem Zentrifugieren mit einer Pipettenspitze von der Membran abgenommen und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt.

3.7.4 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford-Reagenz

Die Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford-Reagenz ist eine kolorimetrische Messung und basiert auf der spezifischen Farbreaktion mit Coomassie-Brillant-Blau G-250. Dieser Farbstoff bindet an basische und aromatische Aminosäurereste von Proteinen. Der komplexierte Farbstoff zeigt ein Absorptionsmaximum bei 595 nm und der ungebundene bei 465 nm.

Die Proteinkonzentration einer Proteinprobe wurde durch Vergleich mit einer zuvor erstellten Kalibrationskurve (Rinderserumalbumin (BSA) 0-10 µg, 2 µg-Schritte) ermittelt.

Es wurden 800 – x µl ddH₂O mit x µl Proteinextrakt (je nach Konzentration des Extraktes x = 5 bis 10 µl) und 200 µl Bradford-Reagenz vermischt und für 10 min bei RT inkubiert. Die Messung des Hintergrundes erfolgte mit 800 µl Wasser versetzt mit 200 µl Bradford-

Reagenz. Die Absorption des Gemisches bei 595 nm wurde photometrisch bestimmt (BioPhotometer plus). Für die eingesetzte Konzentration an Protein gilt:

$$\text{Proteinkonzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{Absorption (595 nm)} / 0,06^*$$

(* ermittelt aus der Steigung der mit BSA generierten Kalibrationskurve)

Für die Proteinkonzentration im Extrakt gilt:

$$\text{Extrakt } [\mu\text{g/ml}] =$$

$$\text{Proteinkonzentration } [\mu\text{g/ml}] \times 1000 \text{ } [\mu\text{l}] / \text{eingesetzte Menge Proteinprobe } [\mu\text{l}]$$

3.7.5 Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine nach der Größe aufgetrennt. Dabei erhalten die Proteine durch gebundenes SDS eine negative Ladung, die proportional zu ihrem Molekulargewicht ist, sodass die SDS-Protein-Komplexe in der Gelmatrix nach ihrer molaren Masse aufgetrennt werden.

Für die Analyse von Proteinen wurden in dieser Arbeit 7 cm x 9 cm große Polyacrylamidgele verwendet. Die Glasplatten, Aluminiumplatten und Abstandhalter wurden jeweils sorgfältig mit destilliertem Wasser und 70 %igem Ethanol gereinigt und getrocknet.

3.7.5.1 Proteinproben-Aufarbeitung für die SDS-Gelelektrophorese

Zu untersuchende Proteinproben müssen denaturiert werden, um sie größenabhängig über ein Polyacrylamidgel zu separieren. Die Aufarbeitung von Hefezellen erfolgte wie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben. Die Aufarbeitung von chlamydialen Proteinproben erfolgte wie in Kapitel 3.4.2.1 beschrieben. Bei *E. coli*-Kulturen wurde 1 OD₆₀₀ der Zellsuspension 5 s lang bei 13 000 UpM (Heraeus Biofuge Pico) zentrifugiert und das Zellpellet in 32,5 µl ddH₂O gemischt. Von gereinigten Proteinextrakten wurden 32,5 µl abgenommen. Anschließend wurde zu der Suspension bzw. dem Extrakt 12,5 µl Proteinblaumarker und 5 µl DTT gegeben.

Die Proben wurden 10 min lang auf 100 °C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt oder bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

3.7.5.2 Herstellung des Trenngels

Im ersten Schritt wurden Acrylamid (30:0.8 = Acrylamid : Bisacrylamid), destilliertes Wasser und Trenngelpuffer gut gemischt. Anschließend wurden TEMED und Ammoniumpersulfat (APS: 10 %ige Stammlösung) hinzugegeben und gut gemischt. Die Gelmasse wurde nun zügig und ohne Blasenbildung zwischen die Glas- und die Aluminiumplatte bis 2 cm unter den oberen Rand gegossen. Das Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet. Nach dem

Auspolymerisieren wurde das Isopropanol abgegossen und das Gel vorsichtig mehrfach mit destilliertem Wasser gespült.

Tabelle 3.7.1: Zusammensetzung von Trenngelen verschiedener Prozentigkeit

Prozentigkeit	Acrylamidlösung	Wasser	4-fachTrenngelpuffer	APS	TEMED
10 %	13,3 ml	16,5 ml	10,0 ml	200 µl	50 µl
12 %	16,0 ml	14,0 ml	10,0 ml	200 µl	50 µl
15 %	20,0 ml	10,0 ml	10,0 ml	200 µl	50 µl

Der aufgeführte Ansatz reicht für acht Trenngele im angegebenen Format.

3.7.5.3 Herstellung des Sammelgels

Das Sammelgel dient dazu, die Proteine vor dem Übergang in das Trenngel zu konzentrieren und eine Bandenbildung der Proteine zu erreichen.

Im ersten Schritt wurden Acrylamid (30:0.8), Wasser und Trenngelpuffer gut gemischt. Anschließend wurden TEMED und Ammoniumpersulfat (APS: 10 %ige Stammlösung) hinzugegeben und gut gemischt. Das Sammelgel wurde anschließend luftblasenfrei auf das Trenngel gegossen. Es wurde zuletzt ein Kamm in das Sammelgel gesteckt, sodass Ladetaschen für die Proteinproben im Sammelgel ausgespart wurden. Mit dem hier verwendeten Gelsystem wurden Polyacrylamid-Gele mit je 10 Probenaschen hergestellt.

Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel für die Elektrophorese verwendet.

Tabelle 3.7.2: Zusammensetzung eines Sammelgels

Acrylamidlösung	Wasser	4-fach Sammelgelpuffer	APS	TEMED
1,5 ml	6 ml	2,5 ml	200 µl	20 µl

Der aufgeführte Ansatz reicht für acht Sammelgele im angegebenen Format.

3.7.5.4 SDS-Gelelektrophorese

Das Acrylamidgel wurde in eine vertikale Mini-Gelelektrophoresekammer (Hofer SE 260) eingespannt und beide Kammern wurden mit Laufpuffer soweit gefüllt, dass das Gel Kontakt zum Laufpuffer hatte. Die Proteinproben (max. 25 µl/Ladetasche) wurden aufgetragen und Strom einer Spannung von max. 200 V bei einer Stromstärke von etwa 20 mA für 1-2 h angelegt. Als Größenstandard wurden 5 bis 7,5 µl PageRuler™ aufgetragen. Das Proteingel wurde nach der Laufzeit vorsichtig von den Platten abgelöst und wie in Kapitel 3.7.6 beschrieben weiter behandelt.

3.7.6 Färbung von Proteingelen mittels Coomassie-Brillant-Blau

Das Proteingel wurde in ddH₂O gelegt und zur Fixierung der Proteine im Gel dreimal 30 s bei 600 Watt in einer handelsüblichen Mikrowelle erwärmt, wobei das Gel nach jedem Erwärmen 10 min lang unter leichtem Schwenken gewaschen wurde. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie-Brillant-Blau überschichtet und für 10 s bei 360 Watt erwärmt.

Die Färbung erfolgte nun für 15 min bis 2 h unter leichtem Schwenken. Die Coomassie-Lösung wurde anschließend abgenommen und das Gel mit ddH₂O gewaschen.

3.7.7 Westernblot-Analyse von Proteinproben

Das Verfahren beruht auf dem Transfer von Proteinen aus einem Acrylamidgel auf eine PVDF-Membran mittels „semi-dry blotting“. Auf dieser Membran werden die Proteine immobilisiert und dann spezifisch mittels Antikörperreaktion nachgewiesen.

Hierbei detektiert ein primärer Antikörper das Protein direkt oder einen an das Protein fusionierte Markierung. Ein sekundärer, mit alkalischer Phosphatase konjugierter Antikörper bindet den Primärantikörper und verstärkt so das Signal. Durch eine Farbreaktion wird das detektierte Protein schließlich sichtbar gemacht.

3.7.7.1 Proteintransfer auf eine PVDF-Membran

Es wurden zwei Filterpapiere (Whatman) und eine PVDF-Membran auf die Maße 7 cm x 9 cm zurechtgeschnitten. Die Membran wurde zur Aktivierung 5 s lang in Methanol inkubiert. Filterpapiere und Membran wurden dann für 5 min in Transferpuffer inkubiert.

Im nächsten Schritt wurde der Blot wie folgt luftblasenfrei auf die Anode der Blotapparatur geschichtet: Filterpapier, PVDF-Membran, Polyacrylamid-Gel, Filterpapier. Zum Schluss wurde die Kathode auf den Stapel gelegt und das Netzgerät (Power Supply GE Healthcare) angeschlossen. Bei einer Stromstärke von 200 mA und einer Spannung von 40 V wurde der Transfer der Proteine auf die Membran je nach Molekulargewicht für 20 bis 30 min durchgeführt. Anschließend wurde die PVDF-Membran vorsichtig für 30 min bei RT unter leichtem Schütteln in Blockierungslösung für Westernblots inkubiert.

Der hier beschriebene Proteintransfer konnte auch mit bereits gefärbten SDS-Gelen durchgeführt werden. Vor einer Antikörperdetektion der Proteine nach Kapitel 3.7.7.3 musste die Membran zuvor entfärbt werden (siehe Kapitel 3.7.7.2).

3.7.7.2 Entfärben von PVDF-Membranen

Die mit Coomassie gefärbte PVDF-Membran wurde für 10 min bei RT in 8 %iger Essigsäure (verdünnt in Wasser) geschwenkt, um die Proteine an der Membran zu fixieren. Anschließend

erfolgte die vollständige Entfärbung der Membran mit 96 %igem Methanol unter Schwenken bei RT. Auch die Färbung des Größenstandards geht dabei verloren, weshalb die Banden zuvor mittels Kugelschreiber markiert wurden. Die Membran wurde anschließend gründlich mit PBS gewaschen, um das Methanol rückstandslos zu entfernen. Anschließend wurde die PVDF-Membran vorsichtig für 30 min bei RT und unter leichtem Schütteln in Blockierungslösung für Westernblots inkubiert.

3.7.7.3 Antikörperreaktion auf einer PVDF-Membran

Die Membran wurde mit in Blockierlösung für Westernblots verdünntem primärem Antikörper 30 min lang bei RT oder ü/N bei 4 °C unter Rotieren bei 140 UpM inkubiert. Anschließend wurde die Antikörperlösung abgenommen und die Membran dreimal 10 min lang in PBS unter leichtem Schütteln gewaschen.

Es folgte die Inkubation der Membran mit dem Sekundäantikörper in Blockierlösung für 30 min bei RT unter Rotieren bei 140 UpM. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal für 10 min mit PBS gewaschen.

3.7.7.4 Farbentwicklung mittels alkalischer Phosphatase

Die PVDF-Membran (Kapitel 3.7.7.3) wurde mit 20 ml Farbsubstrat-Lösung [Detektionspuffer + 33 µl BCIP-Lösung (0,5 g BCIP in 10 ml ddH₂O) + 66 µl NBT-Lösung (0,5 g NBT in 10 ml 70 %igem DMF)] inkubiert. Bei dieser Reaktion werden BCIP und NBT von der alkalischen Phosphatase zu einem indigofarbenen Farbstoff umgesetzt, wodurch Proteine von Interesse sichtbar gemacht werden können. Die Membran wurde so lange inkubiert, bis die Färbung deutlich erkennbar war. Die Farbreaktion wurde durch Waschen mit Wasser abgestoppt.

3.7.7.5 Ablösen eines Antikörpers von der PVDF-Membran

Es ist möglich, eine PVDF-Membran nach der Entwicklung einer ersten Antikörperfärbung abermals mit Antikörpern zu behandeln und ein weiteres Protein zu detektieren. Dies ist von besonderer Bedeutung, wenn verschiedene Proteine einer Proteinprobe direkt miteinander verglichen werden sollen.

Hierzu wurde die Membran für 2 bis 3 min bei RT in Strippingpuffer für Westernblots geschwenkt. Anschließend folgte ein Waschschriff mit PBS, der ebenfalls für 2 bis 3 min bei RT und unter Schwenken durchgeführt wurde. Zur Neutralisation des pH-Wertes der Membran wurde diese 2 bis 3 min lang in 1 M NaOH geschwenkt und danach zweimal mit

PBS gewaschen, bevor nun der Blockierschritt mit Blockierlösung für Westernblots durchgeführt wurde. Anschließend wurde wie in Kapitel 3.7.7.3 beschrieben fortgefahren.

3.7.8 Protein-Protein-Interaktionsstudie mittels Far-Westernblot

Zur Untersuchung von unmittelbaren Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* wurden Far-Westernblot-Analysen durchgeführt. Diese wurden nach einem Protokoll von Wu und Kollegen durchgeführt (Wu *et al.* 2007). Hierfür wurden Proteine wie in Kapitel 3.7.5 und Kapitel 3.7.7.1 beschrieben aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Anschließend wurden die immobilisierten Proteine mit 6 M Guanidin-HCl komplett denaturiert und dann mit schrittweise abnehmender Konzentration an Guanidin-HCl (siehe Tabelle 3.7.3) renaturiert, um so die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins wiederherzustellen.

Das auf Interaktion zu testende Protein wurde ebenfalls rekombinant hergestellt und nach der Reinigung (siehe Kapitel 3.7.1) wie in Kapitel 3.7.13 beschrieben mit Biotin markiert. Die Membran wurde nun ü/N mit 5 µg/ml des biotinylierten Proteins in Blockierlösung für Westernblots bei 4 °C und unter Rotieren bei 140 UpM inkubiert. Anschließend wurde mit alkalischer Phosphatase konjugiertes Streptavidin zur Markierung des Biotins eingesetzt und gemäß Kapitel 3.7.7.4 gefärbt. Interagiert das biotinylierte Protein mit dem auf der PVDF-Membran immobilisierten Protein, kann eine Farbreaktion beobachtet werden.

Tabelle 3.7.3: Far-Westernblot Puffer mit verschiedenen Guanidin-HCl Konzentrationen

Guanidin-HCl [M]	6	3	1	0,1	0
Milchpulver [g]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Glycerin [ml]	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
5 M Natriumchlorid [ml]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
1 M Tris, pH 7,5 [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
8 M Guanidin-HCl [ml]	18,75	9,3	3,13	0,31	0
ddH ₂ O [ml]	2,45	12,82	18,07	20,89	21,2
1 M DTT [µl]	25	25	25	25	25
Σ Volumen [ml]	25	25	25	25	25
Inkubationszeit/Temperatur	30 min/ RT	30 min/ RT	30 min/ RT	30 min/4 °C	ü/N/ 4 °C

3.7.9 Antigenreinigung polyklonaler Antikörper

Polyklonale Antikörperseren werden durch Immunisierung von Tieren mit einem rekombinanten Protein als Antigen hergestellt. Antigene für die in dieser Arbeit verwendeten polyklonalen Antikörper gegen CPn0147, CPn0809 und Pmp21N wurden durch Mitarbeiter

der Arbeitsgruppe für Funktionelle Genomforschung (siehe Tabelle 2.7.1) hergestellt. Die Immunisierung von Kaninchen wurde von der Firma Eurogentec in Belgien durchgeführt. Der im Antiserum des immunisierten Tieres enthaltene polyklonale Antikörper wurde anschließend zur Erhöhung der Spezifität und Reinheit mittels rekombinant-hergestelltem Antigen gereinigt. Die Reinigung erfolgte nach einem Protokoll aus dem Buch „Antibodies: A Laboratory Manual“ (Greenfield 2013).

3.7.9.1 Antikörperreinigung mittels NHS-Sepharose

Bei der Antigenreinigung eines polyklonalen Antikörpers mittels NHS-Sepharose, bildet NHS (*N*-Hydroxysuccinimid) eine chemisch stabile Amidbindung mit primären Aminogruppen von Proteinliganden. Die NHS-Sepharose wurde für die Reinigung mit rekombinantem Protein gekoppelt, um anschließend aus dem Serum spezifisch an das Protein bindende Antikörper zu reinigen. Der spezifisch an das rekombinante Protein gebundene Antikörper wurde anschließend durch Elution gelöst. Für die Reinigung von 2 ml Serum wurden 1,5 ml NHS-Sepharose und 1,5 bis 2 mg rekombinantes Protein eingesetzt. Die Reinigung wurde wie folgt durchgeführt.

In eine Protein-Säule wurde ein Polyethylenfilter gelegt und 1,5 ml NHS-Sepharose hinzugegeben. Durch Zugabe von 20 ml eiskalter 1 mM HCl wurde das Isopropanol, in dem die NHS-Sepharose gelagert wurde, ausgewaschen. Die NHS-Sepharose wurde anschließend mit 10 ml Kopplungspuffer gewaschen. Zu 1,5 bis 2 mg Proteinlösung in PBS wurde dasselbe Volumen an Kopplungspuffer gegeben und gemischt (Vortex-Genie 2). Das Gemisch wurde auf die Säule gegeben, die Säule sorgfältig verschlossen und ü/N bei 4 °C unter Rotieren bei 140 UpM inkubiert. Um nicht-reagierte Gruppen der NHS-Sepharose zu blockieren, wurden anschließend 4 ml Blockierlösung zugefügt und gemischt. Das Gemisch wurde 4 h bei 4 °C unter Rotieren inkubiert. Es wurde nun dreimal mit 1,5 ml Puffer A1 (0,1 M Tris, pH 8,0) und dreimal mit 1,5 ml Puffer A2 (0,1 M Natriumacetat; 0,5 M NaCl, pH 4,0) gewaschen. Dieses alternierende Waschen wurde noch zweimal wiederholt. Nun wurden 2 ml polyklonales Antikörperserum mit 8 ml Puffer A1 in die Protein-Säule gegeben und unter Rotieren für 2 h bei 4 °C inkubiert. Die Säule wurde anschließend einmal mit 10 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) und einmal mit 10 ml 500 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) gewaschen. Die erste Elution wurde nun mit 5 ml 10 mM Glycin (pH 2,5) für 5 min durchgeführt (saure Elution). Die zweite Elution fand mit 5 ml 0,1 M Triethanolamin (pH 11,5) für 5 min statt (basische Elution). Beide Eluate wurden jeweils in 0,5 ml 1 M Tris/HCl (pH 8,0) aufgefangen, um die Lösung zu neutralisieren.

Durch Messung der Absorption bei 280 nm wurde die Proteinkonzentration der Elutionsfraktionen ermittelt. Die gereinigten Antikörper wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

3.7.9.2 Antikörperreinigung mittels Westernblot

Zunächst wurde das rekombinante Antigen auf einem Polyacrylamidgel ohne Probenaschen aufgetrennt und anschließend auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Das Protein wurde danach wie für einen Far-Westernblot (siehe Kapitel 3.7.8) auf der Membran vollständig denaturiert und wieder renaturiert. Mittels Antikörperreaktion wurde auf einem kleinen, zuvor abgetrennten Streifen der Membran die Laufhöhe des rekombinanten Proteins ermittelt. Der Laufhöhe entsprechende Bereich der unbehandelten Membran wurde ausgeschnitten und in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden 500 µl des polyklonalen Antiserums mit 3 % BSA und 0,5 % TWEEN® 20 versetzt und zu dem Blotabschnitt gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde ü/N unter Rotieren bei 140 UpM und 4 °C inkubiert. Das Serum wurde anschließend abgenommen und der Blotabschnitt dreimal 1 h lang mit 1 ml PBS bei 4 °C gewaschen. Nun wurde der Antikörper mit 450 µl 10 mM Glycin (pH 2,5) für 5 min eluiert. Das Eluat wurde mit 50 µl 1 M Tris/HCl (pH 8,0) neutralisiert. Der gereinigte Antikörper wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

3.7.9.3 Abreicherung von Antikörpergemischen gegen fixierte

Humanzellen

Antikörper, die nach der Antigenreinigung unspezifischen Hintergrund zeigten, wurden durch zusätzliche Abreicherungsschritte gegen Humanzellen gereinigt.

Humanzellen wurden zur Konfluenz in 25-cm²-Zellkulturflaschen wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Methanol oder 3 %igem PFA für 5 min bei RT fixiert. Das Fixativ wurde vollständig abgenommen und die Zellen dreimal mit 3 ml HBSS gewaschen. Antigen gereinigter Antikörper wurde mit 3 % BSA und 0,5 % TWEEN® 20 versetzt, in eine Zellkulturflasche mit fixierten Zellen gegeben und durch schwenken gleichmäßig verteilt. Der Antikörper wurde dann für 1 h bei 4 °C auf den Zellen inkubiert. Anschließend wurde die Antikörperlösung abgenommen und in eine neue Zellkulturflasche mit fixierten Zellen gegeben. Der Erfolg der Abreicherung wurde durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie (siehe Kapitel 3.8.1.4) überprüft.

3.7.9.4 Abreicherung von Antikörpergemischen gegen Humanzellysat

Humanzellen einer konfluent gewachsenen 80 cm² Zellkulturflasche wurde dreimal mit 5 ml HBSS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Phospho-Lysis-Puffer überschichtet und 10 min lang bei RT inkubiert. Das Zellysat wurde Kapitel 3.7.5.1 folgend aufbereitet, mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert (siehe Kapitel 3.7.5 und 3.7.7.1). Die PVDF-Membran wurde dann für 30 min bei RT mit Blockierlösung für die Immunfluoreszenz inkubiert. Nun wurde die Membran mit 1 ml gereinigten Antikörper für 1 h bei 4 °C und 140 UpM unter Rotieren inkubiert. Der Erfolg der Abreicherung wurde mikroskopisch überprüft (siehe Kapitel 3.8.1.4).

3.7.10 Beschichtung von Latexkugeln mit rekombinantem Protein

Proteinbeschichtete Latexkugeln wurden in dieser Arbeit genutzt, um die Spezifität von Antikörpern nachzuweisen. Dabei wurde das Antigen, gegen das der Antikörper gerichtet ist rekombinant hergestellt (siehe Kapitel 3.1.3 und 3.7.1) und anschließend auf der Oberfläche der Latexkugeln immobilisiert.

Eine Suspension mit 1×10^9 Latexkugeln (\varnothing 1,1 μ m) wurden in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß mit 1 ml PBS gegeben und 5 min lang bei 13 000 UpM (Heraeus Biofuge pico) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Waschen mit PBS wiederholt. Nun wurden die Latexkugeln mit 1 ml Kopplungspuffer gemischt, 5 min lang bei 13 000 UpM zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Latexkugeln wurden anschließend in 100 μ l Kopplungspuffer und 100 μ l nativem Protein (400 μ l/ml) gemischt und für 1 h bei 4 °C und unter Rotieren bei 140 UpM inkubiert. Nun wurden 500 μ l Kopplungspuffer hinzugegeben und die Suspension im Ultraschallbad sonifiziert. Der Suspension wurden dann 500 μ l BSA-Lösung (40 mg/ml in Kopplungspuffer) zugefügt und abermals 1 h lang bei 4 °C und 140 UpM unter Rotieren zum Blockieren der Latexkugeln inkubiert. Die Suspension wurde 5 min lang bei 13 000 UpM zentrifugiert, der Überstand verworfen und die pelletierten Latexkugeln in 1 ml PBS mit 1 mg/ml BSA gewaschen. Die so behandelten Latexkugeln wurden für die Präadsorption eingesetzt (Kapitel 3.7.10.1). Zur Kontrolle wurden Latexkugeln hergestellt, die nur mit BSA blockiert wurden.

3.7.10.1 Präadsorptionsversuch zum Nachweis der Antikörperspezifität

Polyklonale Antikörper wurden mit Latexkugeln inkubiert, die mit dem Antigen beschichtet waren, gegen das der Antikörper gerichtet ist. Der Antikörper bindet so ebenfalls an die Latexkugeln und wurde aus der Antikörperlösung entfernt. Das spezifische Antikörpersignal ist bei Färbungen mit dieser Antikörperlösung verschwunden.

Proteinbeschichtete Latexkugeln aus Kapitel 3.7.10 wurden bei 13 000 UpM pelletiert, der Überstand verworfen und 100 µl antigengereinigter Antikörper hinzugegeben. Die Suspension wurde ü/N bei 4 °C und unter Rotieren bei 140 UpM inkubiert. Danach wurde die Suspension 5 min lang bei 13 000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt.

Der Überstand und die Latexkugeln wurden mikroskopisch untersucht. Zur Validierung des Versuchs wurde eine Probe der Antikörperlösung mit Kugeln inkubiert, die nur mit BSA behandelt worden waren.

3.7.10.2 Nachweis der Proteinbeschichtung mittels Immunfluoreszenz

Der Erfolg des Präadsorptionsversuches (Kapitel 3.7.10.1) wurde durch Färbung des gebundenen Antikörpers mit fluoreszenzmarkierten, sekundären Antikörpern nachgewiesen. Gebundener Antikörper wurde anschließend mikroskopisch detektiert. Die grün fluoreszierenden Latexkugeln aus Kapitel 3.7.10.1 wurden hierzu mit 100 µl eines entsprechenden sekundären, Alexa Fluor 594-konjugierten Antikörpers für 1 h auf Eis inkubiert. Die so behandelten Latexkugeln wurden anschließend zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und je 5 min lang bei 13 000 UpM pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS gelöst und auf einen Objektträger getropft.

3.7.11 Fraktionierung von infizierten Humanzellen

Zur Detektion von Proteinen, die unterhalb der Nachweisgrenze der Immunfluoreszenz-Mikroskopie liegen, wurden Fraktionierungen von infizierten Humanzellen durchgeführt. Die Fraktionen wurden anschließend mittels Westernblot auf das Vorhandensein chlamydialer Proteine analysiert. In dieser Arbeit wurde eine diskontinuierliche Dichtegradientenfraktionierung mit Optiprep® durchgeführt. Bei solch einer Gesamtzellfraktionierung werden Zellbestandteile in Schichten des Gradienten angereichert, die ihrer eigenen Dichte entsprechen. Die verschiedenen Schichten können anschließend abgenommen und untersucht werden. So sind Rückschlüsse auf die Lokalisation von Proteinen innerhalb einer Zelle möglich. Die Fraktionierung wurde nach einem abgewandelten Protokoll von Valdivia und Kollegen durchgeführt (Jorgensen & Valdivia 2008).

Für diesen Versuch wurden HeLa-Zellen in 32 25-cm²-Zellkulturflaschen ausgesät und 24 h bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Die Zellen wurden dann mit *C. pneumoniae* mit einer MOI=2 infiziert und bei 48 bzw. 65 hpi geerntet und fraktioniert. Dazu wurde das Zellkulturmedium abgenommen und 1 ml PBS mit 1 % *cOmplete Protease Inhibitor Cocktail*

auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden nun mit einem Zellkulturschaber abgelöst und in ein 50-ml-Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Suspension wurde 5 min lang bei 4 °C und 1 000 UpM (Rotanta 460R) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 7 ml PBS *cOmplete Protease Inhibitor Cocktail* suspendiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 7 ml hypoosmotischem 0,2-fach PBS (PBS verdünnt mit ddH₂O) aufgenommen. Die Zellen wurden nun 5 bis 10 min lang auf Eis inkubiert und das Aufschwämmen der Zellen mikroskopisch überprüft (Binokular Axiovert 25C). Die Zellyse wurde mittels Dounce-Homogenisator auf Eis durchgeführt, wobei 30 x mit einem groben Pistill und 30 x mit einem feinen Pistill gearbeitet wurde. Die Lyse der Zellen wurde mikroskopisch geprüft. Die Humanzellen waren aufgebrochen, große Zellorganellen, wie der Zellkern, dagegen größtenteils intakt geblieben.

Das Lysat wurde nun bei 500 x g 5 min lang bei 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge Multifuge 3SR+). Das resultierende Pellet stellt die Kernfraktion und der Überstand die postnukleare Fraktion dar. Der Überstand wurde 1 h lang bei 4 °C und 100 000 x g (Ultrazentrifuge TLA100, Rotor SW40Ti) zentrifugiert. Der geklärte Überstand beinhaltet vor allem das Zytosol der Zellen, und das Pellet – das sogenannte High-Speed-Pellet (HSP) – beinhaltet alle festen Bestandteile der Zellen und Bakterien, wie zum Beispiel Membranen. Im folgenden Optiprep®-Gradienten wurde das HSP weiter aufgetrennt. Es wurde in 1,5 ml PBS + Protease Inhibitor und 1,5 ml 60 %igem Optiprep® resuspendiert. Das so auf 30 % Optiprep® eingestellte Gemisch wurde in ein Ultrazentrifugationsröhrchen gegeben. Nun wurde das Gemisch mit verschiedenen Optiprep®-Konzentrationen überschichtet. Dazu wurde das Optiprep® mit PBS + Protease Inhibitor verdünnt. Das HSP-Gemisch wurde wie folgt überschichtet: 2 ml 25 %, 1,5 ml 20 % und 1 ml 5 % Optiprep®. Die Gradientenzentrifugation wurde 2 h lang bei 4 °C und 100 000 x g (Ultrazentrifuge TLA100, Rotor SW40Ti) durchgeführt. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend in 300 µl Portionen abgenommen. Die Proteinkonzentration jeder Fraktionen wurde mittels Bradford-Reagenz (siehe Kapitel 3.7.4) bestimmt. Für die Westernblot-Analyse wurden gleiche Proteinkonzentrationen je Fraktion eingesetzt.

3.7.12 Behandlung von *C. pneumoniae* EBs mit Detergenzien

Bei der Detergenzienbehandlung von Elementarkörperchen (EBs) soll betrachtet werden, ob bestimmte Proteinen auf der Oberfläche präsentiert sind und unter welchen Bedingungen sich diese Proteine von der Oberfläche lösen lassen.

Hierzu wurden 75 µl (10⁹ IFU/ml) einer EB-Suspension (siehe Kapitel 3.4.3) für 30 min bei 15 000 UpM und 4 °C (Biofuge Primo R) in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß pelletiert. Das

Pellet wurde danach in 100 µl PBS mit Hilfe des Ultraschallbades resuspendiert. Anschließend wurde die EB-Suspension mit PBS oder mit einem der folgenden Detergenzien zu einem Volumen von 150 µl aufgefüllt: Triton X-100 (Zielkonzentration: 1 %) oder Sarkosyl (2 %). Die Proben wurden nun 1 h lang bei 37 °C inkubiert und danach 1 h bei 4 °C und 100 000 x g zentrifugiert (Optima Max 100E, Rotor MLS50). Der Überstand wurde abgenommen und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde in 150 µl PBS gelöst. Beiden Fraktionen wurden mittels Westernblot analysiert (Kapitel 3.7.7).

3.7.13 Markierung von Proteinen mit Biotin

Die Biotinylierung von Proteinen wurde mit EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin in 20-fachem Überschuss durchgeführt. NHS-Biotin bildet Amidbindungen mit Molekülen, die primäre Amide enthalten und wird so an Proteinliganden gebunden.

Es wurden eine 10 mM Biotinlösung in ddH₂O hergestellt. Die Menge Biotin, die zur Biotinylierung von rekombinanten Proteinen eingesetzt wurde, war abhängig von der Konzentration und dem Molekulargewicht des Proteins und wurde nach folgender Formel berechnet:

Eingesetzte µl Biotin-Lösung =

$$(\text{Menge Protein in } \mu\text{g} / \text{Protein-Molekulargewicht in Da}) \times 2 \times 10^6$$

Die Lösung wurde gut gemischt und 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 M Tris/HCl (pH 7,5) (Zielkonzentration: 50 mM) und Inkubation auf Eis für 1 h abgestoppt. So markierte Proteine wurden beispielsweise für Protein-Protein-Interaktionsstudien mittels Far-Westernblot verwendet (siehe Kapitel 3.7.8).

3.7.14 Bindung von Proteinen an Phospholipide

In dieser Arbeit wurde die Bindung von Proteinen an spezifische Lipide mit Membranlipidstreifen (Membrane Lipid Strips™) untersucht.

Die Membranlipidstreifen wurden 1 h lang bei RT unter Rotieren bei 140 UpM in Blockierlösung für Membranlipidstreifen blockiert. Anschließend wurde 1 µg/ml rekombinantes Protein mit Blockierlösung für Membranlipidstreifen verdünnt und 1 h bei RT bei unter Rotieren 140 UpM mit dem Membranlipidstreifen inkubiert. Danach wurde der Streifen dreimal mit PBS + 0,1 % TWEEN® 20 gewaschen. Das Protein wurde anschließend mit einem spezifischen Antikörper, der gegen die Markierung des Proteins gerichtet war, und einem sekundären mit alkalischer Phosphatase-konjugierten Antikörper detektiert. Die Inkubation der Antikörper mit dem Membranlipidstreifen erfolgte für 30 min bei RT und 140 UpM in Blockierlösung für Membranlipidstreifen. Danach wurde der Streifen dreimal mit

PBS + 0,1 % TWEEN® 20 gewaschen und die anschließende Farbreaktion wie in Kapitel 3.7.7.4 beschrieben durchgeführt.

3.8 Immunfluoreszenz-Mikroskopie von Humanzellen

Bei der Immunfluoreszenz-Mikroskopie werden Proteine mittels Antikörperfärbung und eines an den Antikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes sichtbar gemacht.

Hierzu wurden Humanzellen in 24-Well-Platten auf Deckgläschen (\varnothing 12 mm) ausgesät (siehe Kapitel 3.3) und zur halben Konfluenz wachsen gelassen. Die Zellen müssen vor einer immunologischen Analyse fixiert werden.

3.8.1.1 Fixierung von Humanzellen

Das Zellkulturmedium wurde von den Zellen abgenommen. Je nach zu betrachtendem Organell variiert die Fixierung der Zellen. In dieser Arbeit wurden Humanzellen mit Methanol oder 3 %igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

Im Falle von Methanol wurden die Zellen mit auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem Methanol oder Methanol mit RT fixiert. Dazu wurden die Zellen mit 250 μl Methanol überschichtet und 5 bis 10 min lang bei RT inkubiert. Das Methanol wurde anschließend abgenommen und die Zellen dreimal mit 1 ml HBSS gewaschen.

PFA wurde als 30 %ige Stammlösung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt und für die Fixierung von Zellen auf 3 % PFA verdünnt. Die Zellen konnten mit $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem PFA oder mit auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmten PFA fixiert werden. Hierzu wurden die Zellen mit 250 μl PFA überschichtet und 5 bis 20 min lang bei RT fixiert. Anschließend wurde das PFA abgenommen und die Zellen dreimal mit 1 ml HBSS gewaschen.

Die Zellen wurden sofort zur Immunfärbung verwendet oder bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in HBSS im Kühlschrank gelagert.

3.8.1.2 Permeabilisierung von PFA-fixierten Humanzellen

Zellen, die mit Paraformaldehyd fixiert worden waren, mussten vor einer Immunfärbung permeabilisiert werden, um Strukturen innerhalb der Zelle für Antikörper zugänglich zu machen. Eine Permeabilisierung erfolgte mit 0,1 % Triton X-100 oder 0,5 % Saponin. Zur Permeabilisierung mit Triton X-100 wurden die Zellen mit 250 μl 0,1 % Triton X-100 in PBS überschichtet und 5 min lang inkubiert. Zur Permeabilisierung mit Saponin wurden die Zellen initial 20 min lang mit 250 μl 2 %iger Saponin-Lösung bei RT inkubiert und anschließend unter Anwesenheit von 0,5 % Saponin gefärbt (siehe Kapitel 3.8.1.3 und 3.8.1.4).

3.8.1.3 Direkte Immunfluoreszenz

Bei der direkten Immunfluoreszenz werden Proteine durch spezifische Antikörper detektiert, welche mit einem Fluorochrom konjugiert sind.

Fixierte Zellen auf Deckgläschen wurden mit 20-30 μl verdünnter Antikörperlösung überschichtet. Nach einer Inkubationsdauer von 30 min bei RT wurden die Zellen dreimal mit 1 ml PBS gewaschen. Um die DNS sichtbar zu machen wurde 10 min lang mit 1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI gefärbt, woran sich ebenfalls drei Waschschrte mit 1 ml PBS anschlossen. Das Deckgläschen wurde nun getrocknet, mit den Zellen voran in 1-1,5 μl Vectashield® luftblasenfrei auf den Objektträger gelegt und anschließend versiegelt.

3.8.1.4 Indirekte Immunfluoreszenz

Der Antikörper, welcher bei der indirekten Immunfluoreszenz zur Detektion von Proteinen genutzt wird, ist nicht markiert. Er wird mit Hilfe eines sekundären Fluorochrom-konjugierten Antikörpers gebunden und so sichtbar gemacht. Dadurch wird das Signal des markierten Proteins verstärkt.

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden die fixierten Zellen zunächst mit 20-30 μl verdünnter Primäantikörperlösung überschichtet. Die Inkubation erfolgte bei RT für 30 bis 60 min. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 1 ml PBS gewaschen und danach mit 20-30 μl verdünnter Sekundäantikörperlösung für 30 min bei RT inkubiert. Die Färbung von DNS und das Fixieren des Deckgläschens auf dem Objektträger erfolgten wie in Kapitel 3.8.1.3 beschrieben.

3.8.1.5 Lebendzell-Mikroskopie

Die Fixierung von Zellen ist eine etablierte Methode, um mikroskopische Untersuchungen durch Immunfluoreszenz-Analysen zu ermöglichen. Fragen zur Dynamik von Prozessen und biologischen Interaktionen können durch sie nicht geklärt werden, da es sich bei der Betrachtung von fixierten Zellen immer nur um eine Momentaufnahme der tatsächlichen Vorgänge handelt. Zudem können Strukturen durch die jeweilige Fixierungsmethode ungewollt verändert werden. Um dynamische Prozesse *in vivo* sichtbar zu machen, wurden in dieser Arbeit mikroskopische Untersuchungen an lebenden Zellen durchgeführt. Bei der Lebendzell-Mikroskopie können die Proteine nicht mit Antikörpern markiert werden, wodurch alle Prozesse mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen, die in die lebende Zelle eindringen können, oder durch ektopisch produzierte, fluoreszierende Proteine sichtbar gemacht werden müssen.

Für die Lebendzell-Mikroskopie wurden Zellen in Lebendzellkammern ausgesät und 24 h lang zur halben Konfluenz wachsen gelassen. Die Zellen wurden anschließend entweder wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben infiziert, transfiziert (siehe Kapitel 3.6.1) oder ca. 15 h nach der Transfektion infiziert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 2 ml auf 37 °C vorgewärmtem Lebendzell-Mikroskopie-Puffer gewaschen und dann mit 5 µg/ml Bodipy® 493/ 503 und/oder 1 µg/ml Hoechst 33342 in 2 ml Lebendzell-Mikroskopie-Puffer gefärbt. Die Zellen wurden erneut 2 x mit je 2 ml Lebendzell-Mikroskopie-Puffer gewaschen und für die Mikroskopie mit 1 ml Lebendzell-Mikroskopie-Puffer überschichtet. Die Mikroskopie wurde bei 37 °C und mit einem konfokalen Nikon C2 Mikroskop mit Lebendzell-Inkubationskammer durchgeführt.

3.9 Propidiumiodid-Färbung von *E. coli*

Die Färbung von *E. coli* mit Propidiumiodid wurde zur Identifizierung von toten Zellen durchgeführt. Der in die DNS interkalierende Farbstoff kann nur in Zellen eindringen, deren Zellmembran perforiert ist und markiert auf diese Weise tote Zellen.

Es wurde 1 ml einer *E. coli*-Expressionskultur (siehe Kapitel 3.1.3) in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und für 3 min bei 7500 x g (Heraeus Biofuge pico) pelletiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) gewaschen und pelletiert. Die Zellen wurden nun in 1 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) mit 5 µg/ml Propidiumiodid aufgenommen und 3 min lang gefärbt. Die Zellen wurden pelletiert, in 1 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) aufgenommen und anschließend zügig mikroskopiert (Fluoreszenzmikroskop Axioskop 50).

3.10 Quantifizierung von CPn0147-Fäden

Für die Quantifizierung der Fadenrichtung, Fadenzahl und der Assoziation mit chlamydialen Antigenen von CPn0147- und IncA-positiven Fäden wurden Humanzellen mit *C. pneumoniae* bei niedriger MOI (zwischen 0,1 und 1) Kapitel 3.4.1 folgend infiziert. Für die Quantifizierungen wurden nur Einzel-Inklusionen berücksichtigt. Dazu wurde die infizierte Zelle mikroskopisch durchmustert und bei multipler Infektion nicht berücksichtigt. Für die Messung der Abstände zwischen Fäden und Wirtszellkern wurde die NIS-Elements Software von Nikon verwendet. Die Zahl von mit Inklusionen assoziierten Fäden und die Antigen-Assoziation wurden manuell bestimmt.

3.11 Programme und Bildbearbeitung

Für die bioinformatische Analyse von Proteinen zur Identifikation von funktionellen Domänen wurden frei zugängliche internetbasierte Programme verwendet: Für die Vorhersage von hydrophoben und Transmembrandomänen wurden TMHMM 2.0 oder 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) und Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>) und für die Suche nach Domänen-Familien Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) verwendet. Für Sequenzvergleiche von Proteinen wurde der BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) verwendet. Alle Analysen wurden mit den voreingestellten Parametern durchgeführt.

Für die Erfassung von Mikroskopie-Bildern wurden abhängig vom verwendeten Mikroskop verschiedene Programme verwendet. Für das Zeiss Fluoreszenzmikroskop Axioskop 50 mit 12 Bit CCD Kamera wurde das Programm Image Pro Plus der Firma Media Cybernetics genutzt.

Für die Bilderfassung mit dem Zeiss Spinning-Disk Mikroskop Cell Observer wurde das Programm AxioVision von Zeiss verwendet.

Für die Bilderfassung mit dem Nikon Konfokalmikroskop C2 wurde das Nikon Programm NIS-Elements Advanced Research genutzt.

Für eine anschließende Bildbearbeitung und für die Erstellung von Figuren wurde das Vektorzeichenprogramm Canvas 14 verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von CPn0809

Häufig wird CPn0809 aufgrund der genomischen Lokalisierung seines Gens und des typischen Hydrophobizitätsprofils als mögliches Translokationspore-Protein beschrieben (Kapitel 1.6). Da detaillierte bioinformatische Domänenanalysen des CPn0809 und der im selben Operon exprimierten Proteine fehlten, wurden diese im ersten Schritt der Arbeit durchgeführt.

4.1.1 CPn0811 weist Ähnlichkeiten zu T3SS-assoziierten Klasse II-Chaperonen auf

Bisher wurden keine detaillierten Homologie-Analysen der putativen T3SS-assoziierten Klasse II-Chaperone von *C. pneumoniae* CPn0811 (LcrH_1) und CPn1021 (LcrH_2) publiziert (Kapitel 1.4.5.1). In Tabelle 4.1 sind die Ergebnisse der durchgeführten Analyse mittels BLASTp zusammengefasst. Die postulierten chlamydialen Translokon-Chaperone zeigen starke Homologien zu anderen Translokon-Chaperonen. Wie erwartet, bestehen die größten Ähnlichkeiten der beiden *C. pneumoniae* Translokon-Chaperone dabei zu ihren Homologen aus *C. trachomatis*. Bemerkenswert ist die Homologie von CPn0811 und CPn1021 zu SycD aus *Yersinia enterocolitica*, einem humanpathogenen Bakterium, das phylogenetisch weit von *C. pneumoniae* entfernt ist. Dabei zeigte CPn0811 bei einer Abdeckung von 56 % mit SycD 28 % Identität und 49 % Homologie. Das zweite Chaperon CPn1021 zeigte sogar 30 % Identität und 48% Homologie bei einer Abdeckung von 81 % mit SycD.

Allerdings ist die Identität der Sequenzen der Chaperone verschiedener Organismen meist relativ gering. Selbst bei den phylogenetisch eng verwandten Chlamydien-Spezies *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* zeigen die Chaperone eine maximale Identität von 70 % bei CPn0811 und CT_576, bzw. sogar unter 30 % bei CPn1021 und CT_576 oder CPn811 und CT_862.

Durch einen BLASTp-Vergleich von CPn0811 und CPn1021 gegen die Non-redundant protein sequences- (nr-) Datenbank des NCBI unter Ausschluss aller *Chlamydiae* (taxid:51291), wurden Proteine identifiziert, die entweder als mit dem T3SS in Verbindung stehende Chaperone annotiert sind oder als hypothetisch geführt werden. Die Ähnlichkeit der beiden Proteine zu T3SS-assoziierten Chaperonen ist somit spezifisch.

Tabelle 4.1: Ergebnisse der Proteinsequenzvergleiche verschiedener Translokon-Chaperone

T3SS-assoziierte Klasse II-Chaperone aus *C. pneumoniae* (CPn0811/1021), *C. trachomatis* (CT_576/862), *Yersinia* (SycD), *Pseudomonas* (PcrH), *Salmonella* SPI-1 (SicA), *Salmonella* SPI-2 (SscA), *Shigella* (SpG) im Vergleich.

		Identität in % / Abdeckung in %								
		Cpn0811	Cpn1021	CT_576	CT_862	SycD	PcrH	SicA	SscA	SpG
Homologie in % / Erwartungswert	Cpn0811		23/52	70/96	27/65	28/56	29/50	22/64	25/51	26/45
	Cpn1021	41/ 5e-08		26/72	67/99	30/81	22/72	21/67	24/55	23/52
	CT_576	83/ 2e-116	45/ 3e-12		31/64	30/61	28/50	25/54	23/63	24/53
	CT_862	39/ 1e-12	80/ 4e-86	46/ 2e-16		28/66	29/58	23/51	27/38	23/61
	SycD	49/ 1e-15	48/ 1e-17	52/ 2e-17	48/ 9e-17		59/97	26/83	27/83	27/94
	PcrH	51/ 2e-14	45/ 4e-11	50/ 1e-14	51/ 1e-14	77/ 6e-69		29/81	29/83	26/84
	SicA	49/ 2e-10	42/ 3e-09	49/ 5e-10	43/ 2e-08	47/ 2e-15	48/ 6e-17		24/69	60/89
	SscA	40/ 5e-11	47/ 4e-10	40/ 8e-10	49/ 2e-08	45/ 2e-17	48/ 1e-16	42/ 5e-07		24/61
	SpG	54/ 2e-14	41/ 9e-07	54/ 3e-15	46/ 8e-11	45/ 7e-18	47/ 2e-17	80/ 1e-69	40/ 7e-06	

Zudem wurde bei CPn0811 und CPn1021 durch Pfam drei TPR_3- (Tetratricopeptide-like repeat-) Domänen identifiziert. Diese TPR_3-Domänen sind unperfekte, 34-Aminosäuren lange Wiederholungen, die typisch für T3SS-assoziierte Klasse II-Chaperone sind und Protein-Protein Interaktionen vermitteln (Pallen *et al.* 2003; Edqvist *et al.* 2006).

Die gezeigten Daten bestätigten die Ähnlichkeit von CPn0811 und CPn1021 zu Translokon-assoziierten Chaperonen anderer Bakterien. Beide Chaperone werden zusammen mit je drei weiteren Proteinen in Operons codiert (Kapitel 1.6 und 4.1.2). Das in dieser Arbeit untersuchte CPn0809 ist im Operon von CPn0811 codiert und wurde im folgenden Kapitel zusammen mit den anderen Operon-Proteinen bioinformatisch auf Domänen untersucht, welche für Translokator-Proteine typisch sind.

4.1.2 Bioinformatische Charakterisierung der Proteine des CPn0811- und CPn01021-Operons

Das Gen *cpn0809* wird im Genom von *C. pneumoniae* zusammen mit *cpn0811* und zwei anderen Genen als polycystronische mRNA transkribiert (Ouellette *et al.* 2005) (Kapitel 1.6

und 4.1.2). In Abbildung 4.1 ist die genetische Organisation der *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* T3SS Translokation-Operons im Vergleich mit Translokation-Operons anderer humanpathogener Bakterien gezeigt.

Die T3SS-assoziierten Klasse II-Chaperone anderer humanpathogener Bakterien wie *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Salmonella* oder *E. coli* werden in der Regel in der Nähe der drei Translokation-Proteine codiert (Abbildung 4.1). Davon bildet ein Protein die Assemblierungsplattform für die Translokationsspitze an der Nadelspitze des T3SS, während zwei Proteine die Pore in der Membran der Wirtszelle formen (Kapitel 1.4.4.2). Es gibt jedoch Beispiele für Abweichungen von dieser Operon-Struktur. Wie in Abbildung 4.1 zu erkennen ist, codieren einige der Translokation-Operons zusätzliche Chaperone oder regulatorische Proteine. Im Falle von *E. coli* wird das Klasse II-Chaperon nicht zusammen mit den Translokation-Proteinen in einem Operon codiert (Wainwright & Kaper 1998).

Auch die beiden putativen Translokation-Operons von *C. pneumoniae* beinhalten ein Klasse II-Chaperon (Kapitel 4.1.1), zwei Proteine, die Translokationsspitzen-Proteine darstellen könnten und ein Protein, welches als Nadelspitzenprotein fungieren könnte. Die Proteine der Operons wurden aufgrund von Domänenanalysen und Hydrophobizitätsvorhersagen zugeordnet, welche im Folgenden detaillierter beschrieben werden.

Das CPn0811-Operon von *C. pneumoniae* codiert neben CPn0809 auch CPn0808. Interessanterweise zeigen beide Proteine in einer Domänenvorhersage eine SseC- (Secretion system effector C-) Domäne. Es handelt sich bei dieser Domäne um einen Homologiebereich, der im namensgebenden Translokation-Protein SseC und in anderen Translokation-Proteinen wie YopB, PopB und EspD, die auch als große hydrophobe Translokatoren bezeichnet werden, identifiziert wurde (Abbildung 4.2) (vgl. Kapitel 1.4.4.2). Dieses Ergebnis war unerwartet, da bei den anderen betrachteten Translokation-Operons nur der große hydrophobe Translokator eine SseC-Domäne aufweist, während die kleinen hydrophobe Translokatoren, wie z. B. YopD, PopD und EspB, jeweils anderen Translokation-assoziierten Familien angehören (siehe digitaler Anhang).

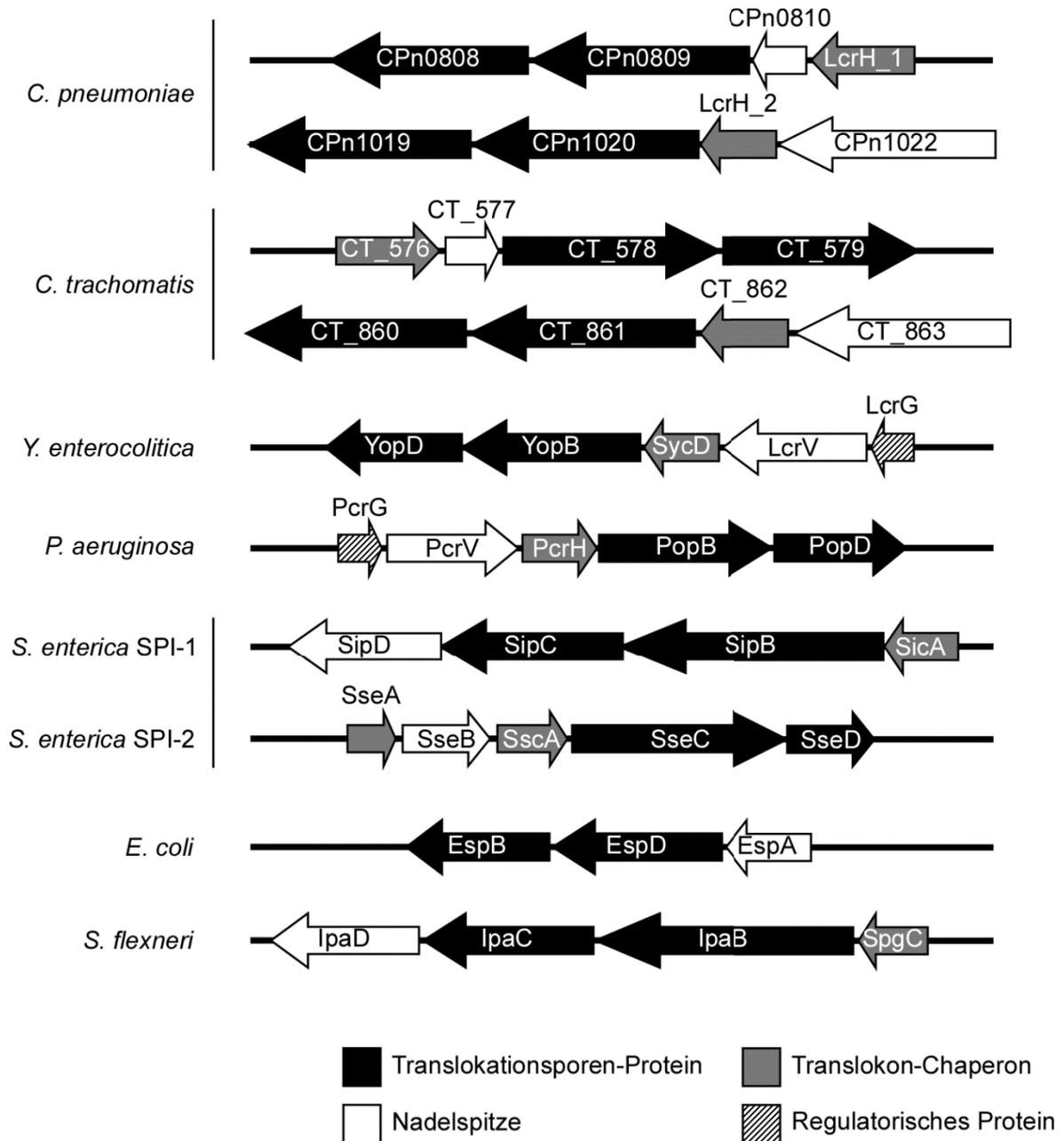


Abbildung 4.1: Schematischer Vergleich der genomischen Organisation verschiedener Translokation-Operons

Die in den Operons codierten Proteine wurden als Pfeile dargestellt. Die Richtung der Pfeile gibt die Orientierung im Genom an. Auf der linken Seite der Zeichnung würde sich der definitionsgemäße Beginn des bakteriellen Chromosoms befinden. Translokationsporen-Proteine sind in Schwarz, T3SS-assoziierte Klasse II-Chaperone in Grau, Nadelspitzenproteine in Weiß und andere regulatorische Proteine gestreift dargestellt. Die Einordnung der chlamydialen Proteine fand nach BLASTp Homologie-Analysen, Vorhersagen von Hydrophobizitätsprofilen mittels TMHMM 2.0 und Phobius, Domänenvorhersagen durch Pfam und aufgrund ihrer genomischen Lage im Verhältnis zum Klasse II-Chaperon des Operons statt.

Da Translokationsporen-Proteine meist mehrere Transmembrandomänen aufweisen, wurden CPn0808, CPn0809 und CPn0810 auf hydrophobe Domänen analysiert (Abbildung 4.2). Für CPn0809 wurden drei hydrophobe Domänen in der C-terminalen Hälfte des Proteins identifiziert, von denen durch Phobius zwei und durch TMHMM 2.0 alle drei als Transmembrandomänen vorhergesagt wurden. CPn0808 weist zwei hydrophobe Domänen auf, welche nicht als Transmembrandomänen annotiert wurden. Für CPn0810 wurden keine Domänen gefunden.

Nadelspitzenproteine der T3SS anderer pathogener Bakterien unterscheiden sich von den Translokationsporen-Proteinen häufig durch das Fehlen von hydrophoben Domänen, weshalb die Nadelspitzenproteine in der Literatur als hydrophile Translokation-Proteine bezeichnet werden (Kapitel 1.4.4.2) (Cornelis 2006). Daher wurde CPn0810 als mögliches Nadelspitzenprotein eingeordnet (Abbildung 4.1).

Das CPn1021- (LcrH₂-) Operon von *C. pneumoniae* codiert ebenfalls zwei Proteine, die aufgrund ihrer Hydrophobizitätsprofile wahrscheinlich den Translokationsporen-Proteinen zuzuordnen sind. CPn1019 besitzt eine hydrophobe Domäne, die jedoch nicht als Transmembrandomäne vorhergesagt wird. Im C-terminalen Teil des CPn1020 befinden sich drei hydrophobe Domänen, von denen durch TMHMM 2.0 eine und von Phobius alle drei als Transmembrandomänen identifiziert wurden (Abbildung 4.2). Im CPn1021-Operon wurde nur für das Protein CPn1020 eine SseC-Domäne gefunden, die im Vergleich zu den anderen betrachteten Proteinen nur einen sehr kleinen Teil des Proteins abdeckt und mit einem relativ schlechten Erwartungswert von $2,2 \times 10^{-3}$ annotiert wurde (Abbildung 4.2). Für CPn1019 wurden keine weiteren funktionellen Domänen identifiziert und die Einordnung als Translokation-Protein in Abbildung 4.1 wurde aufgrund der vorhergesagten hydrophoben Domäne vorgenommen.

Wie bei CPn0810 wurden auch in CPn1022 keine hydrophoben oder andere funktionelle Domänen vorhergesagt. Daher wurde CPn1022 in Abbildung 4.1 als mögliches Nadelspitzenprotein des zweiten *C. pneumoniae* Translokation-Operons eingeordnet.

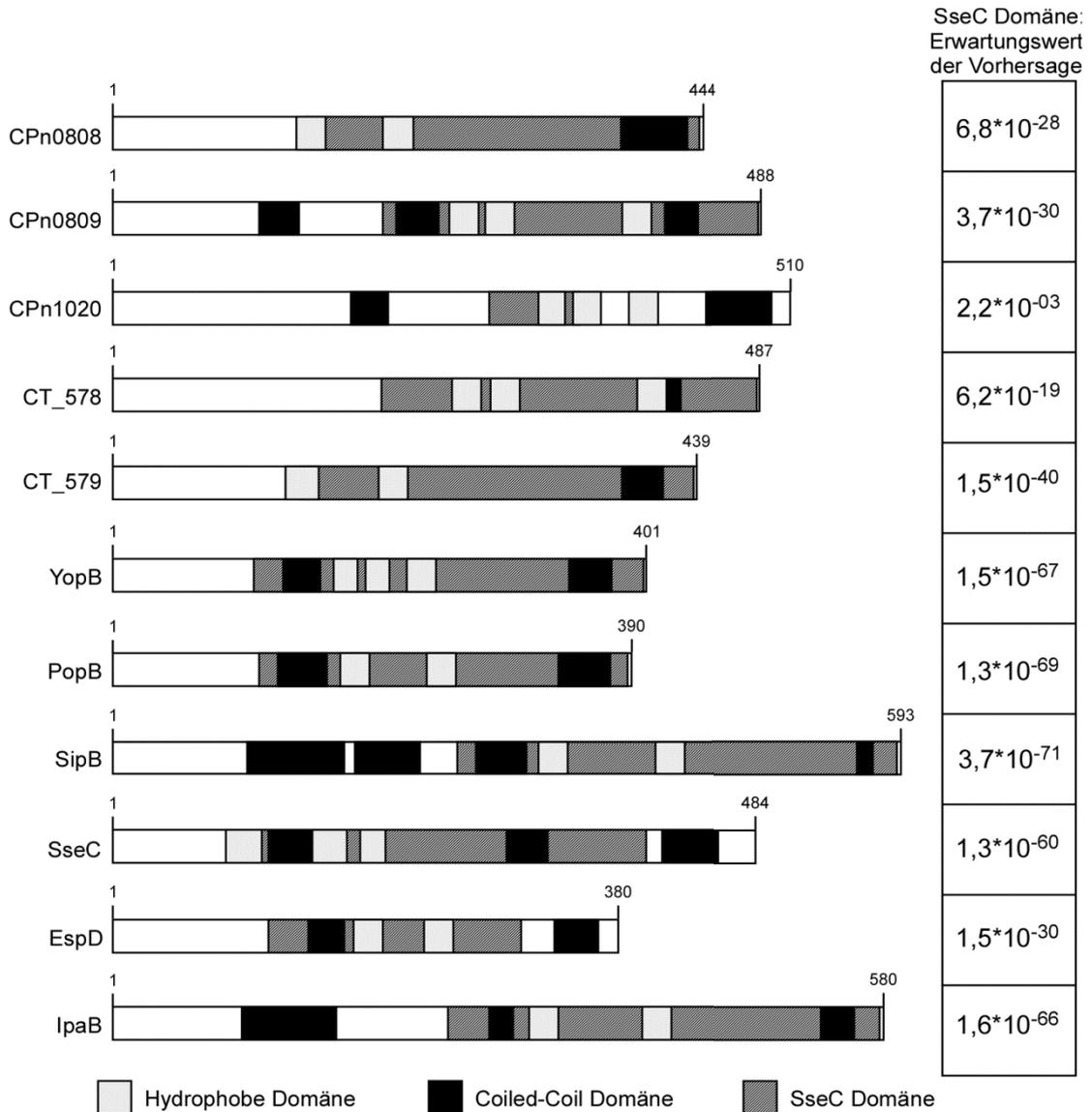


Abbildung 4.2: Grafische Darstellung der Domänenanalyse der Translokationsporen-Proteine

Translokation-Proteine mit einer vorhergesagten SseC-Domäne wurden miteinander verglichen. Hydrophobe Domänen sind als hellgraue, Coiled-Coil Domänen als schwarze und SseC-Domänen als dunkelgraue Boxen dargestellt. Die Erwartungswerte, mit denen die SseC-Domänen in den jeweiligen Proteinen vorhergesagt wurden, sind rechts angegeben. Die eingezeichneten Domänen wurden durch folgende Programme vorhergesagt: Pfam, TMHMM 2.0 bzw. Phobius und Marcoil. Die Größe der Proteine unterscheidet sich und ist durch die Angabe der Länge der Aminosäurekette mit Zahlen über den jeweiligen Skizzen angegeben. Alle vorhergesagten Strukturen wurden im Größenverhältnis proportional zueinander eingezeichnet.

Die SseC-Domänen in den betrachteten Translokon-Proteinen umfassen mindestens eine, meist jedoch zwei vorhergesagte Coiled-Coil Domänen (Abbildung 4.2). Des Weiteren beinhaltet eine SseC-Domäne meist zwei bis drei hydrophobe Domänen. Die SseC-Domäne deckt bei den meisten betrachteten Translokon-Proteinen den überwiegenden Teil der C-terminalen Hälfte des Proteins ab. Auch wenn die vorhergesagten Strukturelemente der Proteine in einigen Fällen außerhalb der SseC-Domänen liegen, ist eine Gemeinsamkeit der Translokationsporen-Proteine, dass hydrophobe Domänen von Coiled-Coil Domänen eingerahmt werden.

CPn0809 zeigte in der Domänen-Analyse die größte Ähnlichkeit zu SipB von *Salmonella* und IpaB von *Shigella*. Die drei Proteine besitzen hydrophobe Domänen, die innerhalb der SseC-Domäne von zwei Coiled-Coil Domänen eingeschlossen werden. Des Weiteren waren diese Proteine die einzigen, die mindestens eine zusätzliche Coiled-Coil Domäne in der N-terminalen Hälfte des Proteins aufwiesen, welche zudem außerhalb der SseC-Domäne lag. Ein gezielter BLASTp-Vergleich zeigte, dass CPn0809 zu SipB eine Identität von 29 % (Homologie 52 %; Abdeckung von 38 %) besitzt und zu IpaB 30 % identisch (Homologie 49 %; Abdeckung von 38 %) ist, diese sind die größten Ähnlichkeiten von CPn0809 zu anderen betrachteten Translokon-Proteinen.

Alle in diesem Kapitel und in Kapitel 4.1.1 beschriebenen bioinformatischen Analysen können im digitalen Anhang eingesehen werden. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass CPn0809 starke strukturelle Ähnlichkeiten zu Translokon-Proteinen anderer pathogener Bakterien aufweist. Die Annahme, dass CPn0809 ein Translokationsporen-Protein darstellt, wurde bioinformatisch unterstützt. Im Folgenden wurde CPn0809 in der chlamydialen Infektion charakterisiert, um weitere Hinweise auf seine Funktion zu sammeln.

4.1.3 CPn0809 spielt eine Rolle in der frühen Infektion

Zur Charakterisierung von CPn0809 wurde gegen die N-terminale Hälfte des Proteins (As 1-253) ein polyklonales Kaninchen-Antiserum generiert (Herbst 2011). Das Antiserum wurde für die folgenden Experimente antigengereinigt (Kapitel 3.7.9), um die spezifisch an CPn0809 bindenden Antikörper anzureichern. Trotz Antigenreinigung wurde in Westernblot-Analysen humaner Zellen auch eine Bande detektiert, die nahezu auf gleicher Höhe wie die CPn0809-Bande lief. In der Immunfluoreszenzmikroskopie waren bei der Färbung nicht-infizierter Zellen ebenfalls deutliche Signale erkennbar, welche bereits in einer früheren Arbeit als unspezifisch identifiziert wurden (Herbst 2011). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zusätzliche Abreicherungs-schritte gegen nicht-infizierte Zellen durchgeführt (Kapitel 3.7.9.3

und 3.7.9.4), um diese unspezifischen Signale zu reduzieren (Abbildung 4.3 und Abbildung 4.4 n. i.).

Die starken Hintergrundsignale welche punktiert im Zellkern und diffus im Zytoplasma der Humanzelle auftreten stören bei der Betrachtung der eigentlichen CPn0809-Signale (Abbildung 4.3 oben). Dagegen zeigt der antigengereinigte, abgereicherte anti-CPn0809-Antikörper bei der Färbung einer nicht-infizierten Zelle kaum noch unspezifischen Signale (Abbildung 4.3 mitte). Die Färbung von infizierten Zellen detektierte nur noch punktierte Signale innerhalb der Inklusionen (Abbildung 4.3 unten). Der antigengereinigte und zusätzlich abgereicherte Antikörper wurde im Folgenden für alle fluoreszenzmikroskopischen und Westernblot-Experimente verwendet.

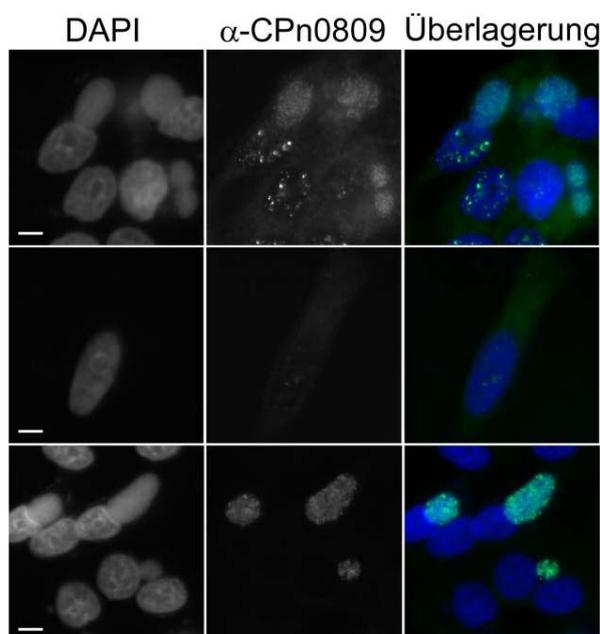


Abbildung 4.3: Abreicherung des antigengereinigten CPn0809

In der oberen Zeile ist die Färbung von infizierten HEp-2-Zellen (60 hpI) mit dem antigengereinigten CPn0809 Antiserum und einem sekundären Alexa-488 konjugierten anti-Kaninchen Antikörper (grün) gezeigt. Das Signal im Zytosol und Kern der Zelle wurde durch Abreicherung des Antikörpers reduziert (Kapitel 3.7.9.3 und 3.7.9.4). In der mittleren Zeile wurden nicht-infizierte HEp-2-Zellen mit dem antigengereinigten CPn0809 Antikörper nach Abreicherung gefärbt. Die unterste Zeile zeigt eine Färbung von infizierten HEp-2-Zellen (60 hpI) mit dem antigengereinigten, abgereicherten CPn0809 Antikörper. Die DNS wurde mit DAPI (blau) gefärbt.

Maßstabsleiste: 5 µm.

Erste Analysen wiesen darauf hin, dass CPn0809 mit Elementarkörperchen (EBs) assoziiert ist (Herbst 2011) (Kapitel 1.6). Daher wurde zunächst die Expression und Lokalisierung des Proteins während der Infektion mit *C. pneumoniae* detailliert analysiert.

4.1.3.1 CPn0809 ist ein spät exprimiertes Protein

Zur Analyse der Expression von CPn0809 wurde das Ganzzelllysate infizierter Zellen mittels Westernblot untersucht. Die Probenentnahmen erfolgten im Abstand von 6 h von Infektionsbeginn (0 hpI) bis 84 hpI (Kapitel 3.4.7). CPn0809 wurde bereits in den ersten Stunden der Infektion deutlich detektiert (Abbildung 4.4). Interessanterweise sank der Proteinlevel von 0 hpI bis 6 hpI deutlich und erreichte zum Zeitpunkt 24 hpI ein Minimum.

Um die chlamydiale Partikelmenge abzuschätzen, wurden die Expression des Chaperons DnaK, der ribosomalen Untereinheit S1 und des Membranproteins MOMP (major outer membrane protein) der Chlamydien ebenfalls untersucht. Die Mengen der Kontrollproteine blieben zu Beginn der Infektion (0 hpi bis 12 hpi) konstant und nahmen erst zwischen 18 und 30 Stunden nach Infektionsbeginn zu, was mit dem Beginn und Verlauf der Replikationsphase der Bakterien korreliert (vgl. Kapitel 1.3.3). Die Expressionsmuster der Kontrollproteine deuteten darauf hin, dass die Intensität des CPn0809-Signals nicht von der Zahl der Bakterien abhängig war. Zwischen 12 und 24 hpi war nur eine schwache Bande für CPn0809 erkennbar und ab 30 hpi nahm die Proteinmenge langsam zu. Ein deutlicher Anstieg der Expression von CPn0809 war zwischen 36 und 42 hpi zu detektieren. Anschließend erhöhte sich die Proteinmenge bis zum Beobachtungsende langsam weiter. Mit zunehmender CPn0809-Proteinmenge wurden niedermolekulare Banden im Blot detektiert, welche möglicherweise Banden von Degradationsprodukten sind.

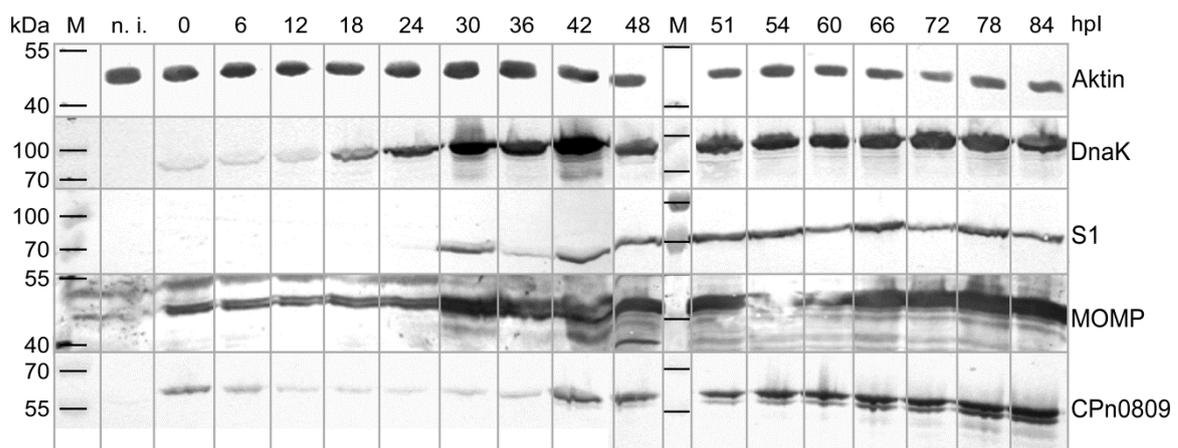


Abbildung 4.4: Expression von CPn0809 im Verlauf der *C. pneumoniae* Infektion

Je Messpunkt wurden zur Konfluenz gewachsene HEp-2 Zellen von zwei Zellkulturflaschen (25 cm²) geerntet (Kapitel 3.4.2). Die Zellen wurden wie in Kapitel 3.4.2.1 beschrieben behandelt und für die Westernblot-Analyse aufgearbeitet. Aufgetragen wurden gleiche Volumina der Proben für nicht-infizierte Zellen (**n.i.**) und infizierte Zellen, die nach der angegebenen Zeit geerntet wurden. Auf der linken Seite der Abbildung sind die Molekülmassen des Proteinstandards (**M**) in Kilodalton (**kDa**) angegeben. Auf der rechten Seite sind die Proteine aufgeführt, die mittels spezifischer Antikörper im Westernblot markiert sind. Die Detektion erfolgte durch sekundäre, mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugierte Antikörper. Als Ladekontrolle für Humanzellen diente β -Aktin mit einer theoretischen Masse von 42 kDa. An chlamydialen Proteinen wurden DnaK (72 kDa), S1 (62 kDa) sowie MOMP (42 kDa) und CPn0809 (50 kDa) detektiert. Alle Antikörper wurden für den Westernblot wie in Tabelle 2.7.1 beschrieben verdünnt. Der Zeitpunkt nach Zugabe der Chlamydien und Zentrifugation wurde als Beginn der Infektion (Zeitpunkt 0 hpi) definiert, alle Infektionszeitpunkte sind in Stunden nach Infektionsbeginn (**hpi**) angegeben.

Dieses Ergebnis bestätigt frühere Befunde (Kapitel 1.6) und zeigt, dass CPn0809 zu den spät exprimierten Proteinen gehört und mit der Redifferenzierung zu infektiösen EBs assoziiert ist.

Die Tatsache, dass CPn0809 direkt nach der Infektion und auch noch 6 Stunden nach Infektionsbeginn deutlich detektiert wurde, ist ein Hinweis auf eine Funktion in der frühen Phase der Infektion.

4.1.3.2 Die Immunfluoreszenzmikroskopie zeigt CPn0809 assoziiert mit der Inklusion

Im Folgenden wurde die Lokalisierung von CPn0809 während der Infektion mikroskopisch untersucht. Infizierte HEP-2-Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten des chlamydialen Infektionszyklus analysiert. Aufgrund der in Kapitel 4.1.3.1 gezeigten Ergebnisse wurden im Folgenden auch sehr frühe Zeitpunkte (0 min pI bis 1 hpI) analysiert.

Wie erwartet, zeigten durch DAPI markierte chlamydiale Partikel an den Humanzellen in den ersten Stunden der Infektion CPn0809-Signale (Abbildung 4.5). Beispielhaft sind hier mikroskopische Aufnahmen von Zellen 30 min nach Infektionsbeginn und 1 hpI gezeigt. In der Vergrößerung ist das CPn0809-Signal mehr oder weniger diffus an einer Seite des DNS-Signals akkumuliert. Partikel, die ein vergleichbares CPn0809-Signal aufwiesen, wurden bis zwei Stunden nach Infektionsbeginn beobachtet (nicht gezeigt). Es ist deutlich erkennbar, dass in der frühen Infektion (30 min pI und 1 hpI) nicht alle DNS-Signale auch ein CPn0809-Signal zeigen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Chlamydien-Infektion trotz verschiedener Hilfstechniken, wie beispielsweise Zentrifugation während der Adhäsionsphase, nicht synchron abläuft. So wurde häufig beobachtet, dass einige Inklusionen auch in der späten Infektion wesentlich kleiner waren als andere und keine CPn0809-Signale aufwiesen (nicht gezeigt). Es ist möglich, dass bei der Reinigung der Chlamydien aus der späten Infektion ein Teil von Bakterien geerntet wurde, die noch kein CPn0809-Signal aufwiesen (Kapitel 3.4.3).

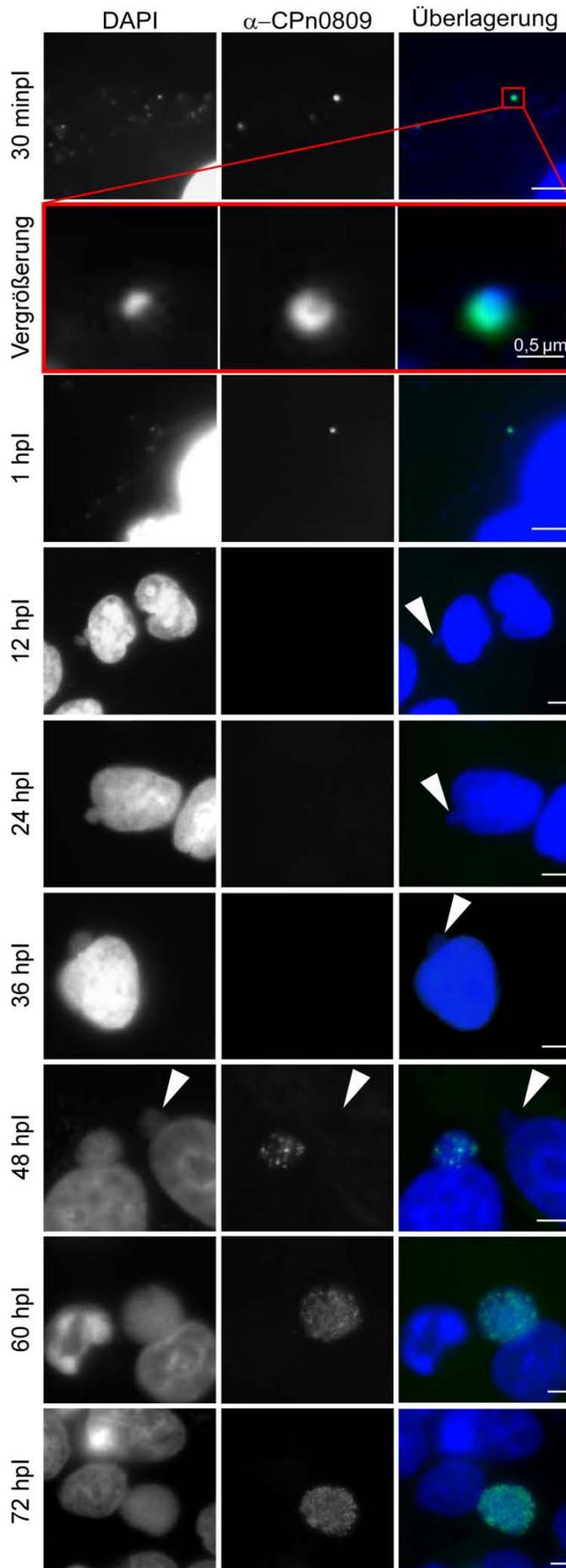


Abbildung 4.5: Lokalisation von CPn0809 in der Infektion

Zur mikroskopischen Untersuchung wurden HEp-2-Zellen halbkonfluent auf Deckgläschen ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit einer Suspension gereinigter EBs einer MOI von 4 für frühe und von 1 für spätere Zeitpunkte infiziert und zu den indizierten Zeitpunkten mit Methanol fixiert (Kapitel 3.8.1.1). Die Infektion erfolgte wie in Kapitel 3.4.7 beschrieben.

Anschließend wurden die Zellen mit dem Antikörper gegen CPn0809 und einem sekundären Alexa-488 konjugierten anti-Kaninchen Antikörper (grün) gefärbt. Die DNS wurde durch Färbung mit DAPI (blau) sichtbar gemacht.

In der Zeile „Vergrößerung“ wurde der markierte Ausschnitt aus der Zeile „30 min pi“ größer dargestellt.

Die weißen Dreiecke weisen auf CPn0809-negative Inklusionen. CPn0809-positive Inklusionen weisen gepunktete CPn0809-Signale auf.

Die Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axioskop Fluoreszenzmikroskop generiert.

Die Maßstabsleiste entspricht, sofern nicht anders angegeben, 5 μ m.

Zwischen 12 und 36 hpI wurde mikroskopisch kein CPn0809-Signal in infizierten Humanzellen detektiert, obwohl zu diesen Zeitpunkten schon Inklusionen in der Peripherie des Zellkerns der infizierten Humanzelle beobachtbar sind (Dreiecke). Die Zellen, die für 48 h infiziert wurden, zeigen vereinzelte, punktierte CPn0809-Signale innerhalb der Inklusion (Abbildung 4.5 „48 hpI“). Zu diesem Zeitpunkt wurden aber auch Inklusionen beobachtet, die keine entsprechenden Signale aufwiesen (Abbildung 4.5 markiert mit Dreieck). Mit fortschreitender Infektion nahm die Menge der punktierten Signale innerhalb einer Inklusion langsam zu, was zeitlich mit der Reifung von RBs und der Re-Differenzierung zu EBs zusammenfällt. Aufgrund der dicht gepackten DNS-Signale konnte für die Infektion ab 48 hpI keine Aussage über eine Assoziation des CPn0809-Signals mit den Bakterien gemacht werden. Da in der frühen Infektion (0-2 hpI) DAPI-markierte chlamydiale Partikel mit CPn0809-Signalen kolokalisiert sind, ist es wahrscheinlich, dass die beobachteten Signale in der späten Infektion (48-72 hpI) ebenfalls mit den Bakterien assoziiert sind. Es lässt sich feststellen, dass die punktierten CPn0809-Signale immer mit Inklusionen assoziiert waren. Zu keinem Zeitpunkt wurden Signale im Zytosol der Zelle detektiert.

Die Beobachtung, dass CPn0809-Signale stets mit chlamydialen Partikeln innerhalb der Inklusionen assoziiert waren, steht im Widerspruch zu bereits publizierten Daten, laut welcher CPn0809 ein sekretiertes Protein ist (Lugert *et al.* 2004) (vgl. Kapitel 1.6). Um die eigenen Daten zu bestätigen, wurde ein Experiment zum Test der Spezifität des Antikörpers durchgeführt (Abbildung 4.6). Dazu wurden grün fluoreszierende Latexkügelchen mit rekombinantem CPn0809N-Protein (As 1-253) beschichtet und anschließend mit dem antigengereinigten und abgereicherten Antikörper inkubiert (Kapitel 3.7.10.1). Der Antikörper wird, wenn er das Antigen spezifisch erkennt, an die Kügelchen adsorbiert, was zu einer Verarmung der Antikörperlösung führt. Wird diese verarmte Antikörperlösung zur Färbung infizierter Zellen verwendet, sollte kein CPn0809-Signal auftreten.

Der CPn0809-Antikörper ist auf den mit rekombinantem CPn0809N-Protein beschichteten Latexkügelchen detektierbar und wurde somit an diese adsorbiert (Abbildung 4.6 A „CPn0809N“). Dagegen war der CPn0809-Antikörper auf BSA beschichteten Kügelchen nicht detektierbar. Diese Kontrolle zeigt, dass der Antikörper spezifisch an das rekombinante CPn0809N-Protein bindet, mit welchem die Kügelchen beschichtet sind.

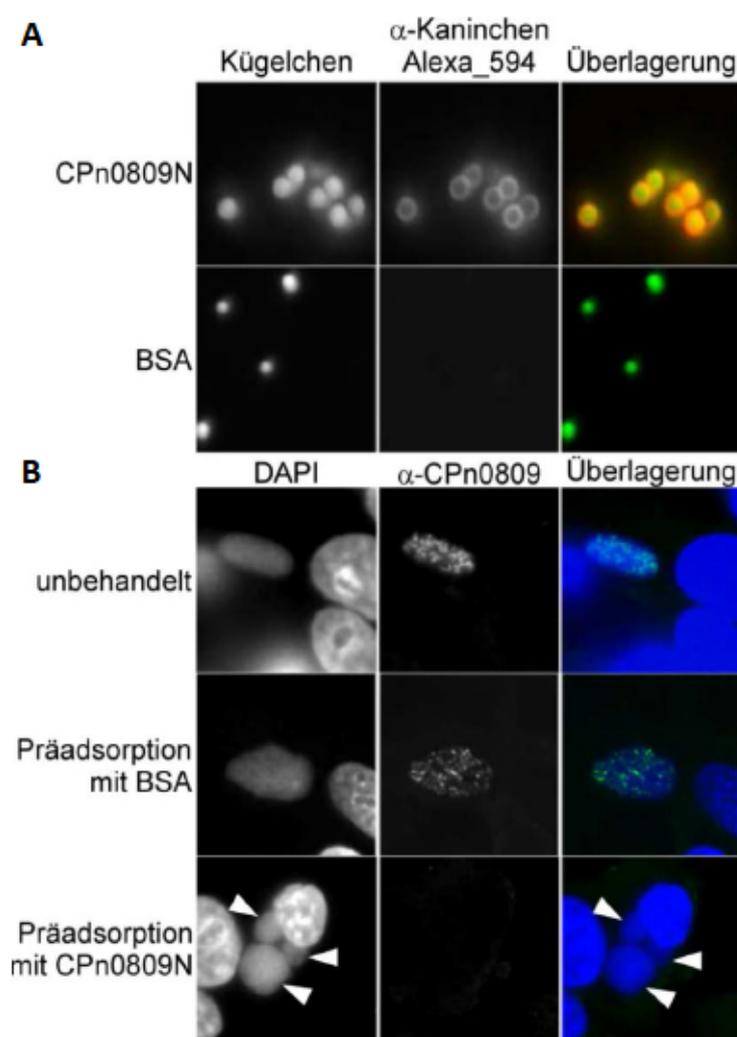


Abbildung 4.6: Präadsorption des CPn0809-Antikörpers

A. Grün fluoreszierende Latexkugeln wurden mit rekombinantem CPn0809N bzw. BSA beschichtet und mit dem anti-CPn0809-Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die Adsorption des Antikörpers an die Kügelchen durch Markierung mit einem sekundären Alexa-594-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper (rot) fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Nur die CPn0809N beschichteten Kügelchen zeigen ein ringförmiges CPn0809-Antikörper Signal.

B. HEp-2-Zellen wurden für 55 h infiziert und anschließend mit anti-CPn0809-Antikörperlösung gefärbt (grün), die nicht behandelt (unbehandelt), mit BSA-beschichteten Kügelchen (Präadsorption mit BSA) oder mit CPn0809N-beschichteten Kügelchen inkubiert worden war (Präadsorption mit CPn0809N). Die DNS wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Weiße Dreiecke deuten auf Inklusionen, die nun kein CPn0809-Signal zeigen.

Infizierte Zellen, die mit dem unbehandelten Antikörper gefärbt wurden, zeigten das punktierte CPn0809-Signal innerhalb der Inklusionen (Abbildung 4.6 B „unbehandelt“). Infizierte Zellen, die zur Kontrolle mit CPn0809-Antikörperlösung gefärbt wurden, welche zuvor mit BSA-beschichteten Latexkugeln inkubiert worden war, zeigten die für den CPn0809-Antikörper typischen punktierten Signale innerhalb der Inklusionen (Abbildung 4.6 B „Präadsorption mit BSA“). Dagegen konnten bei Färbungen keine Signale detektiert werden, wenn die CPn0809-Antikörperlösung zuvor mit CPn0809N-beschichteten Latexkugeln inkubiert worden war (Abbildung 4.6 B „Präadsorption mit CPn0809N“ Dreiecke). Der CPn0809-Antikörper wurde erfolgreich durch die CPn0809N-beschichteten Latexkugeln aus der Antikörperlösung entfernt. Bei den beobachteten punktierten Signalen innerhalb der Inklusion handelt es sich somit um das spezifisch detektierte CPn0809.

Im Folgenden sollte detailliert betrachtet werden, wo CPn0809 innerhalb der Inklusion lokalisiert, um zusätzliche Hinweise auf die Funktion von CPn0809 zu erhalten. Für diese Untersuchung wurden Kofärbungen mit IncA, einem chlamydialen Protein, das in der Inklusionsmembran verankert ist, durchgeführt (Bannantine *et al.* 2000; Flores *et al.* 2007). Da eine Zunahme an CPn0809-Signalen erst ab 48 hpI zu beobachten war, wurden die beiden späten Zeitpunkte 48 hpI und 80 hpI, konfokalmikroskopisch betrachtet.

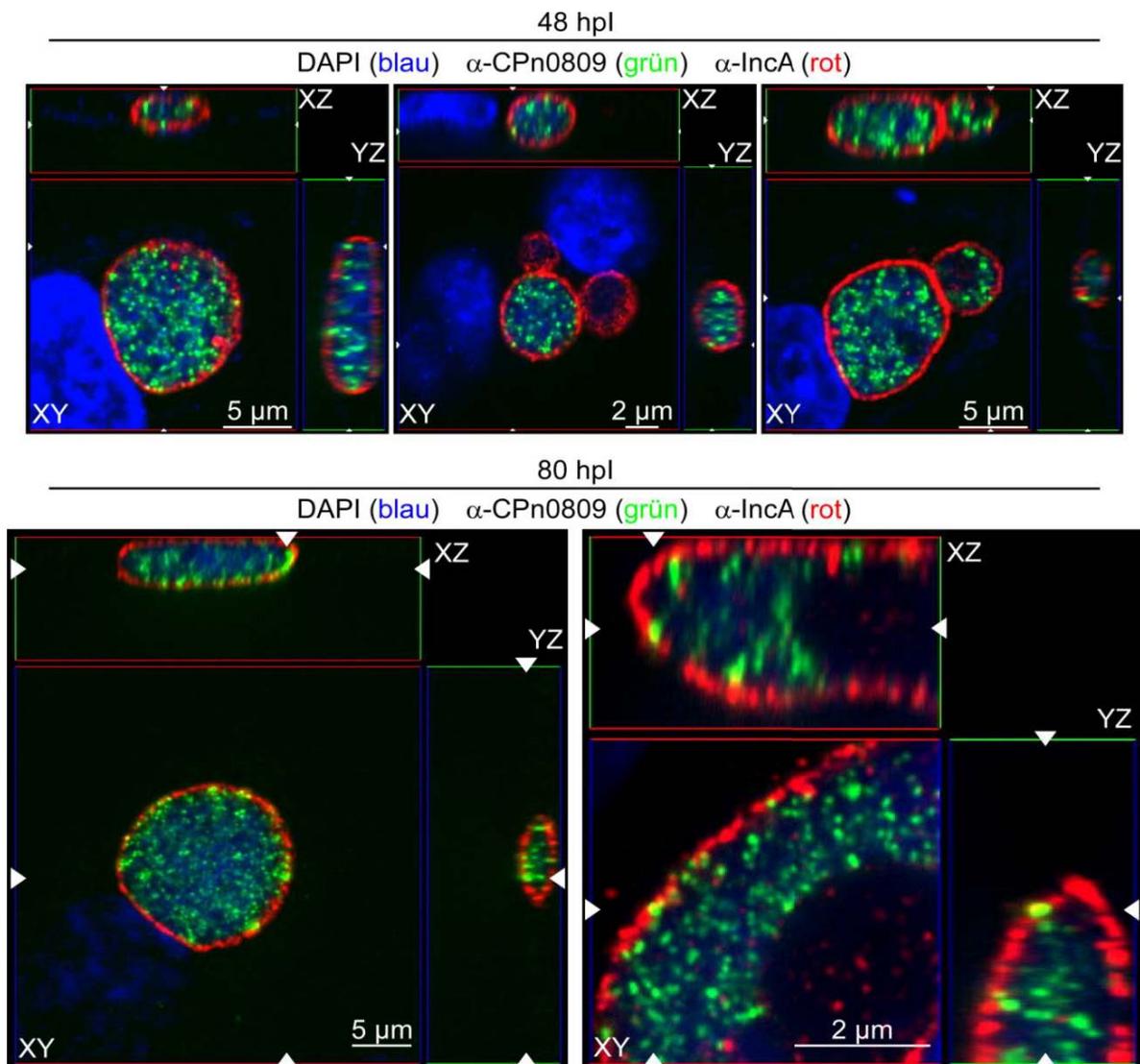


Abbildung 4.7: Kofärbung von CPn0809 und IncA

HEp-2-Zellen wurden mit einer Suspension von gereinigten EBs (MOI=1) infiziert. Nach 48 bzw. 80 hpI wurden die Zellen für 10 min mit Methanol bei RT fixiert. Die infizierten Zellen wurden mit dem anti-CPn0809-Antikörper in Verbindung mit einem sekundären Alexa-488-konjugierten Antikörper (grün) sowie einem anti-IncA-Antikörper in Verbindung mit einem sekundären Alexa-594-konjugierten Antikörper (rot) gefärbt. Die DNS wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Die Aufnahmen wurden konfokal mit einem Zeiss Spinning-Disk Mikroskop generiert.

Die Analysen bestätigten, dass sich die punktierten CPn0809-Signale innerhalb der Inklusion befinden, die durch das IncA-Signal begrenzt wird (Abbildung 4.7). Zu den betrachteten Zeitpunkten wurden keine CPn0809-Signale im Zytosol der Wirtszelle oder außerhalb der Inklusion detektiert. Die drei Beispielbilder der Färbungen der für 48 h infizierten Humanzellen zeigen eine gleichmäßige Verteilung der CPn0809-Signale in der gesamten Inklusion. In einigen Fällen sind punktierte CPn0809-Signale sehr nahe an der Inklusionsmembran zu erkennen und liegen gelegentlich in Bereichen, in denen das überwiegend kontinuierliche IncA-Signal unterbrochen ist. Auch Analysen der späten Infektion (80 hpI) zeigen ein vergleichbares Bild der innerhalb der gesamten Inklusion verteilten CPn0809-Signale, welche gelegentlich in der Inklusionsmembran mit dem IncA-Signal kolokalisieren.

In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass der in dieser Arbeit verwendete antigengereinigte und abgereicherte anti-CPn0809-Antikörper spezifisch CPn0809 in der chlamydialen Infektion detektiert. Da die in diesem Kapitel gezeigten fluoreszenzmikroskopischen Analysen darauf hinwiesen, dass CPn0809 eine Rolle in der frühen Infektion spielt, wurden im Folgenden detaillierte Untersuchungen der frühen Infektion durchgeführt.

4.1.3.3 CPn0809 ist während der Internalisierung mit EBs assoziiert

Wenige Minuten nach Infektionsbeginn wurde CPn0809 mit DAPI-markierten Partikeln in der Nähe von Humanzellen detektiert (vgl. Abbildung 4.5 „30 min pI“ und „1 hpI“). In den folgenden Experimenten wurde die Lokalisierung der CPn0809-Signale näher untersucht.

Die chlamydialen Partikel wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen das *C. pneumoniae* Lipopolysaccharid (LPS), welche auf der Oberfläche der Chlamydien lokalisieren, oder einem Antikörper gegen das intra-chlamydiale Chaperon DnaK und dem CPn0809-Antikörper gefärbt. Färbungen von kurz infizierten Humanzellen (2 bis 20 min) zeigten, dass bakterielle DNS-Partikel häufig kein Signal für eines der gefärbten chlamydialen Proteine aufwiesen, wie es bereits bei CPn0809-Färbungen beobachtet wurde (Abbildung 4.8) (vgl. Kapitel 4.1.3.2). In einigen Fällen zeigten DNS-Partikel nur eines der erwarteten Signale, oder es fanden sich kolokalisierende Signale für die mit Antikörpern gefärbten Proteine, jedoch keine DNS-Signale. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass durch die Standard-Reinigungsmethode, mittels derer die infektiösen EBs gewonnen werden und in deren Verlauf die Bakterien häufiger Sonifikation ausgesetzt sind (Kapitel 3.4.2 und 3.4.3), viele zerstörte Bakterien mit aufkonzentriert werden.

Daneben wurden in den ersten Minuten der Infektion (2 bis 20 min pI) viele Beispiele für kolokalisierende CPn0809- und chlamydiale LPS-Signale detektiert (Abbildung 4.8 A). Das CPn0809-Signal erschien in der Kofärbung in distinkten Bereichen der Partikel deckungsgleich mit dem ringförmig um die DNS liegenden LPS-Signal (Abbildung 4.8 A „Vergrößerung“). Es sind Vergrößerungen verschiedener LPS-positiver Partikel gezeigt, an denen das CPn0809-Signal auf einer Seite mit dem LPS-Signal überlagert (Abbildung 4.8 A „Beispiele Vergrößerungen“).

Signale des Chaperons DnaK kolokalisieren ebenfalls partiell mit CPn0809-Signalen (Abbildung 4.8 B). In einigen Fällen war das DnaK-Signal eines bakteriellen Partikels durch das CPn0809-Signal eingeschlossen, es sind aber auch Beispiele zu beobachten, in denen beide Signale kolokalisieren (vgl. Abbildung 4.8 B Vergrößerungen 1 und 2).

Auch in der konfokalen Mikroskopie erschien das CPn0809-Signal häufig akkumuliert an einer Seite des chlamydialen DNS-Signals (vgl. Kapitel 4.1.3.2). Interessanterweise trifft diese Beobachtung auch in einigen Beispielen für die Antikörpersignale der beiden anderen betrachteten Proteine LPS und DnaK zu (Abbildung 4.8 A „20 min pI“ Vergrößerung 1 und B Vergrößerung 2).

Um zu analysieren, ob die beobachteten CPn0809-positiven Partikel sich an der Zellmembran befinden, wurden Humanzellen infiziert, die mCherry mit einem Glycosylphosphatidylinositol-Anker (mCherryGPI) exprimierten, welches vor allem die Plasmamembran und den Golgi-Apparat markiert (Abbildung 4.8 C). Der gezeigte Ausschnitt weist zwei chlamydiale Partikel an der mCherryGPI-markierten Plasmamembran der Humanzelle auf. Beide Partikel zeigen ein CPn0809-Signal und liegen an einer Stelle der Plasmamembran, an der das rote mCherry Signal intensiver ist (Abbildung 4.8 C Vergrößerung).

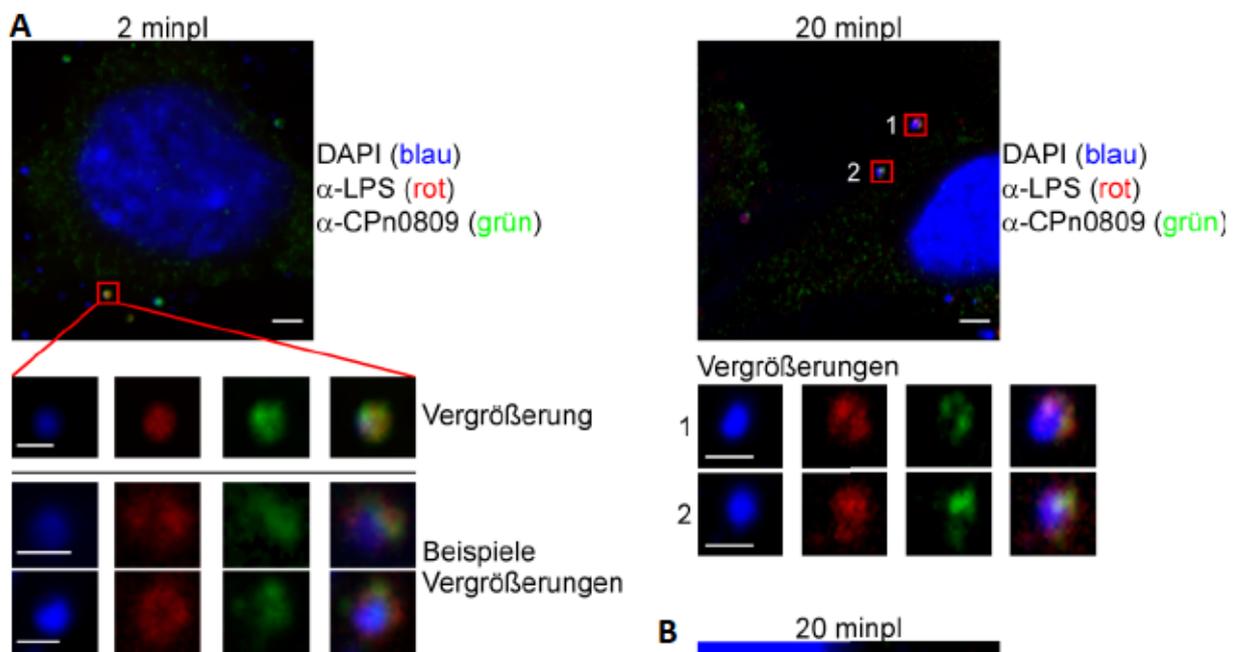


Abbildung 4.8: Kolokalisation von CPn0809 mit *C. pneumoniae* Proteinen und der Humanzellmembran

HEp-2-Zellen wurden mit einer Suspension von gradientengereinigten EBs (MOI=2) infiziert (Kapitel 3.4.3). Die Zellen wurden nach 2 bzw. 20 min mit $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem Methanol 5 min fixiert und anschließend mit dem anti-CPn0809-Antikörper (grün) und DAPI (blau) gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit einem Nikon C2 Konfokalmikroskop generiert.

A. Die infizierten Zellen wurden zusätzlich mit einem *C. pneumoniae* spezifischen anti-LPS-Antikörper gefärbt.

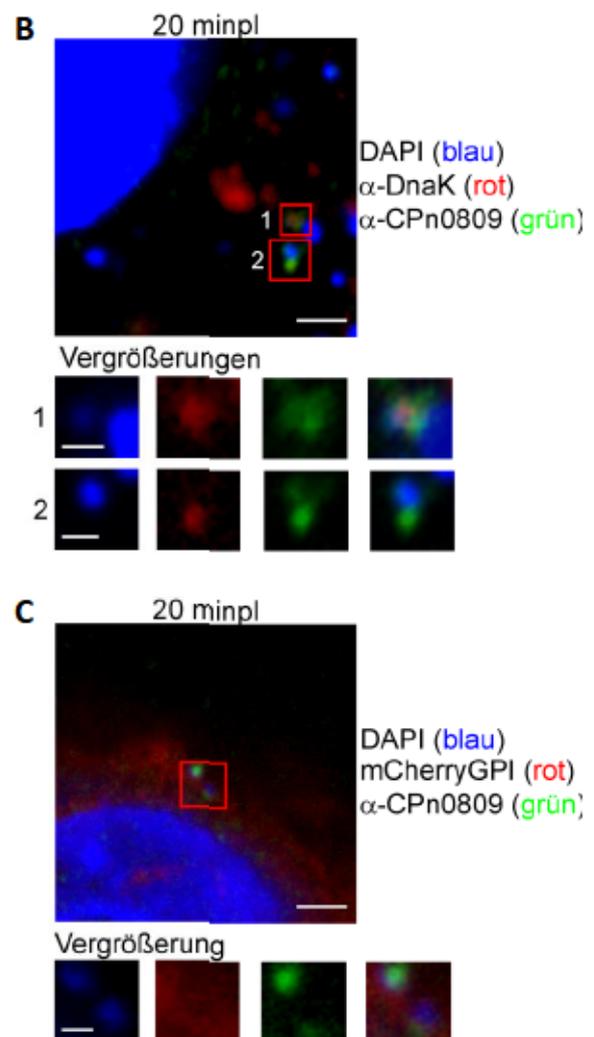
Die markierten Bereiche der Übersichtsbilder sind vergrößert dargestellt und für 2 minpi sind zusätzlich weitere Beispiele gezeigt, die auf anderen infizierten Zellen gefunden wurden.

B. Infizierte Zellen wurden 20 minpi mit einem anti-DnaK-Antikörper gefärbt. Gezeigt sind zwei Vergrößerungen aus der Übersichtsbildung.

C. HEp-2-Zellen wurden 18 h vor der Infektion mit einem Konstrukt transfiziert (Kapitel 3.6.1), das mCherry fusioniert an einen GPI-Anker codiert.

Maßstabsleiste der Übersichtsbilder: $3\text{ }\mu\text{m}$.

Maßstabsleiste der Vergrößerungen: $0,5\text{ }\mu\text{m}$.



Die Lokalisierung des CPn0809-Signals an der Plasmamembran der Humanzelle wurde zusätzlich durch Färbung mit WGA (Wheat germ agglutinin) analysiert. WGA bindet spezifisch an N-Acetylglucosamin und Sialinsäuren und markiert so vor allem Glykoproteine der Plasmamembran und vesikuläre Strukturen innerhalb der Zelle (Abbildung 4.9 A). Die so markierte Plasmamembran erscheint in der mikroskopischen Aufnahme schärfer als das diffusere mCherry-Signal und lässt eine präzisere Aussage über die Position der CPn0809-positiven Partikel zu (vgl. Abbildung 4.8 C). So wurden Partikel, die ein CPn0809-Signal aufwiesen, 10 min pI an der Plasmamembran der Humanzelle detektiert (Abbildung 4.9 A). Die Orthogonalansichten zeigten, dass sich diese Partikel noch außerhalb der Zelle befanden. Auch hier waren bakterielle DNS-Partikel zu erkennen, die kein CPn0809-Signal zeigten.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob Chlamydien, die ein CPn0809-Signal zeigten, internalisiert werden. Hierzu wurden Zellen transient mit einem Konstrukt transfiziert, das die Expression einer GFP-Fusion der Pleckstein-Homologie (PH)-Domäne der Burton-Tyrosinkinase (BTK) ermöglichte. Es ist bekannt, dass die PH-Domäne der BTK spezifisch an Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (Pi3,4,5P_3) in der Plasmamembran bindet. Für *C. trachomatis* Serovar L2 wurde bereits gezeigt, dass Pi3,4,5P_3 an der Internalisierungsstelle synthetisiert wird und bei der Internalisierung eine Rolle spielt (Kapitel 1.3.3) (Lane *et al.* 2008). Erste Untersuchungen lassen die Vermutung zu, dass Pi3,4,5P_3 bei der Internalisierung von *C. pneumoniae* ebenfalls gebildet wird (persönliche Kommunikation mit Dr. Katja Mölleken, Universität Düsseldorf).

BTK-PH-GFP exprimierende Zellen zeigten ein diffuses Signal in der transfizierten Zelle, das in einigen Bereichen der Plasmamembran intensiver erschien (Abbildung 4.9 B). In der frühen Infektion (10-30 min pI) von transfizierten Zellen wiesen einige bakterielle Partikel ein ringförmiges BTK-PH-GFP-Signal auf. Die Häufigkeit dieser ringförmigen Akkumulation war in derselben Infektion von Zelle zu Zelle sehr variabel.

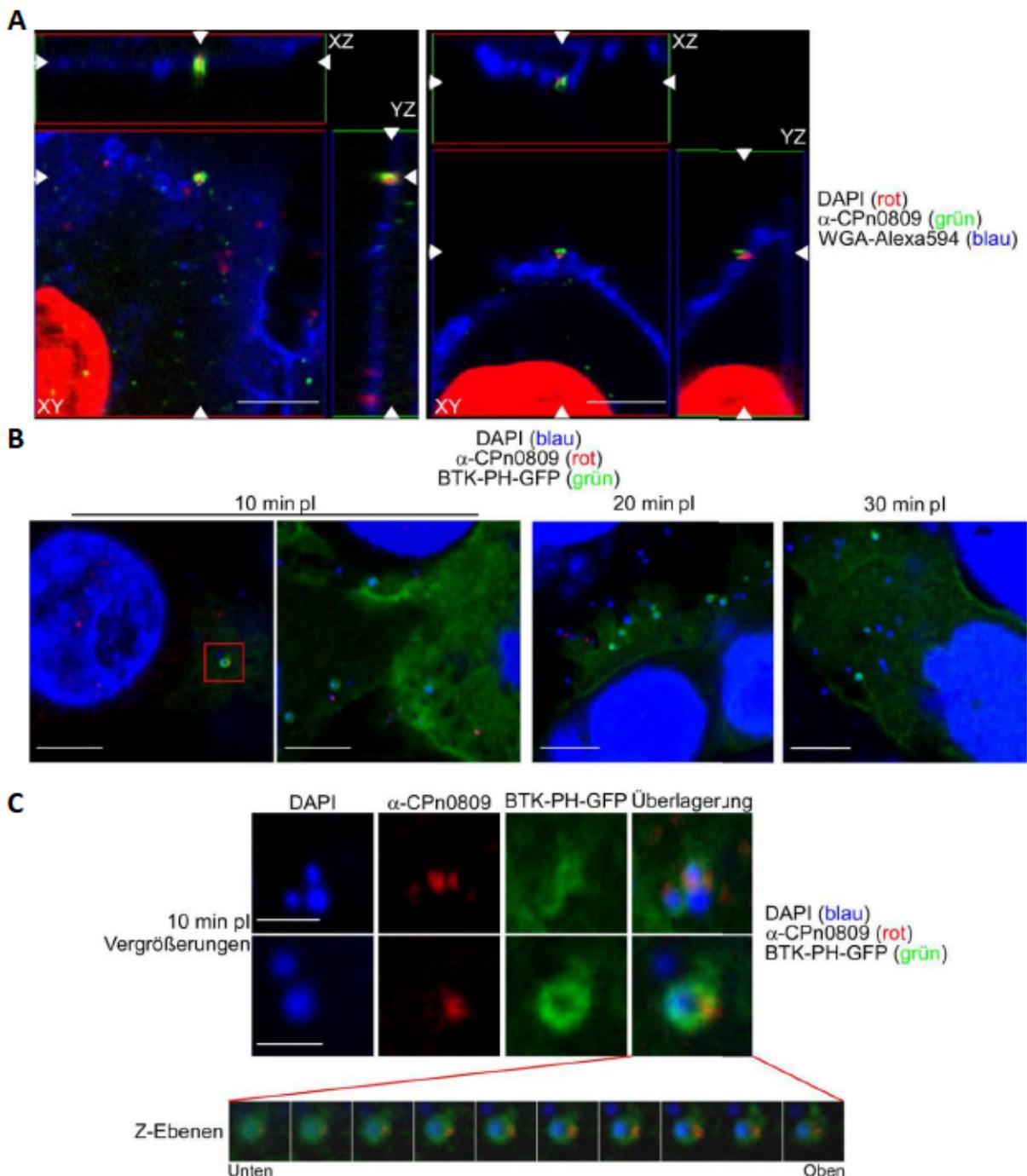


Abbildung 4.9: Kolokalisation von CPn0809 mit der Plasmamembran von Humanzellen

A. HEp-2-Zellen wurden mit einer Lösung gradientengereinigter EBs (MOI=0,1) infiziert und 2 min pi mit Methanol für 10 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem anti-CPn0809-Antikörper (grün), Alexa-594-gekoppeltem WGA (blau) und DAPI (rot) gefärbt. Die konfokale Mikroskopie wurde mit einem Zeiss Spinning-Disc Mikroskop durchgeführt. Maßstabsleiste: 5 μ m

B. HEp-2-Zellen wurden 18 h vor der Infektion mit einem BTK-PH-GFP-Konstrukt transfiziert (grün). Die Zellen wurden mit einer Lösung gradientengereinigter EBs (MOI=2) infiziert und zu den indizierten Zeitpunkten mit -20 °C kaltem Methanol für 5 min fixiert. Die Zellen wurden mit dem anti-CPn0809-Antikörper (rot) und DAPI (blau) gefärbt. Die konfokalen Bilder wurden mit einem Nikon C2 Mikroskop generiert. Maßstabsleiste: 5 μ m

C. Oben: Es sind zwei Vergrößerungen von CPn0809-positiven Partikeln abgebildet, die mit einem BTK-PH-GFP-Signal kolokalisieren. Unten: Der unter B markierte Ausschnitt bei 10 min pi ist detailliert als Vergrößerung und Aufgliederung der Z-Ebenen gezeigt. Maßstabsleiste: 1 μ m.

Chlamydien mit einem ringförmigen BTK-PH-GFP-Signal lagen direkt an der Plasmamembran der humanen Wirtszelle und zum Zeitpunkt der Fixierung wurden sie vermutlich internalisiert. In Untersuchungen mit *C. trachomatis* wurde gezeigt, dass die Rekrutierung von BTK-PH-GFP zum Bildungsort von Pi3,4,5P_3 transient ist, wodurch die hohe Variabilität der auftretenden Signale zu erklären wäre. Es war jedoch erkennbar, dass viele DNS-Partikel, die mit einem BTK-PH-GFP-Signal kolokalisierten, kein CPn0809-Signal zeigten. Nur selten wies ein CPn0809-markiertes DNS-Signal auch einen BTK-PH-GFP-Signal auf (Abbildung 4.9 C). Es war deutlich, dass die CPn0809-Signale jeweils auf einer bestimmten Seite um die gezeigten DNS-Signale herum lokalisierten (Vergrößerungen). Interessanterweise wurden Beispiele gefunden, in denen das polare CPn0809-Signal mit einem Bereich des ringförmigen BTK-PH-GFP-Signals kolokalisierte (Z-Ebenen).

In den Abbildungen kurz infizierter Humanzellen waren, neben der seltenen Kolokalisation von BTK-PH-GFP-, CPn0809- und DNS-Signalen, zwei weitere Arten von Ereignissen zu erkennen: (i) DNS-Signale mit BTK-PH-GFP-Ring zeigten kein CPn0809-Signal und (ii) DNS-Signale, die ein CPn0809-Signal zeigten, jedoch keine Akkumulation des BTK-PH-GFP-Signals (Abbildung 4.9 B). Diese Beobachtungen könnten einerseits auf Bakterien zurückzuführen sein, die durch die Reinigungsmethode zerstört wurden. Andererseits ist es aber auch möglich, dass das CPn0809-Signal von Partikeln, die im Begriff stehen internalisiert zu werden, ab einem bestimmten Zeitpunkt nicht mehr detektiert wurde, da die vom Antikörper detektierten Epitope des CPn0809 im sich schließenden Endozytosevesikel räumlich nicht mehr zugänglich sind.

Da es nicht möglich ist, Lebendzellfärbungen mittels Immunfluoreszenzfärbung durchzuführen oder *C. pneumoniae* genetisch zu manipulieren, um ein Protein gezielt mit einem Fluorochrom zu fusionieren, konnte die Lokalisierung von CPn0809 während der Adhäsion und Internalisierung nicht betrachtet werden. So konnte nicht abschließend geklärt werden, ob in den hier beschriebenen Versuchen die Zugänglichkeit des CPn0809 sich im Verlauf der Internalisierung änderte oder ob Bakterien, die kein CPn0809 aufwiesen ebenfalls internalisiert wurden. Die vorgestellten Daten zeigten, dass CPn0809 ein spät in der Infektion stark exprimiertes Protein ist, das mit bakteriellen Partikeln kolokalisiert und auch zum Zeitpunkt der beginnenden Internalisierung detektiert wurde.

4.1.4 Die Expression von CPn0809 ist toxisch für *E. coli*

Im nächsten Schritt der Untersuchung von CPn0809 sollten biochemische Interaktionsstudien durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurden Konstrukte zur Expression von

rekombinantes CPn0809 generiert. Hierbei erwies sich die Generierung eines CPn0809 Expressionskonstruktes des Volllängenproteins als sehr schwierig. Meist wurden nur geringe Mengen DNS aus entsprechenden Plasmidisolierungen gewonnen. Sequenzierungen der erhaltenen DNS ergaben häufig Nukleotidaustausche oder -deletionen innerhalb der CPn0809 codierenden Sequenz. Die Vermutung lag nahe, dass geringe Mengen des Proteins, welche durch die basale Aktivität des *Lac*-Promotors exprimiert wurden, einen toxischen Effekt auf die *E. coli*-Zellen haben. Um die vorzeitige Expression des Proteins zu verhindern, also die vollständige Repression des *Lac*-Promotors zu erreichen, wurde das LB-Medium für Inkubationsschritte während der Klonierung mit 1 % Glukose versetzt. Auf diese Weise wurde eine fehlerlose Klonierung der codierenden Sequenz des Volllängenproteins als His₆-markiertes Fusionsprotein erreicht.

Dagegen war die rekombinante Expression des N-terminalen Bereiches des CPn0809 (CPn0809N As 1-253) für die Antigenreinigung des Antikörpers in vorhergehenden Versuchen unter Standardbedingungen erfolgreich (vgl. Kapitel 4.1.3). Das Gleiche traf auf ein Konstrukt zu, das die Expression einer GST-markierten Version des C-terminalen Teils des Proteins (CPn0809C As 406-488) erlaubte. Um diese verschiedenen Phänotypen eingehender zu betrachten, wurde das Wachstum von *E. coli*-Expressionskulturen während der Expression der drei Proteinvarianten untersucht (Abbildung 4.10 A).

Das Wachstum der Bakterien wurde mit oder ohne Induktion der Proteinexpression untersucht (Abbildung 4.10). Die nicht-induzierten Kulturen wuchsen über den gesamten Versuchszeitraum stetig weiter und erreichten bis Versuchsende eine OD₆₀₀ von ca. 1,4. Dagegen wuchsen Kulturen, die CPn0809N und CPn0809C exprimierten, nach Induktion der Proteinexpression etwas langsamer und erreichten bis Versuchsende eine OD₆₀₀ von 0,8 bis 1,0 (vgl. Abbildung 4.10 A CPn0809N und CPn0809C). Interessanterweise wuchsen die Kulturen, die das Volllängenprotein exprimierten, nach Induktion der Proteinexpression gar nicht mehr weiter und es wurde sogar eine leichte Verringerung der OD₆₀₀ bis Versuchsende beobachtet, was darauf hinweist, dass die Zellen dieser Kulturen lysieren (vgl. Abbildung 4.10 A CPn0809).

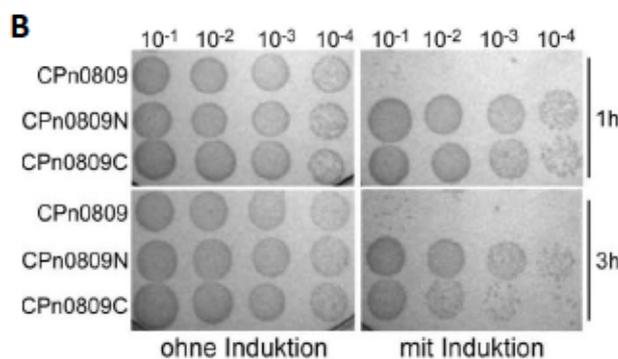
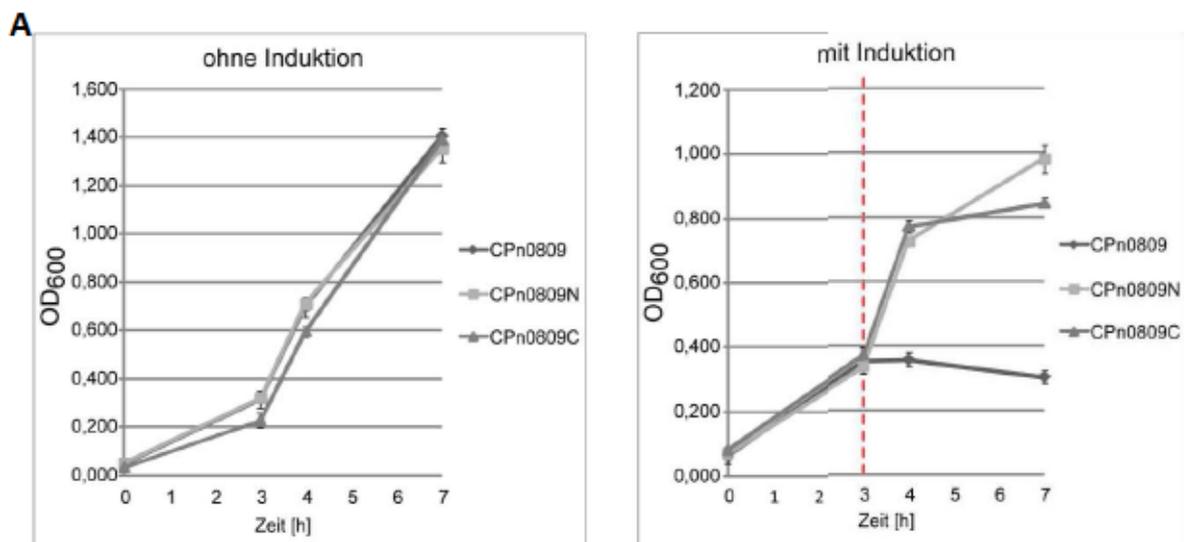
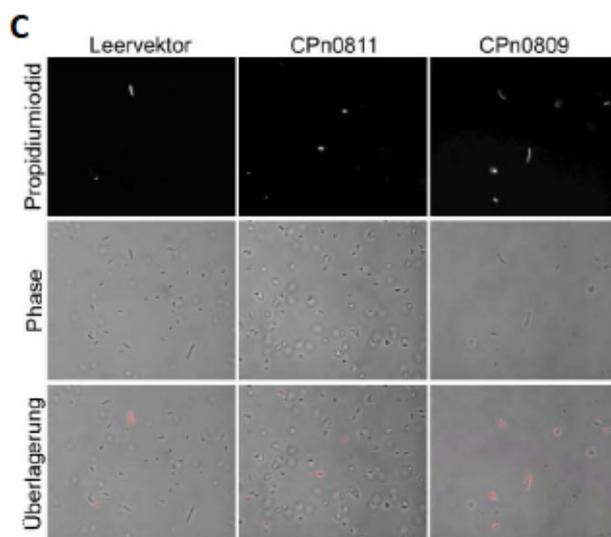


Abbildung 4.10: CPn0809-Expression in *E. coli* führt zur Lyse der Zellen

A. Die gezeigten Wachstumskurven wurden durch Messung der OD₆₀₀ verschiedener Expressionskulturen erstellt. Je Zeitpunkt wurde die OD₆₀₀ von drei unabhängigen Kulturen je exprimiertem Protein gemessen. Die Kulturen für den Vergleich von induzierter und nicht-induzierter Expression wurden jeweils aus denselben Vorkulturen angeimpft. Der Zeitpunkt der Induktion der Proteinexpression ist mit einer roten Linie markiert.

B. Verdünnungstropftests von Stichproben zweier Zeitpunkte aus Versuchsteil A: Die Stichproben wurden 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 verdünnt. Je 10 µl der verdünnten Zellsuspensionen wurden auf Selektivmedium mit 1 % Glukose ausplattiert. Zu sehen sind repräsentative Aufnahmen von Verdünnungstropftests für nicht-induzierende bzw. induzierende Bedingungen für 1 h und 3 h nach Induktion der Proteinexpression.

C: Lebend-/Tot-Färbung der Zellen von *E. coli*-Kulturen (Kapitel 3.9).



Die Bakterien wurden mit Expressionskonstrukten für CPn0811 oder CPn0809 oder zur Kontrolle mit dem Leervektor transformiert und 4 h unter induzierenden Bedingungen inkubiert. Die Färbung erfolgte mit Propidiumiodid (rot). Gezeigt sind Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen der Zellen.

Proben, die zu verschiedenen Zeitpunkten von diesen Expressionskulturen abgenommen und in seriellen Verdünnungstropftests auf Selektivmedium mit 1 % Glukose getropft wurden, unterstreichen die Ergebnisse der Wachstumskurven (Abbildung 4.10 B). Die Verdünnungstropftests der nicht-induzierten Kulturen zeigten alle ein vergleichbares Wachstum. Bis auf die höchste Verdünnung (10^{-4}) zeigen alle Felder einen Bakterienrasen. In der höchsten Verdünnung erkennbare Kolonien wuchsen unabhängig vom Expressionskonstrukt zu vergleichbarer Größe. Dagegen unterscheiden sich die Ergebnisse der Verdünnungstropftests der induzierten Kulturen deutlich voneinander. Proben, die eine Stunde nach Induktion der Proteinexpression von CPn0809N- und CPn0809C-Kulturen entnommen wurden, wuchsen im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle etwa gleich gut. Dagegen zeigten Kulturen, die das Volllängenprotein CPn0809 exprimierten, einen starken Wachstumsdefekt. Hier sind nur für die 1:10 Verdünnung wenige sehr kleine Kolonien erkennbar (Abbildung 4.10 B „CPn0809 10^{-1} “). Glukose im Medium, auf dem die Verdünnungen ausgebracht wurden, verhinderte die basale Expression des Proteins und dadurch einen nachträglich Effekt der Expression auf die *E. coli*-Zellen. Das Ergebnis zeigte, dass eine Stunde nach Induktion der Genexpression nahezu alle *E. coli*-Zellen der CPn0809 exprimierenden Kultur abgestorben waren.

Drei Stunden nach Induktion der Proteinexpression wurde auch bei den CPn0809C exprimierenden Kulturen eine leichte Verringerung der koloniebildenden Einheiten im Vergleich zu nicht-induzierten Kulturen beobachtet (Abbildung 4.10 B „CPn0809C 3 h“). Im Vergleich zu den Kulturen, die CPn0809 in Volllänge exprimierten, war der verursachte Wachstumsdefekt jedoch deutlich schwächer. CPn0809N zeigte auch nach drei Stunden Inkubation unter induzierenden Bedingungen keinen deutlichen Unterschied zur nicht-induzierten Kontrolle.

Zusätzlich zum Verdünnungstropftest wurde eine Lebend-/Tot-Färbung durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Expression von CPn0809 in Volllänge zum Tod der *E. coli*-Zellen führt. Dafür wurden *E. coli*-Zellen mit Expressionsvektoren transformiert, die entweder CPn0809 oder das Chaperon CPn0811 (LcrH_1) exprimierten. Als Kontrolle wurden *E. coli*-Kulturen mit dem Leervektor verwendet. Zur Färbung wurde Propidiumiodid genutzt, das in die DNS interkaliert. Propidiumiodid (PI) wird nur von toten Zellen aufgenommen, die das Membranpotential nicht mehr aufrechterhalten können (Jones & Senft 1985). Für die Leervektorkontrolle und die Zellen, die CPn0811 exprimierten, waren große Mengen kleiner *E. coli*-Zellen zu erkennen, wobei nur wenige Zellen eine rote PI-Färbung aufwiesen

(Abbildung 4.10 C „Leervektor“ und „CPn0811“). Im Vergleich dazu waren bei CPn0809-exprimierenden Kulturen nur wenige Bakterienzellen erkennbar, wobei die meisten eine elongierte Zellmorphologie und der Großteil eine rote PI-Färbung zeigte (Abbildung 4.10 C „CPn0809“).

Der Teilaspekt der Toxizität von CPn0809 für *E. coli*-Zellen wurde auch in einer im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bachelorarbeit betrachtet. Hier wurde gezeigt, dass sowohl die Expression des CPn0809-Volllängenproteins als auch einer CPn0809-Variante, in der die beiden mittleren Transmembrandomänen deletiert waren (CPn0809 Δ TM1,2), im *E. coli*-Stamm Rosetta zur Lyse der Zellen führten (Hüsgen 2012).

Der toxische Effekt bei der heterologen Expression in *E. coli* wurde bereits für Translokationspore-Proteine anderer pathogener Bakterien beschrieben und auf die vorhergesagten hydrophoben Domänen zurückgeführt (Neyt & Cornelis 1999). Häufig verwendete Methoden zur Expression der Translokationspore-Proteine in *E. coli* sind die bicistronische Expression zusammen mit ihrem Klasse II-Chaperon oder alternativ die Expression des gesamten Translokation-Operons (Schoehn *et al.* 2003). Die zytotoxische Wirkung von CPn0809 auf *E. coli*-Zellen verhinderte jedoch eine erfolgreiche Klonierung eines bicistronischen Expressionskonstruktes von CPn0809 und CPn0811 (LcrH_1).

4.1.5 Der C-terminale Teil von CPn0809 vermittelt Bindung an Phospholipide

Die Ergebnisse der bioinformatischen Analysen und der Untersuchungen der Lokalisation des CPn0809 in der Infektion sowie der massive Wachstumsdefekt in *E. coli* bei der Expression von CPn0809, sind starke Indizien für eine Funktion des Proteins als Translokation-Protein des T3SS. Um zu untersuchen, ob CPn0809 als Teil der Translokationspore fungiert, wurden im Folgenden verschiedene Interaktionsstudien durchgeführt.

Zunächst wurde untersucht, ob CPn0809 an Phospholipide bindet, wie sie in Membranen der Humanzellen auftreten, was eine wichtige Eigenschaft der Translokation-Proteine ist. So sind die großen hydrophoben Translokatoren anderer pathogener Bakterien in der Lage, an Membranen der Wirtszellen zu binden und in diese zu inserieren (Veenendaal *et al.* 2007; Romano *et al.* 2011). Für die Bindung an die Membran sind Lipide wie z. B. Phosphatidylserin (PS), Cholesterol oder Phosphatidylcholin (PC) von Bedeutung (Hayward *et al.* 2005; Romano *et al.* 2011) (Kapitel 1.4.4.2).

Um zu überprüfen, ob CPn0809 mit Lipiden interagiert, wurden intensive Versuche zur Herstellung des Volllängenproteins unternommen. Die erfolgreiche Herstellung kleiner Mengen des rekombinanten CPn0809-Volllängenproteins gelang, indem Expressionskulturen auf eine hohe Zellzahl wachsen gelassen und die Zellen spätestens eine Stunde nach Inkubation der Proteinexpression geerntet wurden. Anschließend wurde das Volllängenprotein CPn0809 unter denaturierenden Bedingungen mittels His₆-Markierung gereinigt (Kapitel 3.7.1.1), wodurch kleine Mengen des Proteins isoliert wurden (Abbildung 4.11 A „V“). Proben des gereinigten Volllängenproteins wiesen zusätzliche Banden im SDS-Gel auf, die in der Westernblot-Analyse nicht mit dem anti-CPn0809-Antikörper, jedoch mit einem anti-His-Antikörper detektiert wurden (Abbildung 4.11 B). Es handelte sich wahrscheinlich um unspezifisch an die verwendete Ni-NTA-Agarose gebundene Proteine. Eine Änderung des Reinigungsprotokolls reduzierte die Konzentration des gereinigten CPn0809-Volllängenproteins stark und andere Expressionskonstrukte standen nicht zur Verfügung (vgl. Kapitel 4.1.4), weshalb die unspezifischen Kontaminationen gebilligt wurden. Die Herstellung der rekombinanten Teilstücke von CPn0809 (His₆-CPn0809N-GST und His₆-CPn0809C-GST) war unproblematisch (vgl. Kapitel 4.1.4). Sie wurden wie die Kontrolle GST-His₆ unter nativen Bedingungen mittels GST-Markierung gereinigt (Kapitel 3.7.1.2) (Abbildung 4.11 A).

Nun wurde die Bindefähigkeit der CPn0809-Versionen an verschiedene Membranlipide mit Hilfe von Membranlipidstreifen untersucht. Dabei wurde die Bindung der rekombinanten Proteine an immobilisierte Lipide mit Antikörpern nachgewiesen (Abbildung 4.11 C) (Kapitel 3.7.14). Das GST-His₆-Kontrollprotein bindet wie erwartet nicht an die immobilisierten Lipide (Abbildung 4.11 C „GST Kontrolle“). Für den CPn0809 N-Terminus wurde ebenfalls keine Bindung an eines der Membranlipide festgestellt (Abbildung 4.11 C „CPn0809N“). Im Gegensatz dazu wurden mehrere Lipide identifiziert, die der C-terminalen Teil des CPn0809 starke und spezifisch bindet (Abbildung 4.11 C „CPn0809C“). Interessanterweise zeigt CPn0809C eine Interaktion mit allen getesteten Phosphatidylinositolphosphaten (PiPs) auf, die durch eine deutliche Färbung der entsprechenden Bereiche zu erkennen ist. Zusätzlich ist eine schwache Bindung des C-Terminus an Phosphatidsäure (PA), Cardiolipin und Sulfatid zu erkennen. Auch der Lipidstreifen, welcher mit dem rekombinanten Volllängenprotein inkubiert wurde, zeigte ein sehr schwaches Signal an der Position von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (Pi4,5P₂). Die schwache Intensität des Signals ist mit der geringen Konzentration des Volllängenproteins zu erklären (vgl. Abbildung 4.11 B).

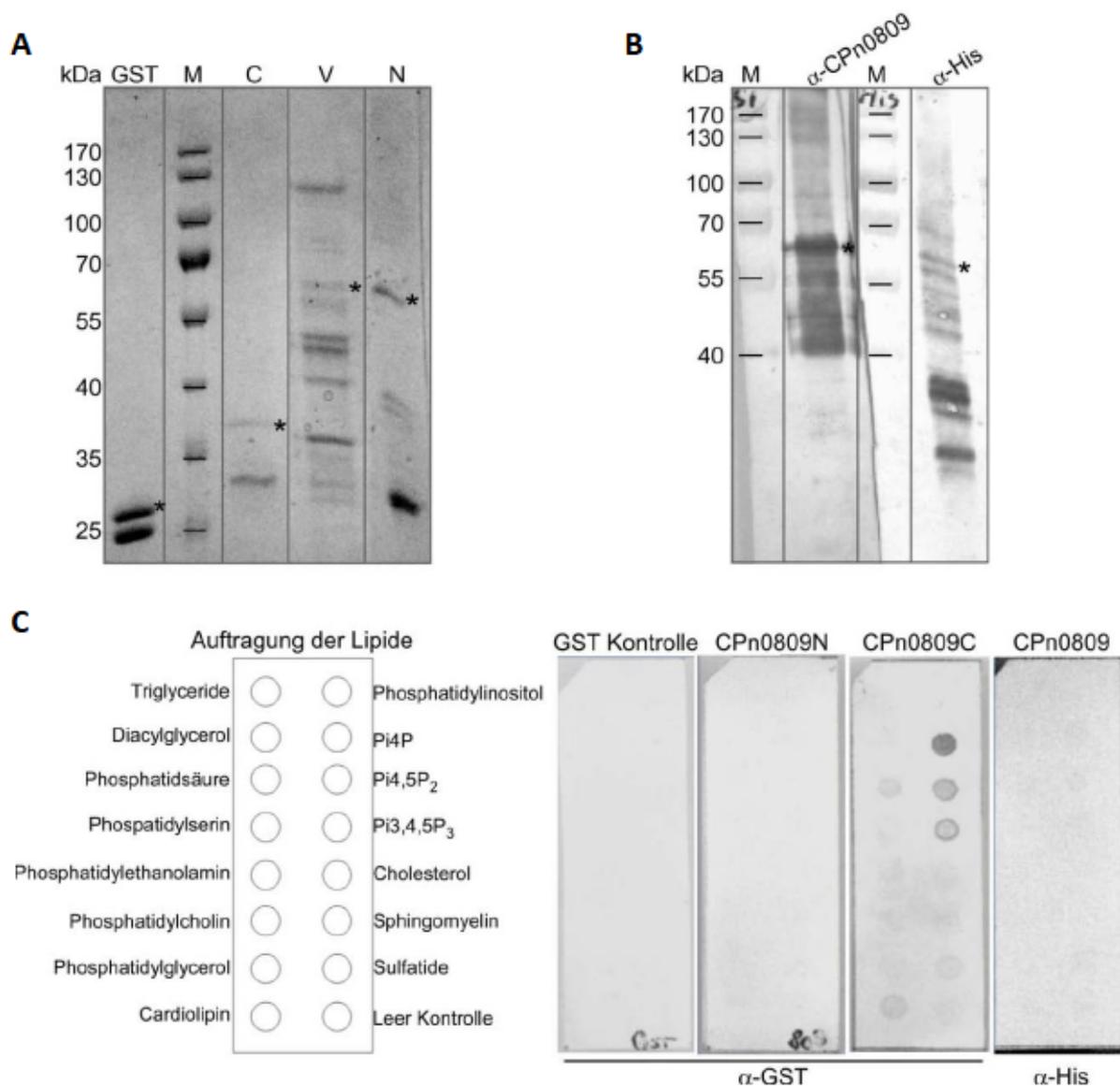


Abbildung 4.11: CPn0809-Reinigung und biochemische Analyse des Lipidbindungsverhaltens

A. Coomassie-Brillant-Blau gefärbtes SDS-Gel einer Auftrennung der gereinigten Proteine GST-His₆ (GST) 28 kDa, GST-CPn0809C-His₆ As 406-488 (C) 37 kDa, CPn0809-His₆ (V) 51,8 kDa und GST-CPn0809N-His₆ As 1-253 (N) 54,5 kDa. Links sind die Molekülmassen der Banden des Proteinstandards (M) in kDa angegeben. Die beobachtete Laufhöhe des Proteins ist jeweils mit einem Stern (*) markiert. Die GST-markierten Proteine zeigen zwischen 25 und 35 kDa eine Bande, die wahrscheinlich freies GST darstellt.

B. Das gereinigte CPn0809-Volllängenprotein wurde in einem Westernblot mit dem anti-CPn0809-Antikörper (α -CPn0809) oder einem anti-Penta-His-Antikörper, der gegen die His₆-Markierung (α -His) des Proteins gerichtet war, und einem sekundären, mit alkalischer Phosphatase (AP)-konjugierten Antikörper detektiert.

C. Links ist eine Übersicht der immobilisierten Lipide auf den verwendeten Membranlipidstreifen gezeigt. Die Streifen wurden wie indiziert mit Lösungen einer Konzentration von 1 μ g/ml der verschiedenen rekombinanten Proteine inkubiert. An Lipide gebundenes Protein wurde mit einem anti-GST-Antikörper (α -GST) oder einem Anti-Penta-His-Antikörper (α -His) und einem sekundären AP-konjugierten-Antikörper detektiert. Der Kontrast der Aufnahme des Membranlipidstreifens, der mit dem Volllängen-CPn0809 (CPn0809) inkubiert wurde, ist im Vergleich zu den Aufnahmen der anderen Streifen erhöht worden, um die schwache Färbung sichtbar zu machen.

Andere orientierende Experimente mit verschiedenen rekombinant hergestellten CPn0809-Versionen bestätigten die hier gezeigten Ergebnisse und deuteten darauf hin, dass CPn0809C in der Lage ist an die Plasmamembran von HEp-2-Zellen zu binden (nicht gezeigt) (Hüsgen 2012).

Der Befund, dass CPn0809C an Lipide bindet, stellt ein weiteres Indiz dafür dar, dass CPn0809 die Funktion eines chlamydialen Translokationsporen-Proteins ausführen kann. Im Folgenden wurden daher Interaktionsstudien im Hefe-Zwei-Hybrid-System durchgeführt, mit denen für Translokationsporen-Proteine typische Protein-Protein-Interaktionen untersucht wurden.

4.1.6 Im N-terminalen Teil von CPn0809 befinden sich Protein-Protein-Interaktionsdomänen

In Translokationsporen-Proteinen anderer Bakterien mit T3SS, wurden Protein-Protein-Interaktionsdomänen identifiziert, die die Interaktion mit dem korrespondierenden Klasse II-Chaperon, sowie eine Oligomerisierung der Translokon-Proteine vermitteln (Kapitel 1.4.3 und 1.4.4.2). Meist liegen diese Protein-Protein-Interaktionsdomänen im N-Terminus der betrachteten Proteine. Für den N-terminalen Teil von CPn0809 wurden zwei Coiled-Coil-Domänen vorhergesagt, welche Protein-Protein-Interaktionen vermitteln könnten (siehe Abbildung 4.2). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob CPn0809N in der Lage ist mit sich selbst und mit CPn0811 (LcrH₁) zu interagieren.

Für eine Analyse der Selbstinteraktion von CPn0809N (As 1-253) mittels Hefe-Zwei-Hybrid-(H2H-) System wurde dessen codierende Sequenz in den H2H-Ködevektor und in den H2H-Beutevektor kloniert. Dies erlaubte die Expression von CPn0809N fusioniert an die *GAL4*-DNS-Bindedomäne (BD) und CPn0809N fusioniert an die *GAL4*-Aktivierungsdomäne (AD) (Kapitel 3.2.4).

Mit der Positivkontrolle transformierte Hefen wuchsen auf allen verwendeten Selektionsmedien. Dagegen wuchs die Negativkontrolle, deren Proteine keine Interaktion zeigen, wie erwartet nur auf dem Kontrollmedium (Abbildung 4.12 A). Hefezellen, die mit den beiden CPn0809N exprimierenden Vektoren transformiert worden waren, zeigten Wachstum auf dem Kontrollmedium und Selektionsmedium mit niedriger Stringenz. Damit wird durch die Interaktion von CPn0809N-BD und CPn0809N-AD das Reporterogen *HIS3* aktiviert (vgl. Kapitel 3.2.4). Da nur ein Reporterogen aktiviert wurde, handelt es sich bei der Selbstinteraktion von CPn0809N wahrscheinlich um eine transiente Interaktion.

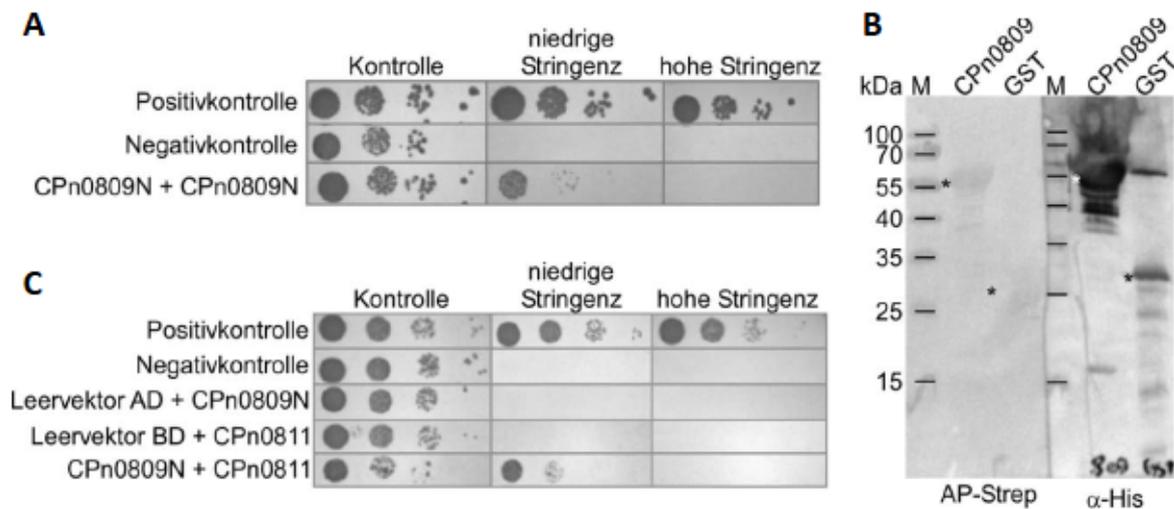


Abbildung 4.12: Protein-Protein-Interaktionsstudien mit CPn0809N

A. Die Sequenz von *cpn0809N* wurde in den H2H-Köder- und in den H2H-Beutevektor kloniert. Mit den H2H-Vektoren kotransformierte Zellen aus ü/N Kulturen wurden in Verdünnungstropftests auf Selektivmedium getropft, das auf das Vorhandensein der Plasmide (SD-trp-leu = Kontrolle), auf die Aktivierung eines Reporterproteins (SD-trp-leu-his = niedrige Stringenz) oder auf die Aktivierung beider Reportergene (SD-trp-leu-his-ade = hohe Stringenz) selektiert (Kapitel 3.2.3 und 3.2.4). Die Platten wurden 48 h bei 30 °C inkubiert.

B. Rekombinant hergestelltes GST-CPn0809N-His₆ (CPn0809) 54,5 kDa und GST-His₆ (GST) 28 kDa wurden auf eine PVDF-Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran mit 5 µg/ml biotinyliertem CPn0809N inkubiert (Kapitel 3.7.8 und 3.7.13). Das biotinylierte Protein wurde mit einem AP-konjugierten Streptavidin (AP-Strep) detektiert. Rechts ist ein Westernblot als Ladekontrolle zu erkennen, die Proteine wurden mit einem anti-Penta-His-Antikörper detektiert (α-His). Die Laufhöhe der Proteine wurde mit einem Stern (*) markiert.

C. In einer H2H-Analyse wurde die Interaktion von CPn0809N fusioniert an die GAL4-BD und CPn0811 (LcrH₁) fusioniert an die GAL4-AD untersucht. Verdünnungstropftests wurden von ü/N-Kulturen der kotransformierten Hefezellen angefertigt und auf den unter A beschriebenen Selektionsmedien für 48 h bei 30 °C inkubiert.

Die Interaktion von CPn0809N mit sich selbst wurde biochemisch mit einer Far-Westernblot-Analyse bestätigt. Dabei wurde die Interaktionsfähigkeit von löslichem CPn0809N mit auf einer Membran immobilisierten CPn0809N untersucht (Abbildung 4.12 B) (Kapitel 3.7.8). Auf Höhe des immobilisierten CPn0809N wurde ein schwaches, aber gut sichtbares Signal detektiert, während das als Negativkontrolle genutzte GST-His₆ nicht durch lösliches CPn0809N markiert wurde (vgl. Abbildung 4.12 B „AP-Strep“). Die Far-Westernblot-Analyse bestätigt das Ergebnis der CPn0809N-Selbstinteraktion aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-Experiment.

Bei der Untersuchung der möglichen Interaktion von CPn0809 mit dem Klasse II-Chaperon CPn0811 (LcrH₁), wurden zunächst Kontrollen durchgeführt, welche eine mögliche Autoaktivierung des Systems durch CPn0809N-BD bzw. CPn0811-AD untersuchten. Dabei

wuchsen die Kontrollen wie die Negativkontrolle nur auf dem Kontrollmedium, während die Positivkontrolle auf allen Medien etwa gleich gut wuchs, womit eine Autoaktivierung ausgeschlossen wurde (Abbildung 4.12 C „Leervektor + CPn0809 bzw. CPn0811“). Hefetransformatanten, die CPn0809N-BD und CPn0811-AD zusammen exprimierten, zeigten Wachstum auf dem Selektionsmedium mit niedriger Stringenz aber nicht auf dem Medium mit hoher Stringenz. Die Aktivierung des *HIS3*-Reportergens deutet auf eine transiente Interaktion der beiden Proteine hin, wie sie auch für die Selbstinteraktion von CPn0809N beobachtet wurde.

Die vorangegangenen Versuche zeigten, dass CPn0809 das Klasse II-Chaperon CPn0811 bindet und durch Selbstinteraktion in der Lage ist Oligomere zu bilden. Damit erfüllt CPn0809 wichtige Voraussetzungen für eine Funktion als Translokationspore-Protein. Da die mikroskopischen Betrachtungen bereits Hinweise auf eine Funktion in der frühen Infektion lieferten und Protein-Protein-Interaktionsstudien ebenfalls Indizien für eine Funktion als Translokation-Protein lieferten, sollte im nächsten Versuch untersucht werden, ob CPn0809 isolierter EBs zugänglich ist.

4.1.7 CPn0809 wird durch Waschen von EBs gelöst

In diesem Kapitel wurde untersucht, ob CPn0809 mittels Detergenzienbehandlung von chlamydialen EBs gelöst wird, um Hinweise auf die subzelluläre Lokalisation zu erhalten. Für diesen Versuch wurden *C. pneumoniae* EBs mit PBS, Triton-X-100 oder Sarkosyl behandelt und anschließend die löslichen von den unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugation getrennt. Als Kontrollen wurden das teilweise oberflächenassoziierte Chaperon GroEL1, der intra-chlamydiale Elongationsfaktor EF-Tu und das gegen Detergenzien resistente Außenmembrankomplex-Protein MOMP genutzt.

Durch die Behandlung von EBs mit PBS wurde ein Teil des GroEL1 und CPn0809 in den löslichen Überstand gebracht, während EF-Tu und MOMP ausschließlich bakterien-assoziiert im Pellet detektierbar waren (Abbildung 4.13 „PBS“). Für GroEL1 ist bekannt, dass es durch PBS-Behandlung von der Oberfläche der Chlamydien gelöst wird (Wuppermann *et al.* 2008).

Proben, die mit dem nicht-ionischen, nicht-denaturierenden Detergenz TritonX-100 behandelt wurden, zeigten einen Teil des GroEL1 im Überstand, während etwa die gleiche Menge CPn0809 im Überstand und Pellet detektierbar war (Abbildung 4.13 „TritonX-100“). Das Membran-Protein MOMP und das intrazelluläre EF-Tu wurden auch hier nur im Pellet detektiert.

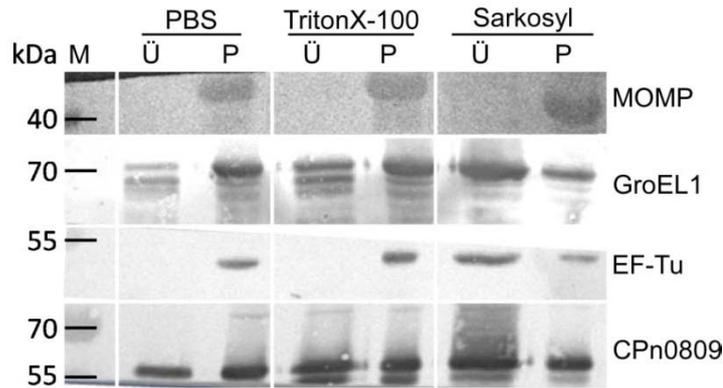


Abbildung 4.13: Detergenzienbehandlung von isolierten *C. pneumoniae* EBs

Mittels Gastrografingradient gereinigte *C. pneumoniae* EBs wurden mit Detergenzien behandelt. Hierzu wurden die EBs in PBS, 1 % TritonX-100 oder 2 % Sarkosyl aufgenommen und 1 h bei 37 °C inkubiert (Kapitel 3.7.12). Anschließend wurden die Proben für 1 h bei 4 °C und 100.000 x g zentrifugiert. Der Überstand (Ü) wurde abgenommen und zusammen mit dem Pellet (P) mittels Westernblot analysiert. Zur Analyse wurden wie rechts angegeben anti-MOMP-, anti-GroEL1-, anti-EF-Tu- und anti-CPn0809-Antikörper genutzt und mit einem sekundären AP-konjugierten Antikörper sichtbar gemacht. Auf der linken Seite sind die Molekülmassen der Banden des Proteinstandards (M) in kDa angegeben. Die berechneten Molekülgrößen der Proteine sind: MOMP 42 kDa, GroEL1 58 kDa, EF-Tu 43 kDa und CPn0809 50 kDa.

Mit dem anionischen Detergenz Sarkosyl wurde der Großteil des GroEL1, EF-Tu und CPn0809 in Lösung überführt (Abbildung 4.13 „Sarkosyl“). Ein kleiner Teil dieser drei Proteine blieb jedoch mit dem Pellet der nicht löslichen Membranfraktion assoziiert. MOMP hingegen wurde auch mit diesem Detergenz nicht in Lösung gebracht. MOMP ist ein Teil des cOMC, welcher stark über Disulfidbrücken vernetzt ist. Für MOMP ist bekannt, dass es nur mit dem stark anionischen Detergenz SDS oder durch Reduktion der Disulfidbrücken mittels DTT aus dem cOMC gelöst werden kann (Caldwell *et al.* 1981) (vgl. Kapitel 1.3.1).

Das Ergebnis, dass eine gewisse Menge CPn0809 leicht zugänglich und möglicherweise auf der Oberfläche von EBs lokalisiert war, ist ein Indiz, dass CPn0809 in der frühen Infektion für eine Interaktion mit der humanen Wirtszelle zugänglich ist. Interessanterweise wurde für das Translokationspore-Protein IpaB gezeigt, dass es vor Infektionsbeginn auf der Oberfläche der Bakterien lokalisiert ist (Veenendaal *et al.* 2007). Die vorgestellten Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass CPn0809 eine Funktion als Teil der Translokationspore hat. Da jedoch eine duale Funktion als sekretiertes Effektorprotein nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann, wurde die subzelluläre Lokalisation von CPn0809 während der Infektion im Folgenden biochemisch analysiert.

4.1.8 CPn0809 oft assoziiert mit Lipidtröpfchen gefunden

Von verschiedenen Translokationssporin-Proteinen ist bekannt, dass sie neben ihrer Funktion als Translokone des T3SS zusätzlich Effektorfunktionen aufweisen (Kapitel 1.4.4.2). Es wäre möglich, dass der Teil des in die Wirtszelle sekretierten CPn0809 bei mikroskopischen Untersuchungen unterhalb der Nachweisgrenze lag und nicht detektiert wurde. Um die subzelluläre Lokalisierung von CPn0809 in der infizierten Humanzelle zu untersuchen wurden daher Zellfraktionierungen für zwei Zeitpunkte der Infektion durchgeführt (Kapitel 3.7.11).

In Proben nicht-infizierter Zellen (n.i.) war die bereits beschriebene unspezifische Bande, die der CPn0809-Antikörper hervorruft, deutlich erkennbar (vgl. Kapitel 4.1.3). Diese war jedoch etwas kleiner als die CPn0809 Bande, wodurch sie im SDS-Gel etwas weiter lief, als die CPn0809-Bande (vgl. Abbildung 4.14 A „n.i.“ mit Fraktionen). Zellen, die für 48 h infiziert worden waren, zeigten in allen Fraktionen ein Signal für CPn0809, in denen auch Signale für die chlamydialen Proteine MOMP und DnaK erkennbar waren (Abbildung 4.14 A „48 hpi“). Interessante Ausnahmen bildeten der Überstand nach der ersten Ultrazentrifugation (HSS) und die Lipidtröpfchen-Fraktion (LD). Hier wurde CPn0809 detektiert, obwohl nur eine sehr schwache Bande für DnaK und kein Signal für MOMP erkennbar war (rote Sterne). Die HSS-Fraktion beinhaltet alle löslichen Bestandteile der infizierten Humanzellen und die LD-Fraktion enthält im Wesentlichen die Lipidtröpfchen der Humanzellen. Es wurden zudem keine membranassoziierten Proteine detektiert, wie das Fehlen der humanen Proteine EGFR (Plasmamembran) und Calnexin (ER) in diesen Fraktionen zeigte. Zytosolische Proteine wie Aktin und Mek1 sowie das Zellkernmatrix-Protein p84 und auch das Lipidtröpfchen-assoziierte Protein ADFP wurden hingegen gefunden.

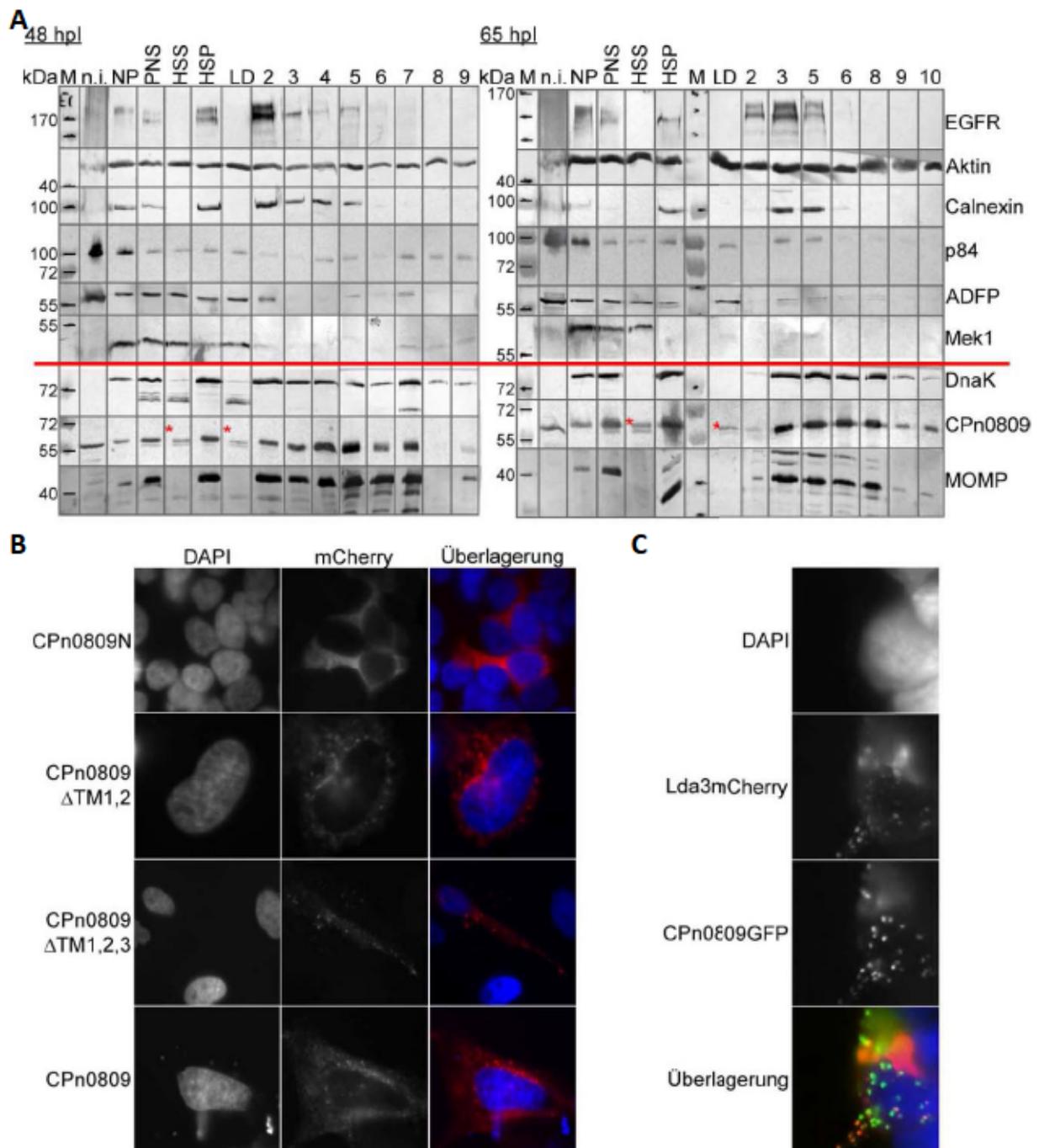


Abbildung 4.14: CPn0809 kann in der Infektion und in der Transfektion mit Lipidtröpfchen assoziiert werden

A. Fraktionierungen von infizierten HeLa-Zellen, die 48 hpi oder 65 hpi geerntet wurden. Die Fraktionierung wurde mit einem diskontinuierlichen Optiprep®-Dichtegradienten nach einem abgewandelten Protokoll von Jorgensen und Kollegen durchgeführt (Jorgensen & Valdivia 2008) (Kapitel 3.7.11). Die Proteinkonzentration aller Fraktionen wurde gemessen und anschließend gleiche Proteinmengen für eine Analyse mittels Westernblot geladen. M = Proteinmarker, n. i. = nicht-infizierte Zellen, NP = Kernpellet, PNS = Überstand nach Pelletieren der Zellkerne, HSS = Überstand nach der ersten Ultrazentrifugation, HSP = Pellet nach der ersten Ultrazentrifugation, LD = Lipidtröpfchen-Fraktion, 2 bis 10 = Fraktionen des HSP nach der zweiten Ultrazentrifugation von oben (geringe Dichte), nach unten (hohe Dichte). Die Angabe der Molekülmassen der Banden des Proteinmarkers erfolgt in kDa. Zur Analyse wurden humane Proteine mit Antikörpern gegen EGFR (130 kDa), β -Aktin (42 kDa), Calnexin (80 kDa), p84 (84 kDa), ADFP (49 kDa) und Mek1 (44 kDa) detektiert.

Chlamydiale Proteine sind durch eine rote Linie von den Humanproteinen getrennt. Sie wurden mit Antikörpern gegen DnaK (72 kDa), MOMP (42 kDa) und CPn0809 (50 kDa) detektiert. Die Primärantikörper wurden mit einem sekundären AP-konjugierten Antikörper sichtbar gemacht. Beachtenswerte Fraktionen mit CPn0809-Signal sind mit einem roten Stern (*) markiert.

B. Transfektion von humanen HeLa-Zellen mit verschiedenen mCherry-Konstrukten von CPn0809 (rot). Die transfizierten Zellen wurden nach 16 h mit Methanol für 10 min bei RT fixiert. Die DNS der Zellen wurde mit DAPI (blau) sichtbar gemacht. Bei den transformierten Konstrukten handelt es sich um CPn0809N (As 1-253), CPn0809 Δ TM1,2 (Δ As 253-302, Deletion der ersten beiden Transmembrandomänen), CPn0809 Δ TM1,2,3 (Δ As 253-302, Δ As 383-405, Deletion der drei vorhergesagten Transmembrandomänen) und CPn0809 (As 1-488). Die Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axioskop Fluoreszenzmikroskop generiert.

C. HeLa-Zellen wurden mit Konstrukten zur Expression von CPn0809 fusioniert an GFP (grün) und einem bekannten chlamydialen Lipidtröpfchen-bindenden Protein Lda3 (CPn0592) fusioniert an mCherry (rot) kotransfiziert. Die DNS der Zellen wurde mit DAPI (blau) sichtbar gemacht. Die Fixierung und Mikroskopie der Zellen erfolgte wie in B beschrieben.

Bei der Fraktionierung von Zellen, die für 65 h infiziert worden waren, wurde ebenfalls beobachtet, dass CPn0809 nicht ausschließlich bakterienassoziiert vorlag (Abbildung 4.14 A „65 hpI“). Auch hier waren CPn0809-Signale unabhängig von anderen chlamydialen Proteinen in der HSS- und LD-Fraktion erkennbar. In diesen Fraktionen waren zytosolische, Kernmatrix- und Lipidtröpfchen-assoziierte Proteine zu detektieren. Wie 48 hpI befand sich der größte Teil des detektierbaren CPn0809 jedoch in den Fraktionen, die auch Signale für die anderen bakteriellen Proteine zeigten. Demnach war CPn0809 also hauptsächlich bakterienassoziiert und ein kleiner Teil war in „bakterienfreien“ Fraktionen detektierbar. In den scheinbar chlamydienfreien Fraktionen könnte CPn0809 eine Kontamination darstellen, die durch Ablösen des CPn0809 von den Bakterien hervorgerufen wurden (vgl. Kapitel 4.1.7).

Dennoch war die Detektion von CPn0809 in den Fraktionen der infizierten Humanzellen, die mit Lipidtröpfchen in Verbindung gebracht wurden, interessant. CPn0809 wurde schon bei der Erstcharakterisierung in Hefe mit Lipidtröpfchen kolokalisiert (vgl. Kapitel 1.6). In Transfektionsversuchen wurde CPn0809 auch mit Lipidtröpfchen der Humanzelle assoziiert. So zeigten Transfektionsversuche des CPn0809-N-Terminus ein zytosolisches Signal und keine distinkte Lokalisierung in der Zelle (Abbildung 4.14 B). Dagegen zeigten das Volllängenprotein und CPn0809-Varianten, in denen zwei Transmembrandomänen bzw. alle drei vorhergesagten Transmembrandomänen deletiert waren, punktierte Signale. Die Signale waren meist über die ganze Zelle verteilt, konzentrierten sich aber häufig entweder in der Zellperipherie oder in Zellkern-Nähe. Da CPn0809 in Hefezellen eine Assoziation mit Lipidtröpfchen zeigt, wurden Kotransfektionen mit einem bekannten chlamydialen

Lipidtröpfchen-bindenden Protein (Lda3) durchgeführt (Abbildung 4.14 C). Lipidtröpfchen sind Organellen der Zelle, welche neutrale Lipide speichern (Martin & Parton 2006). Es wurde bereits gezeigt, dass Chlamydien während der Infektion Lipidtröpfchen zur Inklusion rekrutieren und dass bestimmte chlamydiale Proteine, wenn sie transient exprimiert werden, während der Infektion mit Lipidtröpfchen kolokalisieren (Cocchiario *et al.* 2008). Eines dieser Proteine ist das Lda3 (Lipid Droplet-associated protein 3). CPn0809GFP und Lda3 kolokalisierten, was bedeutet, dass CPn0809 auch bei ektopischer Expression in Humanzellen mit Lipidtröpfchen-Markern assoziiert wurde.

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass CPn0809 in verschiedenen Versuchen mit den Lipidtröpfchen der eukaryotischen Zelle in Verbindung gebracht wurde. Die Verbindung mit diesen Organellen in der Infektion wurde bisher nicht mikroskopisch bestätigt.

4.2 Charakterisierung des Inc-Proteins CPn0147

Das putative Effektorprotein CPn0147 wurde in früheren Arbeiten als Inc-Protein identifiziert, das in der Inklusionsmembran und auf fadenartigen Strukturen, die von der Inklusionsmembran ausgehen, sowie auf Lipidtröpfchen im Zytoplasma der humanen Wirtszelle lokalisiert (Herbst 2011) (vgl. Kapitel 1.7).

Die CPn0147-positiven Strukturen wurden im Folgenden mikroskopisch untersucht. Daher wurde im ersten Schritt die Spezifität des anti-CPn0147-Antikörpers, der bereits im Rahmen einer früheren Arbeit generiert wurde, überprüft (Herbst 2011).

4.2.1 Überprüfung der Spezifität des anti-CPn0147-Antikörpers

Zur Untersuchung der Spezifität des anti-CPn0147-Antikörpers wurde ein Antikörper-Adsorptionsexperiment mit CPn0147-beschichteten Latexkugeln durchgeführt, wie es für den anti-CPn0809-Antikörper bereits vorgestellt wurde (Kapitel 4.1.3.2).

Der antigengereinigte Antikörper wurde mit Latexkugeln inkubiert, die entweder mit BSA (Negativkontrolle) oder mit rekombinantem CPn0147 Δ TM (Δ As 41-91) beschichtet waren (Kapitel 3.7.10). Diese CPn0147-Variante war zur Immunisierung des Kaninchens zur Herstellung des polyklonalen Antikörpers genutzt worden. Wie erwartet wurde eine Bindung des anti-CPn0147-Antikörpers an CPn0147 Δ TM-beschichtete Kugeln nachgewiesen, während der Antikörper nicht an BSA-beschichtete Kugeln band (Abbildung 4.15 A).

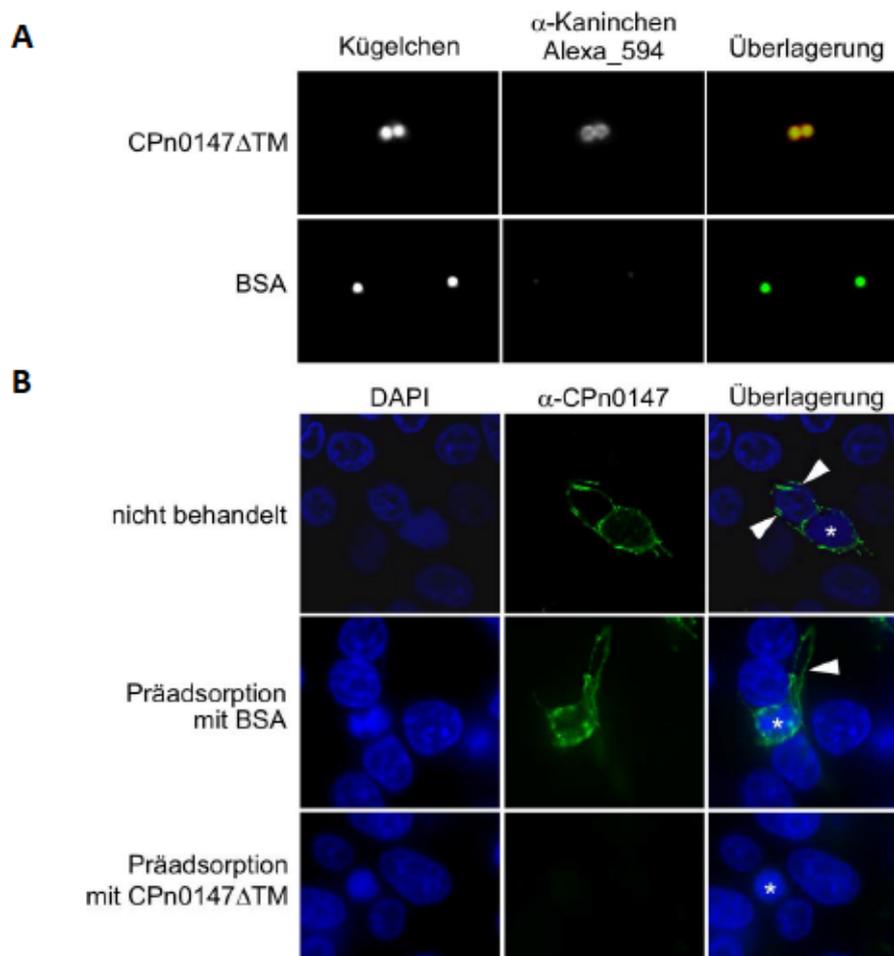


Abbildung 4.15: Mikroskopische Analyse der Präadsorption des CPn0147-Antikörpers

A. Die grün fluoreszierenden Latexkügelchen wurden entweder mit rekombinantem CPn0147 Δ TM-Protein (Δ As 41-91) oder BSA beschichtet und mit dem anti-CPn0147-Antikörper inkubiert (vgl. Kapitel 3.7.10.1). Anschließend wurde die Adsorption des Antikörpers an die Kügelchen durch Markierung mit einem sekundären Alexa-594-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper (rot) fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Nur die CPn0147 Δ TM-beschichteten Kügelchen zeigen ein anti-CPn0147-Antikörper-Signal.

B. HEp-2-Zellen wurden für 42 h infiziert und anschließend mit anti-CPn0147-Antikörperlösung gefärbt (grün), die nicht behandelt, mit BSA-beschichteten Kügelchen (Präadsorption mit BSA) oder mit CPn0147 Δ TM-beschichteten Kügelchen inkubiert worden war (Präadsorption mit CPn0147 Δ TM). DNS wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Weiße Dreiecke deuten auf CPn0147-Fäden. Die Inklusionen sind mit einem weißen Stern (*) markiert.

Die zuvor mit den Kügelchen inkubierten Antikörperlösungen wurden anschließend zur Färbung von infizierten Humanzellen verwendet. Inklusionen infizierter Humanzellen, die mit der nicht-behandelten bzw. der zuvor mit BSA-beschichteten Kügelchen inkubierten Antikörperlösung gefärbt wurden, wiesen eine durchgängige Färbung der Inklusionsmembran und von fadenartigen Strukturen im Zytosol auf (Abbildung 4.15 B „nicht behandelt“ bzw. „Präadsorption mit BSA“). Im Gegensatz dazu war bei der Färbung mit Antikörperlösung, die mit den CPn0147 Δ TM-beschichteten Kügelchen vorinkubiert wurde, keinerlei Signal

detektierbar (Abbildung 4.15 B „Präadsorption mit CPn0147 Δ TM“). Die CPn0147-Lokalisierung in der Infektion wird also spezifisch durch den anti-CPn0147-Antikörper markiert.

4.2.2 Fadenartige IncA- und CPn0147-Strukturen sind identisch

In *C. pneumoniae*-infizierten Epithelzellen sind fadenartige IncA-positive Strukturen bereits seit längerem bekannt und wurden eingehend untersucht (vgl. Kapitel 1.5.1.1). Im Folgenden wurde untersucht, ob die CPn0147-Fäden mit den IncA-Fäden identisch sind und ob die Assoziation der Fäden mit verschiedenen anderen chlamydialen Antigenen sich im Verlauf der Infektion verändert.

In einem orientierenden Experiment wurde zu jedem Zeitpunkt auf 100 % der CPn0147-positiven Fäden ein IncA-Signal detektiert (Abbildung 4.16 A „ α -IncA“ und B). Umgekehrt wurden nur solche IncA-positiven, fädigen Strukturen gefunden, die auch ein durchgängiges CPn0147-Signal zeigten. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass bei *C. pneumoniae* IncA- und CPn0147-Signale dieselbe Struktur markieren.

Signale für das Lipopolysaccharid (LPS) von *C. pneumoniae*, welches normalerweise in der äußeren Membran der Bakterien verankert ist, waren auf den Fäden stets punktförmig. In vielen Fällen wurden mehrere LPS-Signale auf einem CPn0147-Faden detektiert (Abbildung 4.16 A „ α -LPS“). Die LPS-Signale auf den Fäden wiesen keine DNS-Signale auf, es handelte sich bei den punktförmigen LPS-Signalen auf den Fäden also wahrscheinlich nicht um Bakterien. Bis 48 hpI wiesen rund 40 % der CPn0147-positiven Fäden ein oder mehrere LPS-Signale auf, dieser Wert verringerte sich bis 72 hpI auf ca. 20 % (Abbildung 4.16 B).

Nur ein geringer Anteil der CPn0147-positiven Fäden zeigte punktförmige Signale für das chlamydiale Chaperon DnaK. Im Gegensatz zu LPS wurde nie mehr als ein DnaK-Signal je Faden detektiert (Abbildung 4.16 A „ α -DnaK“). Signale für das Chaperon waren stets auch mit einem DNS-Signal kolokalisiert und repräsentieren wahrscheinlich Bakterien. Zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h nach Infektionsbeginn zeigten 3 % der CPn0147-Fäden ein DnaK-Signal (Abbildung 4.16 B). 72 h nach Infektionsbeginn war auf den Fäden kein DnaK-Signal detektierbar.

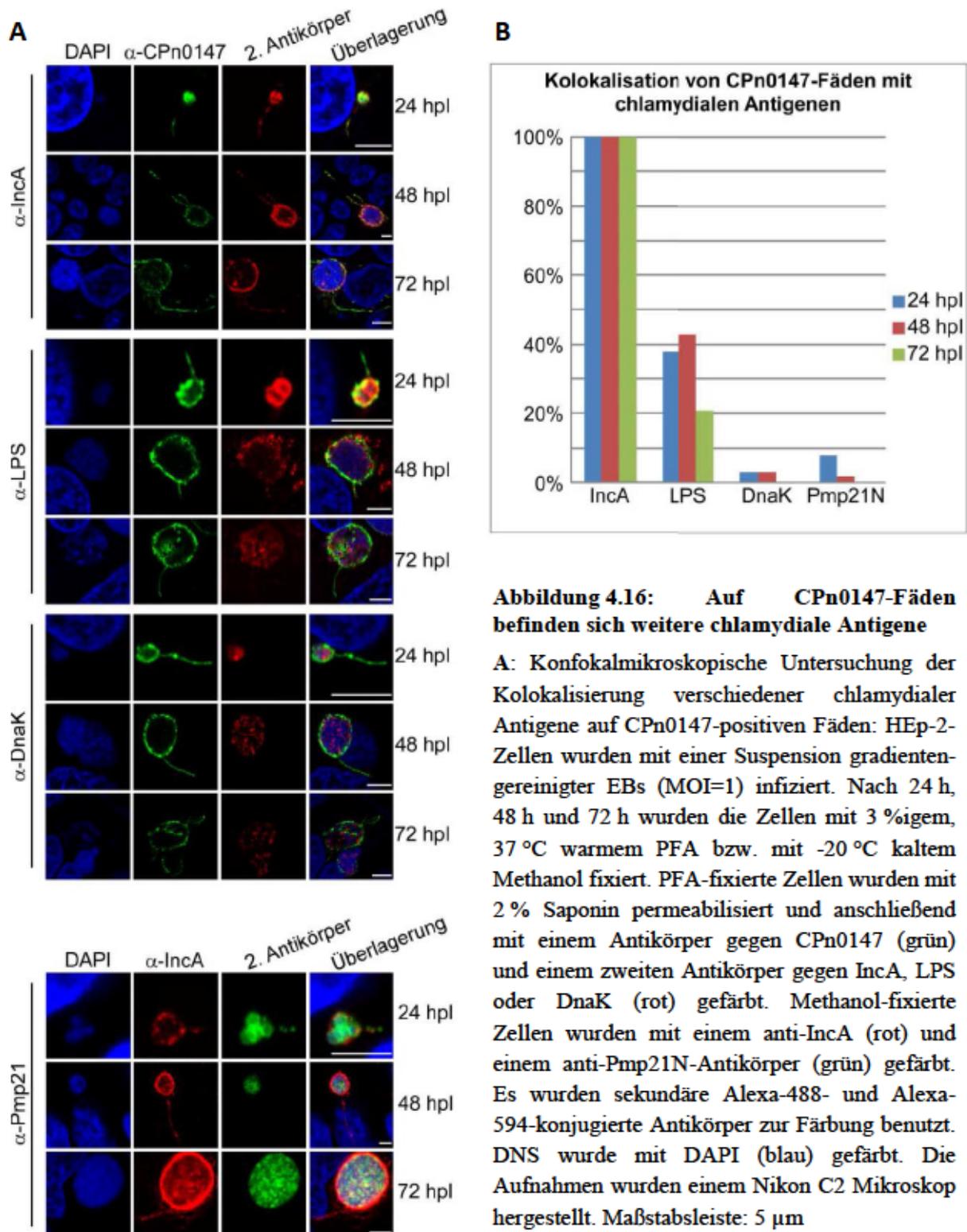


Abbildung 4.16: Auf CPn0147-Fäden befinden sich weitere chlamydiale Antigene

A: Konfokalmikroskopische Untersuchung der Kolokalisierung verschiedener chlamydialer Antigene auf CPn0147-positiven Fäden: HEP-2-Zellen wurden mit einer Suspension gradientengereinigter EBs (MOI=1) infiziert. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurden die Zellen mit 3 %igem, 37 °C warmem PFA bzw. mit -20 °C kaltem Methanol fixiert. PFA-fixierte Zellen wurden mit 2 % Saponin permeabilisiert und anschließend mit einem Antikörper gegen CPn0147 (grün) und einem zweiten Antikörper gegen IncA, LPS oder DnaK (rot) gefärbt. Methanol-fixierte Zellen wurden mit einem anti-IncA (rot) und einem anti-Pmp21N-Antikörper (grün) gefärbt. Es wurden sekundäre Alexa-488- und Alexa-594-konjugierte Antikörper zur Färbung benutzt. DNS wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Die Aufnahmen wurden einem Nikon C2 Mikroskop hergestellt. Maßstabsleiste: 5 μ m

B: Balkendiagramm zur Darstellung des Anteils von CPn0147-positiven, fädigen Strukturen, die mit anderen chlamydialen Antigenen kolokalisierten. Je Zeitpunkt und Antigen wurden einmal 50 Zellen gezählt, die Einzelinklusionen mit einem oder mehreren Fäden aufwiesen. Lokalisierten ein oder mehrere Signale auf einem Faden, wurde dieser Faden als antigensignal-positiv gewertet.

Das Signal des an der Oberfläche der Chlamydien lokalisierten Pmp21 war auf den Fäden wie LPS stets punktiert. Wie bei LPS wurden zum Teil mehrere, nicht mit einem DNS-Signal kolokalisierte Pmp21-Signale auf einem CPn0147-Faden detektiert (Abbildung 4.15 A „ α -Pmp21“). 24 h nach Infektionsbeginn wurden punktierte Pmp21-Signale auf 8 % der betrachteten Fäden detektiert. Dies reduzierte sich bis 48 hpI auf 2 % der Fäden und 72 hpI war kein Pmp21-Signal mehr auf den Fäden detektierbar (Abbildung 4.15 B).

In diesem Versuch war etwas mehr als die Hälfte der beobachteten CPn147-Fäden nicht mit LPS, DnaK oder Pmp21 kolokalisiert. Die Häufigkeit des Auftretens verschiedener Antigene war abhängig vom betrachteten Infektionszeitpunkt und verringerte sich mit fortschreitender Infektion (vgl. Abbildung 4.16 B).

4.2.3 CPn0147-Fäden weisen bevorzugt in Richtung Zellkern

Bei früheren Untersuchungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass CPn0147-positive Fäden bevorzugt in Richtung des Zellkerns weisen (Herbst 2011). Um diese zu stützen, wurde eine Quantifizierung der Orientierung der Fäden durchgeführt, eventuell sind dadurch Rückschlüsse auf die Funktion der Fäden möglich.

Für die Untersuchung wurden ausschließlich Fäden betrachtet, die von Einzelinklusionen stammten, Zellen mit mehreren Inklusionen wurden nicht berücksichtigt (Kapitel 3.10). Die beobachteten Fäden wurden in Kategorien eingeordnet, die durch Richtung und Abstand des Fadens vom Zellkern definiert waren (vgl. Abbildung 4.17 A und B). In Zellen, die 24 h nach Infektionsbeginn fixiert wurden, hatten Fäden der Klasse 1 einen Anteil von 30 % und 48 h bzw. 72 h machten sie rund 35 % der Fäden aus (Abbildung 4.17 C). Fäden der Klasse 2 wurden am seltensten beobachtet und machten 24 hpI 20 % und 48 h bzw. 72 h nach Infektionsbeginn rund 25 % aller beobachteten Fäden aus. Insgesamt traten Fäden der Klasse 3 am häufigsten auf. 24 h nach Infektionsbeginn fiel rund die Hälfte der beobachteten CPn0147-positiven Fäden in die Klasse 3, während nach 48 h und 72 h rund 40 % der Fäden der Klasse 3 zuzuordnen waren.

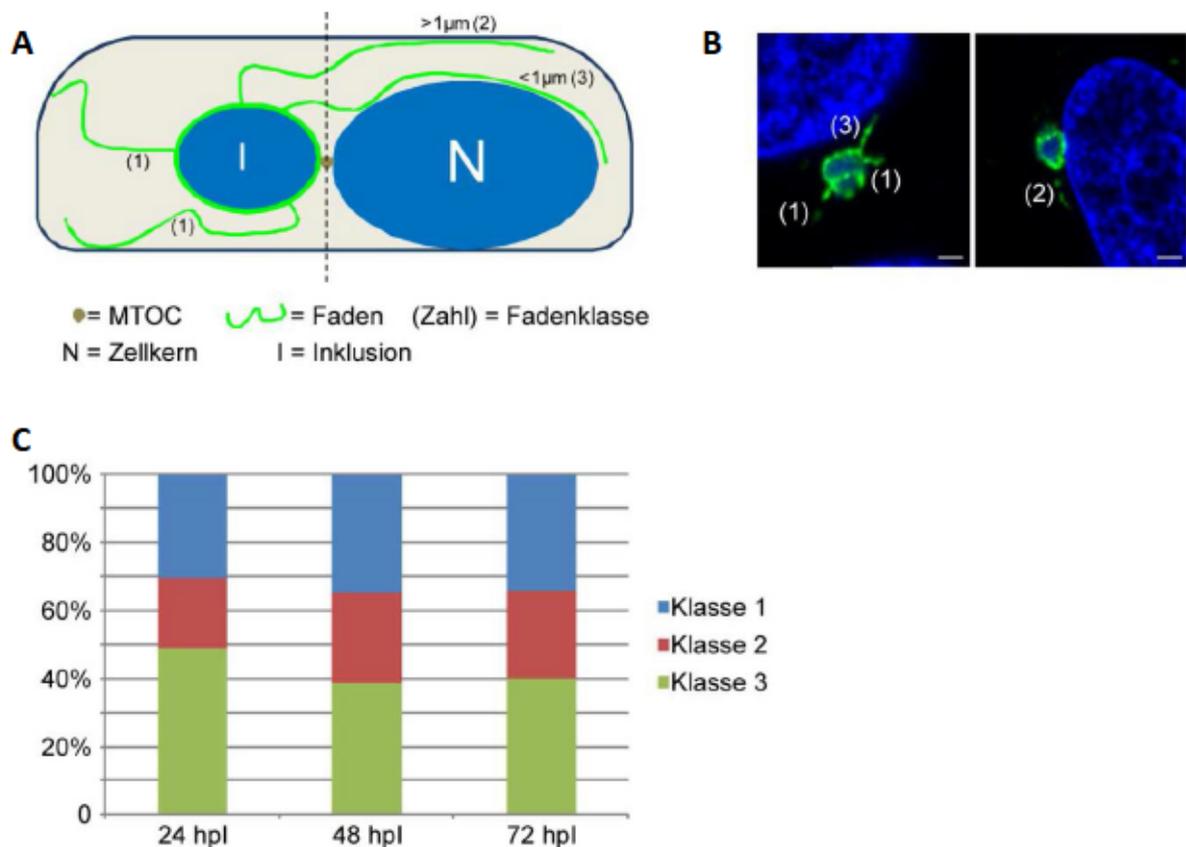


Abbildung 4.17: Analyse der bevorzugten Orientierung von CPn0147-positiven Fäden

Hep-2-Zellen wurden mit einer Suspension gradientengereinigter EBs (MOI=1) infiziert. Nach jeweils 24, 48 und 72 h Infektion wurden die Zellen mit 37 °C warmem, 3 %igem PFA 10 min lang fixiert. Die Zellen wurden mit Saponin permeabilisiert und anschließend mit dem anti-CPn0147-Antikörper und einem sekundären Alexa-488-konjugierten Antikörper (grün) gefärbt. Die DNS wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Zellen mit nur einer Inklusion wurden auf das Vorhandensein von CPn0147-positiven Fäden untersucht.

A: Schematische Darstellung einer mit *C. pneumoniae* infizierten Zelle. Die Fäden der Inklusion sind nach Richtung und Abstand zum DNS-Signal des Zellkerns kategorisiert. Fäden der Klasse 1 zeigen vom Zellkern weg, auch wenn ihr Ursprung in der Hälfte der Inklusion liegt, die zum Zellkern gewandt ist. Fäden der Klasse 2 weisen zum Zellkern hin, liegen jedoch auf ganzer Länge 1 µm bzw. weiter vom DNS-Signal des Kerns entfernt. Fäden der Klasse 3 deuten zum Zellkern hin und sind näher als 1 µm am Signal des Kerns lokalisiert.

B: *C. pneumoniae*-Inklusionen mit CPn0147-positiven Fäden von Zellen, die 24 h lang infiziert wurden. Anhand der abgebildeten CPn0147-Fäden werden Beispiele für die Klassifizierung gezeigt. Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Nikon C2 Mikroskop hergestellt. Die Maßstabsleiste ist 2 µm lang.

C: Verteilung der CPn0147-positiven Fäden auf die verschiedenen Klassen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt in der Infektion. Je betrachteten Zeitpunkt wurden einmal hundert Inklusionen mit Fäden gezählt.

Somit wiesen zu jedem betrachteten Zeitpunkt der Infektion mehr als 60 % der CPn0147-positiven Fäden in Richtung Zellkern (Klasse 2 und 3). Dies könnte bedeuten, dass die Fäden vor allem mit dem zentralen Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Humanzelle in Verbindung stehen, das um den Zellkern lokalisiert. Im Folgenden wurden verschiedene Färbungen von Zellkompartimenten der Wirtszelle durchgeführt, um zu analysieren aus welchem Material die fadenartigen Strukturen aufgebaut sind und ob die Fäden mit Organellen der Wirtszelle, wie dem ER, in Kontakt stehen.

4.2.4 Die CPn0147-Fäden besitzen die Identität membranöser Strukturen

Die Entstehung, Struktur und Funktion der Fäden ist unbekannt. Für weitere Analysen wurden daher drei Arbeitshypothesen entwickelt: (i) Da IncA und CPn0147 Inc-Proteine sind, die in der Inklusionsmembran inseriert werden, handelt es sich bei den CPn0147-IncA-positiven Fäden möglicherweise ebenfalls um membranöse Strukturen, die von der Inklusionsmembran stammen. (ii) Während der chlamydialen Infektion könnte ein chlamydiales Effektorprotein sekretiert werden, welches ähnlich wie Tubulin polymerisiert und so fädige Strukturen bildet. (iii) Ein bestimmtes Wirtszellorganell könnte durch chlamydiale Effektorproteine manipuliert und tubuliert werden, um fädige Strukturen zu bilden, die mit der Inklusionsmembran in Kontakt stehen.

Im Folgenden wurde die mögliche Assoziation von CPn0147- bzw. IncA-Fäden mit verschiedenen Zellorganellen sowie Zytoskelett- und Membrankomponenten der mit *C. pneumoniae* infizierten Wirtszelle untersucht. Es wurden vor allem Wirtszellkomponenten eingehender betrachtet, von denen bekannt ist, dass sie eine enge Assoziation mit der Inklusionsmembran zeigen und/oder für den Verlauf der Infektion von Bedeutung sind (Kapitel 1.5) (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Verwendete Marker verschiedener Wirtszellorganellen

Transfektionskonstrukt (T) / Antikörper (A) / Farbstoff (F)	Markierte Wirtszellkomponente
Rab5-GFP (T)	Ein Protein, das frühe Endosomen markiert.
Rab7-GFP (T)	Ein Protein, das späte Endosomen markiert.
Rab11A-GFP (T)	Ein Protein, das Recycling-Endosomen markiert.
Bodipy® 493/ 503 (F)	Färbt neutrale Lipide, die vor allem in humanen Speicherorganellen, den Lipidtröpfchen, akkumulieren.
LactC2-GFP (T)	Die C2-Domäne des Lactadherin, bindet Phosphatidylserin (PS) und lokalisiert an PS-positiven Strukturen - vor allem an der zytoplasmatischen Seite der humanen Plasmamembran.

Transfektionskonstrukt (T) / Antikörper (A) / Farbstoff (F)	Markierte Wirtszellkomponente
α -Golgi (A)	Ein Protein des Golgi-Apparates.
α -Aktin (F)	Eine Komponente des Aktin-Zytoskeletts der Zelle.
α -Tubulin (A)	Eine Komponente des Mikrotubuli-Zytoskeletts der Zelle.
α -Vimentin (A)	Eine Komponente des Intermediärfilament-Zytoskeletts der Zelle.
α -Calnexin (A)	Ein Chaperon des ER, es lokalisiert im Lumen des ER.
mCherry-GPI (T)	Das fluoreszierende Protein mCherry wurde mit einem GPI-Anker fusioniert, dieses Konstrukt markiert vor allem die Außenseite der humanen Plasmamembran und den Golgi-Apparat.

Kontrollaufnahmen von transfizierten oder gefärbten, nicht-infizierten Zellen können im Anhang eingesehen werden (Kapitel 6).

Über längere Abschnitte waren kontinuierliche Kollokalisierungen zwischen CPn0147-Fäden und dem Rab-Protein Rab11A sowie der Lactadherin C2-Domäne (LactC2) erkennbar (Abbildung 4.18 „Rab11-GFP“ und „LactC2-GFP“). Das mCherry-GPI-Anker-Protein zeigte punktierte, selten auch kurze kontinuierliche Kollokalisierungen mit CPn0147-Fäden (Abbildung 4.18 „mCherry-GPI“). Färbungen verschiedener Zytoskelett-Komponenten wiesen viele Beispiele auf, in denen eine punktförmige Assoziation mit CPn0147-Strukturen zu erkennen ist (Abbildung 4.18 „ α -Aktin“, „ α -Tubulin“ und „ α -Vimentin“). Strukturen, die eine Assoziation zeigten, werden in den nachfolgenden Kapiteln eingehender betrachtet.

Die CPn0147- bzw. IncA-Fäden wiesen keine Assoziation mit frühen und späten endozytotischen Vesikeln, dem Golgi-Apparat und dem durch Calnexin markierten Endoplasmatische Retikulum (ER) auf (vgl. Abbildung 4.18 „Rab5-GFP“, „Rab7-GFP“, „ α -Golgi“ und „ α -Calnexin“).

Signale für mit Bodipy gefärbte Lipidtröpfchen lokalisierten teilweise in räumlicher Nähe der CPn0147-positiven fädigen Strukturen. Da in einer vorangegangenen Arbeit CPn0147-Signale auf der Oberfläche von Lipidtröpfchen nachgewiesen worden waren (Herbst 2011) (vgl. Kapitel 4.2.11), wurde die Assoziation von CPn0147- bzw. IncA-positiven Strukturen mit Lipidtröpfchen in dieser Arbeit eingehender untersucht (siehe Kapitel 4.2.11 und 4.2.12).

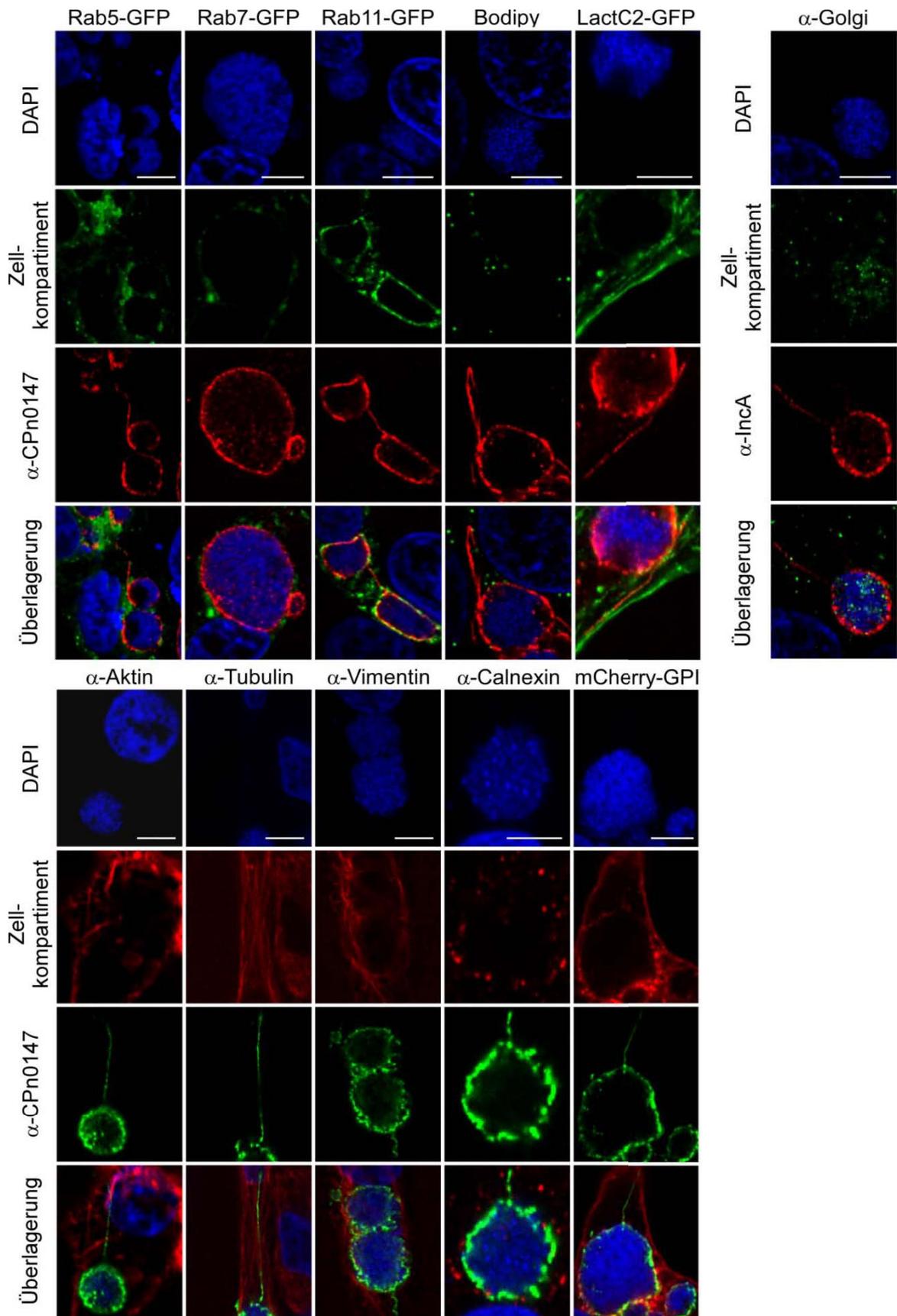


Abbildung 4.18: Kolokalisierung der CPn0147-Fäden mit Zellkompartimenten der Humanzelle
 Hep-2-Zellen wurden 24 h vor der Infektion mit Transfektionskonstrukten für Rab5-GFP, Rab7-GFP, Rab11A-GFP, LactC2-GFP oder mCherry mit GPI-Anker transfiziert. Transfizierte und nicht-

transfizierte Zellen wurden mit einer Suspension gradientengereinigter EBs (MOI=1) für 48 h infiziert. Anschließend wurden die Zellen mit 37 °C warmem, 3 %igem PFA für 10 min fixiert. Die DNS der Zellen wurden mit DAPI gefärbt (blau). Für die Antikörper-Färbungen wurden die Zellen mittels Saponin permeabilisiert (Kapitel 3.8.1.2). Die Wirtszellkomponenten wurden mit Antikörpern gegen ein Golgiprotein (C10orf118), α -Tubulin, Vimentin oder Calnexin und die während der chlamydialen Infektion induzierten Fäden mit dem anti-CPn0147-Antikörper oder dem IncA-Antikörper gefärbt. Färbungen des Aktin-Zytoskeletts mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-Phalloidin wurden 30 min lang bei RT durchgeführt. Die Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bodipy® 493/503 wurde zusammen mit der DAPI-Färbung für 10 min bei RT durchgeführt. Alle Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Nikon C2 Mikroskop generiert. Maßstabsleiste: 5 μ m

4.2.4.1 Die membranhaltigen CPn0147-Strukturen kolokalisieren mit Recycling-Endosomen

Die Kolokalisierung des Markers für Recycling-Endosomen Rab11A-GFP mit CPn0147-Fäden ist sehr interessant, da beschrieben wurde, dass die beiden Rab11-Isoformen Rab11A und Rab11B mit der *C. pneumoniae*-Inklusionsmembran kolokalisieren (Rzomp *et al.* 2003) (Kapitel 1.5.1.3).

In nicht-infizierten Zellen zeigte das Rab11A-GFP-Fusionsprotein punktierte bis vesikuläre Signale, die gleichmäßig in der ganzen Zelle verteilt waren (vgl. Anhang 6). In mit *C. pneumoniae* infizierten Zellen wurden zwei Arten mit CPn0147-positiven Fäden kolokalisierenden Rab11A-GFP-Signalen beobachtet: (i) vesikuläre und (ii) kontinuierliche Strukturen (Abbildung 4.19 A). Beispiele für vesikuläre, mit CPn0147-Fäden kolokalisierende Rab11A-GFP-Signale waren sehr häufig (Abbildung 4.19 B).

Die Vesikel waren entweder teilweise mit den Fäden assoziiert oder überlagerten die CPn0147-Signale vollständig. Darüber hinaus schienen die Rab11-Vesikel den Faden teilweise auch zu unterbrechen. Interessanterweise unterbrachen kontinuierliche Rab11A-GFP-Strukturen den CPn0147-Faden häufig und führten ihn fort, bis anschließend wieder ein CPn0147-Signal detektierbar wurde (Abbildung 4.19 B „Ausschnitt 1“ links und „Ausschnitt 2“ links). Es ist möglich, dass Rab11A-positive Vesikel mit den CPn0147-Fäden interagieren, darauf transportiert werden oder mit ihnen fusionieren, worauf die beobachteten vesikulären bis kontinuierlich-filamentösen Strukturen auf den Fäden hindeuteten.

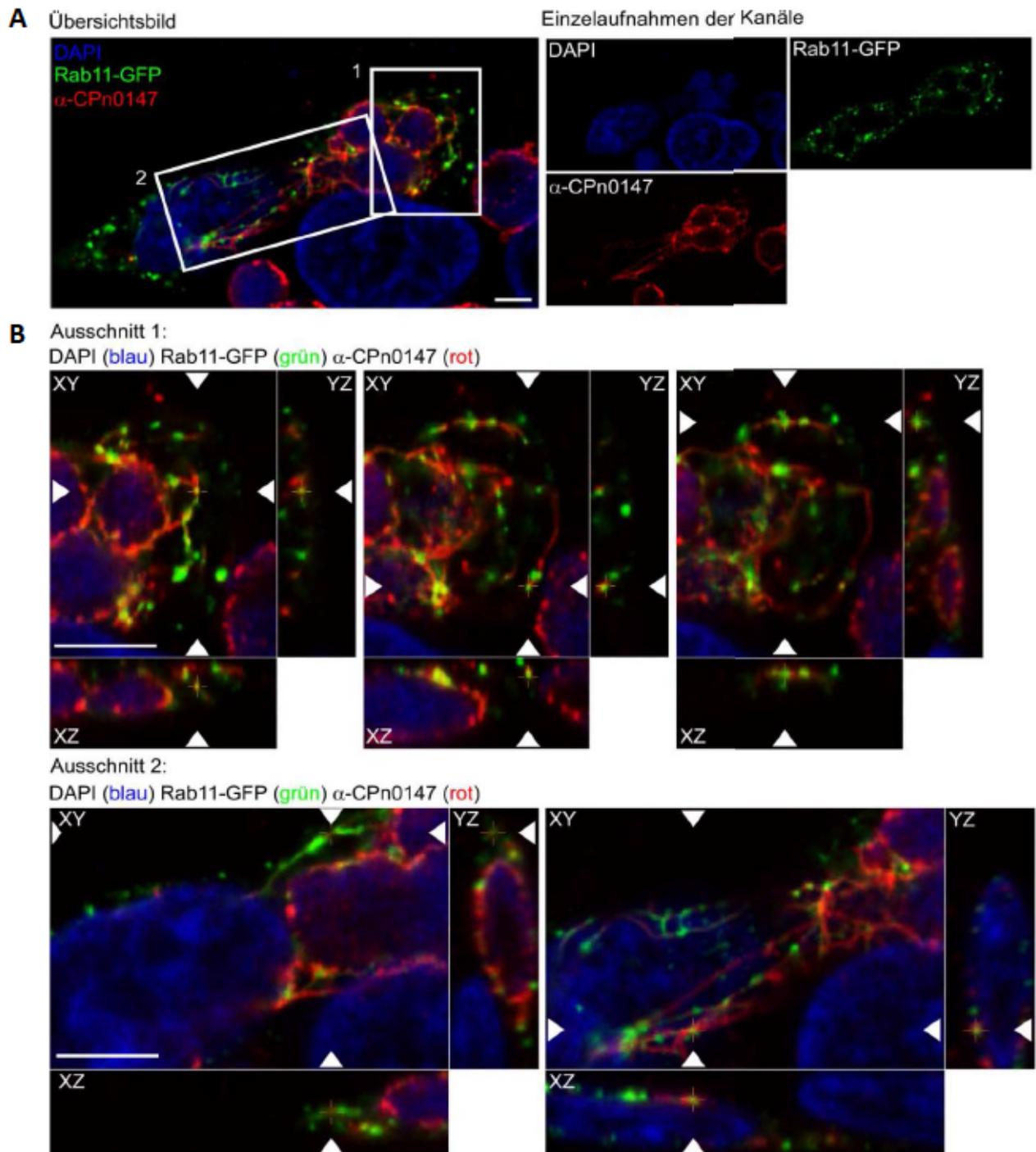


Abbildung 4.19: Phänotypen der Kolo-kalisierung von CPn0147-Fäden und Rab11A-GFP

Hep-2-Zellen wurden 16 h vor der Infektion mit einem RAB11A-GFP Konstrukt transfiziert (Kapitel 3.6.1) und mit dem CPn0147-Antikörper und einem sekundären Alexa-594-konjugierten Antikörper gefärbt. Die Infektion, Fixierung und Mikroskopie der Zellen erfolgte wie beschrieben (Abbildung 4.18). Maßstabsleiste: 2,5 μ m

A: Übersichtsaufnahme einer infizierten Zelle mit drei Inklusionen. Die markierten Bereiche sind unter B vergrößert dargestellt.

B: Orthogonalansichten der in A markierten Ausschnitte. Die im Fokus liegenden Strukturen wurden durch weiße Dreiecke markiert.

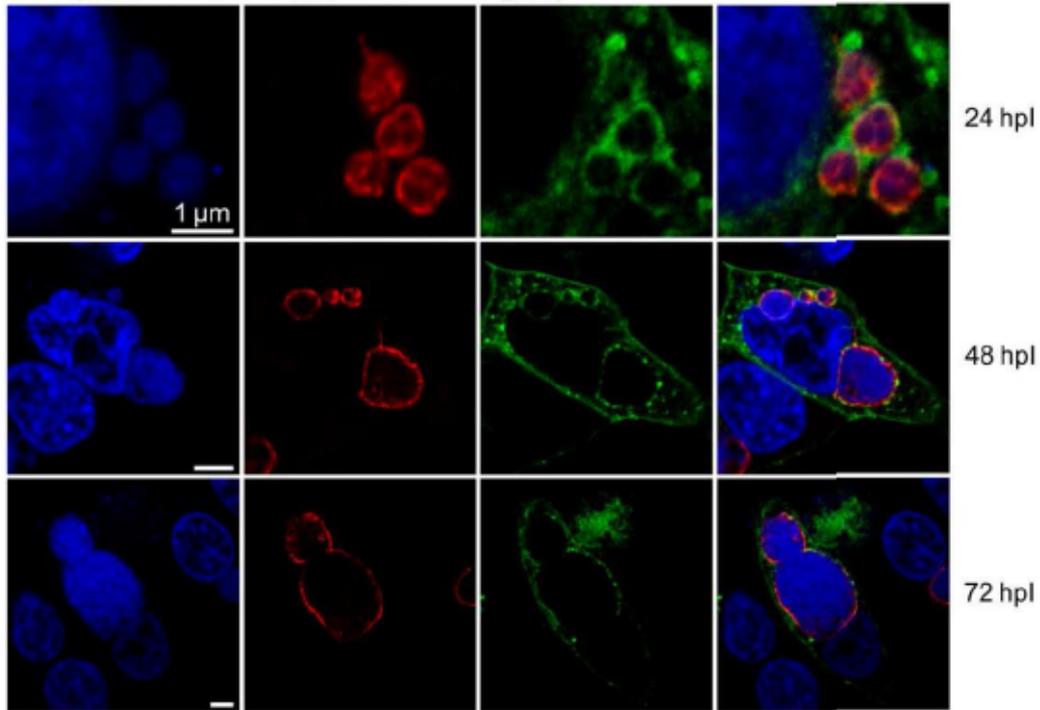
4.2.4.2 CPn0147-Fäden kolokalisieren mit verschiedenen Membranmarkern der humanen Wirtszelle

Als Nächstes wurde die Lokalisierung von verschiedenen Plasmamembranmarkern relativ zu den CPn0147-Fäden untersucht. Im ersten Schritt wurde die Lokalisation von Phosphatidylserin (PS) mit Hilfe der daran bindenden C2-Domäne des Lactadherin (LactC2) betrachtet (vgl. Tabelle 4.2). Nicht-infizierte Zellen wiesen LactC2-GFP-Signale auf, die die Plasmamembran markierten und in vesikulären Strukturen im Zytoplasma der Zelle auftraten (vgl. Anhang 6). Da sich PS vor allem auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran befindet, bindet LactC2-GFP die Innenseite der humanen Plasmamembran.

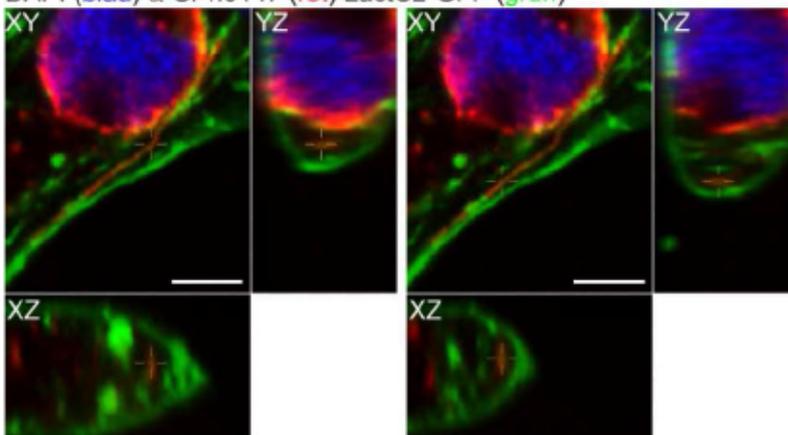
Während des gesamten Infektionsverlaufes war die *C. pneumoniae*-Inklusionsmembran von LactC2-Signalen umgeben. In der frühen Infektion (24 hpI) war die Inklusionsmembran mit LactC2 fast kontinuierlich markiert. Die frühe Inklusionsmembran war demnach auf der zytosolischen Seite durchgängig mit PS besetzt. Zu späteren Zeitpunkten (48 und 72 hpI) markierte LactC2-GFP die Inklusionsmembran in diskontinuierlicher Weise, was auf eine Verringerung des PS in der Inklusionsmembran über die Zeit hindeutet (Abbildung 4.20 A). Das Auftreten von LactC2-GFP-positiven Vesikeln deutet darauf hin, dass diese zur Inklusion rekrutiert wurden und dort mit der Inklusionsmembran fusionierten. Die Ergebnisse sind interessant, da für *C. trachomatis* gezeigt wurde, dass die Inklusionsmembran in der frühen Infektion bei 8 hpI zwar von einem LactC2-GFP-Signal umgeben war, das Signal 18 hpI jedoch verschwand (Yeung *et al.* 2009).

Auf den CPn0147-Fäden wurden vereinzelt vesikuläre LactC2-GFP-Signale detektiert. Das Beispiel in Abbildung 4.20 B zeigt einen Phänotyp, bei dem über die gesamte Länge des dargestellten CPn0147-Fadens schwache LactC2-GFP-Signale detektierbar waren und ihn abschnittsweise auch kontinuierlich markierten. Kontinuierliche durch LactC2-GFP markierte PS-Strukturen waren auf CPn0147-Fäden selten zu beobachten und auch die Assoziation mit PS-positiven Vesikeln wurde nur gelegentlich detektiert. Möglicherweise waren die LactC2-GFP-Signale auf den Fäden zu schwach, um sie effizient zu detektieren. Dennoch weisen die Ergebnisse darauf hin, dass durch LactC2-GFP gebundenes PS in die CPn0147-positiven Fäden eingebaut wurde.

A DAPI (blau) α -CPn0147 (rot) LactC2-GFP (grün)



B DAPI (blau) α -CPn0147 (rot) LactC2-GFP (grün)



C DAPI (blau) mCherry-GPI (rot) α -CPn0147 (grün)

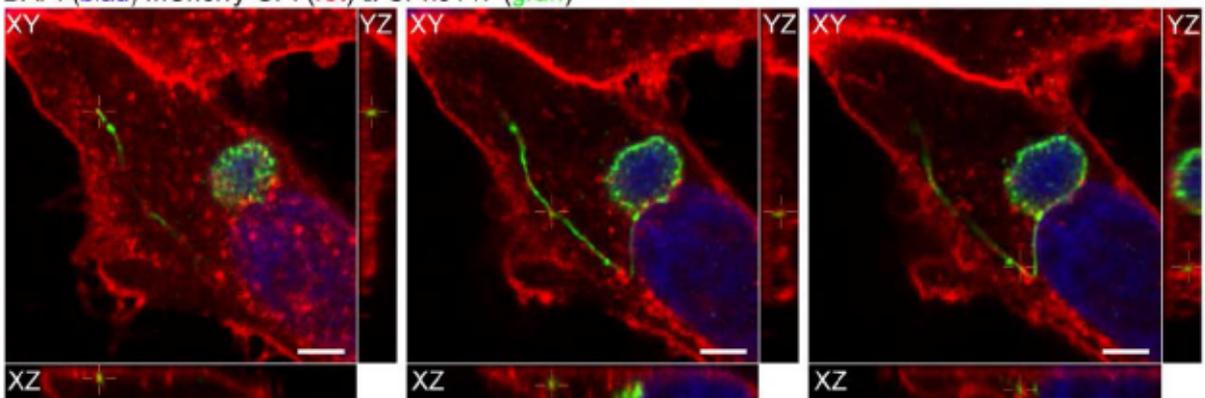


Abbildung 4.20: CPn0147-positive Strukturen sind mit LactC2-GFP und mCherry-GPI assoziiert

Hep-2-Zellen wurden 16 h vor der Infektion mit einem LactC2-GFP oder Cherry-GPI-Anker-Konstrukt transfiziert (Kapitel 3.6.1). Die Infektion, Fixierung, Färbung und Mikroskopie der Zellen erfolgte wie bereits beschrieben (Abbildung 4.18).

A: Die Zellen wurden mit dem anti-CPn0147-Antikörper und einem sekundären Alexa-594-konjugierten Antikörper gefärbt. Maßstabsleiste: 5 μm , falls nicht anders angegeben.

B: Orthogonalansichten einer 48 hpI fixierten Zelle aus der in A dargestellten Färbung. Maßstabsleiste: 2,5 μm

C: Die gezeigten Zellen wurden 48 hpI fixiert. Die Färbung wurde mit dem anti-CPn0147-Antikörper und einem sekundären Alexa-488-konjugierten Antikörper durchgeführt. Dargestellt sind Orthogonalansichten derselben Zelle. Maßstabsleiste: 2,5 μm

Als nächstes wurde die Assoziation der CPn0147-Fäden mit einem mCherry-GPI-Anker-Fusionsprotein untersucht, welches ähnlich wie das LactC2-GFP die Plasmamembran und vesikulären Strukturen im Zytosol der nicht-infizierten Humanzelle markiert (Tabelle 4.2) (vgl. Anhang 6). GPI-Anker-Proteine werden auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran verankert, wohin sie durch exozytotische Vesikel gelangen.

In infizierten Zellen wurden einige Beispiele beobachtet, in denen ein CPn0147-Faden mit dem mCherry-GPI-Signal in der Zytoplasmamembran assoziiert war (Abbildung 4.20 C links). Daneben wurden häufig punktierte mCherry-GPI-Signale auf den CPn0147-positiven Fäden und der Inklusionsmembran detektiert (Abbildung 4.20 mitte und links). Dabei umgaben die punktförmigen bis vesikulären mCherry-GPI-Signale den CPn0147-Faden teilweise (Abbildung 4.20 mitte und rechts). Es wurden keine Kolokalisationen eines kontinuierlichen mCherry-GPI-Signals mit CPn0147-Fäden beobachtet, jedoch wurden teilweise durchgängige Signale in der Inklusionsmembran detektiert, die an die Markierung der Inklusionsmembran durch LactC2-GFP erinnerte (vgl. digitaler Anhang). Da sehr viele mCherry-GPI-Vesikel im Zytosol der Zelle detektiert wurden, ist nicht auszuschließen, dass die Signale zufällig kolokalisierten.

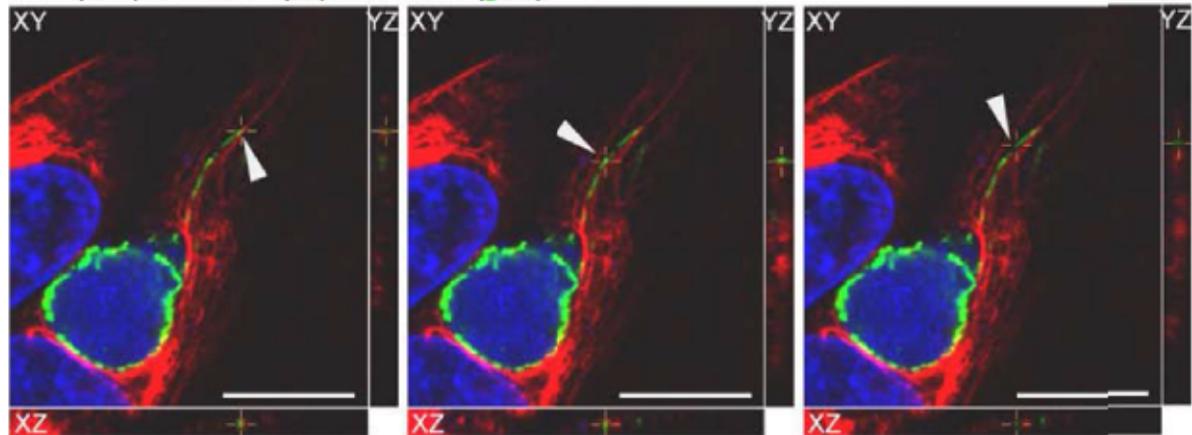
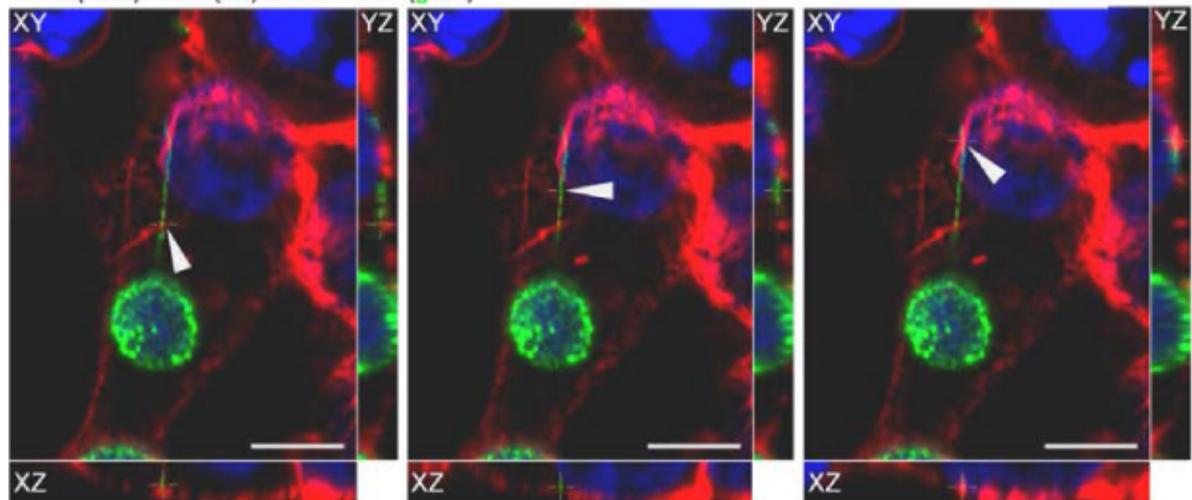
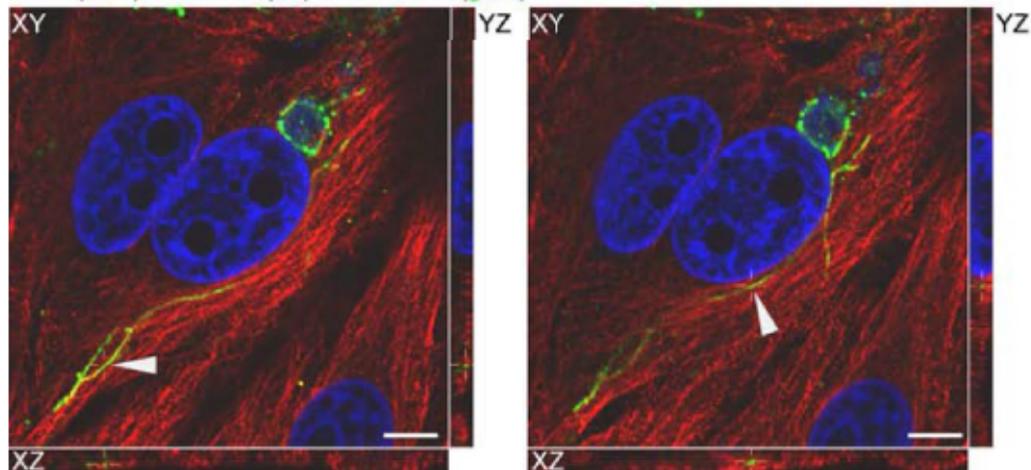
Die kolokalisation der Marker für die humane Zytoplasmamembran mit CPn0147-Signalen und auch die Ergebnisse aus Kapitel 4.2.4.1 zeigten, dass die CPn0147-positiven Fäden wahrscheinlich membranöser Natur sind.

4.2.4.3 Die fädigen CPn0147-Strukturen kolokalisieren vereinzelt mit Zytoskelett-Komponenten der Humanzelle

Neben membranösen Strukturen wurden auch die Zytoskelett-Komponenten Vimentin, Aktin und Mikrotubuli auf eine mögliche Kolokalisation mit CPn0147-Fäden untersucht (Abbildung 4.21).

Vimentin ist eine Komponente der Intermediärfilamente, welche in nicht-infizierten Zellen locker und netzartig-verzweigt im Zytosol und vor allem um den Zellkern der Humanzelle vorlag (vgl. Anhang 6). Bei Vimentin-Färbungen von *C. pneumoniae* infizierten Zellen fiel auf, dass Vimentin-Filamente die *C. pneumoniae*-Inklusion häufig umschlossen (nicht im gezeigten Beispiel). Die CPn0147-positiven Fäden wiesen häufig punktförmige Assoziationen mit Vimentin-Filamenten auf (Abbildung 4.21 links und mitte Dreiecke). Eine Kolokalisation über eine Strecke von einigen μm des CPn0147-Fadens wurde nicht beobachtet und es gab immer auch lange Bereiche der CPn0147-Fäden, an denen kein Vimentin-Signal erkennbar war (Abbildung 4.21 rechts Dreieck).

Aktin war in nicht-infizierten HEp-2-Zellen nur im Zellkortex anfärbbar, das Innere der Zellen war weitestgehend frei von Aktin-Signalen (vgl. Anhang 6). Bei Färbungen infizierter Zellen wurden in einigen Fällen auch im Zytoplasma schwache, unregelmäßige Aktin-Signalen um die Inklusionsmembran herum detektiert, sodass eine Assoziation von Aktin mit der Inklusionsmembran vermutet wurde. Eine Lokalisierung von Aktin- und Intermediärfilamenten an Inklusionen wurde bereits für *C. trachomatis* beschrieben (Kumar & Valdivia 2008). CPn0147-Fäden waren mit Aktin-Signalen ebenfalls nur punktförmig assoziiert (Abbildung 4.21 B links und rechts Dreiecke). Auch hier zeigten Teils lange Abschnitte des CPn0147-Fadens kein Aktin-Signal (Abbildung 4.21 B mitte Dreieck). In der Peripherie der Zelle kolokalisierten CPn0147-Fäden häufiger mit Aktin-Signalen, was auf vermehrte Aktin-Signale im Cortex der Zellen zurückgeführt wurde (Abbildung 4.21 B links und rechts Dreieck).

A DAPI (blau) α -Vimentin (rot) α -CPn0147 (grün)**B** DAPI (blau) Aktin (rot) α -CPn0147 (grün)**C** DAPI (blau) α -Tubulin (rot) α -CPn0147 (grün)**Abbildung 4.21: Kofärbung von Zytoskelett-Komponenten der Wirtszelle und CPn0147**

Die Infektion, Fixierung, Färbung und Mikroskopie der Zellen erfolgte wie beschrieben (Abbildung 4.18). Maßstabsleisten: 5 μ m

A: Infizierte Zellen wurden mit einem Cy3-konjugierten anti-Vimentin-Antikörper und dem anti-CPn0147-Antikörper und einem sekundären Alexa-488-konjugierten Antikörper gefärbt.

B: F-Aktin infizierter Zellen wurden mit Rhodamin-Phalloidin markiert. Die Zellen wurden zusätzlich mit dem anti-CPn0147-Antikörper und einem sekundären Alexa-488-konjugierten Antikörper gefärbt.

C: Infizierte Zellen wurden mit einem anti- α -Tubulin-Antikörper und einem sekundären Alexa-594-konjugierten Antikörper gefärbt. Zusätzlich wurde mit dem anti-CPn0147-Antikörper und einem sekundären Alexa-488-konjugierten Antikörper gefärbt.

Mikrotubuli waren in nicht-infizierten HEp-2-Zellen in der ganzen Zelle als lange fädige bis netzartige Strukturen erkennbar (vgl. Anhang 6). Die Untersuchung einer möglichen Kollokalisierung von CPn0147-Fäden und Mikrotubuli war aufgrund der großen Menge an detektierten Mikrotubuli schwierig (Abbildung 4.21 C). Ebenso wie Vimentin und Aktin zeigten Mikrotubuli nur punktförmige Assoziationen mit CPn0147-Fäden (Abbildung 4.21 C). Mikrotubuli waren immer in der Nähe der CPn0147-Fäden zu erkennen, es wurde aber niemals ein Faden detektiert, der über eine längere Strecke mit einem Mikrotubulus kollokalisierte.

Zusammenfassend wurden viele Beispiele dargelegt, in denen CPn0147-Fäden mit den betrachteten Komponenten des Wirtszellzytoskeletts Vimentin, Aktin und Mikrotubuli kollokalisieren. Aufgrund der Vielzahl der für die jeweilige Zytoskelett-Komponente detektierten Filamente ist allerdings nicht auszuschließen, dass es sich um zufällige Ereignisse handelt.

4.2.5 Ektopisch in Humanzellen exprimiertes CPn0147 bildet fadenartige Strukturen

In den vorangestellten Kapiteln wurden Hinweise gefunden, dass die CPn0147-Fäden membranöse Strukturen darstellen. Die mit den Fäden kollokalisierenden Membranmarker lassen vermuten, dass die Fäden aus derselben Membran bestehen wie die Inklusionsmembran, da die untersuchten Membranmarker mit beiden Strukturen assoziiert waren. Wie die fädigen Strukturen gebildet werden und welche Rolle CPn0147 in der Inklusionsmembran und den Fäden spielt, ist nicht klar. Um die Funktion des CPn0147 eingehender zu untersuchen, wurden CPn0147-Transfektionskonstrukte hergestellt, die eine ektopische Expression von CPn0147 in Humanzellen und die Analyse ihrer Lokalisation erlaubten.

Die verwendeten GFP-Fusionsvarianten von CPn0147 und die vorhergesagten Domänen von CPn0147 sind schematisch in Abbildung 4.22 A dargestellt. Interessanterweise ergab die Analyse der Lokalisation der N-terminalen GFP-CPn0147-Variante (GFPCPn0147) eine ER-

typische Markierung in der transfizierten Humanzelle (Abbildung 4.22 B „N-term GFPCPn0147“). Hochinteressant war, dass die C-terminal markierte CPn0147-GFP-Variante (CPn0147GFP) eine filamentöse bis netzartige Lokalisierung und eine schwache Markierung der Zytoplasmamembran aufwies (Abbildung 4.22 B „CPn0147GFP C-term“). Das die Lokalisation des Fusionsproteins von der Position der Fluoreszenzmarkierung abhängig ist, steht in Einklang mit einer früheren Arbeit, die bereits zeigte, dass die Lokalisierung von Inc-Proteinen davon abhängig sein kann, ob sich eine Markierung am N- oder C-terminalen Ende des Proteins befindet (Shkarupeta *et al.* 2008).

Zur Kontrolle wurden CPn0146 und IncA als C-terminale GFP-Fusion analysiert. IncA gehört zu den bestuntersuchten Inc-Proteinen; während CPn0146 ausgewählt wurde, da es im Genom in direkter Nachbarschaft zu CPn0147 codiert ist, mit 161 Aminosäuren eine vergleichbare Größe und eine ähnliche Anordnung der vorhergesagten Inc-typischen Transmembrandomänen aufweist. Für IncA und CPn0146 war bereits gezeigt worden, dass N-terminal fluoreszenzmarkierte Versionen eine ER-spezifische Lokalisierung aufweisen (Luo *et al.* 2007b). Die Analysen der vorliegenden Arbeit zeigten auch für die C-terminalen GFP-Fusionen eine ER-typische Lokalisierung (Abbildung 4.22 B „IncAGFP C-term“ und „CPn0146GFP C-term“) (vgl. Anhang 6 „dsRed-Calreticulin + IncAGFP“). Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass CPn0147 in der Lage ist spezifisch filamentöse Strukturen zu bilden.

Die filamentösen Strukturen der CPn0147GFP-Expression ließen sich mit einer C-terminalen CPn0147-Fusion mit dem mCherry-Fluoreszenzmarker reproduzieren (Abbildung 4.22 C und D links). Diese beiden CPn0147-Varianten wurden in allen folgenden Transfektions-Experimenten verwendet. Neben dem filamentösen Phänotyp konnten bei der ektopischen CPn0147-Expression zwei weitere Phänotypen unterschieden werden (Abbildung 4.22 C und D). Wesentlich seltener als der Hauptphänotyp traten vesikuläre Strukturen zusammen mit Signalen in der Humanzellmembran auf (Abbildung 4.22 C und D mitte). Äußerst selten tritt ein dritter Phänotyp auf, der an eine ER-typische Lokalisation erinnert (Abbildung 4.22 C und D rechts). Eine Quantifizierung der relativen Häufigkeit der Phänotypen wurde nicht durchgeführt, da die Transfektionseffizienz und die Ausprägung der ersten beiden Phänotypen sehr variabel waren.

Da die Ergebnisse der ektopischen Expression verschiedener CPn0147-Fusionsvarianten darauf hindeuteten, dass der N-Terminus des Proteins eine Bedeutung für die Lokalisierung hat, wurden im Folgenden verschiedene Deletionsvarianten von CPn0147 analysiert.

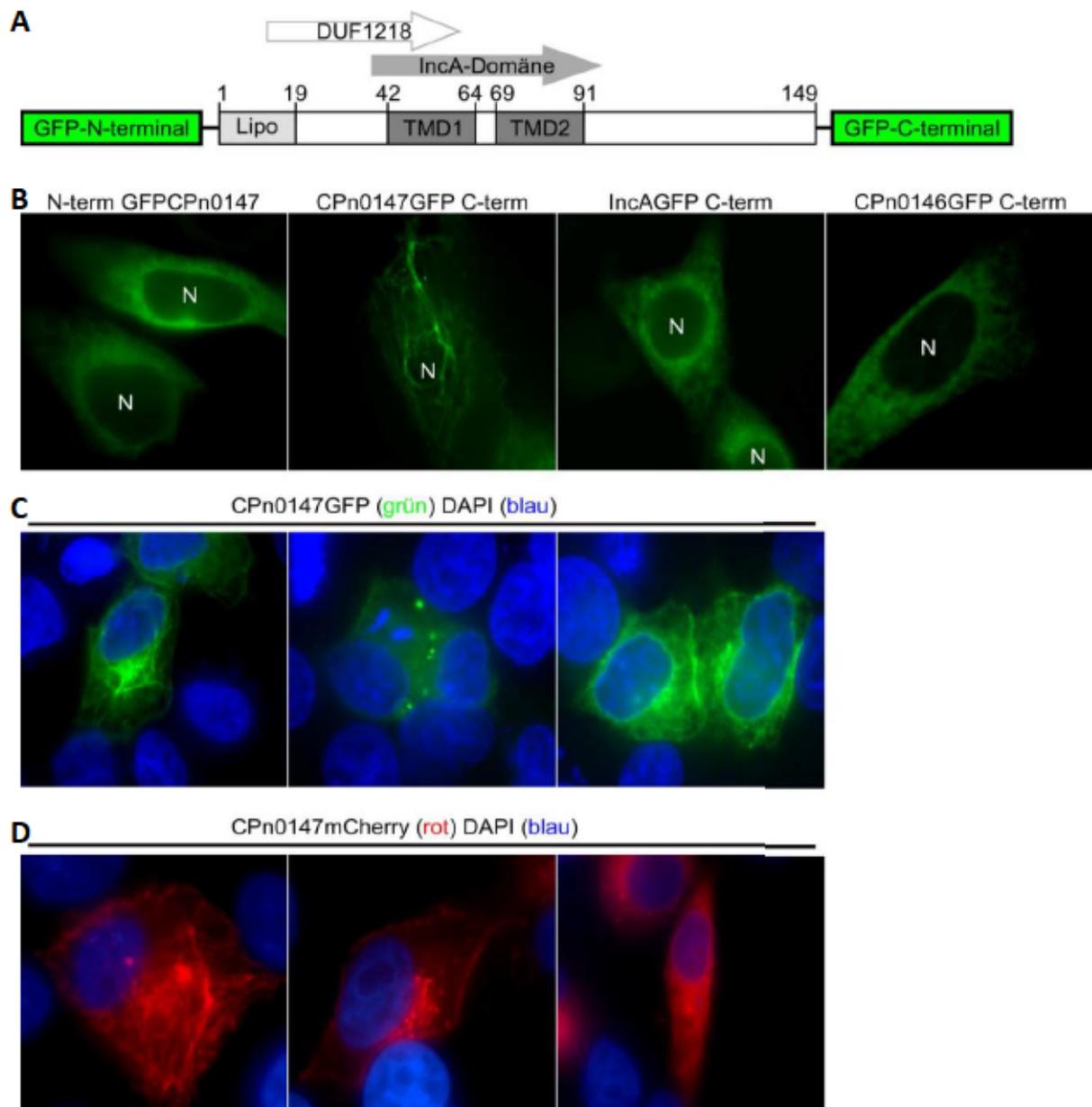


Abbildung 4.22: Die ektopische Expression von CPn0147 führt zur Bildung fadenartiger Strukturen

Hep-2-Zellen wurden mit verschiedenen Konstrukten transfiziert. Nach 16 h wurden die Zellen mit 37 °C warmem, 3 %igem PFA für 10 min fixiert. Die gezeigten Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Nikon C2 Mikroskop generiert.

A: Schematische Darstellung von CPn0147 mit vorhergesagten Domänen und der möglichen N- oder C-terminalen Fusion des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP).

B: Zellen, die eine aminoterminal mit GFP markierte Version von CPn0147 (N-term GFPCPn0147), eine carboxyterminal mit GFP markierte Version von CPn0147 (CPn0147GFP C-term), eine carboxyterminal mit GFP markierte Version von IncA (IncAGFP C-term) oder eine carboxyterminal mit GFP markierte Version von CPn0146 (CPn0146GFP C-term) exprimierten (grün). Die in den Bildern nicht gefärbten Zellkerne wurden mit einem weißen „N“ markiert.

C: Verschiedene Phänotypen der Expression von CPn0147GFP. Die DNS der Humanzellen wurde mit DAPI (blau) sichtbar gemacht.

D: Verschiedene Phänotypen der Expression von CPn0147mCherry. Die DNS der Humanzellen wurde mit DAPI (blau) sichtbar gemacht.

4.2.6 Die fadenartige Lokalisation von CPn0147GFP ist von den Transmembrandomänen und dem C-Terminus abhängig

Es wurden C-terminal GFP-markierte Deletionsvarianten von CPn0147 hergestellt (Abbildung 4.23 A), deren Lokalisierung in Humanzellen durch Transfektionsexperimente analysiert wurde (Abbildung 4.23 B).

Das Volllängenprotein CPn0147GFP bildete Fäden, die sich über die gesamte Zelle erstreckten, wobei in einigen Fällen ein akkumuliertes GFP-Signal in der perinukleären Region der Zelle detektierbar war (Abbildung 4.23 „CPn0147“).

CPn0147 Δ Lipo ist eine N-terminal um 19 Aminosäuren verkürzte CPn0147-Variante. Innerhalb dieser Region befindet sich die vorhergesagte sogenannte „Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site“ (Lipo) (Kapitel 1.7). Diese CPn0147-Variante war in der Lage fadenartige Strukturen zu bilden, die etwas diffuser wirkten als die des Volllängenproteins (Abbildung 4.23 „CPn0147 Δ Lipo“). Insgesamt ähnelte das GFP-Signal dieser Deletionsvariante dem des Volllängenproteins.

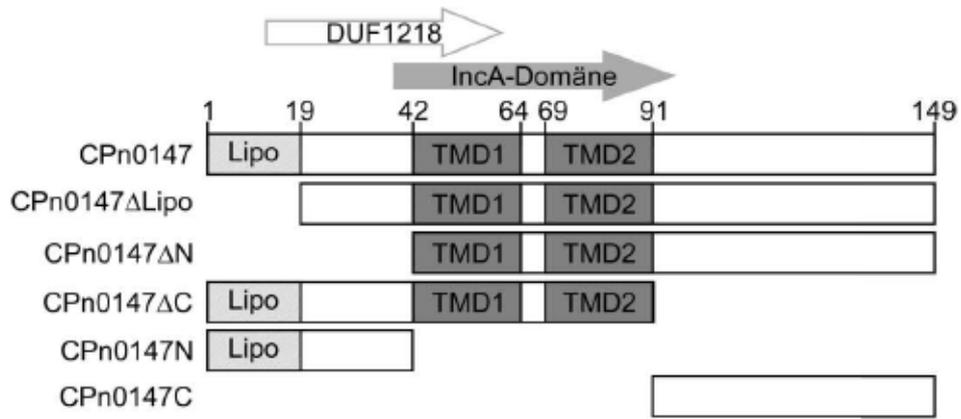
Für CPn0147 Δ N wurde der N-Terminus von CPn0147 bis zum Beginn der ersten Transmembrandomänen (Δ As 1-41) deletiert. Das GFP-Signal dieser Variante unterschied sich deutlich von dem des Volllängenproteins (Abbildung 4.23 „CPn0147 Δ N“). Es waren punktförmige bis vesikuläre, in ihrer Größe stark variable Strukturen detektierbar, die durch ein diffuses im Zytosol der Zelle lokalisiertes Signal ergänzt wurden.

Die Deletion des gesamten C-terminalen Teils hinter den Transmembrandomänen (Δ As 92-149) führte zu einem unregelmäßigen, diffusen Signal im Zytosol und Kern der transfizierten Humanzellen (Abbildung 4.23 B „CPn0147 Δ C“).

Zellen, die den N- (As 1-41) oder den C-Terminus (As 92-149) ohne Transmembrandomänen exprimierten, zeigten ein diffuses zytosolisches Signal und eine Anreicherung des GFP-Signals im Zellkern (Abbildung 4.23 „CPn0147N“ bzw. „CPn0147C“).

Die verschiedenen CPn0147-Deletionsvarianten wurden zwischen 15 und 31 h lang in Humanzellen exprimiert, um die Auswirkung der Expressionszeit auf die beobachteten Phänotypen zu untersuchen. Einige Phänotypen bildeten sich nach längerer Expression deutlicher heraus, veränderten sich jedoch in ihrer Lokalisation nicht (digitaler Anhang „TC CPn0147GFP Deletionsvarianten“).

A



B

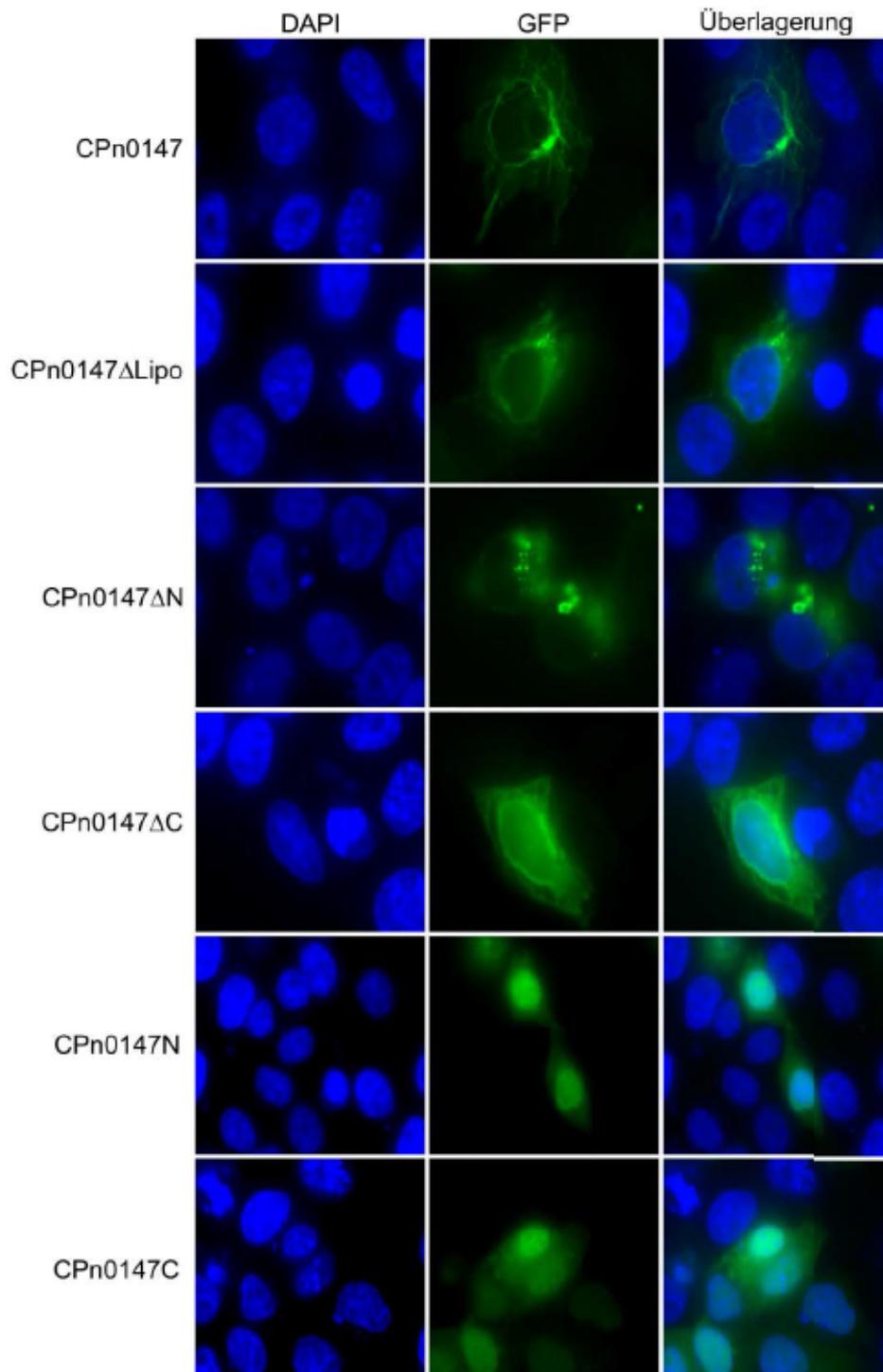


Abbildung 4.23: Lokalisierung verschiedener CPn0147GFP-Deletionsvarianten

A: Schematische Darstellung der verwendeten Deletionsvarianten von CPn0147. Eingezeichnet sind die vorhergesagten Domänen (DUF1218, IncA-Homologie, eine „Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site“ = Lipo und zwei Transmembrandomänen = TMD). Wichtige Aminosäurepositionen (Zahlen oberhalb der CPn0147-Darstellung) sind angegeben. Die verschiedenen Deletionsvarianten CPn0147 Δ Lipo (Δ As 1-19), CPn0147 Δ N (Δ As 1-41), CPn0147 Δ C (Δ As 92-149), CPn0147N (As 1-41) und CPn0147C (As 92-149) wurden C-terminal mit GFP markiert.

B: Beobachtete Lokalisationsphänotypen der CPn0147-Deletionsvarianten (gezeigt in A) bei Expression in HEP-2-Zellen. 18 h nach Transfektionsbeginn wurden die Zellen mit 37 °C warmem, 3 %igem PFA fixiert. Die DNS wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Die GFP-Signale der verschiedenen Konstrukte sind grün dargestellt.

Die in diesem Kapitel gezeigten Ergebnisse ließen eine zentrale Rolle der Transmembrandomänen bei der Lokalisation des CPn0147 vermuten, da N- und C-Terminus allein keine distinkte Lokalisierung aufwiesen. Das Fehlen des C-Terminus (Δ As 92-149) wirkt sich im Gegensatz zur Deletion der Lipo-Domäne stark auf die Lokalisierung des GFP-Signals aus. Dieses Ergebnis war unerwartet, da vermutet wurde, dass die Lipo-Domäne bei der Lokalisierung eine Zentrale Rolle spielt. Doch auch die Deletionsvariante CPn0147 Δ N bildete eine distinkte vesikuläre Struktur, was einen Hinweis darauf darstellt, dass möglicherweise der C-Terminus an der Lokalisierung des Proteins beteiligt ist.

4.2.7 Die CPn0147GFP-Fäden besitzen eine membranöse Identität

Im nächsten Schritt wurde analysiert, ob CPn0147-Fäden der Transfektion (CPn0147GFP bzw CPn0147mCherry) mit einem Kompartiment der Humanzelle kolokalisieren. Dazu wurden bereits in Kapitel 4.2.4 genutzte Markerproteine verwendet (siehe Tabelle 4.2). Dies sollte Aufschluss über die Funktion der Fäden geben und klären, ob es sich bei den hier beobachteten Fäden um die gleichen Fäden handelte, wie die in der Infektion beobachteten. Um eine mögliche Assoziation mit Komponenten der Plasmamembran eingehender zu untersuchen, wurden CPn0147GFP exprimierende Zellen zusätzlich mit dem sogenannten „Wheat germ agglutinin“ (WGA) gefärbt, welches Zuckerstrukturen an der Oberfläche der Humanzellen markiert.

Wurden die Marker für frühe und späte Endosomen Rab5 oder Rab7 ohne zusätzliche CPn0147-Transfektion betrachtet, zeigten transfizierte Zellen vesikuläre, meist in einem Bereich der Zelle akkumulierte Signale (vgl. Anhang 6). Bei Koexpression des CPn0147mCherry mit den Endosomenmarkern wurde der fadenartige CPn0147-Phänotyp nur noch selten beobachtet. Während die vesikuläre Lokalisierung des Rab5 und Rab7 unverändert blieb, waren häufig punktierte CPn0147mCherry-Signale detektierbar, die mit

Rab5 oder Rab7 kolokalisierten (Abbildung 4.24 „Rab5-GFP“ und „Rab7-GFP“). Einige der CPn0147mCherry-Signale waren ringartig von Rab5-GFP- bzw. Rab7-GFP-Signalen umgeben. Innerhalb dieser Rab-GFP-Vesikel erschien das CPn0147mCherry-Signal meist kompakt-punktförmig, seltener auch vesikulär. In manchen Fällen wurden zusätzlich fädige CPn0147-Strukturen beobachtet, die dann jedoch Rab5- oder Rab7-negativ waren (Abbildung 4.24 „Rab7-GFP“).

Zudem zeigten die CPn0147-Fäden meist kontinuierliche Überlagerungen mit den Signalen der Membranmarker LactC2-GFP und mCherry-GPI, sowie dem Marker für Recycling-Endosomen Rab11-GFP (Abbildung 4.24 „Rab11-GFP“, „LactC2-GFP“ und „mCherry-GPI“). Dagegen wurde die Zytoplasmamembran markierende WGA nur in distinkten Vesikeln an den Fäden detektiert (Abbildung 4.24 „WGA“). Die Kolokalisationen der CPn0147-Fäden mit Rab11-GFP, LactC2-GFP und WGA werden in den folgenden Kapiteln ausführlicher dargestellt (Kapitel 4.2.7.1 und 0).

Da eine Assoziation des Zytoskeletts mit CPn0147-positiven Fäden in der *C. pneumoniae*-Infektion nicht ausgeschlossen wurde, wurde auch die Assoziation von Aktin, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten mit ektopisch exprimiertem CPn0147 untersucht. Wie zuvor in den mikroskopischen Untersuchungen der Infektion war aufgrund der vielen Mikrotubuli in den Humanzellen eine Analyse der Kolokalisierung mit CPn0147-Fäden schwierig (Abbildung 4.24 „ α -Tubulin“). In der Transfektion wurden viele Beispiele gefunden, die Überschneidungen der Signale für Tubulin und CPn0147mCherry aufwiesen, jedoch könnte es sich hier auch um zufällige Ereignisse handeln (siehe Kapitel 4.2.4.3). Interessanterweise wurde die Lokalisation der analysierten Intermediärfilament-Komponente Vimentin durch die Expression des CPn0147-GFP stark verändert (Abbildung 4.24 „ α -Vimentin“). Dieser Befund wird im Folgenden detailliert dargestellt (Kapitel 4.2.7.2). Eine Kolokalisation von CPn0147-Fäden mit Aktinfilamenten wurde nicht beobachtet (nicht gezeigt).

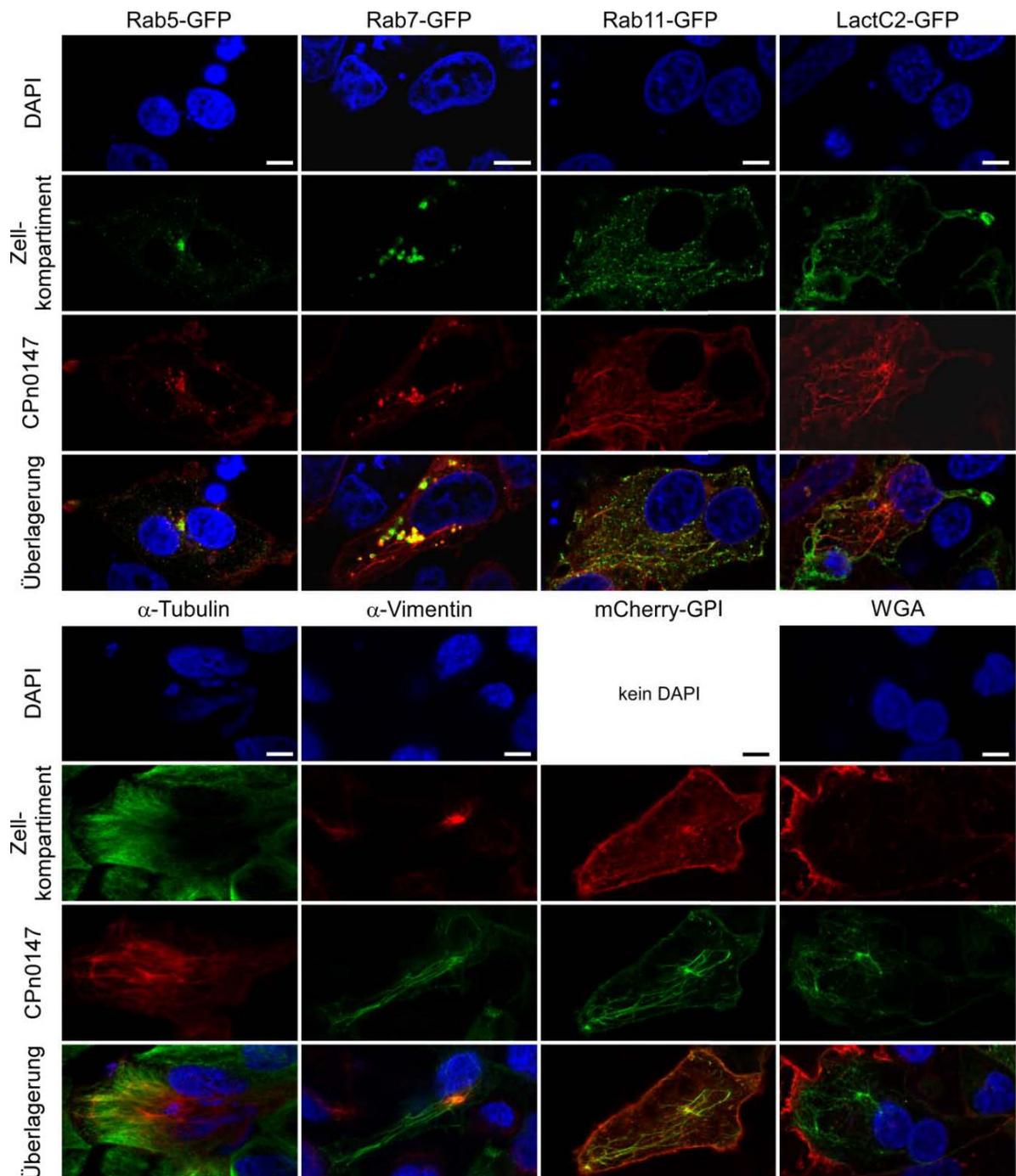


Abbildung 4.24: Kolokalisation von Humanzellkompartimenten mit ektopisch exprimiertem CPn0147

Hep-2-Zellen wurden mit Konstrukten für Rab5-GFP, Rab7-GFP, Rab11A-GFP, LactC2-GFP oder mCherry mit GPI-Anker und CPn0147GFP oder CPn0147mCherry transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden nach 18 h mit 37 °C warmem, 3 %igem PFA für 10 min fixiert. Die DNS wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Für Antikörper-Färbungen wurden die Zellen mit Saponin permeabilisiert und anschließend mit einem anti- α -Tubulin-Antikörper und einem sekundären Alexa-488-konjugierten Antikörper oder einem Cy3-konjugierten Vimentin-Antikörper gefärbt. Die Färbung mit Alexa-594-konjugiertem WGA wurde für 10 min bei RT durchgeführt. Alle Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Nikon C2 Mikroskop generiert. Maßstabsleiste: 5 μ m

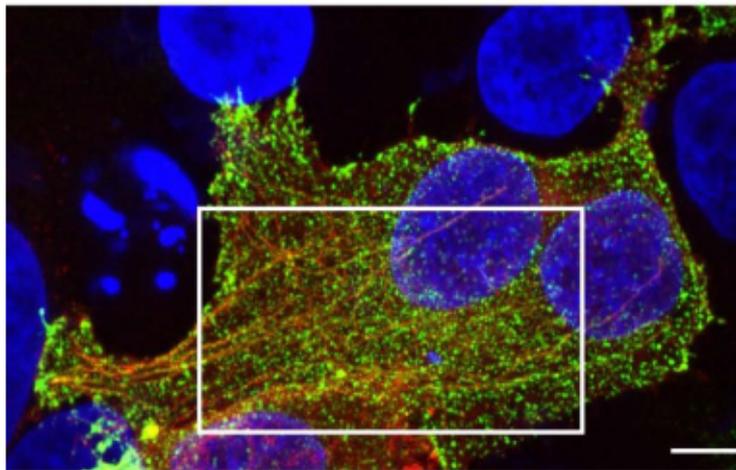
4.2.7.1 CPn0147GFP-Fäden kolokalisieren mit Rab11-positiven Recycling-Endosomen

Da in der Infektion eine Kolokalisation von Rab11 mit CPn0147-positiven Fäden beobachtet worden war, wurde eine mögliche Assoziation dieser beiden Proteine auch in Transfektionsexperimenten analysiert.

Zellen, die ausschließlich Rab11-GFP exprimierten, wiesen sehr viele punktierte GFP-Signale auf, die mehr oder weniger gleichmäßig im Zytosol verteilt waren (vgl. Anhang 6). Mit CPn0147mCherry und Rab11-GFP kotransfizierte Zellen wiesen CPn0147mCherry-Fäden auf, die mit punktförmigen oder kontinuierlichen Rab11-GFP-Signalen kolokalisierten (Abbildung 4.25 A). Abbildung 4.25 B zeigt zwei Beispiele für ein punktförmiges (oben, Dreieck) bzw. fadenförmiges Rab11-GFP Signal (unten, Dreieck) welche auf einem CPn0147mCherry-Faden lokalisierten. Ähnlich wie bei CPn0147-positive Fäden in der Infektion wurden die CPn0147mCherry-Fäden durch die Rab11-GFP-Signale unterbrochen und streckenweise fortgeführt (vgl. Kapitel 4.2.4.1).

Die Ähnlichkeit der Kolokalisations-Muster der CPn0147mCherry-Fäden mit Rab11-GFP zu CPn0147-positiven Fäden mit Rab11-GFP in der *C. pneumoniae*-Infektion war ein Hinweis darauf, dass sich die jeweiligen CPn0147-Strukturen ähneln. Möglicherweise handelt es sich bei den CPn0147mCherry-Fäden um Membranstrukturen, die mit Rab11-Vesikeln interagieren oder sogar mit ihnen fusionieren können.

A DAPI (blau) Rab11-GFP (grün) CPn0147mCherry (rot)



B

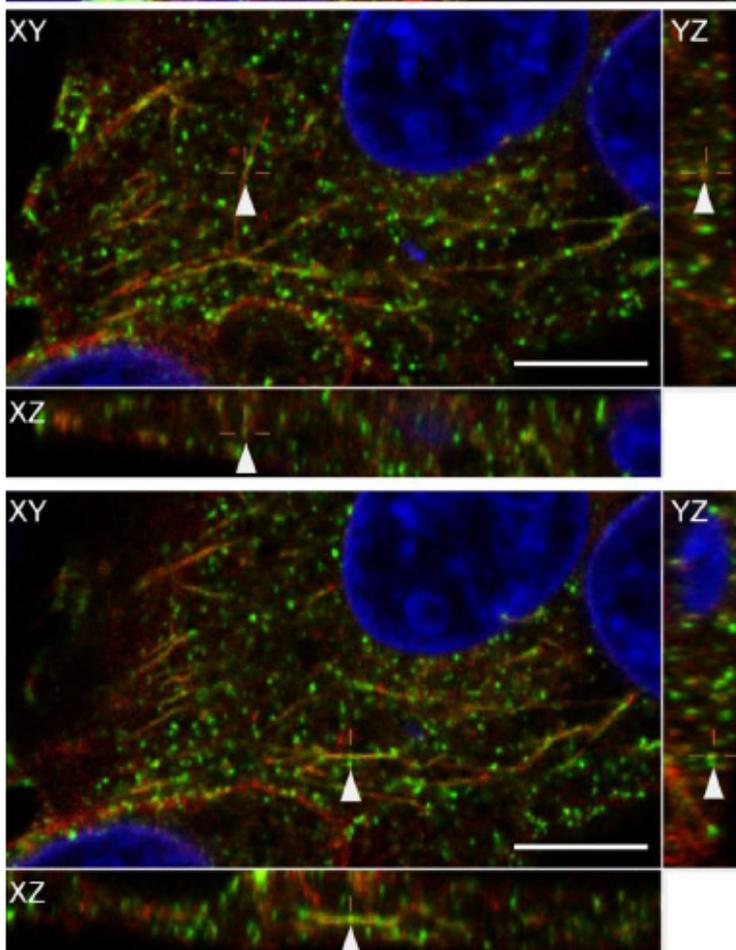


Abbildung 4.25: Kolokalisation von Rab11-GFP-Vesikeln mit CPn0147mCherry-Fäden

HEp-2-Zellen wurden mittels mit einem Rab11-GFP (grün) und einem CPn0147mCherry (rot) Konstrukt transfiziert. Der Versuch wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt (siehe Abbildung 4.24).

Maßstabsleiste: 5 μ m

A: Eine „maximum intensity projection“ (MIP) einer transfizierten Zelle. Eine MIP ist fasst mehrere Aufnahmen verschiedener Präparats-Ebenen zu einem 2D-Bild zusammen. So ist es möglich, fädige CPn0147mCherryStrukturen in ihrer gesamten Ausdehnung zu betrachten. Der unter B vergrößerte Ausschnitt ist markiert.

B: Zwei verschiedene Ebenen des unter A markierten Bildausschnittes. Bereiche von Interesse sind in den verschiedenen Ebenen der Orthogonalansichten durch weiße Dreiecke markiert.

4.2.7.2 Die Expression von CPn0147GFP verändert das Zytoskelett der Humanzelle

Wie in Kapitel 4.2.7 beschrieben wurde, zeigte die Färbung des Vimentin in CPn0147-exprimierenden Humanzellen starke Unterschiede in der Lokalisation im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen. Die Färbung von Vimentin in nicht-transfizierten Zellen wies meist ein lockeres netzartiges, in der Nähe des Zellkerns lokalisiertes Signal auf (Abbildung 4.26 A).

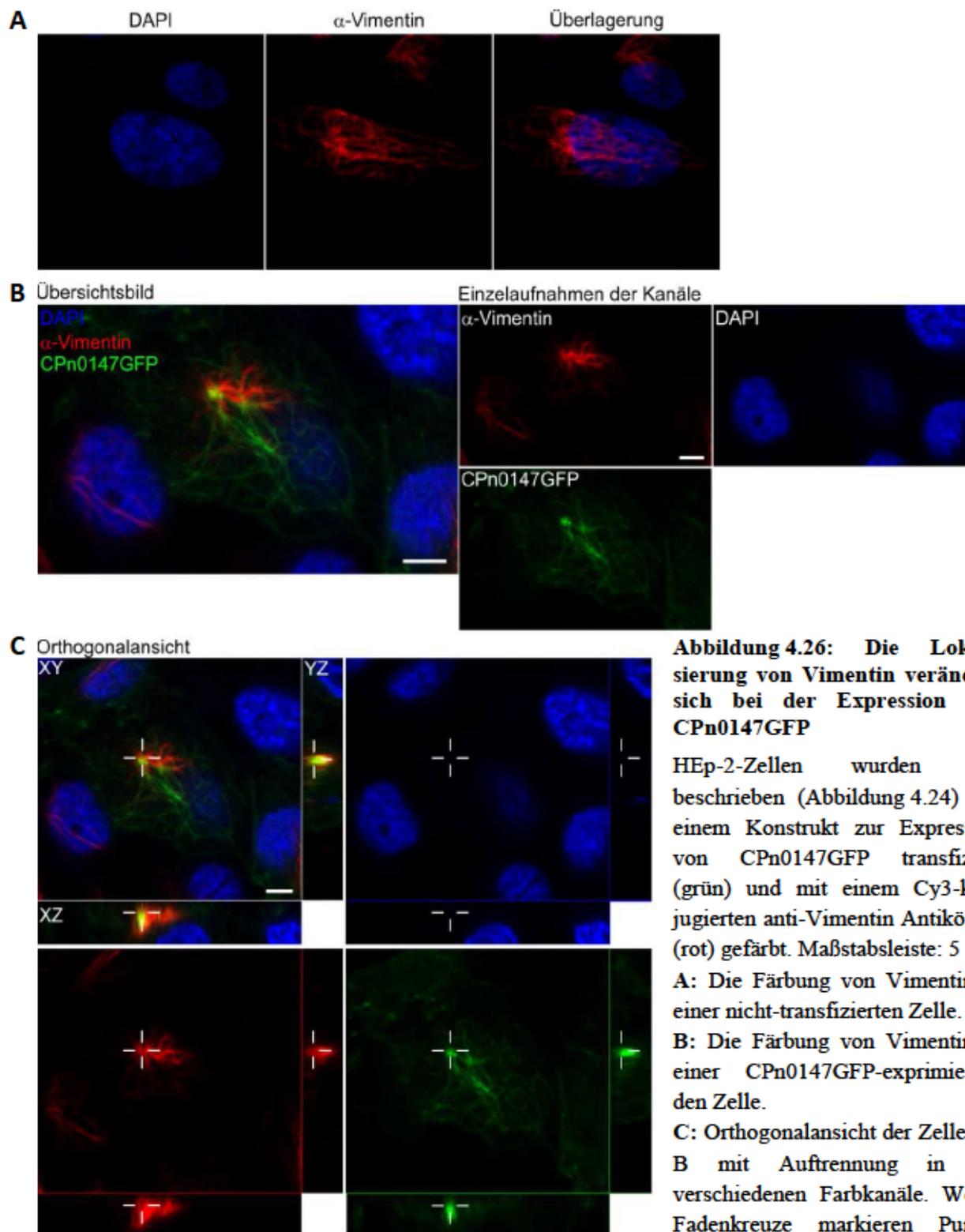


Abbildung 4.26: Die Lokalisierung von Vimentin verändert sich bei der Expression von CPn0147GFP

HEp-2-Zellen wurden wie beschrieben (Abbildung 4.24) mit einem Konstrukt zur Expression von CPn0147GFP transfiziert (grün) und mit einem Cy3-konjugierten anti-Vimentin Antikörper (rot) gefärbt. Maßstabsleiste: 5 μ m

A: Die Färbung von Vimentin in einer nicht-transfizierten Zelle.

B: Die Färbung von Vimentin in einer CPn0147GFP-exprimierenden Zelle.

C: Orthogonalansicht der Zelle aus B mit Auftrennung in die verschiedenen Farbkanäle. Weiße Fadenkreuze markieren Punkte von Interesse.

Dagegen wiesen Zellen, die CPn0147GFP exprimierten, häufig ein Vimentin-Signal auf, das in einem Punkt akkumuliert in der Nähe des Zellkerns lokalisiert (Abbildung 4.26 B). Die netzartige Vimentin-Struktur war nicht mehr erkennbar, aber von dem akkumulierten Vimentin-Signal gingen meist wenige dicke und kurze Filamente aus. In mehreren Fällen wurde beobachtet, dass wie im gezeigten Beispiel ein stärkeres CPn0147GFP-Signal mit dem akkumulierten Vimentin-Signal assoziiert war. Zusätzlich zum stärkeren CPn0147GFP-Signal waren die typischen CPn0147GFP-Fäden vorhanden, die jedoch nicht mit dem Vimentin-Signal kolokalisierten (Abbildung 4.26 B und C).

Eine Auftrennung der verschiedenen Farbkanäle verdeutlichte, dass die Signale des CPn0147-Signals und des Vimentin nicht kolokalisierten (Abbildung 4.26 C). Vielmehr war das CPn0147GFP-Signal im Vimentin-Signal eingebettet und wurde von diesem nahezu umschlossen (Abbildung 4.26 C Fadenkreuz).

Dieser Befund lässt vermuten, dass CPn0147GFP nicht direkt mit Vimentin interagiert, sondern auf eine andere Weise die Lokalisierung dieser Komponente des Intermediärfilament-Zytoskeletts veränderte.

4.2.7.3 CPn0147-Fäden sind mit endo- oder exozytotischen Vesikeln assoziiert

LactC2-GFP markierte in nicht-transfizierten Zellen die Zytoplasmamembran und einige Vesikel im Zytosol der Humanzelle (vgl. Anhang 6). Interessanterweise verändert die Koexpression von CPn0147mCherry und LactC2-GFP die Lokalisierung des LactC2-GFP teilweise, sodass auch fädige LactC2-Strukturen im Zytosol der Humanzelle detektiert wurden (Abbildung 4.27 A). Die Signale der beiden ektopisch exprimierten Proteine waren in den fädigen Strukturen nahezu deckungsgleich. Zusätzlich waren viele LactC2-GFP-Strukturen erkennbar, die einen punktierten bis vesikulären Charakter aufwiesen. Die meisten dieser LactC2-GFP-positiven Vesikel waren mit CPn0147mCherry-Signalen assoziiert (Abbildung 4.27 B). Dabei umschlossen vesikuläre LactC2-GFP-Strukturen teilweise selbst punktierte CPn0147mCherry-Strukturen (links) oder LactC2-GFP-Vesikel waren vollständig von CPn0147mCherry-Signalen umgeben (rechts). Interessanterweise ähnelte der beobachtete Phänotyp der Koexpression von CPn0147GFP und dem mCherry-GPI-Anker-Protein sehr stark der beobachteten Kolokalisation CPn0147mCherry und LactC2-GFP (Abbildung 4.24 „mCherry-GPI“).

Ähnlich dem LactC2-GFP-Signal markierte WGA in nicht-transfizierten Humanzellen die Zytoplasmamembran und Vesikel im Zytosol (vgl. Anhang 6). WGA markiert dabei Zuckerstrukturen auf der Außenseite der humanen Plasmamembran. Interessanterweise waren WGA-Signale im Gegensatz zu LactC2-GFP-Signalen nicht mit den beobachteten CPn0147GFP-Fäden in transfizierten Zellen überlagert (Abbildung 4.27 C). WGA-positive Vesikel waren mit den Fäden assoziiert und wurden teilweise von CPn0147GFP-Fäden umgeben oder befanden sich in räumlicher Nähe zu CPn0147GFP-Signalen (Abbildung 4.27 C Fadenkreuze).

Da die getesteten Marker vor allem die Plasmamembran der Humanzelle markieren, könnten die CPn0147GFP- bzw. CPn0147mCherry-Fäden mit endozytotischen Vesikeln assoziiert sein, die von der Membran stammen. Die Marker könnten jedoch auch exozytotische Ladung markieren, da Proteine der Plasmamembran im ER und Golgi-Apparat glykosyliert werden (WGA-Markierung) und Phosphatidylserin (LactC2-Markierung) während des Transportes in exozytotischen Vesikeln angereichert wird (Fairn *et al.* 2011; Moremen *et al.* 2012). Daher konnten die gezeigten Versuche nicht zwischen den verschiedenen Transportwegen unterscheiden. Orientierende Experimente ließen vermuten, dass sich CPn0147GFP-Fäden in räumlicher Nähe zum Golgi-Apparat befinden (vgl. Anhang 6 „ α -Golgi + CPn0147GFP“).

Die in den letzten Kapiteln gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass CPn0147-Fäden der ektopischen Expression ebenfalls membranöser Natur sind.

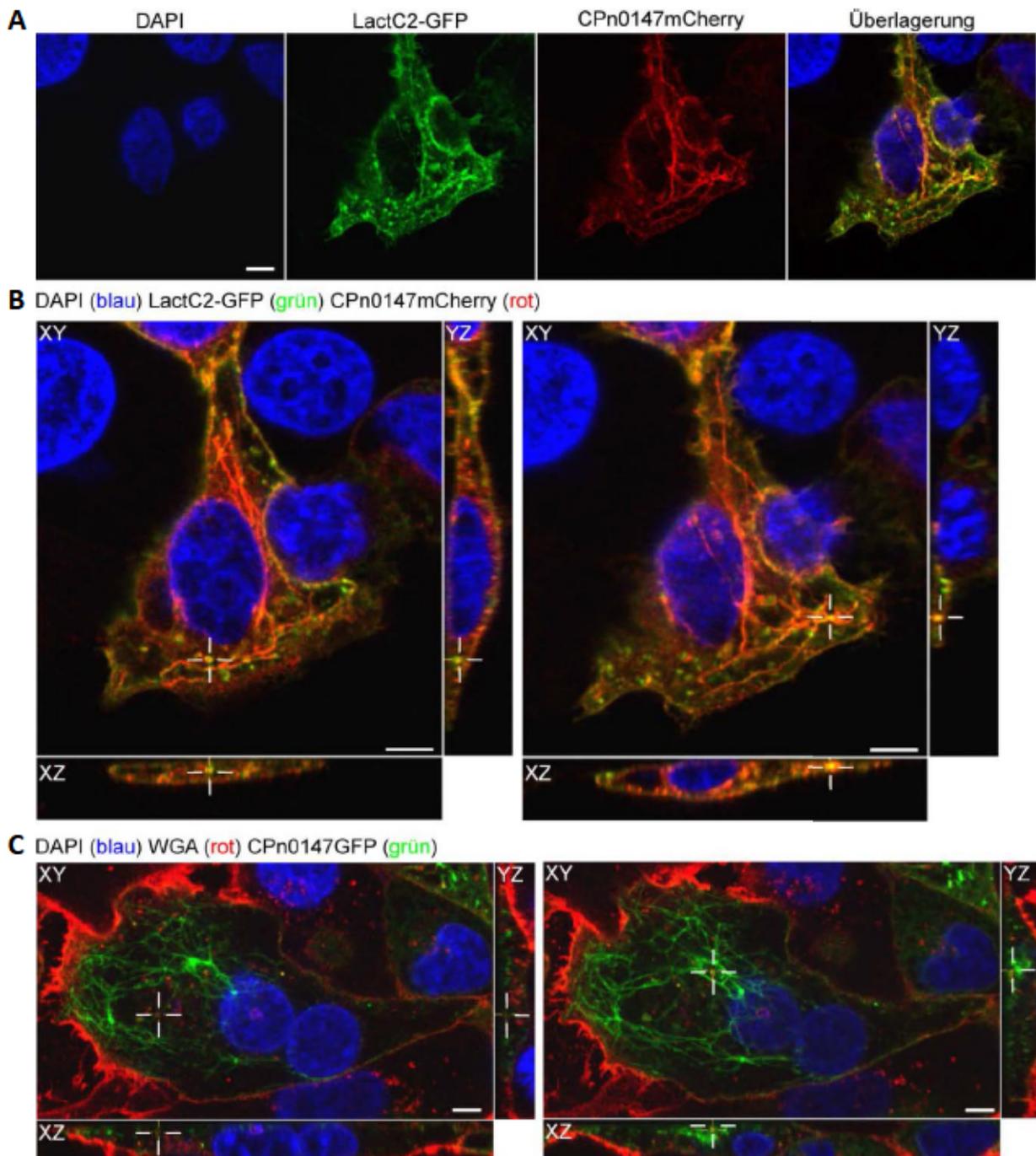


Abbildung 4.27: In Transfektionsexperimenten sind CPn0147GFP-Fäden mit WGA- und LactC2-GFP-positiven Vesikeln assoziiert

Hep-2-Zellen wurden mit Konstrukten für CPn0147GFP oder CPn0147mCherry und LactC2-GFP transfiziert und wie beschrieben weiter behandelt (Abbildung 4.24). Maßstabsleiste: 5 μm

A: MIP-Übersichtsaufnahme einer mit CPn0147mCherry (rot) und LactC2-GFP (grün) kotransfizierten Zelle. Die verschiedenen Farbkanäle sind separat und überlagert dargestellt.

B: Zwei verschiedene Orthogonalansichten der unter A abgebildeten Zelle. Interessante Punkte sind mit Fadenkreuzen markiert.

C: Zellen, die CPn0147GFP exprimierten (grün), wurden mit Alexa-594-konjugiertem WGA (rot) gefärbt. Gezeigt sind zwei verschiedene Orthogonalansichten einer Zelle. Interessante Punkte sind mit Fadenkreuzen markiert.

4.2.8 Die CPn0147-Fäden sind mit dem ER der Humanzelle assoziiert

Während der Infektion wird CPn0147 in die Membran der Inklusion sekretiert und dort wahrscheinlich mit den zwei vorhergesagten Transmembrandomänen verankert, um eine Funktion während der *C. pneumoniae*-Infektion auszuüben. In der Transfektionssituation wird CPn0147 am rauen Endoplasmatischen Retikulum (ER) der transfizierten Zelle translatiert. Da die Möglichkeit besteht, dass CPn0147 bei ektopischer Expression wegen seiner Transmembrandomänen vor allem in die Membran des ER inseriert wird, wurde als nächstes die mögliche Assoziation mit dem ER untersucht. Dazu wurden Transfektionskonstrukte für die Expression fluoreszenzmarkierter Versionen des Chaperons Calreticulin und des Stromal interaction molecule 1 (STIM-1) transfiziert. Es wurden Transfektionsexperimente genutzt, da Signale des anti-Calnexin-Antikörpers nicht mit CPn0147-Fäden in der Infektion (vgl. Abbildung 4.18 α -Calnexin) bzw. mit CPn0147-Signalen der Transfektion (nicht gezeigt) kolokalisierten.

Das ER-Chaperon Calreticulin markiert das ER-Lumen. STIM-1 markiert die ER-Mikrotubuli-Kontaktstellen, an denen das periphere ER wächst (Grigoriev *et al.* 2008). STIM-1 wurde gewählt, da eine mittelbare oder unmittelbare Interaktion von CPn0147 mit dem Zytoskelett der Humanzelle bisher nicht ausgeschlossen werden konnte.

Zellen, die das Transfektionskonstrukt dsRed-Calreticulin exprimierten, zeigen im Zytoplasma der Zelle verteilte Signale mit Bereichen stärkerer und schwächerer Intensität (Abbildung 4.28 A „dsRed-Calreticulin“). STIM-1GFP exprimierende Zellen zeigten ebenfalls Signale im Zytoplasma der Zelle die aber eher eine netzartige Struktur und teilweise stärkere, punktförmige Signale aufwiesen (Abbildung 4.28 A „STIM-1GFP“).

Durch die Koexpression änderte sich die Lokalisation der verwendeten ER-Marker und die fädigen Strukturen von CPn0147GFP bzw. CPn0147mCherry nicht (Abbildung 4.28 B und C). Im Falle der Koexpression von Calreticulin mit CPn0147 wurde keine bemerkenswerte Kolokalisierung des Calreticulin-Signals mit den CPn0147GFP-Fäden detektiert (Abbildung 4.28 B). Da Calreticulin im gesamten Lumen der Zelle detektiert wurde, kam es gelegentlich zu Überschneidungen der Signale mit CPn0147-Fäden.

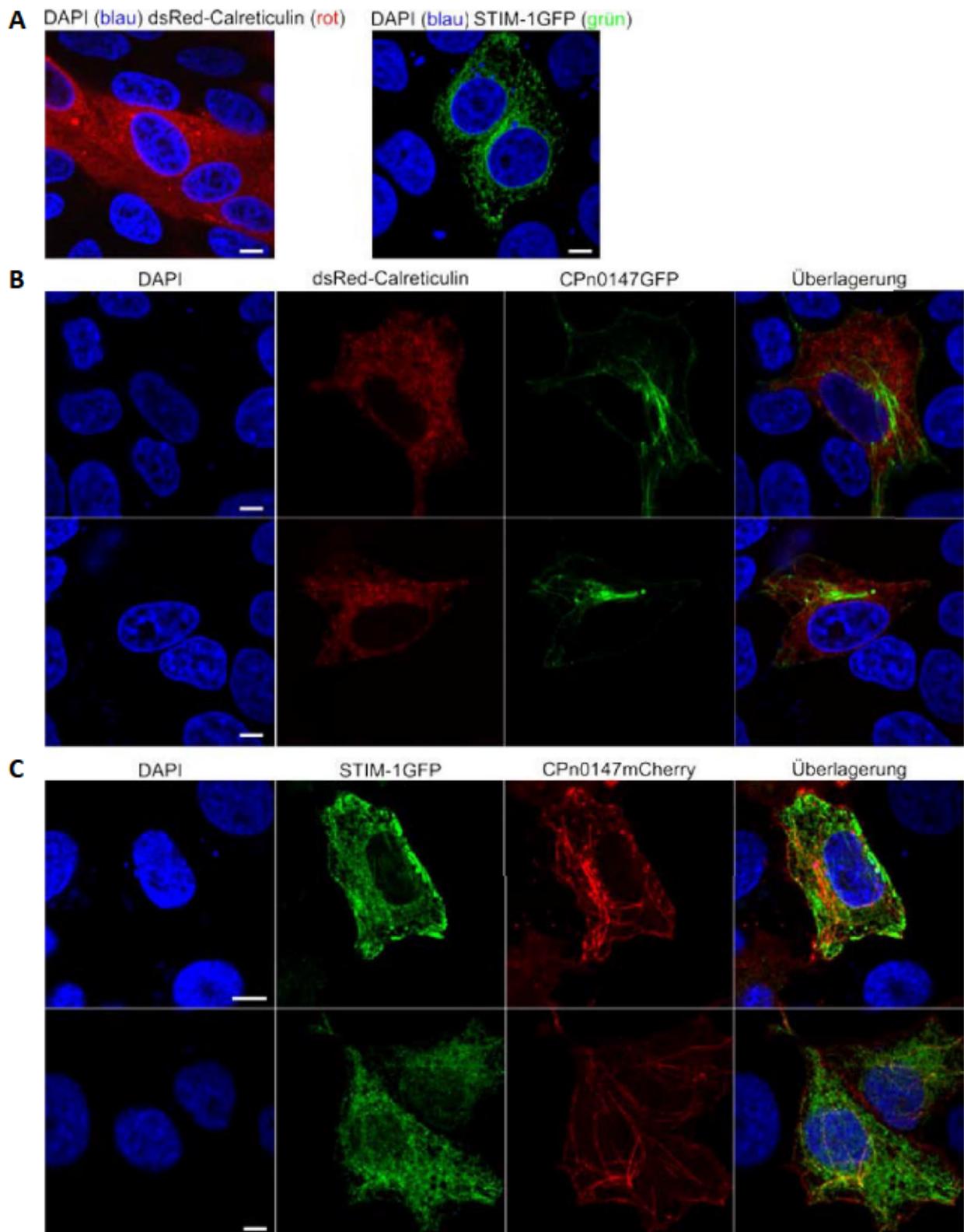


Abbildung 4.28: Ektopisch exprimiertes CPn0147 kolokalisiert mit einem ER-Markerprotein

Hep-2-Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konstrukten transfiziert. Die Zellen wurden zur Färbung und Mikroskopie wie beschrieben behandelt (Abbildung 4.24). Maßstabsleiste: 2,5 μ m

A: Transfektionskontrolle von Zellen die nur dsRed-Calreticulin (rot) oder STIM-1GFP (grün) exprimieren.

B: Zwei Beispiele der Kotransfektion von dsRed-Calreticulin (rot) und CPn0147GFP (grün).

C: Zwei Beispiele der Kotransfektion von STIM-1GFP (grün) und CPn0147mCherry (rot).

Im Gegensatz dazu kolokalisierten gepunktete STIM-1GFP-Signale auf ganzer Länge der CPn0147mCherry-Fäden (siehe Abbildung 4.28 C). Interessanterweise wurde auch eine Assoziation des in Kapitel 4.2.5 beschriebenen vesikulären CPn0147-Phänotyps mit STIM-1GFP-Strukturen beobachtet (Abbildung 4.29 A). Nahezu alle vesikulären CPn0147mCherry-Signale waren hier mit den netzartigen STIM-1GFP-Signalen assoziiert und zum Teil vollständig von STIM-1GFP-Signalen umgeben (Abbildung 4.29 A Dreieck in der Vergrößerung).

Zudem wurden häufig intensivere STIM-1GFP-Signale in der Peripherie der Zelle detektiert, die mit CPn0147mCherry-Fäden kolokalisierten und vor allem deren Enden markieren (Abbildung 4.29 B Dreiecke). In einigen Fällen wurden in distinkten Bereichen der CPn0147-Fäden kontinuierliche STIM-1GFP-Signale detektiert, die über kurze Strecken mit dem CPn0147mCherry-Faden kolokalisierten (Abbildung 4.29 C Vergrößerungen 1 und 2; Dreiecke). Am häufigsten wurden jedoch gepunktete STIM-1GFP-Signale wie auf einer Perlenkette auf den CPn0147-Fäden detektiert (Abbildung 4.29 C Vergrößerung 3; Dreiecke).

Die Orthogonalansichten zeigten, dass punktförmige STIM-1GFP-Signale die CPn0147-Fäden teilweise umgeben (links) und in einigen Fällen auch zu tubulären Strukturen gehörten, die sich verzweigen und in anderen Ebenen fortgeführt werden (rechts) (Abbildung 4.29 D Fadenkreuze).

Die Koexpressions-Experimente bestätigten, dass die fädigen CPn0147mCherry-Strukturen über längere Bereiche mit STIM-1GFP-Signalen kolokalisierten. Dies ist ein Hinweis darauf, dass CPn0147-Fäden mit dem ER der Humanzelle in Verbindung stehen, obwohl Analysen mit den ER-Chaperonen Calnexin und Calreticulin hier bisher keine eindeutigen Ergebnisse lieferten.

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die Fäden in der *C. pneumoniae*-Infektion mit STIM-1GFP assoziiert sind.

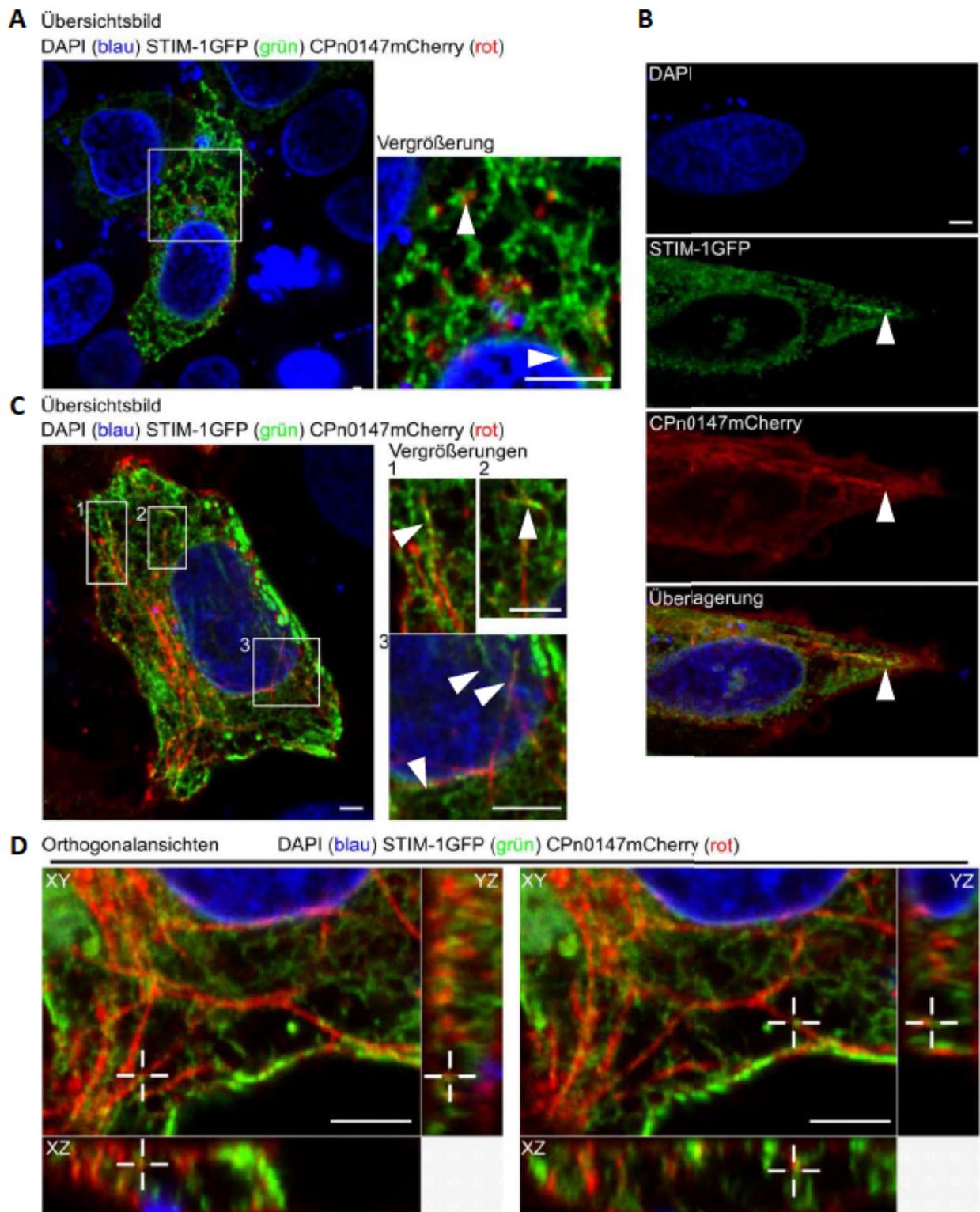


Abbildung 4.29: Analyse der Kolo-kalisierung von CPn0147mCherry-Fäden mit STIM-1GFP-positiven Strukturen

Hep-2-Zellen wurden 24 h mit CPn0147mCherry (rot) und STIM-1GFP (grün) Konstrukten kotransfiziert. Die Zellen wurden zur Färbung und Mikroskopie wie bereits beschrieben behandelt (Abbildung 4.24). Maßstabsleiste: 2,5 μm .

A: Eine kotransfizierte Zelle, die den seltener vorkommenden, punktierten CPn0147mCherry-Phänotyp zeigt. Der mit einem Quadrat markierte Bereich der Zelle wurde vergrößert dargestellt.

B: Eine kotransfizierte Zelle, die den fadenartigen CPn0147mCherry-Phänotyp zeigt. Die Dreiecke markieren ein starkes STIM-1GFP-Signal in der Peripherie der Zelle, das mit CPn0147mCherry-Fäden kolokalisiert.

C: Die kotransfizierte Zelle aus Abbildung 4.28 C oben ist gezeigt. Beispiele für kolokalisierende CPn0147mCherry- und STIM-1GFP-Signale der mit Quadraten markierten Bereiche sind vergrößert dargestellt. Interessante Bereiche wurden mit Dreiecken markiert.

D: Zwei verschiedene Orthogonalansichten der in C abgebildeten Zelle. Es wurden weiße Fadenkreuze zur Orientierung eingefügt, um Punkte von Interesse zu markieren.

4.2.9 STIM-1GFP lokalisiert in der Infektion teilweise auf IncA-positiven Fäden

Die Inklusionsmembran steht mit dem ER der Humanzelle in engem räumlichen Kontakt (Dumoux *et al.* 2012). Es konnte bereits gezeigt werden, dass an diesen Kontaktstellen ein Transport von Lipiden der ER-Membran zur Inklusionsmembran durch das Inc-Protein IncD vermittelt wird (Derré *et al.* 2011). Da bisher keine Assoziation der in der *C. pneumoniae*-Infektion beobachteten CPn0147- bzw. IncA-positiven Fäden mit dem ER der Humanzelle detektierbar war (Abbildung 4.18 „ α -Calnexin“), wurde nun eine mögliche Assoziation mit STIM-1GFP untersucht.

Wurden mit *C. pneumoniae* infizierten Zellen mit einem STIM-1GFP-Konstrukt transfiziert, wurden IncA-positive Fäden mit punktierten STIM-1GFP-Signalen kolokalisierten (Abbildung 4.30 A). Wie in den doppelt-transfizierten Zellen erfolgte in der Infektion keine Akkumulation oder Rekrutierung des STIM-1GFP-Signals an die fädigen IncA-Strukturen (vgl. Kapitel 4.2.8). Punktierte STIM-1GFP-Signale waren auch in der Infektion teilweise wie auf einer Perlenkette mit den IncA-positiven Fäden assoziiert (Abbildung 4.30 B Fadenkreuze). In der YZ-Ebene des gezeigten Beispiels ist gut zu erkennen, dass die punktierten STIM-1GFP-Signale über die ganze Länge des CPn0147-Fadens detektiert wurden (Abbildung 4.30 B unten).

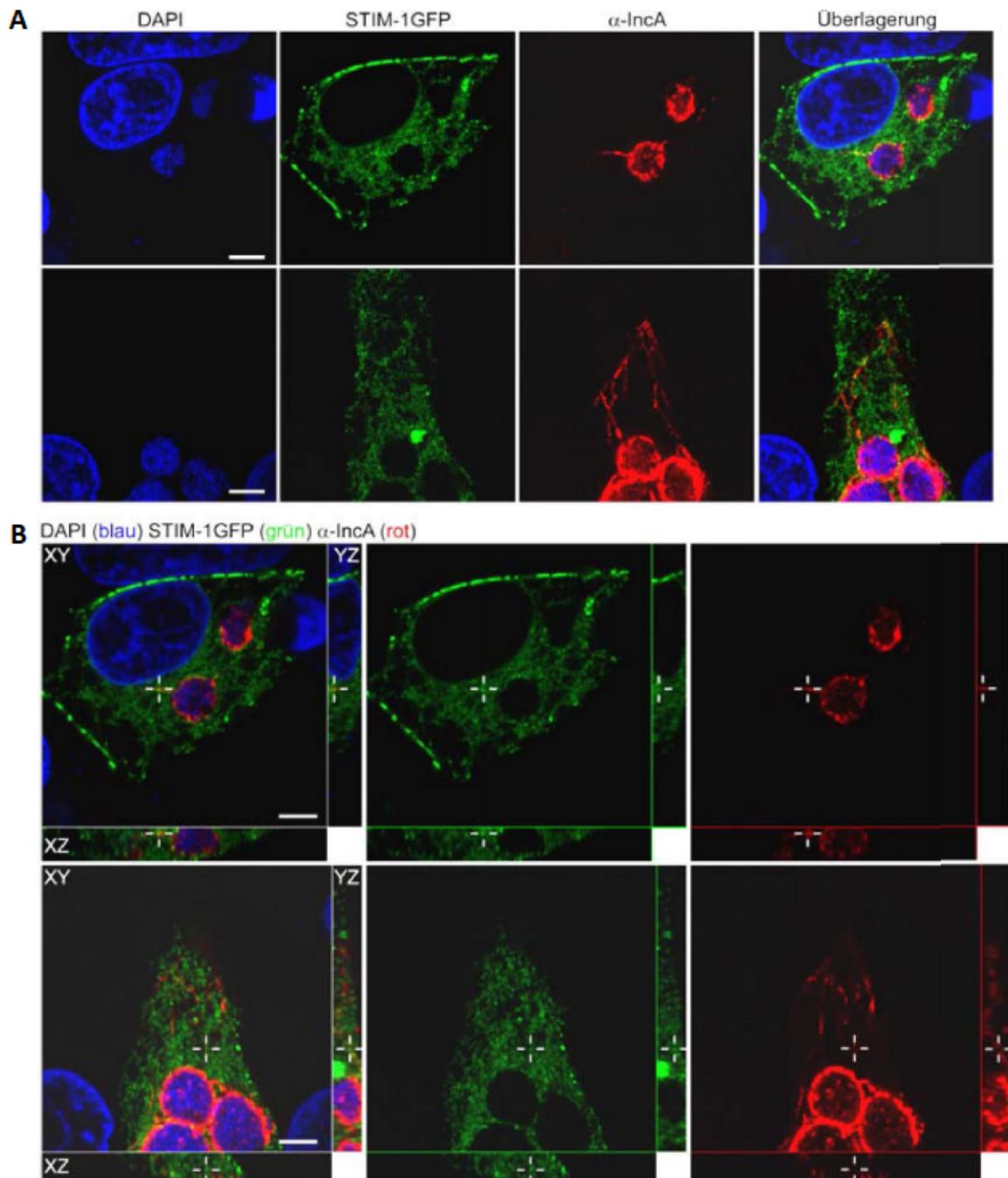


Abbildung 4.30: Mikroskopische Untersuchung der Kolokalisation von STIM-1GFP und IncA-positiven Fäden

Hep-2-Zellen wurden mit einer Suspension gradientengereinigter EBs (MOI=2) infiziert. 24 h nach Infektionsbeginn wurden die Zellen mit einem STIM-1GFP-Konstrukt (grün) transfiziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit 37 °C warmem, 3 %igem PFA fixiert. Die Zellen wurden mit Saponin permeabilisiert und mit einem anti-IncA-Antikörper und einem sekundären Alexa-594-konjugierten Antikörper (rot) gefärbt. Die DNS wurde mit DAPI (blau) markiert. Alle Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Nikon C2 Mikroskop generiert.

Maßstabsleiste: 5 μ m.

A: MIP-Darstellungen zweier Beispielszellen, die infiziert und transfiziert wurden. Die Kanäle für das GFP-Signal (grün) und für den Alexa-594-konjugierten Antikörper (rot) sind separat abgebildet.

B: Orthogonalansichten der unter A dargestellten Zellen. Die einzelnen Farbkanäle sind separat abgebildet. Zur besseren Orientierung wurden weiße Fadenkreuze eingezeichnet.

Die in diesem Kapitel gezeigten Kollokalisierungsexperimente lassen vermuten, dass die durch die Infektion induzierten, fädigen Strukturen mit dem ER der humanen Wirtszelle in Kontakt stehen. Die Assoziation von STIM-1GFP-Signalen mit IncA-positiven Fäden war der Kollokolation von STIM-1 und CPn0147mCherry-Fäden sehr ähnlich, weshalb im nächsten Schritt analysiert werden sollte, ob CPn0147-Fäden der ektopischen Expression mit der Inklusion und/oder Fäden in der Infektion assoziiert sind.

4.2.10 Ektopisch exprimiertes CPn0147 lokalisiert partiell an der Inklusion

Eine Assoziation von ektopisch exprimiertem CPn0147 mit der Inklusionsmembran und/oder den in der Infektion beobachteten Fäden, wäre einen Hinweis auf eine Interaktion des CPn0147 mit anderen Faktoren der Inklusionsmembran. Um eine solche Assoziation zu analysieren wurden Zellen mit einem CPn0147mCherry-Konstrukt transfiziert und mit *C. pneumoniae* infiziert. Bei diesem Experiment waren nur wenige Zellen zu finden, die sowohl transfiziert als auch infiziert waren und zusätzlich einen Faden aufwiesen.

In dem gezeigten Beispiel einer Infektion, die nach 24 h gestoppt worden war, waren keine IncA-positiven Fäden erkennbar. Allerdings trat ein schwaches Signal für CPn0147mCherry an der Inklusionsmembran auf, das nicht zu den ebenfalls beobachteten CPn0147mCherry-Fäden zu gehören schien (Abbildung 4.31 „24hpI“). Die in dieser Zelle detektierten CPn0147mCherry-Fäden hatten keinen Kontakt zur Inklusionsmembran. Es wurden für diesen Zeitpunkt mehrere Beispiele für solch eine Assoziation des CPn0147mCherry-Signals mit der Inklusionsmembran gefunden (Anhang 6). Möglicherweise handelte es sich hierbei um ER-Inklusionsmembran-Kontaktstellen, die durch CPn0147mCherry markiert wurden.

Das Beispiel einer Zelle, die für 48 h infiziert wurden, zeigt eine Inklusion, die scheinbar aberrante Chlamydien enthielt und drei IncA-positive Fäden aufwies (siehe Kapitel 1.3.3) (Abbildung 4.31 „48 hpI“). Die Inklusionsmembran zeigte, im Gegensatz zur frühen Infektion (24 hpI), keine CPn0147mCherry-Markierung. Interessanterweise waren die detektierten CPn0147mCherry-Fäden teilweise mit den IncA-positiven Fäden kollokalisiert (Dreieck). Diese Assoziation konnte nicht eingehender untersucht werden, da transfizierte und infizierte Zellen mit IncA-positiven Fäden in diesem orientierenden Versuch nur einmal auftraten. Es wurden jedoch verschiedene Beispiele einer Assoziation von CPn0147GFP-Fäden der

Transfektion mit der Inklusion gefunden, wobei nicht klar ist, ob es sich hierbei um funktionelle Assoziationen handelte (Beispiele siehe Kapitel 6).

Die bisherigen Ergebnisse wiesen auf eine Assoziation der fädigen CPn0147-Strukturen aus Infektion und Transfektion mit dem ER der Humanzelle hin. Es konnte nicht abschließend geklärt werden, ob es sich bei diesen Fäden um funktionell gleichwertige Strukturen handelt.

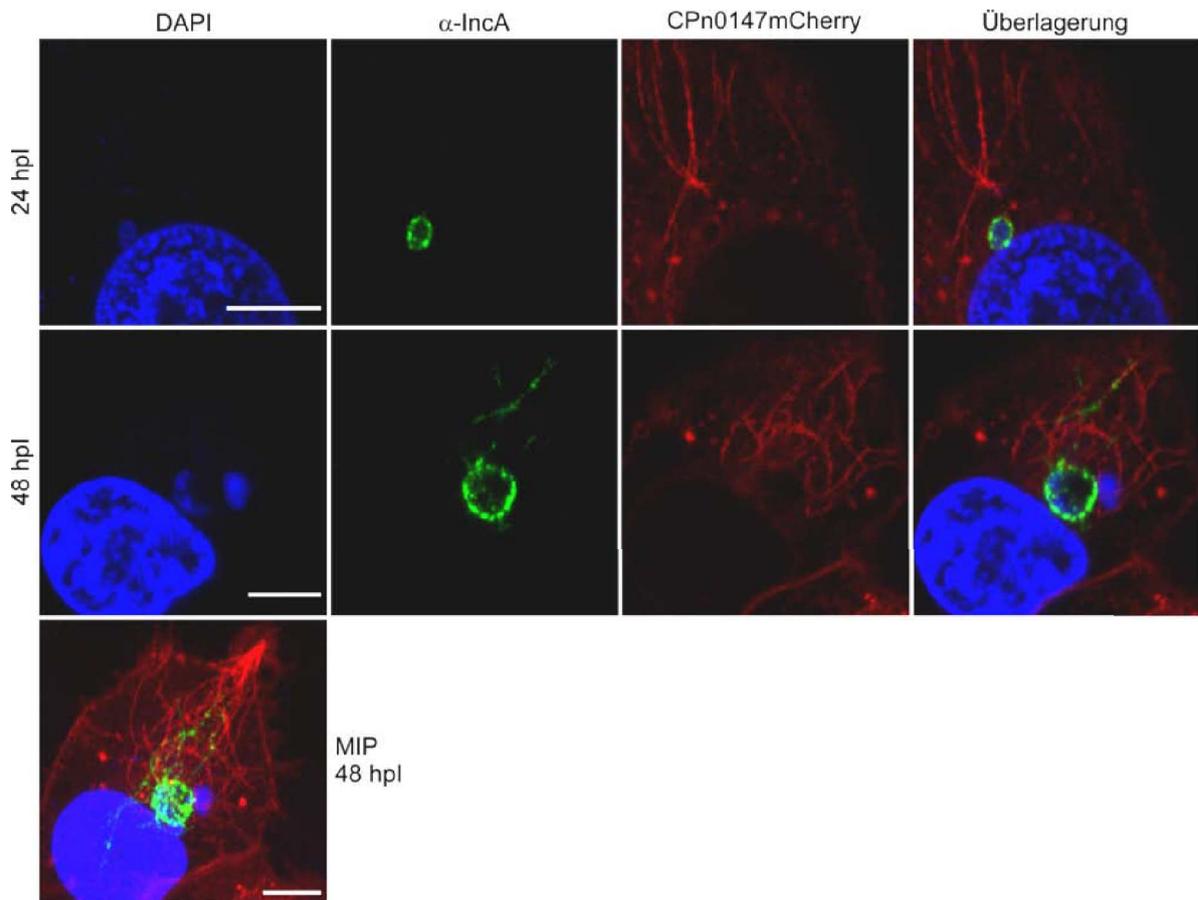


Abbildung 4.31: CPn0147mCherry kolokalisiert partiell mit IncA-positiven Strukturen

Hep-2-Zellen wurden mit einem Konstrukt, das CPn0147mCherry codierte, transfiziert (Kapitel 3.6.1). Nach 8 h wurden die transfizierten Zellen mit einer Suspension gradientengereinigter EBs (MOI=1) infiziert. Da der anti-CPn0147-Antikörper auch ektopisch exprimiertes CPn0147 markiert (Anhang 6), wurde zur Detektion der Inklusionsmembran und möglicher durch die Infektion induzierter Fäden ein anti-IncA-Antikörper genutzt. Das Fixieren und Färben der Zellen mit einem anti-IncA-Antikörper und einem sekundären Alexa-488-konjugierten Antikörper sowie die Mikroskopie wurden wie beschrieben durchgeführt (Abbildung 4.30). In der ersten Zeile ist die Aufnahme einer Zelle gezeigt, die 24 h lang infiziert wurde. In der zweiten Zeile ist die Aufnahme einer Zelle gezeigt, die 48 h lang infiziert wurde. Die dritte Zeile zeigt eine „maximum intensity projection“ (MIP) der unter 48 hpl dargestellten Zelle. Maßstabsleiste: 5 μ m

4.2.11 Lipidtröpfchen sind in der Infektion mit CPn0147-positiven Fäden assoziiert

In früheren Analysen wurde bereits gezeigt, dass CPn0147 während der Infektion auf Lipidtröpfchen im Zytosol der humanen Wirtszelle lokalisiert (Herbst 2011). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde jedoch keine Kolo-kalisation von Lipidtröpfchen mit CPn0147-Signalen detektiert (vgl. Kapitel 4.2.4), weshalb im nächsten Schritt die Assoziation von Lipidtröpfchen mit CPn0147-positiven Fäden infizierter Zellen näher untersucht wurde.

Die infizierten Zellen wiesen zu jedem betrachteten Zeitpunkt der Infektion viele Lipidtröpfchen verschiedener Größen auf, obwohl in diesen Experimenten die Lipidtröpfchen-Produktion der Zellen nicht zusätzlich durch Ölsäurezugabe stimuliert wurde (Abbildung 4.32) (Herbst 2011). In vielen Fällen wurden Lipidtröpfchen in der Nähe der Inklusion und mit der Inklusionsmembran oder mit den Fäden assoziiert beobachtet (Abbildung 4.32). Interessanterweise waren besonders große Lipidtröpfchen an solche Bereichen der Fäden assoziiert, an denen das CPn0147-Signal schwach war oder sogar einer Lücke aufwies (Abbildung 4.32 Dreiecke). In einigen Fällen wurde im Bereich der Lipidtröpfchen an solchen unterbrochenen Fäden ein diffuses, sehr schwaches CPn0147-Signal beobachtet, was jedoch auch bei Färbungen des IncA beobachtet werden konnte (Abbildung 4.33 A oben und C links) (vgl. Anhang 6 „ α -Tip47 + α -IncA“). Die orthogonale Ansicht solcher großen, die Fäden scheinbar unterbrechenden Lipidtröpfchen zeigt, dass die Fäden auch nicht in einer anderen Ebene fortgeführt werden (Abbildung 4.33A und C). Dagegen sind kleinere Lipidtröpfchen, die mit den Fäden in Verbindung stehen, meist nicht mit starken morphologischen Änderungen des Fadens assoziiert (Abbildung 4.33 A unten und B mitte).

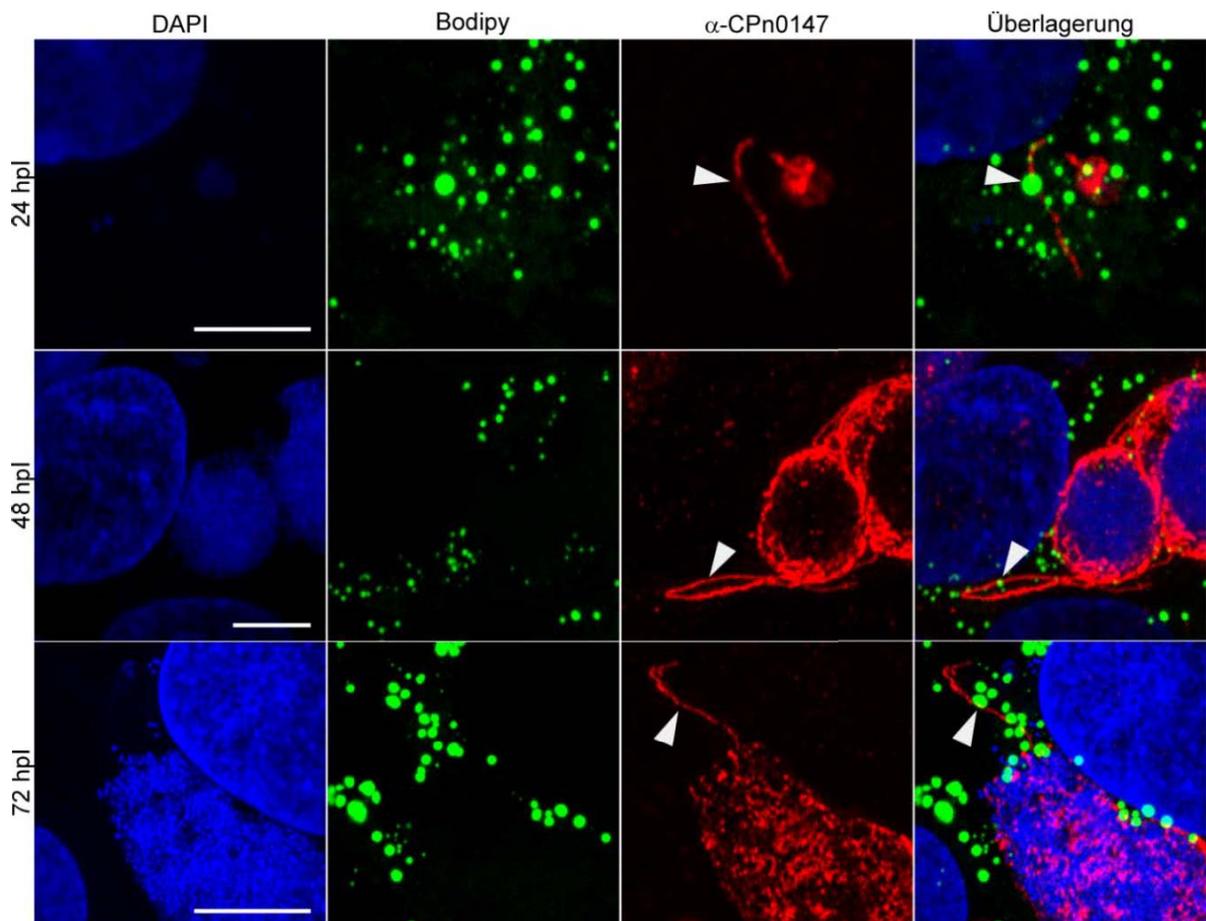


Abbildung 4.32: Die Assoziation von Lipidtröpfchen mit CPn0147-positiven Fäden

Hep-2-Zellen wurden mit einer Suspension gradientengereinigter EBs (MOI=1) infiziert. Die Zellen wurden zu den indizierten Zeitpunkten mit 37 °C warmem, 3 %igem PFA für 10 min fixiert. Für eine Färbung mit dem anti-CPn0147-Antikörper und einem sekundären Alexa-594-konjugierten Antikörper (rot) wurden die Zellen mit Saponin permeabilisiert. Die Färbung von Lipidtröpfchen erfolgte mit Bodipy® 493/503 (grün). Die DNS wurde mit DAPI (blau) gefärbt.

Die MIPs wurden mit einem konfokalen Nikon C2 Mikroskop generiert. Maßstabsleiste: 5 µm.

Durch Lipidtröpfchen erzeugte Aussparungen wurden auch an der Inklusionsmembran beobachtet (Abbildung 4.33 B links).

In keiner der durchgeführten Untersuchungen wurde ein CPn0147-Signal auf der Oberfläche von Lipidtröpfchen detektiert, die direkt an der Inklusionsmembran (vgl. Abbildung 4.33 B links), mit Fäden assoziiert (Abbildung 4.33 A, B mitte und C) oder in der Nähe von Fäden (Abbildung 4.33 B mitte) vorlagen.

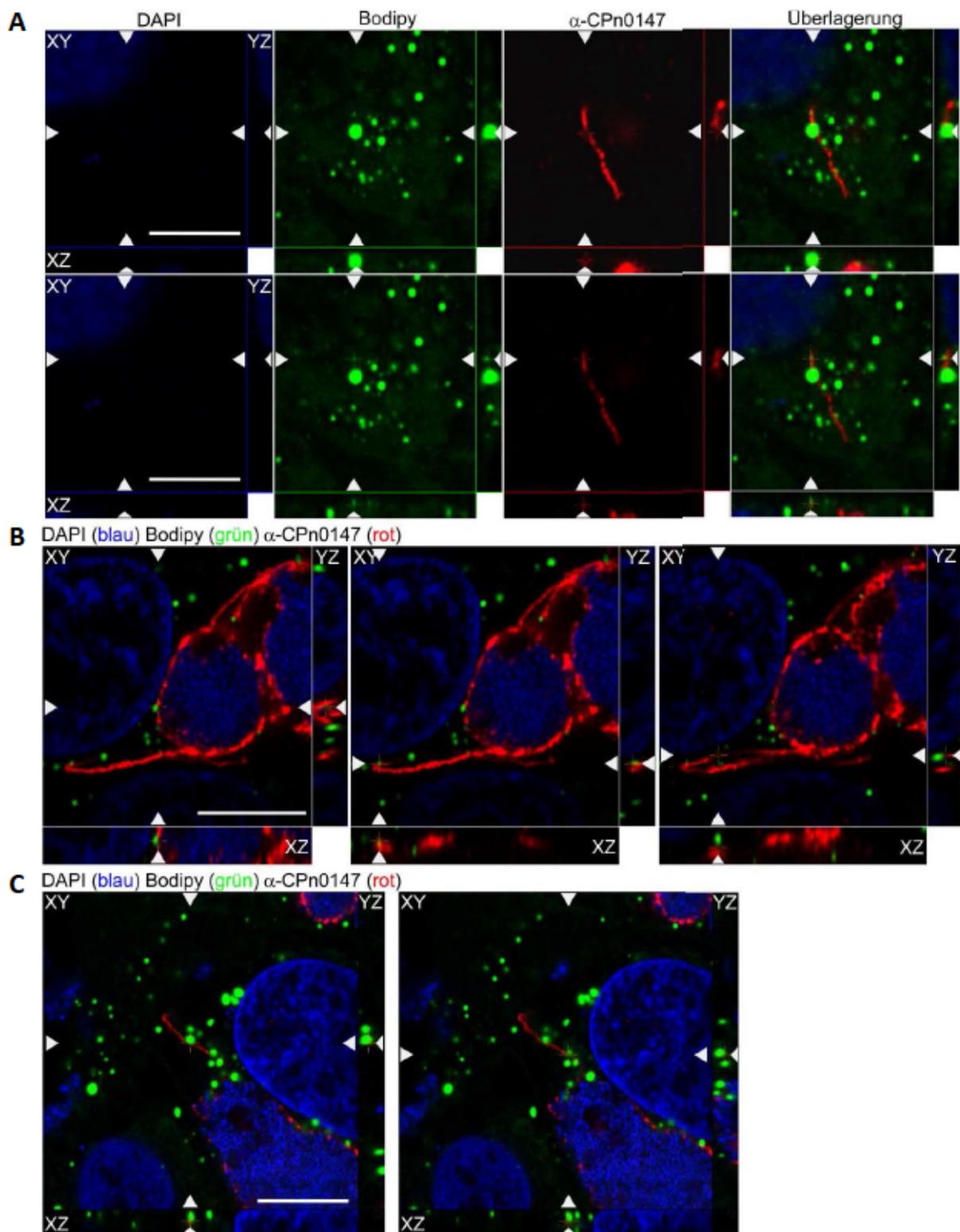


Abbildung 4.33: Lipidtröpfchen sind mit CPn0147-Fäden assoziiert und unterbrechen diese
 Infizierte HEp-2-Zellen aus dem in Abbildung 4.32 vorgestellten Experiment. Auf Bereiche von Interesse weisen zur besseren Orientierung weiße Dreiecke. Maßstabsleiste: 5 μ m.
 A: Orthogonalansichten einer 24 hpI fixierten Zelle. Die Farbkanäle sind einzeln dargestellt.
 B: Verschiedene Orthogonalansichten einer 48 hpI fixierten Zelle.
 C: Verschiedene Orthogonalansichten einer 72 hpI fixierten Zelle.

Während mikroskopische Untersuchungen kleinerer Lipidtröpfchen offen ließen, ob diese sich nur in räumlicher Nähe der Fäden befanden oder direkt mit diesen interagierten, wiesen die von großen Lipidtröpfchen hervorgerufenen Unterbrechungen der CPn0147-Fäden auf eine direkte Interaktion hin. Es ist auch denkbar, dass die Unterbrechungen der Fäden sich an Bildungsorten der Lipidtröpfchen im ER der Humanzelle befanden, an denen die CPn0147-Fäden mit dem ER interagierten.

4.2.12 Lipidtröpfchen sind in der Transfektion teilweise mit CPn0147GFP-Fäden assoziiert

Bisher ist unklar, ob CPn0147 ohne weitere chlamydiale Faktoren in der Lage ist mit Lipidtröpfchen der Humanzelle zu interagieren. Daher wurden Transfektionsexperimente durchgeführt, bei denen eine mögliche Assoziation von CPn0147GFP mit Lipidtröpfchen analysiert wurde.

Die transfizierten Zellen zeigten CPn0147GFP-Fäden, welche die gesamte Zelle durchzogen, und eine große Menge an Lipidtröpfchen (Abbildung 4.34 A und B „Übersichtsbilder“). Die Vergrößerung zeigt zwei CPn0147GFP-Fäden, an denen drei Lipidtröpfchen liegen (Abbildung 4.34 A „Orthogonalansicht Ausschnitt 1“). Interessanterweise wurden die Lipidtröpfchen teilweise von Fäden eingewickelt (Dreiecke). Zudem wurden häufig Lipidtröpfchen beobachtet, die mit CPn0147GFP-Signalen assoziiert waren (Abbildung 4.34 A „Orthogonalansicht Ausschnitt 2“ oben und B „Orthogonalansichten“). Allerdings wurden auch viele Lipidtröpfchen beobachtet, die sich sehr nahe an einem CPn0147GFP-Faden befanden, jedoch keine Assoziation mit diesen zeigten bzw. die sich nicht in der Nähe eines CPn0147GFP-Fadens befanden (Abbildung 4.34 A „Orthogonalansicht Ausschnitt 2“ unten).

Die vorgestellten Ergebnisse zeigten, dass Lipidtröpfchen in einer gegebenen Zelle etwa mit gleicher Häufigkeit mit CPn0147GFP-Signalen assoziiert oder frei auftraten. Es gab kein Beispiel, in dem Lipidtröpfchen vollkommen von CPn0147GFP-Signalen umgeben waren, was bei einer direkten Interaktion erwartet worden wäre. Lipidtröpfchen werden an den Membranen des peripheren ERs gebildet und während der Reifung zum zentralen ER transportiert (Kassan *et al.* 2013), so befinden sie sich am Ende ihrer Reifung in unmittelbarer Nähe zum Bildungsort von CPn0147GFP, das von der Zelle im rauen ER translatiert wird. Würde CPn0147GFP direkt mit Lipidtröpfchen interagieren, wären dies ideale Voraussetzungen, CPn0147 in räumlicher Nähe zu Lipidtröpfchen zu beobachten.

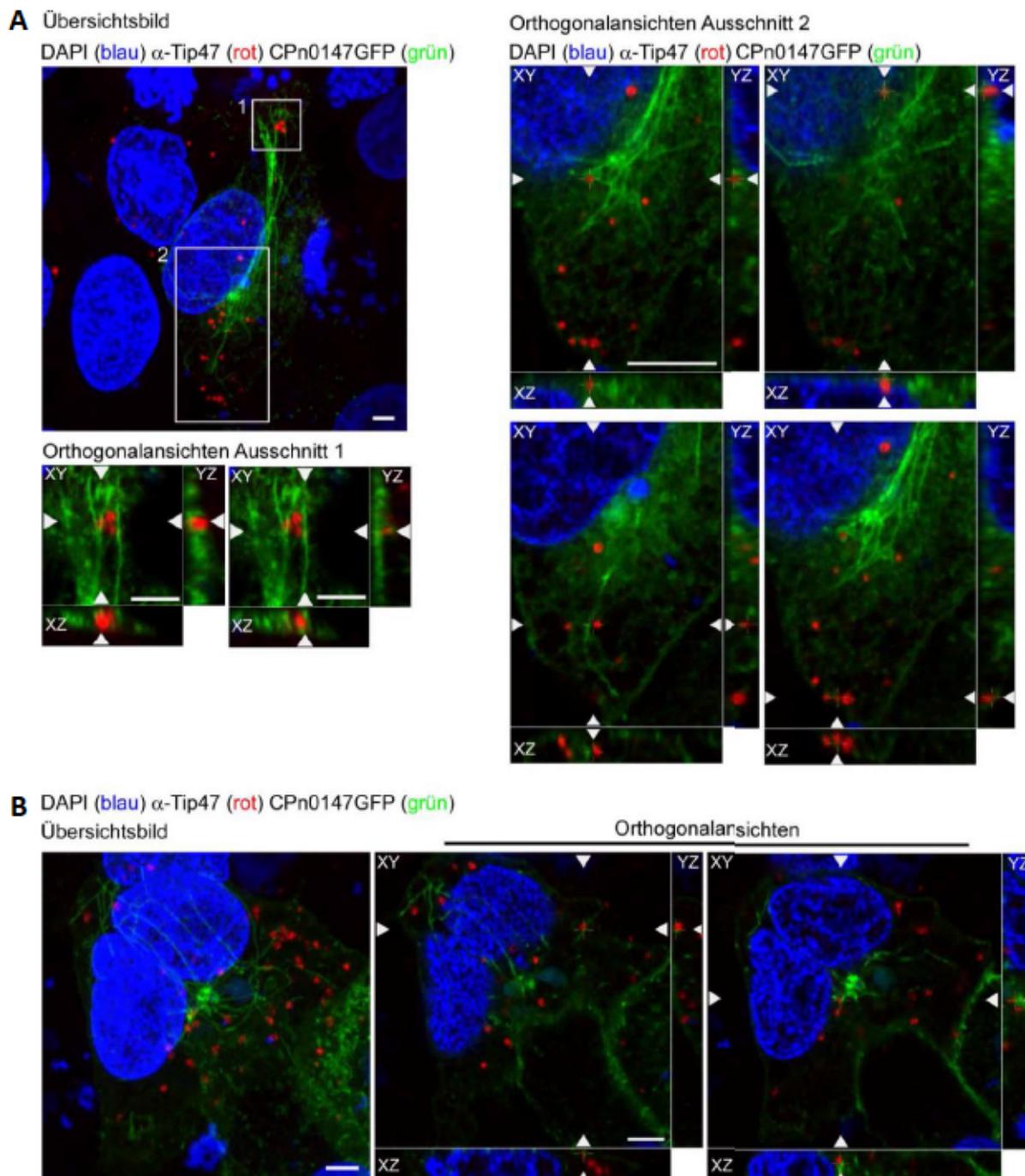


Abbildung 4.34: In der Transfektion gebildete CPn0147GFP-Fäden assoziieren mit Lipidtröpfchen

HEp-2-Zellen wurden mit CPn0147GFP (grün) codierenden Konstrukten transfiziert (Kapitel 3.6.1). Nach 24 h wurden die Zellen wie beschrieben fixiert und permeabilisiert (Abbildung 4.30). Die Zellen wurden mit dem anti-Tip47-Antikörper und einem sekundären Alexa-594-konjugierten Antikörper (rot) gefärbt. Die DNS wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Weiße Dreiecke weisen auf Punkte von Interesse. Maßstabsleiste: 2,5 μ m.

A: Übersichtsbild (MIP) und Orthogonalansichten einer CPn0147GFP-exprimierenden Zelle. Die markierten Bereiche des Übersichtsbildes wurden als vergrößerte Orthogonalansichten dargestellt.

C: Übersichtsbild (MIP) und verschiedene Orthogonalansichten einer CPn0147GFP-exprimierenden Zelle.

4.2.13 Die Bildung von CPn0147-Fäden ist abhängig vom Mikrotubuli-Zytoskelett und ER-Stress

Abschließend wurden Bedingungen untersucht, die die Bildung von CPn0147-positiven Fäden während der Infektion mit *C. pneumoniae* ermöglichen. Frühere Arbeiten konnten bereits verschiedene Faktoren identifizieren, die zu einer vermehrten Bildung von Fäden in der Infektion führen (Herbst 2011). Die Zahl der Fäden je Inklusion nimmt beispielsweise mit andauernder Infektionszeit, Erhöhung der MOI, Weglassen von Cycloheximid oder Zugabe von Ölsäure in das Kulturmedium der infizierten Humanzellen zu. Bisher ist jedoch nicht klar, welcher Mechanismus zur Bildung der Fäden führt und ob die Bildung der Fäden vom Zytoskelett der Humanzelle abhängig ist. Die bisher im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Experimente lassen vermuten, dass Membrankomponenten der Wirtszelle aus der Endo- oder Exozytose dafür genutzt werden, die Membran der CPn0147-positiven Fäden aufzubauen. Ein Einfluss von Mikrotubuli auf die Bildung der Fäden konnte mikroskopisch weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

In dem im Folgenden vorgestellten Experiment wurde quantifiziert, wie sich eine dauerhafte Depolymerisierung des Mikrotubuli-Zytoskeletts durch Nocodazol oder die Blockierung der Exozytose der Wirtszelle durch Brefeldin A auf die Bildung von CPn0147-positiven Fäden auswirkten. Für diese Quantifizierung wurde die Anzahl der Fäden je Inklusion in Bezug auf drei wechselnde Parameter untersucht: (i) Ölsäurezugabe, (ii) Stärke der Infektion (engl. multiplicity of infection = MOI), (iii) Zugabe von Inhibitoren (Nocodazol oder Brefeldin A). Um in der Ausgangssituation eine möglichst große Zahl an Fäden beobachten zu können, wurden die infizierten Humanzellen in Zellkulturmedium ohne Cycloheximid inkubiert. Um zu verhindern, dass Fäden untersucht werden, die möglicherweise eine Funktion bei der Bildung von Sekundärinklusionen haben, wurden nur Fäden von einzelnen Inklusionen berücksichtigt (vgl. Kapitel 3.10).

Bei beiden analysierten MOIs wiesen über 50 % der beobachteten Inklusionen der DMSO-Kontrolle Fäden auf, davon zeigte rund die Hälfte einen Faden (Abbildung 4.35 A „ohne Ölsäure“). Wurde den Zellen 10 μ M Nocodazol, 1 μ M Nocodazol bzw. für 18 h Brefeldin A zugegeben, zeigten weniger als 10 % der betrachteten Inklusionen Fäden. Wurden die Zellen für 24 h mit Brefeldin A behandelt, zeigten Inklusionen in rund 15 % der Fälle Fäden. Inklusionen von Zellen, die mit 10 μ M Nocodazol behandelt worden waren, zeigten bei einer MOI von 1 in 5 % und bei einer MOI von 2 in 2 % der Fälle einen Faden und niemals mehr Fäden. Inklusionen von Zellen, die mit 1 μ M Nocodazol behandelt worden waren, zeigten bei

einer MOI von 1 in 2 % der Fälle einen Faden und in 1 % zwei Fäden, dagegen bei einer MOI von 2 in knapp 8 % der Fälle einen Faden und nie mehr. Die Zugabe von Nocodazol oder Brefeldin A hemmt also die Fadenbildung deutlich.

Wurde das Kulturmedium der Zellen mit Ölsäure versetzt, so wurden deutlich mehr Fäden gebildet (Abbildung 4.35 A). Nur noch 31 % der Inklusionen von Zellen, die mit dem DMSO-Kontrollmedium inkubiert wurden, zeigten bei einer MOI von 1 keinen Faden. Bei dieser MOI zeigten 23 % der beobachteten Inklusionen einen Faden, 20 % zwei und 27 % mehr als zwei Fäden. Im Vergleich dazu waren bei einer MOI von 2 die Werte für die Fadenanzahl von Inklusionen der DMSO-Kontrolle nur leicht unterschiedlich. Hier zeigten 36 % der Inklusionen keinen, 25 % einen Faden, 19 % zwei und knapp 20 % mehr als zwei Fäden. Somit hatte auch bei Ölsäurezugabe eine höhere MOI keine deutliche Auswirkung auf die Anzahl der Fäden je Inklusion. In den Zellen, die mit 10 μ M Nocodazol behandelt worden waren, zeigten nur 5 % der Inklusionen unabhängig von der MOI Fäden, was somit vergleichbar mit dem Ergebnis des Experiments ohne Ölsäurezugabe war. Auch die Fadenzahlen von Inklusionen der mit 1 μ M Nocodazol inkubierten Zellen wichen nach Ölsäurebehandlung nur leicht von denen ohne Ölsäurezugabe ab. Rund 10 % der Inklusionen in Zellen, die mit 1 μ M Nocodazol inkubiert worden waren, zeigten bei einer MOI=2 einen Faden. Fadenzahlen der Inklusionen von Zellen, die mit einer MOI von 1 infiziert wurden, wichen geringfügig ab. Hier wiesen 68 % der Inklusionen keinen, rund 15 % einen Faden, 12 % zwei und noch 4 % mehr als zwei Fäden auf. Die Zugabe von Nocodazol in das Wachstumsmedium infizierter Zellen inhibiert auch bei Ölsäurezugabe effizient die Fadenbildung.

Die Zugabe von Brefeldin A in das Zellkulturmedium mit Ölsäure reduzierte die Fadenbildung nicht so drastisch, wie es im Versuchsteil ohne Ölsäurezugabe zu beobachten war. Bei Zellen, die mit einer MOI von 1 infiziert und 24 h in Kulturmedium mit Brefeldin A inkubiert worden waren, zeigten nur rund 42 % der Inklusionen keinen, dafür aber 26 % einen Faden, 18 % zwei und 14 % mehr als zwei Fäden. Bei einer MOI von 2 fiel der Unterschied zu den nicht mit Ölsäure inkubierten Zellen weniger stark aus. Hier zeigten 57 % der Inklusionen keinen und 20 % einen Faden, rund 16 % zeigten zwei und rund 6 % mehr als zwei Fäden. Inklusionen von Zellen, die nur 18 h mit Brefeldin A inkubiert worden waren, zeigten bei den verschiedenen MOIs keine deutlichen Unterschiede in der Zahl der gebildeten Fäden. Hier besaßen rund 70 % der Inklusionen keinen und 14 % einen Faden, 18 % zeigten

zwei oder weniger Fäden. Der inhibierende Effekt von Brefeldin A auf die Fadenbildung wird durch Ölsäurezugabe stark reduziert.

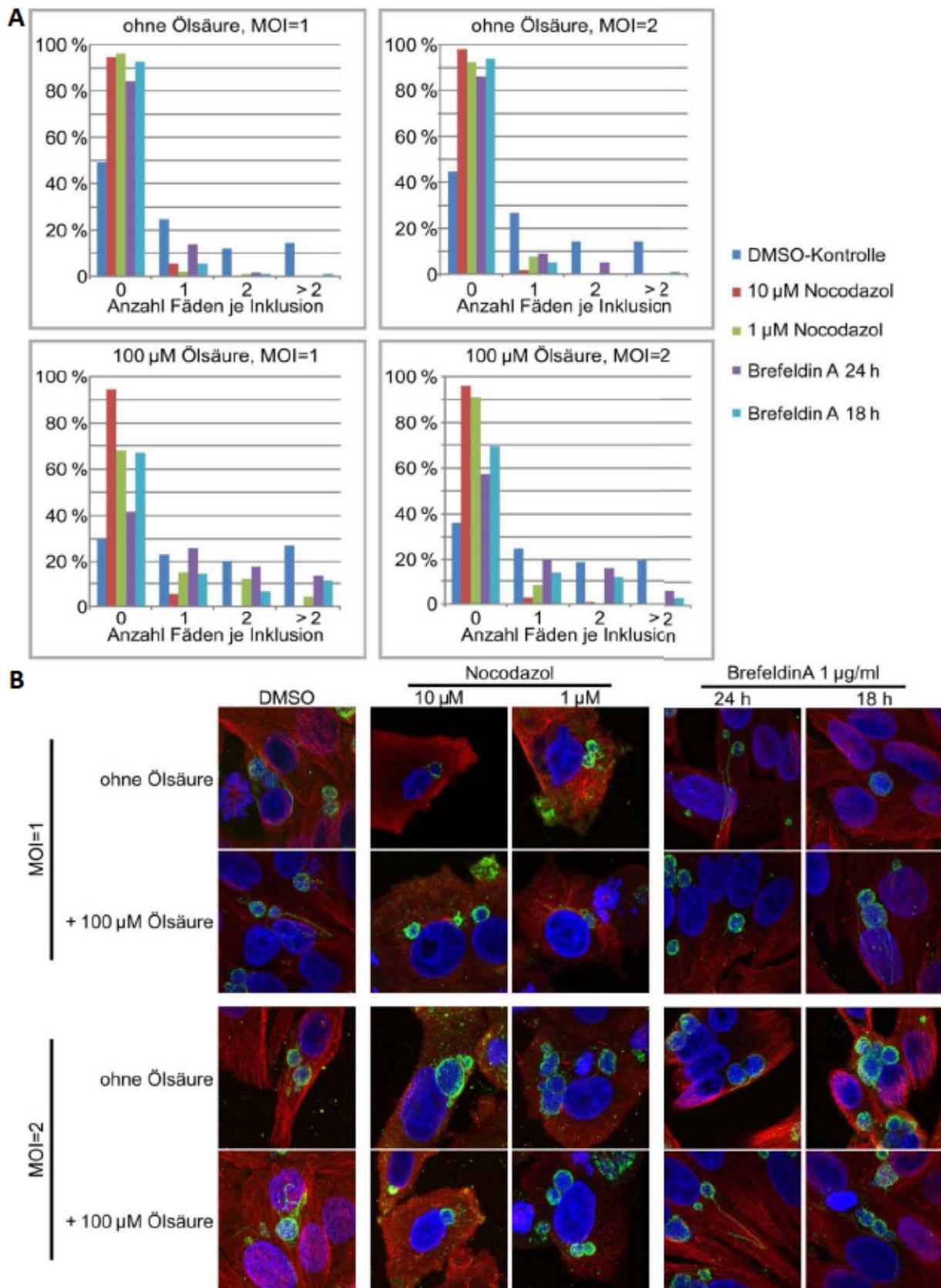


Abbildung 4.35: Quantitative Analyse der Bildung CPn0147-positiver Fäden in der Infektion

HEp-2-Zellen wurden mit gradientengereinigten EBs (MOI wie angegeben) infiziert. Nach 24 h wurde das Kulturmedium abgenommen und während der Infektion durch Medium ersetzt, das mit 10 μ M Nocodazol, 1 μ M Nocodazol oder 1 μ g/ml Brefeldin A versetzt war. Brefeldin A wurde entweder 24 h mit den Zellen inkubiert (Brefeldin A 24 h) oder 6 h vor Fixierung der Zellen durch zweimaliges Waschen der Zellen mit 37 °C warmem Medium entfernt (Brefeldin A 18 h). Die Kontrollzellen wurden mit 5 μ l DMSO im Kulturmedium inkubiert. Die Zellen wurden für weitere 24 h inkubiert und anschließend wie beschrieben fixiert und permeabilisiert (Abbildung 4.30).

A: Die Diagramme zeigen die Ergebnisse der Quantifizierungen der Fadenanzahl pro Inklusion unter den verschiedenen Bedingungen. Es wurden nur Inklusionen bei der Quantifizierung berücksichtigt, die die einzige in einer Zelle darstellten. Zur Quantifizierung der Fäden wurden die Zellen mit dem anti-CPn0147-Antiserum (Verdünnung 1:50) und einem sekundären Alexa-488-konjugierten Antikörper gefärbt. In einer Einzelbestimmung wurden je Ansatz zwischen 90 und 120 Einzelinklusionen betrachtet.

B: Zur Überprüfung des Mikrotubuli-Zytoskeletts wurden Testfärbungen mit einem anti- α -Tubulin-Antikörper und einem sekundären Alexa-594-konjugierten Antikörper (rot) durchgeführt. Die Inklusionsmembran und die Fäden wurden mit dem anti-CPn0147-Antiserum (Verdünnung 1:50) und einem sekundären Alexa-488-konjugiertem Antikörper (grün) gefärbt.

Zusätzlich wurden Kontrollfärbungen des Mikrotubulizytoskeletts der untersuchten Zellen durchgeführt (Abbildung 4.35 B). Zellen der DMSO-Kontrolle und Brefeldin A behandelte Zellen zeigten ein normales Mikrotubuli-Zytoskelett mit filamentösen Tubulin-Signalen („DMSO“ und „Brefeldin A 1 μ g/ml“). Dagegen zeigten Zellen, die mit 10 μ M Nocodazol inkubiert wurden, keine phänotypisch normalen Mikrotubuli. Hier war ein diffuses Antikörper-Signal detektierbar und in einigen Fällen kurze, filamentöse Signale, die interessanterweise häufig in der Nähe von Inklusionen lokalisiert waren. Zellen, die mit 1 μ M Nocodazol im Kulturmedium inkubiert worden waren, zeigten häufig filamentöse Tubulin-Signale, die jedoch nicht mit dem Mikrotubuli-Zytoskelett der DMSO-Kontrollzellen vergleichbar waren (vgl. Abbildung 4.35 B „DMSO“ und „Nocodazol 1 μ M“). Die mit 1 μ M Nocodazol behandelten Zellen wiesen vor allem netzartige, mehrfach gebogene oder kurze und verästelte Mikrotubuli-Signale auf. In mehreren Fällen wurden diese Strukturen kolokalisiert mit den CPn0147-positiven Fäden gefunden.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass ein intaktes Mikrotubuli-Zytoskelett benötigt wird, damit die CPn0147-positiven Fäden gebildet werden können. Eine leicht erhöhte MOI hatte auf die Bildung von Fäden der analysierten Einzelinklusionen keinen deutlichen Einfluss. Die Zugabe von Ölsäure zeigte dagegen einen sehr starken Effekt auf die Bildung von Fäden, der sich in Form einer Erhöhung der Fadenzahl zeigte. Die Zugabe von Brefeldin A reduzierte die Fadenbildung während der Infektion stark im Vergleich zu Inklusionen der DMSO-Kontrollzellen.

5 Diskussion

5.1 CPn0809, das große Translokationspore-Protein

Zu Beginn dieser Arbeit war die Funktion von CPn0809 unbekannt. Es gab Hinweise, dass es sich bei CPn0809 um ein lösliches Effektorprotein handelt. Diese Vermutung stützte sich auf eine mikroskopische Analyse, die CPn0809 in der späten *C. pneumoniae*-Infektion (55 hpI) als sekretiert im Zytosol der Wirtszelle identifizierte (Lugert *et al.* 2004). Zudem wurde CPn0809 durch das Auslösen eines Wachstumsdefekts im Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* von Herbst und Kerres als putatives Effektorprotein identifiziert und es wurden mögliche humane Interaktionspartner in Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen gefunden (Engel 2010; Herbst 2011; Markkula *et al.* 2013). Anhand eines T3SS-assoziierten Klasse II-Chaperons, welches gemeinsam mit CPn0809 und zwei weiteren Proteinen als Operon codiert wird, wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei CPn0809 um ein Translokation-Protein des T3SS handelt (Subtil *et al.* 2000). In der vorliegenden Arbeit sollte eine Funktion als Effektor und/ oder als Translokation-Protein bestätigt werden (Kapitel 1.8). Die im Folgenden diskutierten Ergebnisse weisen darauf hin, dass CPn0809 eines der *C. pneumoniae* Translokation-Proteine ist.

5.1.1 Die Translokation-Operons von Chlamydien zeigen Unterschiede zu Translokation-Operons anderer Bakterien

C. pneumoniae und *C. trachomatis* besitzen zwei T3SS-assoziierten Klasse II-Chaperone, welche in je zwei potentiellen Translokation-Operons codiert sind (Subtil *et al.* 2000). Für *C. pneumoniae* werden die Klasse II-Chaperone CPn0811 und CPn1021 als LcrH_1 bzw. LcrH_2 bezeichnet. Die *C. trachomatis* Klasse II-Chaperone CT_576 und CT_862 werden als Scc2 und Scc3 bezeichnet (Betts-Hampikian & Fields 2010). Die putativen Translokation-Operons der beiden Spezies unterscheiden sich in ihrem Aufbau nicht voneinander (vgl. Kapitel 1.6 und 4.1.2).

Bioinformatische Analysen der Operons stützen die These, dass sie Translokation-Proteine codieren. In anderen pathogenen Bakterien werden in Translokation-Operons neben den Klasse II-Chaperonen die Translokatoren, zwei hydrophobe und ein hydrophiler Translokator, codiert (vgl. Kapitel 1.4.4.2). Von diesem Bauplan gibt es gelegentlich Abweichungen. Zum Beispiel wird im Translokation-Operon von *E. coli* das Klasse II-Chaperon nicht im selben Operon wie die Translokation-Proteine codiert. Auch zusätzliche Gene können in den

Translokon-Operons codiert sein, beispielsweise werden bei *Yersinia* und *Pseudomonas* zusätzliche regulatorische Proteine codiert (Abbildung 4.1). In den beiden putativen Translokon-Operons von *C. pneumoniae* sind jeweils zwei Proteine codiert (CPn0809 und CPn0808 sowie CPn1020 und CPn1019), welche hydrophobe Profile mit ein bis drei vorhergesagten Transmembrandomänen aufweisen (Abbildung 4.1 und Abbildung 4.2). Zudem wurde jeweils ein hydrophiles Protein identifiziert (CPn0810 und CPn1022). In Translokons anderer Bakterien bilden die hydrophilen Translokatoren den Nadelspitzenkomplex, weshalb sie auch als Nadelspitzen-Protein bezeichnet werden (vgl. Kapitel 1.4.4.2). Für *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* wurden mit CT_584 und CPn0803 mögliche Nadelspitzen-Proteine beschrieben, die *nicht* in den Operons der Klasse II-Chaperone codiert sind (Markham *et al.* 2009) (vgl. Kapitel 1.6). Allerdings werden sie kontrovers diskutiert, da ihre Tertiärstruktur von der anderer T3SS-Nadelspitzen-Proteinen stark abweicht (Stone *et al.* 2012; Barta *et al.* 2013). Somit sind CPn0810 und CPn1022 weiterhin Kandidaten für die Nadelspitzen-Proteine der *C. pneumoniae* T3SS-Translokons.

Die Translokon-Operons von *C. pneumoniae* weisen eine weitere interessante Eigenheit auf. Die beiden hydrophoben Translokatoren von Bakterien mit T3SS werden auf Basis der Länge der Aminosäuresequenz und der Anzahl der vorhergesagten Transmembrandomänen in einen großen und einen kleinen hydrophoben Translokator eingeteilt (Mattei *et al.* 2011) (vgl. Kapitel 1.4.4.2). Demnach sind CPn0809 und CPn1020 große hydrophoben Translokatoren und CPn0808 und CPn1019 kleine. Die großen hydrophoben Translokatoren der anderen betrachteten Bakterien weisen eine sogenannte SseC-Domäne auf, während bei der bioinformatischen Untersuchung der kleinen hydrophoben Translokatoren keine solche identifiziert wurde (vgl. Kapitel 4.1.2). Überraschenderweise konnte in *beiden* hydrophoben Translokon-Proteinen des *C. pneumoniae* LcrH_1-Operons eine SseC-Domäne identifiziert werden, dagegen aber nur mit einer geringen Abdeckung in CPn1020 und nicht in CPn1019 des LcrH_2-Operons (vgl. Abbildung 4.2 und Kapitel 4.1.2). Zudem wurden bei der gezielten Suche nach Sequenzhomologien mittels BLASTp schwache Homologien zwischen CPn0808 und dem großen hydrophoben Translokator EspD (*E. coli*), aber auch zwischen CPn0809 und den großen hydrophoben Translokatoren SipB (*Salmonella*) und IpaB (*Shigella*) festgestellt (vgl. digitaler Anhang). Für CPn0809 überschneiden sich die Bereiche der stärksten Homologie mit der ersten vorhergesagten Coiled-Coil-Domäne (CC1) und der ersten Transmembrandomäne (TM1) (siehe Abbildung 4.2). Dass die Bereiche mit den stärksten Sequenzhomologien der hydrophoben Translokatoren mit den Transmembrandomänen und Bereichen dazwischen zusammenfallen, wurde bereits beobachtet und die Wichtigkeit dieser

Bereiche mit diesem Argument hervorgehoben (Mattei *et al.* 2011). Dass beide hydrophoben Translokatoren des LcrH_1-Operons von *C. pneumoniae* leichte Sequenzhomologien zu großen hydrophoben Translokatoren anderer Bakterien aufweisen, passt zu dem Ergebnis, dass beide Proteine eine vorhergesagte SseC-Domäne aufweisen. Welche Bedeutung das für die Funktion des T3SS der Chlamydien hat, ist nicht klar. Es wird aber deutlich, dass die experimentellen Ergebnisse zur Charakterisierung der Translokons anderer Bakterien-Spezies nicht ohne weiteres auf die der Chlamydien übertragen werden können.

5.1.2 CPn0809 kann in der frühen Infektion als Translokator fungieren

Die Analysen der CPn0809-Expression ließen vermuten, dass CPn0809 in der frühen Infektion eine wichtige Rolle spielt (vgl. Kapitel 4.1.3). Die Expression von CPn0809 nahm mit Beginn der Re-Differenzierung zu EBs ab 42 h nach Infektionsbeginn (hpI) stark zu, was im Westernblot durch verstärkte Detektion von CPn0809 und mikroskopisch durch das Auftreten der ersten punktierten CPn0809-Signale in der Inklusion beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 4.4 und Abbildung 4.5). Zwischen 0 bis 6 hpI ist CPn0809 im Westernblot ebenfalls deutlich detektierbar (Abbildung 4.4). Es spielt wahrscheinlich in den ersten Stunden der Infektion eine Rolle, bis die EBs mit der *de novo* Proteinbiosynthese beginnen und zu RBs differenzieren. Diese Beobachtungen bestätigen bereits publizierte Transkript-Daten bestätigt, die eine sehr späte Transkription des LcrH_1-Operons zeigen (Ouellette *et al.* 2005; Mäurer *et al.* 2007). Somit codiert das Operon wahrscheinlich Proteine, die in EBs gespeichert werden und in der frühen Infektion eine Funktion ausüben.

In einer älteren Arbeit, welche die Identifikation von möglichen sekretierten Effektoren von *C. pneumoniae* Isolat TWAR (TW183) zum Ziel hatte, wurde unter anderem die Expression von CPn0808, dem zweiten hydrophoben Translokator des LcrH_1-Operons, untersucht (Herrmann *et al.* 2006). Die in jener Arbeit publizierten Westernblot-Analysen zeigen, dass CPn0808 in der frühen Infektion deutlich detektierbar ist (Zeitpunkte: 0,5 und 6 hpI), während das CPn0808-Signal in der Mitte der Infektion (24 und 48 hpI) schwächer wird und bis zum letzten untersuchten Zeitpunkt in der späten Infektion (72 hpI) wieder zunimmt. Des Weiteren berichtet die Arbeitsgruppe von einer Bakterien-assoziierten Lokalisation des Proteins innerhalb der Inklusion. Die Beschreibung lässt vermuten, dass CPn0808 im gleichen Zeitraum wie CPn0809 exprimiert wird und eine vergleichbare Lokalisation aufweist, was ein Zusammenwirken der beiden Proteine bei der Bildung der T3SS-Translokationspore ermöglicht.

Interessanterweise wird das CPn0809-Homolog in *C. trachomatis* CT_578 (CopB), unter Beachtung des deutlich kürzeren Infektionszyklus dieser Spezies (48 h vs. *C. pneumoniae* 72 h), etwa im gleichen Zeitfenster wie CPn0809 mittels Westernblot-Analyse detektiert. In der frühen Infektion (0 hpI) ist CT_578 (CopB) sehr deutlich, zwischen 2 und 6 hpI nur schwach und bis 16 hpI gar nicht mehr detektierbar, während 20 hpI wieder ein sehr starkes CT_578-Signal erkennbar ist (Chellas-Gery *et al.* 2011). Hier weisen die beiden großen hydrophoben Translokatoren aus *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* eine Ähnlichkeit auf, im mikroskopischen Bild unterscheiden sie sich dagegen deutlich. In der *C. trachomatis*-Infektion lokalisiert CT_578 bei 20 hpI in der Inklusionsmembran, wohingegen CPn0809 ab 42 hpI punktiert innerhalb der Inklusion erscheint und keine eindeutige Assoziation mit der Inklusionsmembran zeigt (Fields *et al.* 2005) (Abbildung 4.5 und Abbildung 4.7). Diese starken Unterschiede in der Lokalisation der beiden Proteine, sind ein Hinweis auf verschiedene Funktionen in der Infektion der beiden Chlamydien-Spezies.

Transkriptionsanalysen zeigten, dass die beiden Translokon-Operons von *C. pneumoniae* zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion exprimiert werden (Ouellette *et al.* 2005; Mäurer *et al.* 2007). Damit weisen Chlamydien zwei Translokons auf, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Infektion eine Rolle spielen könnten. Analog dazu codiert *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium zwei T3SS in zwei genomischen Pathogenitätsinseln, die in verschiedenen Phasen der Infektion eine Rolle spielen und Salmonella Pathogenitätsinsel 1 und 2 (SPI-1 und SPI-2) genannt werden (vgl. Kapitel 1.4.2). Es wird vermutet, dass bei *Salmonella* das T3SS der SPI-1 eine Rolle bei der Adhäsion und Internalisierung in nicht-phagozytische Darm-Epithelzellen und der Translokation der in diesem Teil der Infektion benötigten Effektoren spielt; das T3SS und die Effektoren der SPI-2 werden während der intrazellulären Phase der Infektion benötigt (Knodler & Steele-Mortimer 2003; Waterman & Holden 2003; Figueira & Holden 2012). Dass Chlamydien dagegen nur zwei Translokons aufweisen und nicht zwei distinkte, vollständige T3SS, ist möglicherweise ihren stark optimierten Genomen geschuldet. Analog zu *Salmonella* würde das Translokon, welches CPn0809 enthält, in der frühen Infektion während der Adhäsion und der Internalisierung eine Rolle spielen. Dass das zweite Translokon eine Rolle in der intrazellulären Phase der Infektion spielen könnte, lassen Analysen des mRNA-Niveaus dieser Proteine vermuten (Ouellette *et al.* 2005; Mäurer *et al.* 2007). Somit sind die Translokons der Chlamydien möglicherweise optimal an die jeweilige Membran (Wirtszell- bzw. Inklusionsmembran) angepasst, in welcher sie zum Einsatz kommen.

Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass CPn0809 in der frühen Infektion mit Chlamydien kolokalisierte, die an der Zytoplasmamembran von humanen Zellen detektierbar waren (Abbildung 4.8 und Abbildung 4.9). Die hierfür verwendeten infizierten Zellen wurden mit Methanol fixiert, welches alle Membranen permeabilisiert und so die Färbung des intrabakteriellen CPn0809 erlaubt. Dagegen zeigten infizierte Zellen, die mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert worden waren, welches die Bakterien nicht permeabilisiert und somit nur extrabakterielle Proteine markiert, keine oder nur sehr schwache CPn0809-Signale (vgl. Anhang Abbildung 6.8). Dass CPn0809 zu Beginn der Infektion mikroskopisch nicht auf der Oberfläche der Chlamydien detektierbar ist, passt zu Beobachtungen, die für hydrophobe Translokatoren anderer Bakterien mit T3SS gemacht wurden. Die meisten hydrophoben Translokatoren anderer Bakterienarten lokalisieren vor Beginn der Infektion nicht an der Spitze des T3SS, weshalb vermutet wird, dass sie erst bei Kontakt mit einer Wirtszelle T3SS-abhängig sekretiert werden (siehe Kapitel 1.4.4.2). Die Ausnahme bildet IpaB von *Shigella*, das zusammen mit dem hydrophilen Translokator (IpaD) an der Detektion der Wirtszellmembran beteiligt ist und vor dem Beginn der Infektion an der Spitze des T3SS detektierbar ist (Johnson *et al.* 2007; Veenendaal *et al.* 2007; Roehrich *et al.* 2013). Da CPn0809 unter nicht-permeabilisierenden Bedingungen mittels Antikörper nicht markiert wurde, ist es möglich, dass die *C. pneumoniae* Translokatoren ebenfalls erst bei Kontakt mit der Wirtszelle sekretiert werden, um die Translokationspore in der Zytoplasmamembran der Zielzelle zu bilden. Das sekretierte CPn0809 könnte anschließend in der Wirtszellmembran schwierig zu detektieren sein, da hier die Zugänglichkeit des Epitops durch die Translokon-Proteine und Membranbestandteile für den Antikörper blockiert sein könnte.

In infektiösen EBs war CPn0809 leicht zugänglich, was ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Rolle als früh sekretiertes Translokationsporen-Protein ist (Kapitel 4.1.7 und Abbildung 4.13). Durch Waschen der EBs mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) wurde eine distinkte Menge des CPn0809 von den Bakterien abgelöst, während die intrazelluläre Kontrolle EF-Tu weiter mit der Bakterien-Fraktion assoziiert blieb. Für das als Kontrolle genutzte Chaperon GroEL1 wurde bereits in einer früheren Arbeit eine Oberflächenassoziation gezeigt, indem es durch Waschen mit PBS von EBs gelöst wurde (Wuppermann *et al.* 2008). Wenn CPn0809 also nicht auf der Oberfläche der Chlamydien lokalisiert (siehe oben), ist es möglich, dass sekretionsbereite CPn0809-Moleküle an der Basis des T3SS durch die Zentrifugalkräfte bei der Ultrazentrifugation aus dem T3SS der EBs gedrückt wurden (Kapitel 3.7.12). Daneben ist auch möglich, dass ein geringer Teil des CPn0809 auf der Oberfläche der EBs lokalisiert und ähnlich wie IpaB an der Detektion der Zielzellmembran

beteiligt ist. Dies würde mit der Beobachtung zusammenpassen, dass nur ein gewisser Teil CPn0809 mit PBS von EBs gelöst wurde, während der Großteil bakterienassoziiert blieb. Dieser größere Teil CPn0809 würde analog zu IpaB erst sekretiert werden, wenn der Kontakt zur Zielzelle hergestellt ist, um gemeinsam mit CPn0808 die Translokationspore aufzubauen (Veenendaal *et al.* 2007; Roehrich *et al.* 2013) (Kapitel 1.4.4.2). Eine geringe Menge CPn0809 auf der Oberfläche der EBs wäre in Westernblot-Analysen nach Waschen mit PBS detektierbar, während sie bei mikroskopischen Untersuchungen unterhalb der Nachweisgrenze liegen könnte.

Um Aufschluss über eine mögliche Oberflächenlokalisierung des CPn0809 zu erhalten, sollte in zukünftigen Experimenten auf die Pelletierung der EBs durch Zentrifugation verzichtet werden. Stattdessen könnten die Bakterien nach dem Waschen mit PBS mit einem Sterilfilter vom löslichen Überstand getrennt werden. Aufgrund der geringen Größe von EBs wäre ein Filter mit einer Porengröße von 0,1 µm bis 0,2 µm notwendig. Eine mögliche Lokalisation von CPn0809 an der Nadelspitze des T3SS der Chlamydien könnte mittels Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden. Möglich ist auch die Verwendung eines biochemischen Ansatzes, der für die Untersuchung von Translokons anderer Bakterien-Spezies angewendet wurde. Hierbei werden die Bakterien mit Erythrozyten inkubiert, welche nicht die eigentlichen Wirtszellen darstellen und als Modellmembran genutzt werden. Anschließend werden die Membranen der Erythrozyten isoliert und die Inkorporation der hydrophoben Translokatoren in der Membran mittels Westernblot-Analyse untersucht (Blocker *et al.* 1999; Ide *et al.* 2001; Goure *et al.* 2004; Montagner *et al.* 2011).

5.1.3 CPn0809 zeigt Eigenschaften hydrophober Translokatoren

Heterologe Sekretionsstudien mit *Shigella flexneri* zeigen, dass die N-Termini der hydrophoben Translokatoren des LcrH_1-Operons (CPn0809 und CPn0808) und des LcrH_2-Operons (CPn1020 und CPn1019) die T3SS-vermittelte Sekretion von Reporterproteinen erlauben (Subtil *et al.* 2005). Die heterologe Sekretion der Reporterfusionen der N-Termini der hydrophilen Translokatoren konnte nur für CPn1022 aus dem LcrH_2-Operon gezeigt werden, denn die Expression des CPn0810-Fusionsproteins ist toxisch für *Shigella* (Subtil *et al.* 2005). Die Proteine des Translokons werden in anderen Bakterien selbst T3SS-abhängig sekretiert (Kapitel 1.4.4.1). Ein Sekretionssignal im N-terminalen Teil eines Proteins weist somit nicht zwingend auf ein sekretiertes Effektorprotein hin. Es ist ebenso möglich, dass es sich beim untersuchten Protein um einen Bestandteil des T3SS handelt.

Die für hydrophobe Translokatoren essenziellen Interaktions-Fähigkeiten wurden auch für die N-terminale Hälfte des CPn0809 (As 1-253) nachgewiesen (vgl. Kapitel 1.4.4.2, Abbildung 4.11 und Abbildung 4.12). Für verschiedene große hydrophobe Translokatoren ist bekannt, dass sie die Fähigkeit zur Selbstinteraktion besitzen und Homooligomere oder durch Interaktion mit den jeweiligen kleinen hydrophoben Translokatoren Heterooligomere bilden (Daniell *et al.* 2001; Hume *et al.* 2003; Dasanayake *et al.* 2011; Romano *et al.* 2011). Aufgrund der Toxizität des heterolog exprimierten CPn0809-Volllängenproteins für *E. coli* konnten keine Studien zur Charakterisierung der Oligomerisierung des Proteins vorgenommen werden. Die Selbstinteraktion ist jedoch eine essenzielle Eigenschaft der Translokationsporen-Proteine, ebenso wie die Interaktion mit ihren korrespondierenden Chaperonen (Kapitel 1.4.3). Die Translokator-Chaperon-Interaktion erlaubt die Speicherung der hydrophoben Translokatoren im Zytosol der Bakterien bis zur Sekretion bei Kontakt mit der Zielzelle, hält das Protein in einem partiell ungefalteten, sekretionskompetenten Zustand und schützt das Bakterium vor der zytotoxischen Wirkung des Proteins. Die mittels Far-Westernblot- und Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen nachgewiesene Selbstinteraktion des CPn0809 N-Terminus (As 1-253) weist darauf hin, dass CPn0809 ebenfalls in der Lage ist Homooligomere zu bilden. Des Weiteren wurde durch Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen demonstriert, dass in der N-terminalen Hälfte des CPn0809 (As 1-253) die für hydrophobe Translokatoren essenzielle Bindedomäne für sein korrespondierendes Klasse II-Chaperon CPn0811 (LcrH_1) liegt (vgl. Kapitel 4.1.6).

Der zytotoxische Effekt der Expression von CPn0809 in *E. coli* wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingehender untersucht (Kapitel 4.1.4). Mikroskopische Analysen von mit Propidium-Iodid gefärbten Zellen zeigten, dass die Expression von CPn0809 zum Tod der *E. coli*-Zellen führte. Die Analyse der optischen Dichte (OD_{600}) von *E. coli*-Flüssigkulturen über die Zeit ergab, dass die Expression von CPn0809 nicht nur toxisch für die *E. coli*-Zellen ist, sondern sogar zur Lyse der Zellen führt. Diese Eigenschaft wird auch für die großen hydrophoben Translokatoren YopB (*Yersinia*) und PopB (*Pseudomonas*) beobachtet, und auch von anderen porenbildenden Proteinen ist dieser Effekt bekannt (Neyt & Cornelis 1999; Allmond *et al.* 2003; Aistleitner *et al.* 2013). Im Fall von YopB sind die Transmembrandomänen für den zytotoxischen Phänotyp verantwortlich, wobei dieser Effekt durch die Koexpression des korrespondierenden Klasse II-Chaperons SycD gemildert wird (Neyt & Cornelis 1999). Die toxische Wirkung von CPn0809 konnte ebenfalls auf die Transmembrandomänen zurückgeführt werden, da die Expression des N-terminalen Teils (As

1-253) keine und die des C-terminalen Teils (As 406-488) nur eine leicht toxische Wirkung auf *E. coli* zeigte (Abbildung 4.10).

Trotz des toxischen Effekts von CPn0809 auf *E. coli* sollte rekombinantes CPn0809 hergestellt werden. Für weitere biochemische Analysen ist die Herstellung von rekombinanten Proteinen von großer Bedeutung. Beispielsweise sollte untersucht werden, ob CPn0809 Homooligomere bildet und ob diese die Fähigkeit besitzen, in artifizielle Membranen zu inserieren. Es wäre interessant, ob CPn0809 in der Lage ist wie IpaB Poren in artifiziellen Membranen zu bilden (Dickenson *et al.* 2013). Für die Produktion von rekombinantem Protein werden hydrophobe Translokatoren oft bicystronisch mit ihrem korrespondierenden Klasse II-Chaperon exprimiert, oder *E. coli*-Zellen werden mit zwei Plasmiden kotransformiert, von denen das eine das Chaperon codiert und das andere den hydrophoben Translokator (Schoehn *et al.* 2003; Birket *et al.* 2007; Dickenson *et al.* 2013). Die Strategie, CPn0809 mit seinem Chaperon als bicystronisches Konstrukt zu exprimieren, war bisher nicht erfolgreich (nicht gezeigt).

Interessanterweise identifizierten Bulir und Kollegen in einer aktuellen Publikation CPn0808, das zweite hydrophobe Protein des LcrH_1-Operons, als kleinen hydrophoben Translokator von *C. pneumoniae* und fanden verschiedene Strukturmerkmale und Domänen, die für hydrophobe Translokatoren typisch sind (Bulir *et al.* 2014). Insbesondere wurde ein Motiv (PxLxxP) identifiziert, das die Bindung an LcrH_1 vermittelt. Dieses Motiv ist auch in CPn0809 vorhanden (As 166-171) und liegt in der N-terminalen Hälfte des Proteins, mit der in der vorliegenden Arbeit die Interaktionsstudien zur Selbstinteraktion und LcrH_1-Bindung durchgeführt wurden (vgl. Kapitel 4.1.6). Die Sequenz liegt jedoch nicht innerhalb der Coiled-Coil-Domänen, von denen angenommen wurde, dass eine oder beide die Protein-Protein-Interaktionsdomänen von CPn0809 mit LcrH_1 darstellen. Daher sind weitere Untersuchungen, ob dieses Motiv auch in CPn0809 in der Lage ist die Interaktion mit LcrH_1 zu vermitteln, interessant. Des Weiteren wurde gezeigt, dass rekombinantes CPn0808 tetra- und dekamere Oligomere bildet und in der Lage ist CopN, CdsF und CdsN zu binden (Bulir *et al.* 2014).

Die Inkubation von *C. pneumoniae* EBs mit einem polyklonalen Peptid-Antikörper gegen einen Bereich im N-terminalen Teil des CPn0808 (As 76-89) vor dem Beginn der Infektion reduzierte die Infektion um 98 % (Bulir *et al.* 2014). Ein vergleichbares, im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführtes, Neutralisations-Experiment mit dem polyklonalen CPn0809-Antikörper zeigte dagegen keine Reduktion der *C. pneumoniae*-Infektion (nicht

gezeigt). Dies könnte bedeuten, dass der kleine hydrophobe Translokator von *C. pneumoniae* CPn0808, anders als diejenigen anderer Bakterien mit T3SS, bereits vor dem Kontakt mit der Zielzelle an der Spitze der Nadel präsent ist und von dem Peptid-Antikörper detektiert und gebunden werden kann (siehe Abbildung 5.1 A). CPn0809 ist demnach vor dem Kontakt mit einer Wirtszelle noch im bakteriellen Zytosol gespeichert und würde erst bei Kontakt mit der Zielzelle zusammen mit CPn0808 eine Pore in der Wirtszellmembran aufbauen (Abbildung 5.1 B-D). Es könnte jedoch auch sein, dass der Anti-CPn0809-Antikörper CPn0809 an der Nadelspitze nicht detektieren kann, da die vom Antikörper erkannten Epitope sich im Inneren der Translokationspore befinden und so nicht zugänglich sind. Dies würde auch erklären, weshalb das Protein bei mikroskopischen Untersuchungen ohne vorherige Permeabilisierung nicht detektiert wurde (vgl. Kapitel 5.1.2). Es sind verschiedene Zusammensetzungen der Pore vorstellbar: (i) CPn0809 und CPn0808 könnten ringförmig angeordnet sein, wobei das eine Protein das andere umgibt (Abbildung 5.1 B), oder zwei homooligomere Ringe könnten übereinander gestapelt sein (Abbildung 5.1 C). (ii) Es ist auch möglich, dass CPn0809 und CPn0808 gemeinsam, wie es für andere Translokationsporen-Proteine vermutet wird, eine heterooligomere Pore in der Membran der Wirtszelle bilden (Abbildung 5.1 D). Die Untersuchung der Interaktion von CPn0809 und CPn0808 ist daher in Zukunft besonders interessant.

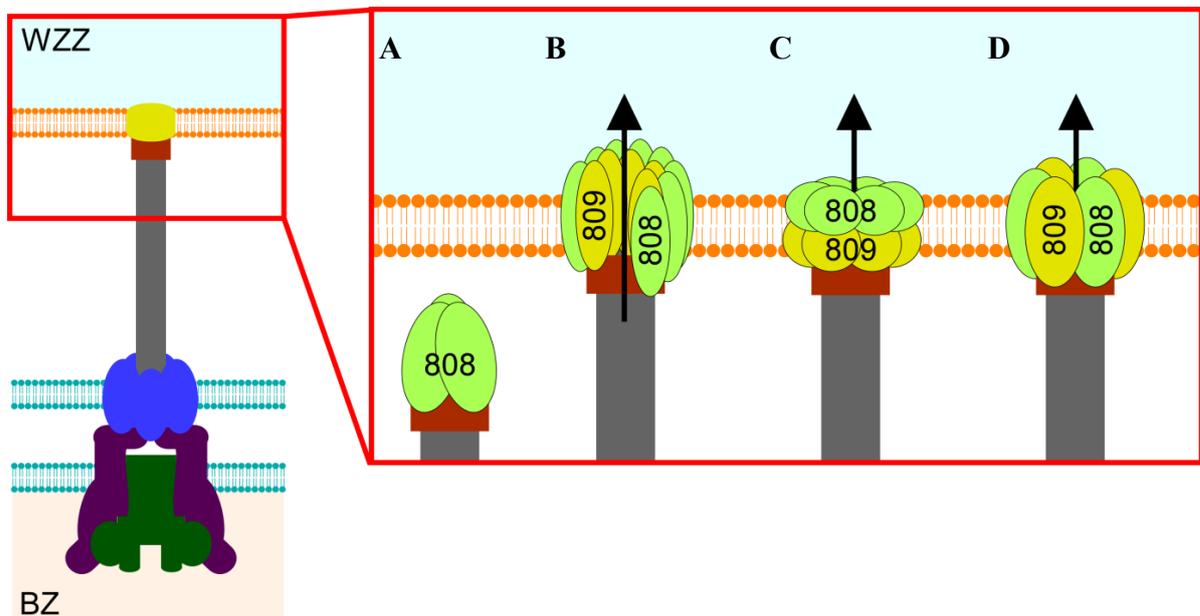


Abbildung 5.1: Schema des möglichen Aufbaus der Translokationsporen in *C. pneumoniae*

Das T3SS durchspannt die Membranen des Bakteriums und der Wirtszelle, um eine Translokation von Proteinen aus dem bakteriellen Zytosol (**BZ**) in das Zytosol der Wirtszelle (**WZZ**) in einem Schritt zu ermöglichen (vgl. Kapitel 1.4.1). Verschiedene mögliche Zusammensetzungen der Translokationspore in der Wirtszellmembran sind vergrößert dargestellt.

A: CPn0808 ist bereits vor Kontakt mit der Wirtszelle an der Spitze des T3SS lokalisiert. CPn0809 ist noch nicht sekretiert.

B: CPn0808 umgibt CPn0809 in der Translokationspore, sodass Epitope von CPn0809 nach außen hin abgeschirmt sind. In dieser Darstellung ist die Pore an der linken Seite geöffnet, um das Innere der Pore sichtbar zu machen.

C: CPn0809 und CPn0808 bilden ringförmige Homooligomere, die zusammen eine heterooligomere Pore in der Zytoplasmamembran der Wirtszelle bilden. Die Orientierung der beiden Homooligomere könnte auch anders herum vorliegen.

D: CPn0809 und CPn0808 bilden eine heterooligomere Pore in der Membran der Zielzelle.

5.1.3.1 Der C-Terminus von CPn0809 erkennt distinkte Lipide

Die hydrophoben Translokatoren bilden eine Pore in Membranen, um die Sekretion von Effektoren zu ermöglichen. Daher war die Beobachtung, dass CPn0809 spezifische Lipide bindet, besonders interessant. Andere hydrophobe Translokatoren binden artifizielle Membranen (vgl. Kapitel 1.4.4.2). Diese Interaktion wird durch die Lipid-Zusammensetzung der Membran beeinflusst, wobei vor allem Cholesterol, Phosphatidylserin oder Phosphatidylcholin hier eine Rolle spielen (Schoehn *et al.* 2003; van der Goot *et al.* 2004; Hayward *et al.* 2005; Faudry *et al.* 2006; Harrington *et al.* 2006; Romano *et al.* 2011). Es gibt jedoch auch Beispiele, bei denen die Zusammensetzung der Zielmembran keine Rolle spielt. So interagiert der N-terminale Teil (As 1-171) von EspD mit artifiziellen Liposomen verschiedener Zusammensetzung gleichermaßen gut, weshalb hier eine hydrophobe statt einer elektrostatischen Interaktion angenommen wird (Dasanayake *et al.* 2011).

Erste Studien zur Bindung von CPn0809 an natürliche Membranen zeigten, dass rekombinante CPn0809-Varianten, in denen die drei vorhergesagten Transmembrandomänen deletiert waren, an Membranen von humanen HeLa-Zellen binden (Hüsgen 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der C-terminale Teil des CPn0809 (CPn0809C As 406-488) an Lipide bindet. Dabei interagierte CPn0809C stark mit negativ geladenen Lipiden wie Phosphatidsäure, Cardiolipin, Sulfatiden und Phosphatidylinositolphosphaten (PiPs) (Abbildung 4.11). Phosphatidylinositolphosphate sind äußerst wichtige Signalmoleküle der eukaryotischen Zelle, die verschiedenste Signal- und Vesikeltransportwege regulieren und die Identität von Zellorganellen maßgeblich mitbestimmen (Di Paolo & De Camilli 2006; Balla 2013). Phosphatidylinositole werden vor allem am Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und ihre Mono-Phosphorylierung findet vor allem an Endomembranen, wie den Endosomen und dem Golgi/ *trans*-Golgi-Netzwerk, statt (Di Paolo & De Camilli 2006; Balla

2013). Beispielsweise ist Phosphatidylinositol-4-phosphat (Pi(4)P₁) vor allem auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran lokalisiert und wird hier zu Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (Pi(4,5)P₂) phosphoryliert. Pi(4,5)P₂ kolokalisiert vor allem mit Caveolae in der Plasmamembran und spielt neben vielen anderen zellulären Prozessen eine Rolle bei der Endo-, Phago- und Pinozytose (Pike & Casey 1996; Di Paolo & De Camilli 2006).

Die Bindung von CPn0809C an die drei verschiedenen PiPs ist hochinteressant, da Phosphatidylinositol nicht gebunden wurde. Die Affinität zu Pi(4)P₁ war besonders stark und die zu Pi(4,5)P₂ und Pi(3,4,5)P₃ etwas schwächer. Die zusätzlichen negativen Ladungen durch die zweite und dritte Phosphatgruppe wirkten sich offenbar negativ auf die Bindung von CPn0809C aus. Es wäre möglich, dass die Affinität von CPn0809 zu bestimmten Lipiden die Lipid-Komposition am Insertionsort des Translokons in der Plasmamembran der Zielzelle widerspiegelt. So zeigten mikroskopische Analysen der CPn0809-Lokalisation während der frühen Infektion die Assoziation eines CPn0809-positiven chlamydialen Partikels mit dem Signal der Pleckstrin-Homologie- (PH-) Domäne der Burton's-Tyrosin-Kinase (BTK), welche spezifisch an Pi(3,4,5)P₃ bindet (vgl. Abbildung 4.9). Für *C. trachomatis* wurde die transiente Synthese von Pi(3,4,5)P₃ aus Pi(4,5)P₂ durch die Rekrutierung der Phosphoinositid-3- (PI3-) Kinase zum Eintrittsort infektiöser EBs bereits gezeigt (Lane *et al.* 2008) (siehe Kapitel 1.3.3). Des Weiteren sind Marker für Pi(4)P₁ in der Mitte der Infektion an der *C. trachomatis* (18 hpI) und *C. pneumoniae* (48 hpI) Inklusionsmembran detektierbar (Moorhead *et al.* 2010). Es wäre demnach möglich, dass die von CPn0809C erkannten PiPs bei der Adhäsion und Internalisierung der EBs in den beteiligten Wirtszellmembranen vorhanden sind (siehe Abbildung 5.2). Die Affinität des CPn0809 C-Terminus zu Lipiden, die sich zum Zeitpunkt der Internalisierung an der Stelle des Eintrittsortes befinden, könnte die Insertion der Translokationspore begünstigen oder die Pore stabilisieren.

5.1.4 Agiert CPn0809 neben der Translokator-Funktion als Effektor?

CPn0809 wurde in einer früheren Arbeit als translozierter Effektor identifiziert, der 55 hpI im Zytosol der infizierten Zelle zu detektieren ist (Lugert *et al.* 2004). Dabei wurde in mikroskopischen Untersuchungen mit einem polyklonalen Antiserum ein deutliches Signal für CPn0809 außerhalb der Inklusion detektiert. Diese Befunde wurden durch die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Experimente nicht bestätigt. Der hier verwendete polyklonale CPn0809-Antikörper wurde gegen den N-terminalen Bereich des Proteins hergestellt (As 1-253), womit auch der gesamte Bereich abgedeckt ist, gegen den Lugert und Kollegen das verwendete CPn0809-Antiserum gerichtet hatten (As 73-171). Die Spezifität des in der

vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörpers wurde mittels Präadsorption nachgewiesen (vgl. Abbildung 4.6). Allerdings wurde der verwendete anti-CPn0809-Antikörper einer Antigenreinigung und verschiedenen Abreicherungs-schritten unterzogen und somit ist es möglich, dass aufgrund einer dabei verursachten Verdünnung des Antikörpers geringe Mengen des translozierten Epitops mikroskopisch nicht detektiert wurden. Dagegen wurden weder mit dem unbehandelten anti-CPn0809-Antiserum, noch mit dem antigengereinigten anti-CPn0809-Antikörper Signale im Zytosol infizierter Zellen detektiert, die nicht auch in nicht-infizierten Zellen beobachtet wurden (nicht gezeigt und Abbildung 4.3). Die hier gezeigten mikroskopischen Analysen zeigen somit, dass CPn0809 während der Infektion *nicht* in das Zytosol der Wirtszelle transloziert wird. Es ist jedoch möglich, dass CPn0809 neben seiner Funktion als Translokationspore-Protein auch eine Effektorfunktion aufweist. Solche dualen Funktionen wurden bereits für verschiedene kleine hydrophobe Translokatoren nachgewiesen (vgl. Kapitel 1.4.4.2).

Aufgrund dieser zuvor gezeigten Translokation von CPn0809 wurden in verschiedenen Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen Interaktionspartner identifiziert (Engel 2010; Markkula *et al.* 2013). Eine Relevanz der möglichen Interaktionspartner MIF4GD und NCAPH2 für die *C. pneumoniae*-Infektion wurde allerdings nicht gefunden (Engel 2010) (vgl. Kapitel 1.6). Eine Relevanz des Golgi-Anti-Apoptose-Proteins (GAAP), welches durch Markkula und Kollegen als Interaktionspartner von CPn0809 identifiziert wurde, wurde für die *C. pneumoniae*-Infektion nachgewiesen (Markkula *et al.* 2013). Eine direkte Interaktion des CPn0809 mit GAAP in der Infektion wurde dagegen nicht gefunden.

Für die Infektion mit *C. trachomatis* ist bekannt, dass der Golgi-Apparat fragmentiert wird und die resultierenden Golgi-Ministapel zur Inklusionsmembran transportiert werden (Heuer *et al.* 2009) (vgl. Kapitel 1.5.1.3). Für *C. pneumoniae* wiesen mikroskopische Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass hier ein ähnlicher Vorgang stattfindet. So zeigten Zellen, die 24 h mit *C. pneumoniae* infiziert worden waren, noch einen intakten Golgi-Apparat (siehe digitalen Anhang). Nach 48 hpI wurde der Golgi-Apparat nicht mehr detektiert und es waren keine wie für *C. trachomatis* typischen Golgi-Ministapel um die *C. pneumoniae*-Inklusion erkennbar. Allerdings wurden diffuse bis punktierte Signale des Golgi-Antikörpers im Lumen der Inklusion detektiert. Markkula und Kollegen haben nach eigener Aussage die Spaltung von Golgin-84 in der *C. pneumoniae*-Infektion beobachtet, was jedoch in der Publikation nicht gezeigt wurde (Markkula *et al.* 2013). Eine Neuorganisation und Rekrutierung des fragmentierten Golgi-Apparates in die Inklusion würde GAAP in der

späten Infektion (ab 48 hpI) in räumliche Nähe zu den sich re-differenzierenden RBs bringen, die nun mit der Expression von CPn0809 beginnen (vgl. Kapitel 4.1.3). Bei Untersuchungen der Lokalisation des CPn0809 in der späten Infektion (48 hpI und 80 hpI) wurden punktierte CPn0809-Signale sehr nahe an der Inklusionsmembran innerhalb der Inklusion beobachtet (Abbildung 4.7). Diese markierten wahrscheinlich reife RBs oder bereits re-differenzierte EBs unterhalb der Inklusionsmembran. Durch Antikörper-Transfektionsexperimente konnte nicht bestätigt werden, dass CPn0809 in der Inklusionsmembran mit dem Zytosol der Humanzelle in Kontakt steht (Herbst 2011). Hätte CPn0809 während der späten Infektion eine Funktion und wäre zu diesem Zeitpunkt in der Inklusionsmembran inseriert, könnte die in Kapitel 5.1.3 beschriebene schwierige Erreichbarkeit des Epitops für den Antikörper die Detektion verhindern. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass CPn0809 in der späten *C. pneumoniae*-Infektion in der Inklusionsmembran oder innerhalb der Inklusion mit GAAP interagiert. Es würde sich hierbei um eine neue Interaktion in der späten Infektion handeln, die die Apoptose-Mechanismen der Wirtszelle beeinflusst. Um dies eingehender zu untersuchen, müssen mikroskopische Untersuchungen mit einem GAAP-spezifischen Antikörper und Kopräzipitations-Experimente der Proteine aus der Infektion durchgeführt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Fraktionierung infizierter Zellen und Westernblot-Analyse der Fraktionen ein Hinweis auf die Sekretion des CPn0809 in der späten Infektion gefunden. CPn0809 wurde 65 hpI in Fraktionen detektiert, die nicht mit anderen chlamydialen Proteinen assoziiert waren (Abbildung 4.14). Diese späte Detektion des Proteins kann drei Ursachen haben: (i) CPn0809 ist zu diesem Zeitpunkt der Infektion relativ abundant und wird dadurch besser in den entsprechenden Fraktionen detektiert; (ii) CPn0809 wird während der Ultrazentrifugation aus den reifen EBs gedrückt (vgl. Kapitel 5.1.2) und sammelt sich aufgrund seines hydrophoben Profils vor allem in der Lipidtröpfchen-Phase; (iii) CPn0809 wird zu diesem späten Zeitpunkt in der Infektion transloziert, um eine Effektorfunktion in der Zelle auszuüben, wie beispielsweise mit GAAP zu interagieren. Die Detektion von CPn0809 in der Lipidtröpfchen-Phase ist interessant, da CPn0809 bereits in früheren Arbeiten bei ektopischer Expression in der Hefe *S. cerevisiae* mit dem Lipidtröpfchen-Marker Erg6-GFP kolokalisiert wurde (Herbst 2011). Die Assoziation mit Lipidtröpfchen wurde auch bei der Expression in Humanzellen gefunden. Hier kolokalisiert CPn0809 mit dem Lipidtröpfchen-Marker Bodipy (nicht gezeigt) und dem *C. pneumoniae*-Homolog von Lda3 (Abbildung 4.14), welches in der *C. trachomatis*-Infektion mit Lipidtröpfchen der Wirtszelle assoziiert ist (Kumar *et al.* 2006; Cocchiario *et al.* 2008). In der Infektion wurden CPn0809-

Signale mikroskopisch bislang nicht mit Lipidtröpfchen kolokalisiert, wobei die Menge des sekretierten CPn0809 möglicherweise unterhalb der Nachweisgrenze liegt.

Lipidtröpfchen sind Speicherorganellen der eukaryotischen Zelle für Neutrallipide (Fujimoto *et al.* 2008). Sie sind von einer einfachen Phospholipid-Schicht umgeben und werden am ER der Zelle gebildet. Die Phospholipid-Zusammensetzung spiegelt die der ER-Membran wider und weist vor allem Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinositol auf (Fujimoto *et al.* 2008; Ohsaki *et al.* 2014). Somit sind keine Lipide angereichert, für die eine Affinität von CPn0809C gezeigt wurden. Eine Insertion des Proteins vermittelt durch die vorhergesagten Transmembrandomänen ist ebenfalls unwahrscheinlich, da die Lipidtröpfchen-Hülle normalerweise aus einer einfachen Phospholipid-Schicht besteht, während typische Transmembrandomänen Phospholipid-*Doppelschichten* durchspannen. Bei der ektopischen Expression wird CPn0809 artifiziell am ER der eukaryotischen Zelle synthetisiert. Es ist möglich, dass CPn0809 nach Transfektion mit seinem hydrophoben C-Terminus in die Membran des ERs inseriert wird und anschließend in neugebildete Lipidtröpfchen inkorporiert wird, wo es akkumuliert. Ein ähnlicher mit dem ER verknüpfter Mechanismus wurde zur Insertion von Lipidtröpfchen assoziierten-Proteinen vorgeschlagen (Ohsaki *et al.* 2014).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für CPn0809 keine Funktion als Effektor von *C. pneumoniae* nachgewiesen. Dennoch ist es möglich, dass das Protein multiple Funktionen aufweist. Für viele der kleinen hydrophoben Translokatoren anderer Bakterien wurde eine Funktion als Effektor gezeigt. Zumeist begünstigen sie durch die Interaktion mit Aktin die Aufnahme des Bakteriums in die Wirtszelle (vgl. Kapitel 1.4.4.2). Für den großen hydrophoben Translokator aus *Shigella* (IpaB) wurde eine Interaktion mit Mad2L2, dem Inhibitor des Anaphase fördernden Komplexes (APC = engl. anaphase-promoting complex/cyclosome) gezeigt, durch die mit *Shigella* infizierte Epithelzellen im Zellzyklus arretiert werden (Iwai *et al.* 2007). Für CPn0809 wurde innerhalb seines C-Terminus eine Coiled-Coil-Domäne (As 411-436) vorhergesagt, deren Funktion noch nicht klar ist. Die vorhergesagte Coiled-Coil-Domäne liegt in dem Bereich des CPn0809 C-Terminus (As 406-488), welcher in der Lage ist an Phosphatidylinositolphosphate (PiPs) zu binden (Kapitel 4.1.5 und 5.1.3.1). Es wäre möglich, dass CPn0809 mit PiPs an der Eintrittsstelle interagiert, um dort einen Signalweg derart zu beeinflussen, dass die Internalisierung von *C. pneumoniae* begünstigt wird (Abbildung 5.2). Es wäre daher interessant, den C-terminalen Bereich des CPn0809 in der Zukunft eingehender zu untersuchen. Da der C-Terminus des CPn0809 selbstständig an Phospholipide bindet,

könnten Studien zur Bindefähigkeit des Proteins an Membranen mit CPn0809C oder einer Version von CPn0809 ohne die vorhergesagten Transmembrandomänen durchgeführt werden. Des Weiteren sollten mögliche Wechselwirkungen des CPn0809 mit Signalwegen untersucht werden, an denen PiPs bei der Internalisierung von extrazellulärem Material beteiligt sind (vgl. Kapitel 5.1.3.1).

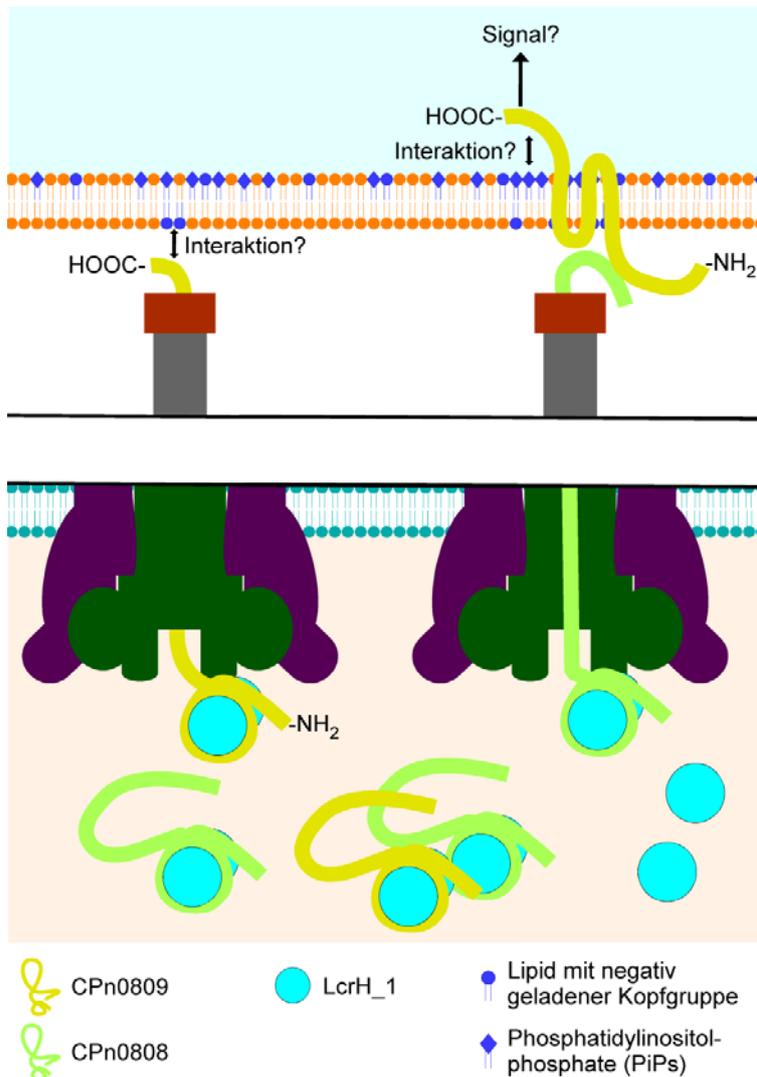


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der CPn0809-Insertion

CPn0809 bindet mit dem N-Terminus an das Klasse II-Chaperon LcrH_1. Bei Kontakt mit einer Zielzelle wird es sekretiert und könnte mit seinem C-Terminus mit den negativ geladenen Lipiden der humanen Plasmamembran interagieren. Anschließend werden die Transmembrandomänen von CPn0809 in die Membran inseriert, um das Protein zu verankern. Der C-Terminus von CPn0809 könnte nun auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran mit PiPs interagieren, um Signalkaskaden zu aktivieren oder zu manipulieren, um die Internalisierung des EBs zu begünstigen. Vermittelt durch den N-Terminus könnte CPn0809 in der Membran mit anderen CPn0809- oder CPn0808-Molekülen interagieren.

CPn0809 ist mit CPn0808 zusammen vermutlich eines der ersten Proteine, die bei Kontakt der EBs zu einer möglichen Zielzelle sekretiert werden (siehe Abbildung 5.2). Wie die erfolgreiche Inhibition der Infektion mittels Peptid-Antikörper gegen CPn0808 bereits zeigte, sind die Translokationspore-Proteine ein guter Angriffspunkt für einen Impfstoff gegen die Infektion mit *C. pneumoniae*. Des Weiteren ist die Analyse der exakten Funktion der beiden hydrophoben Translokatoren zum Verständnis der chlamydialen Infektion von großer Wichtigkeit. Sie sollten aufgrund zahlreicher Beispiele für eine mögliche duale Funktion der

Translokatoren anderer Spezies auf ihre mögliche Funktion als Effektorproteine der Chlamydien untersucht werden.

5.2 CPn0147 und seine Assoziation mit fädigen Strukturen

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass CPn0147 ein Inklusionsmembran-Protein (Inc-Protein) ist, das mit Beginn der Differenzierung der EBs zu RBs (6 hpI) mikroskopisch detektierbar wird (Luo *et al.* 2007b). Für CPn0147 wurde zudem eine Lokalisierung auf von der Inklusion ausgehenden fadenartigen Strukturen und eine Assoziation mit Lipidtröpfchen gezeigt (Herbst 2011). Die Natur der CPn0147-positiven fädigen Strukturen und die Funktion von CPn0147 wurden im Rahmen dieser Arbeit eingehender untersucht.

5.2.1 Durch die *C. pneumoniae*-Infektion hervorgerufene Fäden könnten Infektionsphasen-abhängige Funktionen haben

Die durch eine Chlamydien-Infektion hervorgerufenen Fäden wurden bereits bei der ersten Untersuchung der Lokalisierung von IncA aus *Chlamydia caviae* beobachtet (Rockey *et al.* 1995). Trotz einiger Untersuchungen zur Funktion dieser fädigen Strukturen, ist nicht klar, aus welchem Material die Fäden aufgebaut sind, welche Faktoren zu ihrer Bildung führen - denn längst nicht jede Inklusion weist assoziierte fädige Strukturen auf - und welche Funktion den Fäden während der Infektion zukommt. Eine Untersuchung der IncA-positiven Fäden in der *C. trachomatis*-Infektion führte zu der Schlussfolgerung, dass die Fäden eine an der Bildung von Sekundärinklusionen beteiligt sind (Suchland *et al.* 2005). Versuche zur Untersuchung CPn0147-positiver Fäden deuten allerdings darauf hin, dass dies nicht ihre primäre Funktion ist, da abhängig von Infektionsstärke (MOI) und anderen Faktoren, sehr viele Fäden beobachtet werden, die nicht mit anderen Inklusionen oder Chlamydien verbunden sind (Herbst 2011) (vgl. Abbildung 4.16).

Durch die mikroskopische Untersuchung der Lokalisation verschiedener chlamydialer Antigene auf CPn0147-Fäden, die nur zu einer Inklusion Kontakt haben, wurden Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den CPn0147-Fäden aufgedeckt. Zu jedem Zeitpunkt der Infektion wiesen CPn0147-positiven Fäden auch IncA-Signale auf, was eine gemeinsame Identität der IncA- und CPn0147-Fäden zeigte (vgl. Abbildung 4.16). Dagegen zeigten nur ca. 3 % der betrachteten Fäden zwischen 24 und 48 hpI eine Assoziation mit dem chlamydialen Chaperon DnaK, das immer mit einem Signal für DNS kolokalisierte (vgl. Kapitel 0). Da in der späten Infektion keine Fäden mehr eine Assoziation mit DnaK/ DNS-Signalen zeigten und auch die Verbindung zu anderen Inklusionen bei niedriger MOI sehr

selten war, wurde auch hier kein Hinweis auf eine Beteiligung bei der Bildung von Sekundärinklusionen gefunden (siehe oben). Das oberflächenpräsentierte Lipopolysaccharid (LPS) lokalisierte dagegen häufig auf CPn0147-positiven Fäden (~40 % 24 und 48 hpI; 20 % 72 hpI). In der vorliegenden Arbeit wurde LPS zu jedem betrachteten Zeitpunkt auf den CPn0147-Fäden detektiert, es wurden aber Unterschiede der Assoziation verschiedener chlamydialer Antigene in Abhängigkeit von der Infektionsdauer beobachtet (Abbildung 4.16). So sank die Anzahl der LPS-, DnaK- und Pmp21-assoziierten CPn0147-positiven Fäden mit fortschreitender Infektion. Interessanterweise wurde bereits eine Abhängigkeit der Präsentation des LPS und anderer chlamydialer Antigene auf IncA-positiven Fäden von äußeren Bedingungen beschrieben (Brown *et al.* 2002). So sind bei Behandlung der *C. pneumoniae* infizierten Zellen mit dem β -Lactam-Antibiotikum Ampicillin 27 % der IncA-positiven Fäden mit einem LPS-Signal assoziiert, während unter Standardbedingungen kein LPS auf IncA-positiven Fäden detektierbar ist (Brown *et al.* 2002). Dies sind Hinweise darauf, dass die Fäden abhängig von Infektionsdauer und/oder äußeren Einflüssen unterscheidbar sind.

Die beobachtete punktierte Lokalisierung von Pmp21 ist ein weiterer Hinweis auf die Verschiedenartigkeit von Fäden. In einer früheren Arbeit wurden kontinuierliche Pmp21-Signale detektiert, die 48 hpI mit bis zu 15 % der CPn0147-positiven Fäden kolokalisierten (Becker 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden nie kontinuierliche Pmp21-Signale beobachtet (vgl. Abbildung 4.16), allerdings zeigen die Beispielaufnahmen von Becker multipel infizierte Zellen, wobei sich die kontinuierlichen Pmp21-Signale zwischen zwei Inklusionen befinden. In der vorliegenden Arbeit wurden niedrige MOIs gewählt, um Fäden zu untersuchen, die nicht mit anderen Inklusionen verbunden sind. Es ist demnach möglich, dass die Änderung weitere Faktoren wie eine erhöhte MOI die Präsentation von Antigenen auf den Fäden verändert.

Über die Bedeutung der chlamydialen Antigene in oder auf den durch die Infektion verursachten Fäden, kann bisher nur spekuliert werden. Sie könnten die Zusammensetzung der sich entwickelnden Bakterien widerspiegeln, welche an der Inklusionsmembran liegen und von deren Oberfläche LPS oder Pmp21 gelegentlich von den sich bildenden Fäden mitgetragen werden. Die Oberfläche der RBs ist dabei möglicherweise leichter zugänglich als die der EBs, deren Oberflächenproteine durch Disulfidbrücken stark vernetzt sind (vgl. Kapitel 1.3.1), was die Verringerung der Oberflächen-assoziierten Antigene auf den Fäden über die Zeit erklären kann (Abbildung 4.16). Die DnaK/ DNS-Signale könnten RBs

darstellen, die auf CPn0147-Fäden transportiert werden, um so Sekundärinklusionen in einem anderen Bereich der Zelle zu bilden. Allerdings ist bekannt, dass *C. trachomatis* RBs durch ihr T3SS in der Inklusionsmembran verankert sind (Peters *et al.* 2007; Dumoux *et al.* 2012). Vermutlich sind auch *C. pneumoniae* RBs mit dem T3SS in der Inklusionsmembran verankert, um durch Sekretion von Effektoren die Wirtszelle zu manipulieren. Somit wäre es wahrscheinlich, dass die RBs durch ihre Verankerung in der Inklusionsmembran gelegentlich auf die fädigen Strukturen gelangen.

Nicht nur in der Präsentation verschiedener Antigene unterscheiden sich die fadenförmigen Strukturen, die durch die *C. pneumoniae*-Infektion induziert werden. Die Analyse der Faden-Orientierung zeigte, dass der Großteil in Richtung des Zellkerns wies und nur ca. ein Drittel der untersuchten Fäden wies vom Zellkern weg (Abbildung 4.17). Dieses Ergebnis bestätigte, die bei der Untersuchung der fadenartigen Strukturen mehrfach geäußerte Vermutung, dass die fädigen Strukturen vor allem am Zellkern und um den Zellkern der Wirtszelle „gewickelt“ erscheinen (Rockey *et al.* 1995; Suchland *et al.* 2005; Herbst 2011). Es wäre möglich, dass auch die subzelluläre Lokalisation der fädigen Strukturen mit verschiedenen Funktionen assoziiert ist. Es könnten Fäden existieren, die einerseits in der Peripherie der Zelle mit endo- oder exozytotischen Vesikeln interagieren und andererseits mit dem Zentralen ER der Wirtszelle assoziiert sind.

Auch bei einer Infektion mit *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium wird die Bildung von fadenartigen Strukturen beobachtet, die je nach Infektionszeitpunkt verschiedene Assoziationen mit Effektoren und Wirtszellfaktoren aufweisen (Schroeder *et al.* 2011). So wird bei der Infektion von Epithelzellen mit dem gramnegativen, fakultativ intrazellulär lebenden Pathogen das Auftreten von fädigen Strukturen beobachtet, deren Bildung 30 min bis 5 h nach Infektionsbeginn zu beobachten ist (Schlumberger & Hardt 2006; Schroeder *et al.* 2011). *Salmonella* verbleibt in der Wirtszelle innerhalb einer von einer Membran umgebenen Vakuole, der SCV (engl. *Salmonella*-containing vacuole). Es wurde vermutet, dass die Fäden durch kontinuierliche Verschmelzung endozytotischer Vesikel mit der SCV, durch nicht abgeschlossene Vesikel-Abspaltung von der SCV-Membran oder durch die Interaktion der SCV-Membran mit Kinesin, einem zum Plus-Ende der Mikrotubuli gerichteten Motorprotein, entstehen (Haraga *et al.* 2008). Seitdem wurden mehrere, aufgrund ihrer Assoziation mit verschiedenen *Salmonella*-Effektoren und Wirtszellproteinen unterscheidbare, fadenartige Strukturen identifiziert, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der intrazellulären Infektion auftreten (Schroeder *et al.* 2011). So werden beispielsweise in der

frühen Infektion (30 min bis 3 h) Sorting nexin-assoziierte Fäden detektiert (SNX-Tubuli), die wahrscheinlich an der Rekrutierung von endosomalen Vesikeln und Lysosomen zur SCV beteiligt sind. Später werden Brefeldin A unempfindliche SIFs (engl. *Salmonella*-induced filaments), Brefeldin A sensitive SISTs (engl. *Salmonella*-induced secretory carrier membrane protein 3 (SCAMP3) tubules) und mit LAMP1-positiven Vesikeln interagierende LNTs (engl. lysosome-associated membrane protein 1 (LAMP1)-negative tubules) unterschieden (Schroeder *et al.* 2011).

Die für *Salmonella* beobachtete Diversität fadenartiger Strukturen macht klar, dass es in weiterführenden Experimenten wichtig ist, die Assoziation der Fäden mit verschiedenen chlamydialen Effektoren, wie beispielsweise unterschiedlichen Inc-Proteinen, zu untersuchen. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass die CPn0147-positiven Fäden mit den bereits bekannten IncA-Fäden identisch sind, werden diese im Folgenden als chlamydiale Inc-positive Fäden (CIPF) bezeichnet. Es wäre interessant zu analysieren, ob sich die Zusammensetzung der Inc-Proteine auf den Fäden von der der Inklusionsmembran unterscheidet und ob sie sich in unterschiedlichen Phasen der Infektion verändert. Die Untersuchung von Inc-Proteinen, welche in Mikrodomänen vorkommen, wäre besonders interessant (Mital *et al.* 2010) (vgl. Kapitel 1.5.1.1). Mital und Kollegen zeigten, dass bestimmte Inc-Domänen mit aktiven Kinasen der Src-Familie, γ - und β -Tubulin und Dynein assoziiert sind. Es wäre also möglich, dass diese Inc-Mikrodomänen eine Rolle bei der Bildung der CIPF spielen.

5.2.2 CPn0147 kolokalisiert in der Infektion und in der Transfektion mit Membranstrukturen

Verschiedene Kolokalisierungs-Experimente deuteten darauf hin, dass CIPF und in der Transfektion beobachteten CPn0147-Fäden ähnliche, wenn nicht sogar identische Strukturen markierten. Die beiden fadenartigen Strukturen wurden mit verschiedenen Markern der Plasmamembran (LactC2-GFP und mCherry-GPI) und einem Marker für Recycling-Endosomen (Rab11) kolokalisiert. Die Intensität der Markierung von CIPF und CPn0147-Fäden der Transfektion unterschied sich hierbei etwas. So war die Markierung mit Rab11 in beiden Situationen identisch, während LactC2-GFP und mCherry-GPI die CIPF zum Teil nur punktiert markierten, mit den CPn0147-Fäden in der Transfektion jedoch nahezu kontinuierlich kolokalisierten (Abbildung 4.20 und Abbildung 4.27). LactC2-GFP markiert Phosphatidylserin (PS), das vor allem in der zytosolischen Seite der Phospholipid-Doppelschicht der Plasmamembran vorkommt, wohingegen mCherry-GPI mittels

Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) in die äußere Seite der Plasmamembran inseriert wird (Fairn *et al.* 2011; Eierhoff *et al.* 2014). LactC2-GFP bindet vermutlich PS, welches in der Infektion wahrscheinlich durch endozytotische Vesikel zur Inklusion gelangt und durch Verschmelzung der Vesikel mit der Inklusionsmembran in diese inseriert wird. LactC2 könnte demnach direkt mit dem PS der Plasmamembran zur Inklusionsmembran transportiert werden oder erst hier an PS binden. Das PS der Wirtszelle wird von den Chlamydien zur Produktion anderer Phospholipide verwendet, wodurch das PS in der Inklusionsmembran reduziert wird und die nicht-kontinuierliche Markierung der Inklusionsmembran und CIPF erklärt werden könnte (Wylie *et al.* 1997). Da in Transfektionsexperimenten die Bakterien fehlen, wäre es möglich, dass einmal in die CPn0147-Fäden eingebautes PS dort verbleibt und so eine vollkommene Kollokalisierung mit LactC2-GFP beobachtet wird.

Im Gegensatz zu den Membranmarkern LactC2 und mCherry-GPI ist Rab11 ein Marker für Recycling-Endosomen. Diese lokalisieren in den meisten Zelllinien in der Nähe des Mikrotubuli-organisierenden Zentrums (MTOC) und verbinden Endozytose und Exozytose der Zelle miteinander (van Ijzendoorn 2006). Die Rekrutierung von Recycling-Endosomen würde für Chlamydien eine Möglichkeit darstellen, z. B. Membrankomponenten der Wirtszelle umzuleiten, um sie für den Aufbau der Inklusionsmembran und der RBs zu nutzen. Die Assoziation von Rab11 mit CPn0147-Fäden in der Transfektion und CIPF ist ein Hinweis, dass CPn0147 in der Lage ist mit Recycling-Endosomen oder Strukturen, die mit Recycling-Endosomen assoziiert sind, ohne die Beteiligung anderer chlamydialer Faktoren zu interagieren. Eine mögliche Interaktion von CPn0147 und Rab11 wurde mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen untersucht, auf diese Weise jedoch nicht bestätigt (nicht gezeigt).

Bei den vorgestellten Transfektions-Experimenten war auffällig, dass die transfizierten Membranmarker (Rab5-GFP, Rab7-GFP, Rab11-GFP, LactC2-GFP und mCherry-GPI) mit dem Signal für CPn0147GFP bzw. CPn0147mCherry zum Teil oder vollkommen kollokalisieren, während durch Färbungen markierte Zellkomponenten nur teilweise mit CPn0147 kollokalisieren (Tubulin) oder mit dem Signal assoziiert waren (Vimentin und WGA) (Kapitel 4.2.4 und 4.2.7). Es ist daher möglich, dass die transfizierten Marker auf einem anderen Weg auf die CPn0147-Fäden der ektopischen Expression gelangen. Eine Hypothese hierzu wird in Kapitel 5.2.6 erläutert.

Auch wenn nicht abschließend geklärt wurde, wie es zu der Assoziation der verschiedenen Marker mit den CIPF und CPn0147-Fäden kommt, ist die eindeutige Kollokalisierung mit

verschiedenen Membranmarkern ein deutlicher Hinweis auf die membranöse Struktur der CIPF und der CPn0147-Fäden in der Transfektion.

5.2.3 CPn0147 bildet durch Interaktion mit Membranen fädige Strukturen

Da die genetische Manipulation von *C. pneumoniae* nicht möglich ist, können Proteine zur Untersuchung ihrer Funktion nicht mutiert oder deletiert werden (vgl. Kapitel 1.3.2). Um Analysen der Funktion von Inc-Proteinen zu unterstützen, werden die Proteine häufig ektopisch in Humanzellen exprimiert. Für IncA, CPn0146, CPn0147, CPn0284 und CPn0285 beispielsweise wurde eine Lokalisation im ER der Zelle beschrieben, während IncB, IncG, CT_229, CT_101 und CT_850 durch ihre Membraninteraktion Vesikel mit mehrfachen Membranen bilden, die nicht mit Markern der Wirtszelle kolokalisieren (Alzhanov *et al.* 2004; Luo *et al.* 2007b; Mital *et al.* 2013). Soweit bekannt, wurde ein Inc-Protein (CT_813) mit unbekannter Funktion identifiziert, welches bei ektopischer Expression eine entfernt ähnliche Struktur wie CPn0147 bildet. Sie wird als fibrillenartige oder verzweigte Struktur beschrieben, die dem Zytoskelett ähnlich sieht, jedoch mit keiner Komponente des Zytoskeletts der Wirtszelle assoziiert werden konnte (Chen *et al.* 2006).

Bemerkenswerterweise ist, dass die Orientierung der Fluoreszenz-Markierung für die Lokalisierung des ektopisch exprimierten CPn0147 von großer Bedeutung war (Abbildung 4.22). In früheren Arbeiten wurde CPn0147 in Transfektions-Experimenten als ER-lokalisiert beschrieben (Luo *et al.* 2007b; Herbst 2011). Dass die Orientierung der Fluoreszenz-Markierung eine Änderung der Lokalisierung ektopisch exprimierter Inc-Proteine verursachen kann, wurde in früheren Arbeiten eingehender untersucht (Kostyukova *et al.* 2005; Shkarupeta *et al.* 2008). Hierbei wurde beispielsweise für eine N-terminal-markierte Version von IncE eine diffuse Lokalisierung in der transfizierten Zelle detektiert, während eine C-terminal-markierte IncE-Version punktierte bis vesikuläre Strukturen im perinukleären Raum bilde (Kostyukova *et al.* 2005). Für CPn0147 deutete die Relevanz der Orientierung der Fluoreszenz-Markierung auf eine Bedeutung der Lipo-Domäne bei der Bildung von Fäden hin (Abbildung 4.22). Deletions-Analysen des CPn0147 in Transfektions-Experimenten zeigten jedoch, dass der N-terminale Teil des Proteins allein nicht ausreichte, um die CPn0147-Fäden zu bilden und eine Deletion der Lipo-Domäne nicht zu einem vollkommenen Verlust der Fadenbildung führte (Abbildung 4.23). Dagegen schien den Transmembrandomänen eine wichtige Rolle bei der Positionierung des Proteins zu

zukommen, da nur eine diffuse Lokalisation des CPn0147 N- bzw. des C-Terminus ohne sie detektierbar war.

Interessanterweise ist von Retikulons, evolutionär konservierten Proteinen, die die Form des kortikalen ERs regulieren, bekannt, dass sie bei Überexpression in der Transfektionssituation ähnliche Strukturen bilden, wie sie bei der ektopischen Expression von CPn0147 beobachtet wurden (persönliche Kommunikation mit Dr. Robin Klemm, Universität Zürich) (Voeltz *et al.* 2006; Hu *et al.* 2008). CPn0147 besitzt ein entfernt ähnliches hydrophobes Profil wie Retikulons, welche zwei ungewöhnlich große, hydrophobe Domänen (30-34 As) getrennt von einer Schleife hydrophiler Aminosäuren (60-70 As) aufweisen (Yang & Strittmatter 2007). Mit diesen Motiven sind die Retikulons in die Membran des ERs inseriert und durchspannen die Phospholipid-Doppelschicht vollkommen oder bilden eine Haarnadel in der zytosolischen bzw. der dem ER-Lumen zugewandenen Phospholipid-Schicht (Abbildung 5.3). CPn0147 besitzt im Vergleich nur zwei Transmembrandomänen von normaler Größe, die vermutlich die Membran des ER durchspannen (Abbildung 5.3). Neben seiner geringen Größe und der fehlenden hydrophilen Schleife, weist CPn0147 einen weiteren Unterschied zu Retikulons auf. Retikulons sind in der Lage Homo- und Heteromultimere mit anderen ER-Membranproteinen zu bilden. Bisher wurde weder in Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen, noch in Far-Westernblot-Untersuchungen oder Kopräzipitations-Versuchen eine Selbstinteraktion von CPn0147 oder eine Interaktion mit anderen Proteinen festgestellt (nicht gezeigt) (Herbst 2011). Die ersten beiden Test-Systeme könnten jedoch für die Untersuchung der CPn0147-Selbstinteraktion nicht geeignet sein, da das Protein von relativ geringer Größe (148 As) im Vergleich einen großen hydrophoben Bereich mit zwei vorhergesagten Transmembrandomänen aufweist (As 42-64 und 69-91), die für diese Analysen deletiert wurden. Es ist bekannt, dass verschiedene integrale Membranproteine über die Interaktion von Transmembrandomänen oligomerisieren oder eine Interaktion über Wechselwirkungen von Transmembrandomänen stabilisiert wird (Fink *et al.* 2011). Gegen eine Relevanz der vermeintlichen strukturellen Ähnlichkeit von CPn0147 und Retikulons für die Funktion spricht auch, dass die Transmembrandomänen des CPn0147 die IncA-ähnliche Domäne bilden und somit in allen Inc-Proteinen zu finden ist. Eine Kontroll-Transfektion zur Untersuchung der Lokalisation des CPn0146 zeigte, dass ein Inc-Protein mit ähnlicher Lage der Transmembrandomänen und vergleichbarer Größe nicht in der Lage war fadenartige Strukturen zu bilden (Abbildung 4.22). So wiesen die Ergebnisse der Transfektions-Experimente darauf hin, dass eine bisher nicht identifizierte Domäne oder Struktur des CPn0147 die Fadenbildung auslöst. Diese befindet sich vermutlich im C-terminalen Teil des

Proteins (As 91-149), da eine Deletionsvariante ohne diesen Bereich nicht in der Lage war distinkte Strukturen zu bilden (Abbildung 4.23). Die Bildung membranöser Fäden in der Transfektion bleibt unterdessen ein starker Hinweis, dass CPn0147 auch in der Infektion die Fähigkeit hat Membrantopologien zu modifizieren.

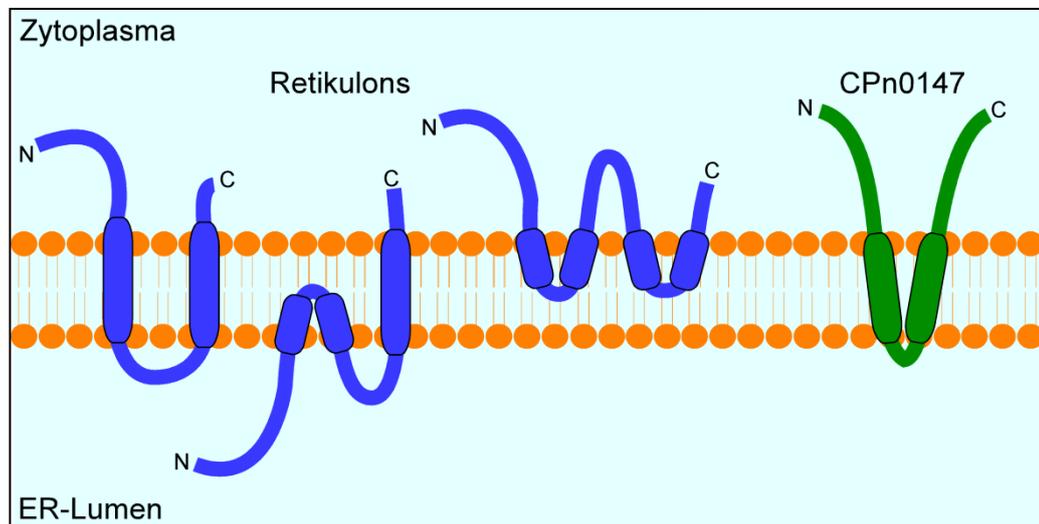


Abbildung 5.3: Orientierung von Retikulons und ektopisch exprimiertem CPn0147 in der ER-Membran

Dargestellt sind verschiedene Konformations-Möglichkeiten der Retikulons, für die experimentelle Hinweise vorhanden sind. Zum Vergleich wurde eine mögliche Insertion des CPn0147 in die ER-Membran dargestellt, wie sie für andere Inc-Proteine postuliert wird (Mital *et al.* 2013). Es ist möglich, dass CPn0147 in umgekehrter Orientierung in die ER-Membran inseriert ist. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Yang & Strittmatter 2007).

In der artifiziellen Transfektion wird CPn0147 wahrscheinlich in eine Membran inseriert und verbleibt dort. Da für CPn0147 keine eukaryotische Signalsequenz vorhergesagt ist, wird das Protein wahrscheinlich nach der Translation in die erste verfügbare Membran inseriert, welches wahrscheinlich die Membran des rauhen ER ist. Die Kolokalisierung mit dem ER-Marker Calreticulin und CPn0147 lieferte keine eindeutigen Ergebnisse (Abbildung 4.18 und Abbildung 6.4). Da jedoch vermutet wurde, dass CPn0147 ähnlich wie Retikulons die ER-Membran tubuliert, wurde untersucht, ob die CPn0147-Fäden mit dem ER-Protein STIM-1 kolokalisieren. Das stromal interaction molecule 1 (STIM-1) ist ein integrales Membranprotein, welches das gesamte ER markiert und besonders in Bereichen des tubulären, peripheren ERs angereichert ist, an denen das ER wächst. STIM-1 interagiert direkt mit dem Mikrotubuli-Plus-Ende-bindenden EB-1, wodurch das ER unabhängig von Motorproteinen über die Interaktion von STIM-1 mit EB-1 an polymerisierenden Mikrotubuli wächst (Grigoriev *et al.* 2008; Goyal & Blackstone 2013). Die CPn0147 und STIM-1 Kotransfektions-Versuche ergaben eine deutliche Assoziation der beiden Proteine, bei der

STIM-1-Signale über die ganze Länge der CPn0147-Fäden detektiert wurden (Abbildung 4.29). Dieses Ergebnis ist ein starker Hinweis, dass CPn0147 in der ektopischen Expression fädige Strukturen im ER der Humanzelle bildet, was auf eine membranmodulierende Funktion hindeutet. Ob CPn0147 ohne Partner in der Infektion z. B. die Inklusionsmembran tubulieren kann oder ob andere bakterielle Proteine beteiligt sind, muss durch eine Suche nach chlamydialen oder humanen Interaktionspartnern für CPn0147 geklärt werden.

5.2.4 Ist die Assoziation des ERs mit den CPn0147-positiven Strukturen für die Kolokalisierung mit Lipidtröpfchen verantwortlich?

In der vorliegenden Arbeit wurden Signale für mit Bodipy gefärbte Lipidtröpfchen häufig nahe an chlamydialen Inc-positive Fäden (CIPF) oder gelegentlich innerhalb der Inklusion detektiert (Abbildung 4.32 und Abbildung 4.33). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte allerdings die Färbung ringförmiger CPn0147-Signale auf Lipidtröpfchen infizierter Zellen nicht reproduziert werden (Herbst 2011). Möglicherweise beruhte dies auf Unterschieden in der Fixierungsmethode. In früheren Experimenten wurden die betrachteten Zellen mit Methanol fixiert, in der vorliegenden Arbeit jedoch mit PFA. Methanol konnte hier nicht verwendet werden, da Methanol regelmäßig zur Zerstörung der Lipidtröpfchen führte. Dies steht im Einklang mit publizierten Ergebnissen, die zeigten, dass die Behandlung von Humanzellen mit Methanol zur Fusion und Auflösung der Lipidtröpfchen und zur Ablösung der auf deren Oberfläche lokalisierten Proteine führt (persönliche Kommunikation mit Prof. Dr. Stefan Höning, Universität Köln; siehe Abbildung 5.4 A) (DiDonato & Brasaemle 2003; Ohsaki *et al.* 2005).

Von einigen integralen Membranproteinen ist bekannt, dass sie in mikroskopischen Untersuchungen ringförmige Strukturen um Lipidtröpfchen bilden, die jedoch nichts mit einer spezifischen Lokalisierung auf der Oberfläche dieser Organellen zu tun haben (Soni *et al.* 2009; Walther & Farese 2012). So haben die Bedingungen, unter denen Lipidtröpfchen beobachtet werden, eine kritische Auswirkungen auf die Lokalisierung assoziierter Proteine. Beispielsweise wird für das Protein p58, welches normalerweise punktiert im Zytosol der Zelle lokalisiert und das ER-Golgi Zwischenkompartiment (ERGIC = engl. ER-Golgi intermediate compartment) markiert, eine ringförmige Assoziation um Lipidtröpfchen detektiert, wenn Zellen zuvor mit Ölsäure behandelt worden sind (Soni *et al.* 2009). CPn0147 wurde in mikroskopischen Untersuchungen und in biochemischen und mikroskopischen Analysen von Fraktionen infizierter Zellen auf Lipidtröpfchen detektiert (Herbst 2011). Diese

Experimente wurden in Anwesenheit von bis zu 200 mM Ölsäure durchgeführt, daher ist nicht klar, ob die Assoziation von CPn0147 mit den so generierten Lipidtröpfchen eine für die Infektion physiologische Bedeutung hat. Dass sich durch Ölsäure-Zugabe generierte Lipidtröpfchen in ihrer Zusammensetzung und Interaktion mit Humanproteinen von endogenen Lipidtröpfchen unterscheiden, wurde bereits bei der Untersuchung von Epithelzellen und Adipozyten beobachtet (Heid *et al.* 2013; Heid *et al.* 2014). Daneben wurden bei Interaktionsstudien von Oberflächenproteinen der Lipidtröpfchen und CPn0147 mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse bisher keine humaner Interaktionspartner für CPn0147 identifiziert (Herbst 2011). Hier könnten die bereits diskutierten Probleme des Systems eine Detektion von Interaktionen behindern (siehe Kapitel 5.2.2). Allerdings wäre es möglich, dass CPn0147 nicht direkt mit Lipidtröpfchen oder mit an der Rekrutierung von Lipidtröpfchen beteiligten Proteinen interagiert.

Die in Kapitel 4.2.11 vorgestellten Experimente zeigten zwar nicht die in früheren Arbeiten beobachteten Kollokalisationsmuster von CPn0147 und Lipidtröpfchen, deuteten jedoch trotzdem auf eine Interaktion der CPn0147-Fäden mit Lipidtröpfchen hin. Es wurden mehrere Beispiele gefunden, in denen das CPn0147-Signal eines CIPF mit dem Bodipy-Signal eines Lipidtröpfchen assoziiert oder sogar an den Stellen unterbrochen war, an denen Lipidtröpfchen detektiert wurden (Abbildung 4.33). In einigen Fällen wurde zudem ein schwaches CPn0147-Signal an der Position von Lipidtröpfchen detektiert, was jedoch nicht CPn0147 spezifisch ist, sondern auch bei Kontrollfärbungen mit IncA der Fall und bereits zuvor beschrieben worden war (Abbildung 4.33 und Abbildung 6.7) (Cocchiario *et al.* 2008).

In Transfektions-Experimenten wurden teilweise Signale des ER-Proteins STIM-1 mit CIPF und der Inklusionsmembran assoziiert beobachtet (Abbildung 4.30). Es wäre somit möglich, dass die CIPF mit der Membran des ER in Kontakt stehen (Abbildung 5.4 A). Die Assoziation des ERs mit CIPF konnte durch die Verwendung anderer ER-Marker wie den ER-Chaperonen Calreticulin und Calnexin nicht bestätigt werden, in zukünftigen Experimenten muss die Assoziation mit geeigneteren ER-Markern bestätigt werden (Abbildung 4.18, vgl. Kapitel 5.2.6). Allerdings sind enge Assoziation des ERs mit der Inklusionsmembran von *C. trachomatis* und *C. muridarum* bereits beschrieben worden (Derré *et al.* 2011; Elwell *et al.* 2011; Dumoux *et al.* 2012). Ein Kontakt oder eine Assoziation des ERs der humanen Wirtszelle mit der Inklusionsmembran und den CIPF brächte CPn0147 in der Infektion in direkte Nähe des Entstehungsortes von Lipidtröpfchen, was eine Kollokalisierung erklären würde. Die relativ harsche Fixierung mit Methanol könnte zu einem

Abriss der Inklusionsmembran bzw. der membranösen CIPF an Lipidtröpfchen- oder ER-Kontaktstellen geführt haben, die anschließend als Artefakte detektiert wurden (Abbildung 5.4 A PFA vs. MeOH).

Falls CPn0147 entgegen der bisherigen Vermutungen in der Lage ist *direkt* mit Lipidtröpfchen oder mit Lipidtröpfchen-assoziierten Proteinen zu interagieren, sollte diese Interaktion besonders in Transfektionsversuchen beobachtbar sein (Abbildung 5.4 B). Bei der ektopischen Expression von CPn0147 in Humanzellen wird das Protein am rauen ER translatiert und wahrscheinlich in die ER-Membran inseriert, wo es sich direkt am Entstehungsort der Lipidtröpfchen befindet (Ohsaki *et al.* 2009). Mit der hydrophoben IncA-Domäne könnte CPn0147 aus der Phospholipid-Doppelschicht des ER in die Phospholipid-Schicht des Lipidtröpfchens transportiert werden. Da Lipidtröpfchen nur eine Phospholipid-Schicht aufweisen, ist jedoch unklar, ob CPn0147 auf diese Weise inseriert wird. Möglicherweise ist die Lipo-Domäne im N-Terminus des CPn0147 an einer Interaktion beteiligt (Abbildung 5.4 unten). Um diese hypothetische Interaktion zu überprüfen, wurden Lipidtröpfchen in Zellen, die CPn0147 ektopisch exprimierten, gefärbt. Eine Kollokalisierung des CPn0147 mit Lipidtröpfchen wurde nicht beobachtet (Abbildung 4.34). Allerdings wurden gelegentlich Lipidtröpfchen beobachtet, die an CPn0147-Fäden assoziiert oder sogar in diese „eingewickelt“ waren. Auch mikroskopische Lebendzell-Untersuchungen von Zellen, die CPn0147 exprimierten und mit Bodipy gefärbt worden waren, zeigten keine signifikante Interaktion der beiden Strukturen (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass CPn0147 entweder nicht direkt mit Lipidtröpfchen interagiert oder zu 100 % in einer Orientierung in das ER der transfizierten Zelle eingebaut wird, die eine Interaktion des Proteins mit den Lipidtröpfchen unmöglich macht.

Eine Interaktion des ER mit der Inklusionsmembran und/ oder CIPF und eine Beteiligung des ER an der Bildung von CIPF scheint wahrscheinlich, da Bereiche der Kollokalisierung von CIPF und Lipidtröpfchen Änderungen der Fadenmorphologie aufweisen. Es bleibt unklar, ob CPn0147 selbstständig mit Lipidtröpfchen interagiert, durch die Interaktion der CIPF mit dem ER oder durch aktive Insertion auf die Oberfläche von Lipidtröpfchen gelangte.

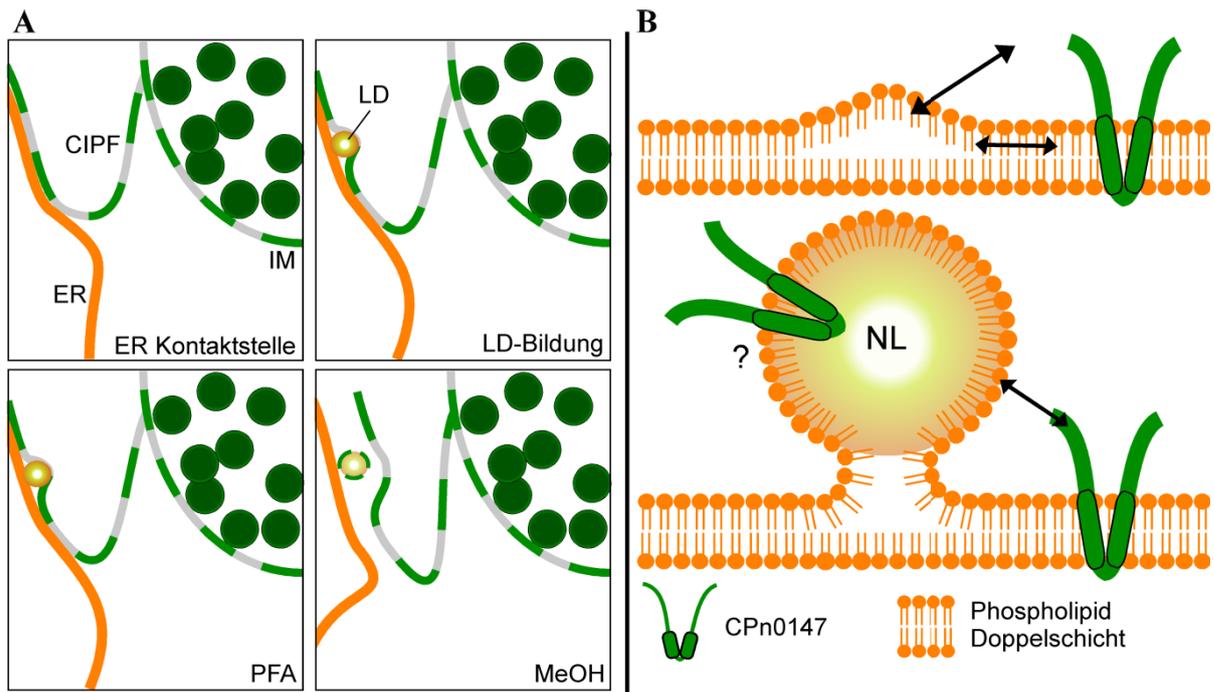


Abbildung 5.4: Postulierte Interaktion von CIPF und CPn0147 mit Lipidtröpfchen

A: Ein Modell der möglichen Kontaktstelle eines chlamydialen Inc-positive Fadens (CIPF) mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) ist dargestellt. Der membranöse CIPF ist Bestandteil der Inklusionsmembran (IM). CIPF stehen in Kontakt mit Domänen des ER, an denen Lipidtröpfchen (LD) gebildet werden. Chlamydiale Proteine, die auf den CIPF lokalisieren, sind hier in der Lage mit den Lipidtröpfchen zu interagieren. Bei der Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA) wird die Situation erhalten und einige der auf dem CIPF präsentierten Antigene sind durch den engen Kontakt zu ER und Lipidtröpfchen nicht zugänglich. In der Methanol-fixierten Situation (MeOH) werden Proteine präzipitiert und durch Dehydrierung Membranen auseinander gerissen. Fragmente und Proteine der Inklusionsmembran und die ER-Kontaktstelle werden abgerissen, sodass die Position verschiedener Antigene verändert erscheint.

B: Die mögliche Interaktion des ektopisch exprimierten CPn0147 in der Membran des ER und daran entstehender Lipidtröpfchen. CPn0147 ist mit der Inc-typischen hydrophoben Haarnadel direkt in die Phospholipid-Doppelschicht des ERs inseriert. Zwischen den beiden Phospholipid-Schichten des ERs werden Neutrallipide (NL) eingelagert und bilden so Lipidtröpfchen. Interagiert CPn0147 direkt mit Lipidtröpfchen, käme das ektopisch exprimierte CPn0147 hier in räumliche Nähe des Lipidtröpfchen-Bildungsortes und würde inseriert. Hierbei interagiert entweder die Lipo-Domäne des CPn0147 mit dem Lipidtröpfchen oder die Transmembrandomänen wechselwirken mit dem lipophilen Kern der Lipidtröpfchen. Daneben wäre es möglich, dass CPn0147 bei der ektopischen Expression in der dem Lumen des ER zugewandten Phospholipid-Schicht inseriert ist und daher nicht mit Lipidtröpfchen interagieren kann (nicht dargestellt).

5.2.5 Das Zytoskelett und die Verfügbarkeit von Membranmaterial haben Bedeutung bei der Entstehung von CIPF

Bei Betrachtungen verschiedener Zytoskelett-Komponenten wurde keine Kollokalisierung von CIPF mit Mikrotubuli, Aktin und Vimentin beobachtet. Es wurden nur gelegentlich Bereiche gefunden, in denen sich Signale für die Zytoskelett-Komponenten mit den CIPF überschneiden (Abbildung 4.21). Das Zytoskelett der Humanzelle spielt zu verschiedenen Zeitpunkten der Chlamydien-Infektion eine wichtige Rolle. Aktin wird für die erfolgreiche Internalisierung benötigt (Carabeo *et al.* 2002; Clifton *et al.* 2004; Jewett *et al.* 2006; Carabeo *et al.* 2007; Jewett *et al.* 2010). Mikrotubuli sind für die Positionierung der Inklusion innerhalb der Wirtszelle essenziell (Clausen *et al.* 1997; Grieshaber *et al.* 2003). In der voranschreitenden Infektion stabilisiert ein Käfig aus Aktin- und Intermediärfilamenten die wachsende Inklusion und detryponisierte, stabile Mikrotubuli (dtMT) verankern Golgi-Ministapel an der Inklusionsmembran (Kumar & Valdivia 2008; Al-Zeer *et al.* 2014).

Da auch bei der Bildung von CIPF eine Beteiligung der verschiedenen Zytoskelett-Komponenten möglich erschien, wurden bei der mikroskopischen Untersuchung von CPn0147-Fäden bei ektopischer Expression ebenfalls die verschiedenen Zytoskelett-Komponenten betrachtet (Abbildung 4.24 und Abbildung 4.26). Auch hier trat keine eindeutige Kollokalisierung auf, jedoch eine interessante Assoziation von CPn0147-Fäden mit Vimentin (Abbildung 4.26). Die ektopische Expression des CPn0147 bewirkte, dass die zuvor beobachtete, netzartige Vimentin-Lokalisierung in HEP-2-Zellen einer mehr oder weniger klumpigen Akkumulation des Vimentin-Signals wich. Interessant war, dass das Vimentin- und CPn0147-Signal sich dabei kaum überschneiden. Die Lokalisierung keiner anderen untersuchten Zellkomponente wurde so deutlich durch die Expression von CPn0147 in Humanzellen verändert (vgl. Kapitel 4.2.7.2). Da Vimentin und CPn0147 nicht in direktem Kontakt miteinander stehen, wurde die Änderung der Vimentin-Lokalisation vermutlich durch die Interaktion von CPn0147 mit einem anderen Organell oder Protein der Zelle bewirkt. Vimentin ist eine Komponente des Intermediärfilament-Zytoskeletts der Zelle, welches viele Funktionen in der eukaryotischen Zelle hat. Es ist vor allem für die Formgebung und mechanische Festigkeit von Zellen verantwortlich, daneben aber auch für die Positionierung von Zellorganellen innerhalb der Zelle (Gruenbaum & Aebi 2014; Huber *et al.* 2014). Die Komplexität der Interaktion von Vimentin mit anderen Zytoskelett-Komponenten und Organellen der Zelle ist allerdings noch nicht vollkommen verstanden. Klar ist, dass Aufbau und Organisation des Vimentin-Netzwerkes stark von Mikrotubuli und deren assoziierten Motorproteinen abhängig sind (Huber *et al.* 2014).

Speziell in Adipozyten (Zellen des Fettgewebes), aber auch in Zellen epithelialen Ursprungs, wird interessanterweise eine Assoziation von Lipidtröpfchen mit Vimentin beobachtet (Heid *et al.* 2013; Heid *et al.* 2014). Zudem sind Intermediärfilamente mit dem Golgi-Apparat assoziiert und es wurde das Golgi-Protein Formiminotransferase-Zyklodeaminase (FTCD = engl. *formiminotransferase cyclodeaminase*) identifiziert, welches Untereinheiten der Intermediärfilamente bindet und polymerisiert (Gao & Sztul 2001). Diese Interaktion des Golgi-Apparates stellt ebenfalls eine interessante indirekte Verbindung von CPn0147 mit dem Intermediärfilament-Zytoskelett dar. Vor allem weil mikroskopische eine Assoziationen von CIPF und von CPn0147-Fäden der Transfektion mit Vesikeln beobachtet wurden, die exozytotischen Ursprungs sein und somit vom Golgi-Apparat der Zelle stammen könnten (Kapitel 5.2.6). Bei Untersuchungen einer möglichen Kolo-kalisation von Vimentin und CIPF in der *C. pneumoniae*-Infektion wurde lediglich in einigen Fällen die bereits beschriebene Akkumulation des Vimentin um die Inklusion beobachtet (Kumar & Valdivia 2008). Eine Kolo-kalisation der CIPF mit Vimentin, die mit dem Phänotyp der Transfektion vergleichbar wäre, wurde nicht beobachtet (vgl. Abbildung 4.21).

Eine Assoziation von Mikrotubuli mit CIPF wurde mikroskopische weder bestätigt noch ausgeschlossen. Deshalb wurden die Mikrotubuli von mit *C. pneumoniae* infizierten Humanzellen durch Nocodazol-Zugabe an der Polymerisierung gehindert (siehe Kapitel 4.2.13). Durch Nocodazol-Behandlung über einen längeren Zeitraum wurde die Bildung von CIPF drastisch reduziert. Auch die zusätzliche Inkubation mit Ölsäure, die bekannterweise die Anzahl der CIPF je Inklusion stark erhöht, führte unter Nocodazol-Einwirkung nicht zu einer deutlichen Erhöhung der CIPF-Zahl (vgl. Kapitel 4.2.13) (Herbst 2011). Die CIPF werden demnach nur in Anwesenheit eines funktionsfähigen Mikrotubuli-Zytoskelett aufgebaut. Dies kann mit verschiedenen anderen Interaktionen der Fäden mit Zellorganellen der Humanzelle zusammenhängen und muss nicht zwangsläufig eine direkte Interaktion der Mikrotubuli mit CIPF bedeuten. Beispielsweise ist bekannt, dass das periphere ER der Zelle von der Stabilisierung durch Mikrotubuli abhängig ist. So verschmelzen die ER-Tubuli des peripheren ER bei Nocodazol-Einwirkung für längere Zeit (≥ 2 h) zu Zisternen, der flachen, sackartigen Erscheinungsform des ERs und ziehen sich in Richtung Zellkern zurück (Terasaki *et al.* 1986). Dieser Vorgang ist reversibel: wird das Nocodazol ausgewaschen, werden sehr schnell (nach ca. 4 min) wieder tubuläre Strukturen in der Peripherie des ER beobachtet (Lee *et al.* 1989). Des Weiteren ist bekannt, dass der Golgi-Apparat zu Golgi-Ministapeln fragmentiert, wenn das Mikrotubuli-Zytoskelett durch Nocodazol an der Polymerisation gehindert wird (Cole *et al.* 1996).

Zukünftig wäre es interessant zu betrachten, inwiefern die Dynamik der CIPF und der CPn0147-Fäden der Transfektion von der Destabilisierung des Mikrotubuli-Zytoskeletts beeinträchtigt wird. Dazu sind vor allem Lebendzell-Untersuchungen sinnvoll, da hier eine bessere zeitliche Auflösung erreicht wird und Artefakte durch die Fixierung vermieden werden. Die Betrachtung der CPn0147-Fäden der Transfektion ist dabei nahezu unproblematisch, da bereits vorhandene mCherry- und GFP-Konstrukte genutzt werden können. Dagegen können die CIPF der Infektion nicht so einfach in der lebenden Zelle untersucht werden, da bisher kein Marker identifiziert wurde, der die CIPF kontinuierlich markiert (siehe Kapitel 4.2.4).

Durch Behandlung von mit *C. pneumoniae* infizierten Humanzellen mit dem Antibiotikum Brefeldin A (BFA) wurde ebenfalls eine starke Reduktion der CIPF erreicht, obwohl in diesem Fall das Mikrotubuli-Zytoskelett intakt blieb (Abbildung 4.35). Die Zahl der Inklusionen ohne CIPF war in BFA- und Nocodazol-behandelten Zellen vergleichbar. BFA inhibiert den ER-Golgi- sowie den Intra-Golgi-Vesikeltransport und bewirkt den retrograden Transport von Golgi-Markern in das ER, bis der Golgi-Apparat vollständig mit dem ER verschmolzen ist (Fujiwara *et al.* 1988; Doms *et al.* 1989; Lippincott-Schwartz *et al.* 1989). Dabei inhibiert BFA die kleine GTPase Arf1 durch Interaktion mit dessen Guanosintriphosphat-Austauschfaktoren GBF1 und BIG1/2 (Roth 1999; Bastidas *et al.* 2013). Arf1 ist maßgeblich an der Bildung von Golgi-Vesikeln beteiligt (Roth 1999). Interessanterweise nutzen Chlamydien GBF1, um Sphingomyelin für den Aufbau der Inklusionsmembran zu rekrutieren (Elwell *et al.* 2011). Somit ist die Wirkung von BFA wahrscheinlich, dass die Versorgung der Inklusion mit Membranbausteinen unterbrochen wird und damit das Material für die membranösen CIPF und die Einschlußmembran fehlt.

Wurden dem Wachstumsmedium der infizierten Humanzellen BFA und Ölsäure zugegeben, so zeigten die Inklusionen interessanterweise deutlich mehr CIPF als Zellen, die nur mit BFA behandelt worden waren. Das Herauswaschen des Antibiotikums führte jedoch nicht dazu, dass wieder mehr Fäden gebildet wurden. Im Gegenteil wiesen die Inklusionen von infizierten Zellen, bei denen das BFA-haltige Wachstumsmedium nach 18 h durch normales Wachstumsmedium ersetzt wurde, seltener CIPF auf (vgl. Abbildung 4.35). Möglicherweise wurden hier zwei getrennte Phänomene beobachtet, einerseits das Fehlen von Material zum Aufbau der Inklusionsmembran und damit auch der davon ausgehenden membranösen CIPF und andererseits die Zunahme von CIPF durch ER-Stress und die Akquisition von Membranmaterial aus anderen Quellen wie Lipidtröpfchen. Bei der Zugabe von Ölsäure zum

Wachstumsmedium von Humanzellen entstehen artifizielle Lipidtröpfchen mit einer Phospholipid-Doppelschicht (Heid *et al.* 2014). Es wäre möglich, dass diese als Ressource für den Aufbau membranösen CIPF dienen.

Die Bildung von Lipidtröpfchen wird häufig als Stressantwort auf eine ganze Reihe verschiedener zellulärer Stressauslöser beobachtet. So lösen Lipide in großen Mengen ER-Stress aus und die Bildung von Lipidtröpfchen wirkt diesem ER-Stress entgegen (Hapala *et al.* 2011; Zhang & Zhang 2012). Inwiefern die Zugabe von Ölsäure (eine einfach-ungesättigte Fettsäure) ER-Stress auslöst oder inhibiert, wird kontrovers diskutiert, denn meist werden ungesättigte Fettsäuren mit der Inhibition von ER-Stress in Verbindung gebracht (Wei *et al.* 2006; Ota *et al.* 2008; Hapala *et al.* 2011; Zhang & Zhang 2012). Die Assoziation mit einer möglichen Induktion oder Vermeidung von ER-Stress ist interessant, da bekannt ist, dass auch die Behandlung von Zellen mit BFA ER-Stress auslöst, da es zu einer Akkumulation von Glykoproteinen im ER kommt, wenn der ER-Golgi-Transport unterbrochen ist (Kaufman 1999; Moon *et al.* 2012). Die in Kapitel 4.2.13 gemachten Beobachtungen weisen darauf hin, dass ER-Stress sich negativ auf die Bildung von CIPF auswirkt: die Inkubation von infizierten Zellen mit BFA verminderte die Zahl der CIPF, die Zugabe von Ölsäure erhöhte die Zahl der CIPF im Vergleich zur Kontrolle stark, die Inkubation von infizierten Zellen mit BFA und Ölsäure führte zu einer mit der Kontrolle vergleichbaren Zahl von CIPF (vgl. Abbildung 4.35). Gegen diese Hypothese spricht, dass eine erhöhte MOI und die andauernde Infektion, welche vermehrten Stress in der infizierten Zelle bedeuten, zu einem Anstieg der CIPF-Zahl führt (Herbst 2011). Interessanterweise wurde gezeigt, dass sich ER-Stress auf die Morphologie des ERs auswirkt, wobei die Art des Stress einen Einfluss hat. Die Inhibition der Ca²⁺-ATPase des ER durch Thapsigargin und Zugabe der ER-Stress auslösenden, gesättigten Fettsäure Palmitat führt zu einer verstärkten Bildung von ER-Zisternen, während die Zugabe von Glukose keine Änderungen bewirkt (Wikstrom *et al.* 2013).

In zukünftigen Experimenten wäre die Analyse der Auswirkung anderer ER-Stress-Auslöser, wie Thapsigargin- oder oxydativer Stress durch H₂O₂-Zugabe, auf die Bildung von CIPF interessant. Hierdurch kann festgestellt werden, ob der induzierte ER-Stress für die Inhibition der Bildung von CIPF verantwortlich ist.

5.2.6 Die mögliche Funktion von CPn0147 in der Infektion

Die Fähigkeit des ektopisch exprimierten CPn0147 Fäden zu bilden, die den CIPF der Infektion ähneln (vgl. Kapitel 4.2.5 und 5.2.2), führte zu der Annahme, dass es in der Lage ist Membranamorphologien zu modifizieren und so die CIPF durch Tubulation der

Inklusionsmembran erzeugt. CPn0147-Homologe kommen nur in bestimmten Chlamydien-Spezies vor. So gibt es in *C. trachomatis* kein Homolog zu CPn0147, und trotzdem weist auch *C. trachomatis*, wie bereits in Kapitel 5.2.1 beschrieben, CIPF auf. Möglicherweise wird die Bildung von CIPF in *C. trachomatis* durch ein anderes Inc-Protein reguliert. Eine weitere Möglichkeit ist, dass CPn0147 nicht selbstständig in der Lage ist die Inklusionsmembran zu tubulieren und CIPF zu bilden. Experimente zur Assoziation der CPn0147-Fäden der Transfektion mit der Inklusion infizierter Zellen zeigten, dass in einigen Fällen die CPn0147-Fäden der Transfektion die Inklusion teilweise umgaben (siehe Anhang Kapitel 6). Interessant war jedoch die beobachtete Assoziation von CPn0147-Fäden der Transfektion mit IncA-positiven CIPF (Abbildung 4.31). Das seltene Auftreten von CIPF bei CPn0147-transfizierten Zellen kann ein Hinweis darauf sein, dass die CPn0147-Fäden der Transfektion durch Interaktion mit geichen Strukturen die Bildung von CIPF inhibiert. Andererseits sind die Überexpression eines Proteins und eine simultane Infektion starke Stressfaktoren für die Humanzelle, die die CIPF-Bildung inhibieren könnten.

Sollte CPn0147 für die Bildung von membranösen, fädigen Strukturen in der Infektion eine untergeordnete Rolle spielen, so sind die Assoziationen mit Membran- und Vesikel-Markern in Kotransfektions-Experimenten wichtige Hinweise auf die Funktion des CPn0147. Besonders interessant ist die Kolokalisation mit Rab11-positiven Strukturen, da sie auch mit CIPF während der Infektion kolokalisieren (siehe Kapitel 4.2.4.1 und 4.2.7.1). Die Assoziation der CPn0147-Fäden bei der ektopischen Expression mit Rab11-GFP, mCherry-GPI-Anker und LactC2-GFP lässt sich ohne weitere Experimente nicht abschließend interpretieren. LactC2-GFP und mCherry-GPI befinden sich an der Zytoplasmamembran von humanen Zellen und markieren die zytosolische Seite bzw. die äußere Seite der Membran. Die Assoziation der CPn0147-Fäden mit diesen Markern kann einerseits dadurch erklärt werden, dass Endozytosevesikel der Zytoplasmamembran mit den fädigen Strukturen verschmelzen. Andererseits ist es möglich, dass die Markerproteine nachdem sie am rauen ER translatiert und am Golgi-Apparat in Vesikel verpackt worden sind, via exozytotischem Transportweg direkt zu den CPn0147-Fäden rekrutiert werden. Die massive Kolokalisation von Rab11-positiven Vesikeln mit CPn0147-Fäden lässt zudem vermuten, dass diese Strukturen auch mit dem endozytotischen Recycling-Transportweg assoziiert sind. Die Kolokalisation von Markern für frühe und späte endozytotische Vesikel Rab5 und Rab7 konnten nicht klären, ob die membranösen Fäden endozytotisches oder exozytotisches Material rekrutieren. Sie waren nicht mit CIPF assoziiert und veränderten die Lokalisation von CPn0147-Fäden der Transfektion stark (vgl. Abbildung 4.24). WGA-markierte Vesikel

waren indes nur mit den Fäden assoziiert. Eine Verschmelzung wurde nicht beobachtet, was zeigte, dass in die CPn0147-Fäden keine Glykoproteine der Zytoplasmamembran eingebaut wurden (vgl. Abbildung 4.27). Orientierende Versuche mit fluoreszenzmarkiertem EGF zeigten mit der WGA-Färbung vergleichbare Assoziationen EGF-positiver Vesikel mit CPn0147-Fäden der Transfektion (nicht gezeigt). Fluoreszenzmarkierter Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF = engl. *epidermal growth factor*) bindet an den EGF-Rezeptor, der durch dieses Signal internalisiert wird und somit frühe endozytotische Vesikel markiert (Sorkin 2001). Es scheint also wahrscheinlicher, dass LactC2-GFP und mCherry-GPI aus dem exozytotischen Transportweg rekrutiert werden und nicht direkt von der Membran stammen. In Folgeversuchen muss untersucht werden, ob die Markierung der CPn0147-Fäden der Transfektion mit Plasmamembran-Markern durch Inhibierung der Exozytose (z. B. durch BFA) verringert oder sogar verhindert wird.

In der Infektion interagiert *C. trachomatis* ebenfalls mit dem exozytotischen Transport, um beispielsweise Sphingomyelin für den Aufbau der Inklusionsmembran zu rekrutieren (Hackstadt *et al.* 1995; Hackstadt *et al.* 1996; Elwell *et al.* 2011). Es ist möglich, dass CIPF in der Infektion ebenfalls mit dem exozytotischen Transportweg interagiert, um Vesikel und Membranbestandteile zu rekrutieren. Ob eine direkte Interaktion von CPn0147 mit Endosomen des Recycling-Transportweges möglich ist, ist nicht klar. In der *C. pneumoniae*-Infektion wird Rab11 zur Inklusion rekrutiert und markiert die Inklusionsmembran während des gesamten Infektionszyklus (Rzomp *et al.* 2006). Allerdings wurde für *C. pneumoniae* ein Inc-Protein identifiziert, das neben weiteren Rab-Proteinen mit Rab11 interagiert (vgl. Kapitel 1.5.1.3) (Cortes *et al.* 2007). Zudem wurde eine direkte Interaktion von CPn0147 und Rab11 in Hefe-zwei-Hybrid-Analysen nicht bestätigt (nicht gezeigt).

Die Inklusionsmembran bildet mit ihren Inc-Proteinen für die Chlamydien eine Interaktionsplattform für Zellorganellen und Transportvesikel der Wirtszelle. Die Vergrößerung dieser Oberfläche durch CIPF ist eine mögliche Strategie auch in entfernten Bereichen der infizierten Zelle effizient mit Organellen zu wechselwirken. Ein Hinweis darauf, dass CIPF an der effizienten Akquirierung von Nährstoffen beteiligt sind, ist die Erhöhung der CIPF-Zahl durch Verringerung des Nährstoffangebots durch Verzicht auf Cycloheximid im Zellkulturmedium (Herbst 2011). Zukünftig muss daher untersucht werden, ob die Anzahl der CIPF durch die Verfügbarkeit aller Nährstoffe, oder nur bestimmter Nährstoffe wie z. B. Lipide beeinflusst wird.

CPn0147-positive Strukturen interagierten in der Infektion wie auch in der Transfektion mit Komponenten des Endosomen-Recyclingweges und mit dem ER der humanen Zelle. So erinnert die Assoziation von WGA-positiven Vesikeln mit CPn0147-Fäden der Transfektion stark an die Assoziation von Endozytosevesikeln mit dem ER während der Endozytose (Friedman *et al.* 2013). Auch Lipidtröpfchen werden vom ER gebildet und verbleiben mit dem ER in engem Kontakt (Kassan *et al.* 2013). Des Weiteren wurde in Transfektionsversuchen die Assoziation von STIM-1 mit den Enden fädiger CPn0147-Strukturen beobachtet (Abbildung 4.29). In der Infektion waren die CIPF zwar mit einigen STIM-1-Signalen assoziiert, es ist jedoch nicht klar, ob die CIPF mit dem ER interagierten oder an das ER banden (vgl. Abbildung 5.5). Um zu untersuchen, ob und wie CIPF und ER interagieren, müssen weitere ER-Marker und Zellen verwendet werden, mit deren Hilfe sich das ER besser abgrenzen lässt. Hier bieten sich Cos-7-Zellen (ATCC®CRL-1651™) und gut etablierte ER-Marker wie Sec61 β - oder KDEL-Fusionsproteine an, die häufig in Untersuchungen zum ER genutzt werden (persönliche Kommunikation mit Dr. Robin Klemm, Universität Zürich) (Friedman *et al.* 2013). Kontaktstellen der Inklusionsmembran mit dem rauhen und glatten ER der Wirtszelle, unterhalb derer RBs detektiert werden, sind lange bekannt (Peterson & de la Maza 1988). Diese Beobachtung erlangte vor kurzem neue Relevanz, als Hayward und Kollegen feststellten, dass RBs unterhalb solcher Kontaktstellen möglicherweise in der Lage sind mittels Typ-3-Sekretionssystem direkten Kontakt zur Membran des ERs herzustellen (Dumoux *et al.* 2012). An diesen Inklusionsmembran-ER-Kontaktstellen (IEK) könnten chlamydiale Proteine mit der Membran des ER wechselwirken oder sogar in diese inseriert werden, um einerseits den IEK-Kontakt zu verstärken und andererseits direkt Nährstoffe wie Proteine und Lipide umzuleiten (vgl. Kapitel 1.5.1 und Abbildung 5.5). Es ist möglich, dass an dieser Stelle CPn0147 eine entscheidende Rolle spielt. Wenn ER-Tubuli vermittelt durch STIM-1 an oder in der Nähe dieser IEKs wachsen, könnten tubulierte Bereiche der Inklusionsmembran mit dem ER wachsen, die anschließend als CIPF beobachtet werden. ER-Stress führt zur Bildung von Zisternen im peripheren ER (Schuck *et al.* 2009). In dieser Situation würden keine peripheren ER-Tubuli mehr gebildet werden und CIPF könnten nicht an ihnen elongieren, wodurch eine verringerte Anzahl CIPF beobachtet werden würde.

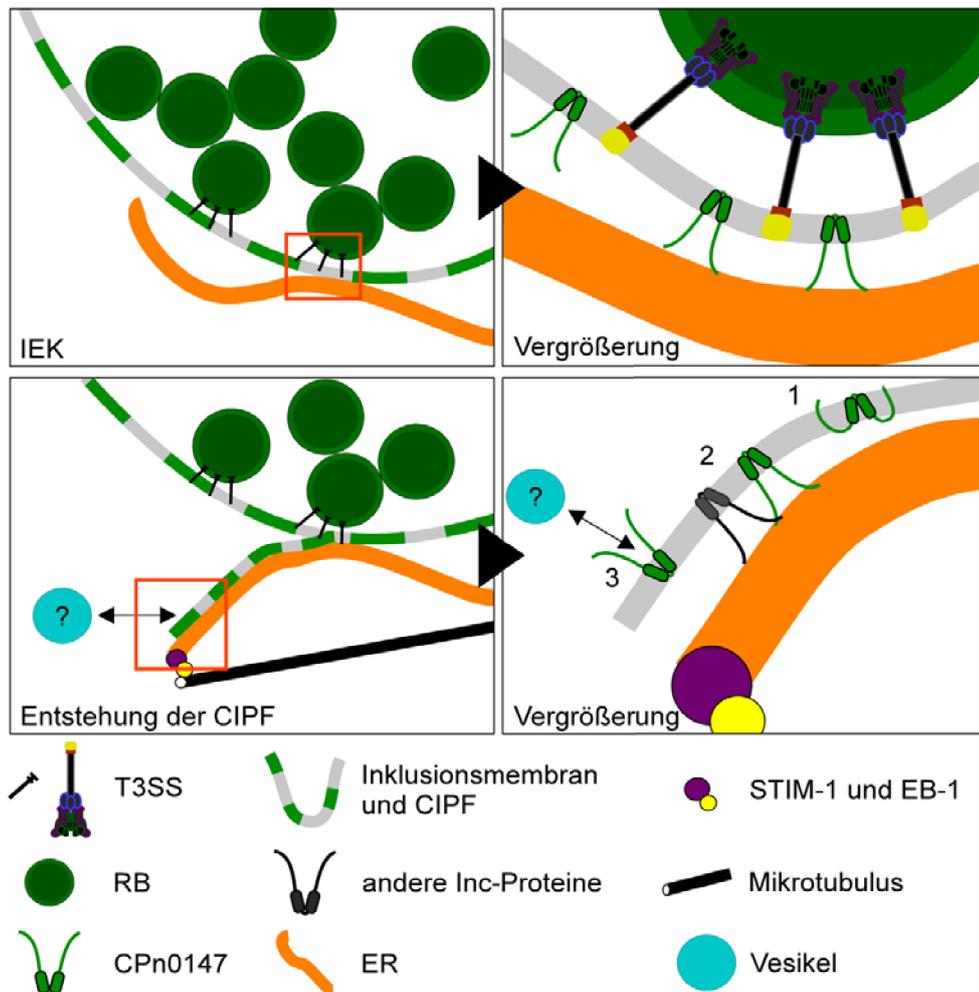


Abbildung 5.5: Modell der Entstehung der CIPF unter Beteiligung von CPn0147

Während des Infektionszyklus hat die chlamydiale Inklusion Kontakt zum Endoplasmatischen Retikulum (ER). Hier dargestellt wurde eine der Kontaktstellen der Inklusionsmembran zu einem Bereich des tubulären ERs (IEK = Inklusionsmembran-ER-Kontaktstellen). An IEK befinden sich Retikularkörperchen (RBs), deren Typ-III-Sekretionssysteme (T3SS) unterhalb der IEK verankert sind (Vergrößerung oben). In der Inklusionsmembran ist CPn0147 (und andere Inc-Proteine, nicht gezeigt) inseriert, an IEK befindet es sich in unmittelbarer Nähe zum ER. Das tubuläre ER wächst durch die Interaktion von STIM-1 und dem Mikrotubuli-Plus-Ende-bindenden EB-1. Das an der IEK befindliche CPn0147 wäre an dieser Stelle in der Lage durch seine membranmodulierende Funktion CIPF von der Inklusionsmembran zu tubulieren (1). Durch Interaktion von CPn0147 und/oder anderen Inc-Proteine mit dem wachsenden ER-Tubulus könnten die CIPF elongieren (2). Durch die Interaktion mit endo- oder exozytotischen Vesikeln, könnte CPn0147 Membranmaterial für die wachsenden CIPF und die Inklusionsmembran rekrutieren (3).

Zusammengefasst deuten die präsentierten experimentellen Daten auf eine direkte oder indirekte Rolle des CPn0147 bei der Entstehung von CIPF hin und assoziieren das Protein mit der Rekrutierung von Vesikeln des exozytotischen Transportwegs und des Recycling-Weges der Zelle. Ob CPn0147 direkt oder indirekt über eine Interaktion mit dem ER der Wirtszelle in Verbindung mit diesen Organellen steht, muss durch die vorgeschlagenen Folge-Experimenten untersucht werden.

6 Anhang

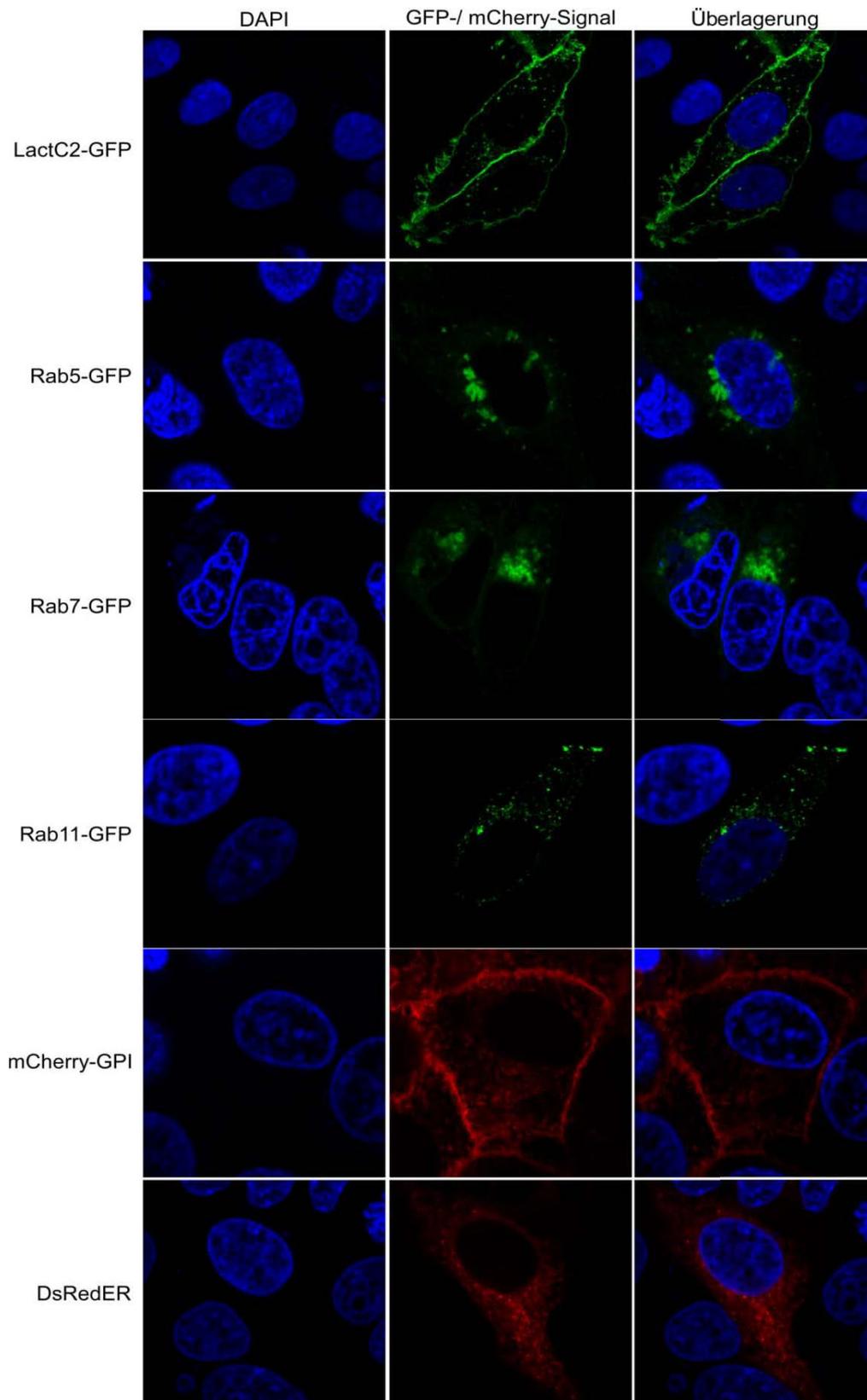


Abbildung 6.1: Kontrollen verschiedener Transfektionskonstrukte in HEp-2-Zellen

Nicht infizierte HEp-2-Zellen wurden zur Kontrolle mit verschiedenen Transfektionskonstrukten transfiziert. Die Zellen wurden 18 h nach Transfektionsbeginn mit 37 °C warmem, 3 %igem PFA für 10 min fixiert. Die DNS wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Nikon C2 Mikroskop generiert.

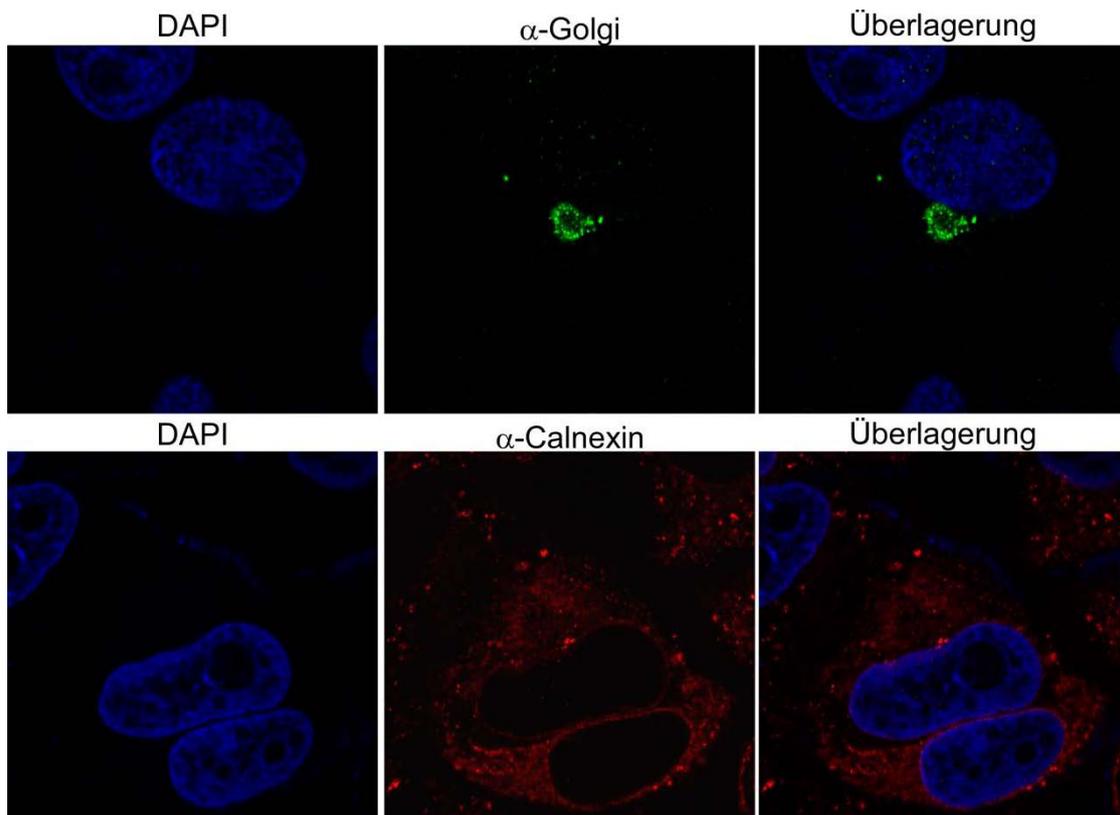


Abbildung 6.2: Kontrollfärbungen von Zellorganellen der verwendeten HEp-2-Zellen

Nicht infizierte, nicht transfizierte HEp-2-Zellen wurden mit 37 °C warmem, 3 %igem PFA für 10 min fixiert. Die Zellen wurden für die Antikörperfärbung mit 2 % Saponin permeabilisiert. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit einem anti-Golgi-Antikörper und einem sekundären Alexa-488-konjugierten Antikörper (grün) oder mit einem anti-Calnexin-Antikörper und einem sekundären Alexa-594-konjugierten Antikörper (rot) gefärbt. Die DNS wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Nikon C2 Mikroskop generiert.

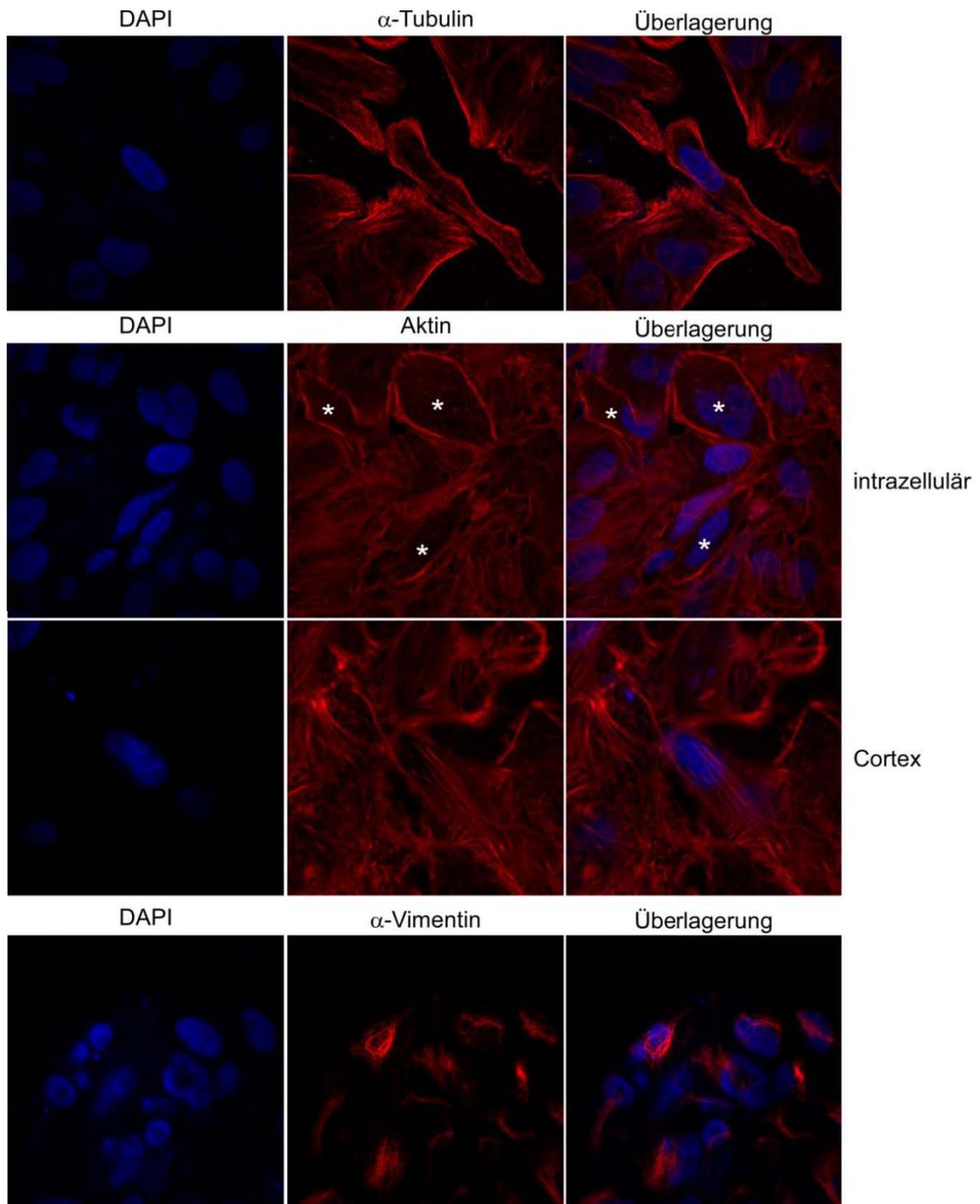


Abbildung 6.3: Kontrollfärbungen des Zytoskeletts der verwendeten HEP-2-Zellen

Nicht infizierte, nicht transfizierte Zellen wurden mit 37 °C warmem, 3 %igem PFA 10 min lang fixiert. Zur Färbung verschiedener Zytoskelettkomponenten wurden die Zellen mit Saponin permeabilisiert. Die Zellen wurden mit einem anti- α -Tubulin-Antikörper und einem sekundären Alexa-594-konjugierten Antikörper (rot) oder einem Cy3-konjugierten Vimentin-Antikörper (rot) gefärbt. F-Aktin wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-Phalloidin (rot) gefärbt. Für die Aktinfärbung wurden Zellen aufgenommen, auf deren Zellkernmitte (intrazellulär), sie sind mit weißen Sternen (*) markiert, und auf deren Zellcortex (Cortex) fokussiert wurde. Im Zellcortex ist das Aktinzytoskelett in den verwendeten HEP-2-Zellen sehr gut zu detektieren, in der Zellmitte dagegen nicht. Die DNS wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Alle Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Nikon C2 Mikroskop generiert.

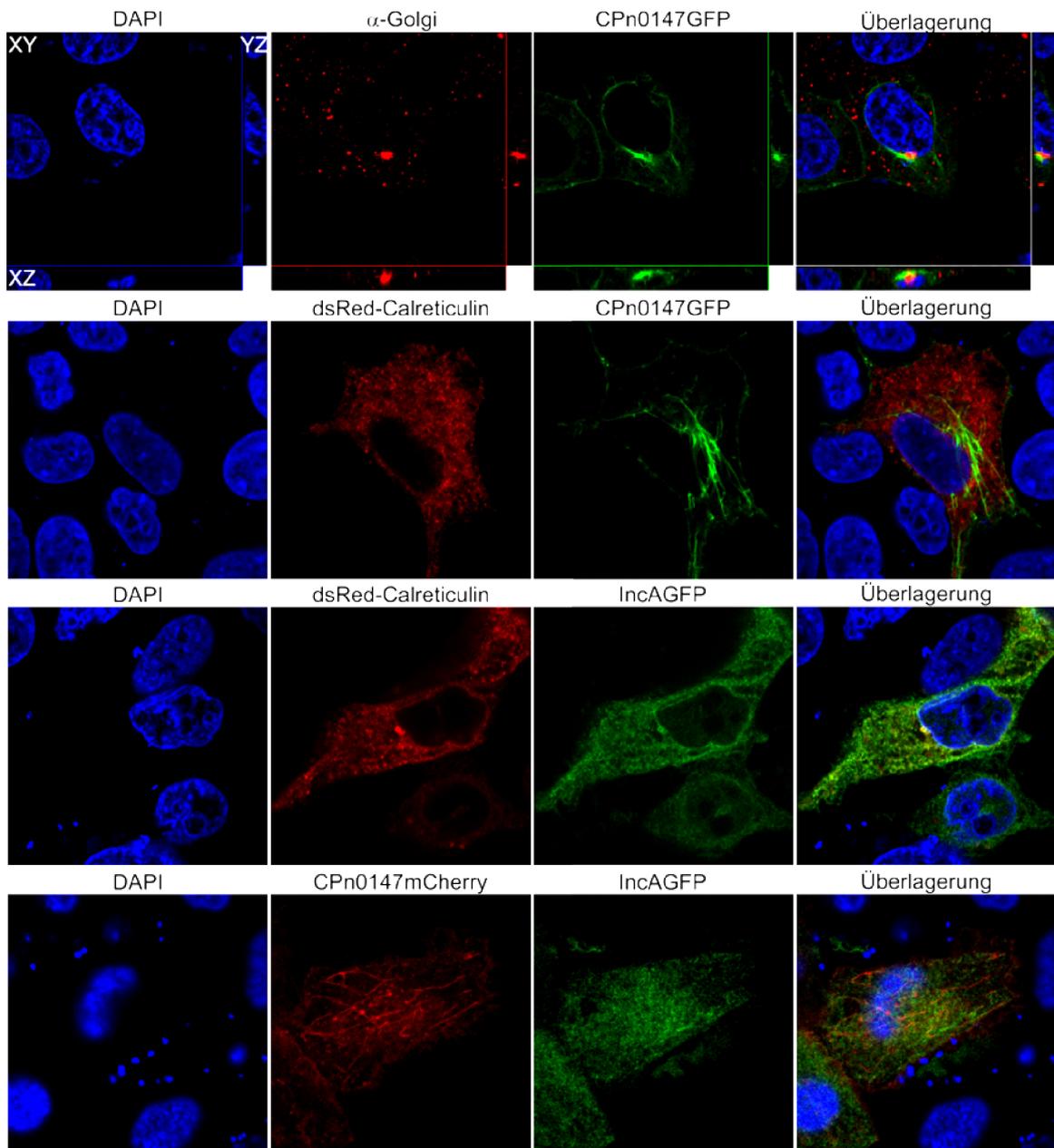


Abbildung 6.4: Kofärbung und verschiedene Kotransfektionen in HEp-2-Zellen.

Nicht infizierte HEp-2-Zellen wurden zur Kontrolle mit verschiedenen Konstrukten transfiziert. Nach 18 h wurden die Zellen mit 37 °C warmem, 3 %igem PFA fixiert. Für die Färbung mit einem anti-Golgi-Antikörper und einem sekundären Alexa-488-konjugierten Antikörper (grün) wurden die Zellen mit Saponin permeabilisiert. Die DNS wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Alle Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Nikon C2 Mikroskop generiert.

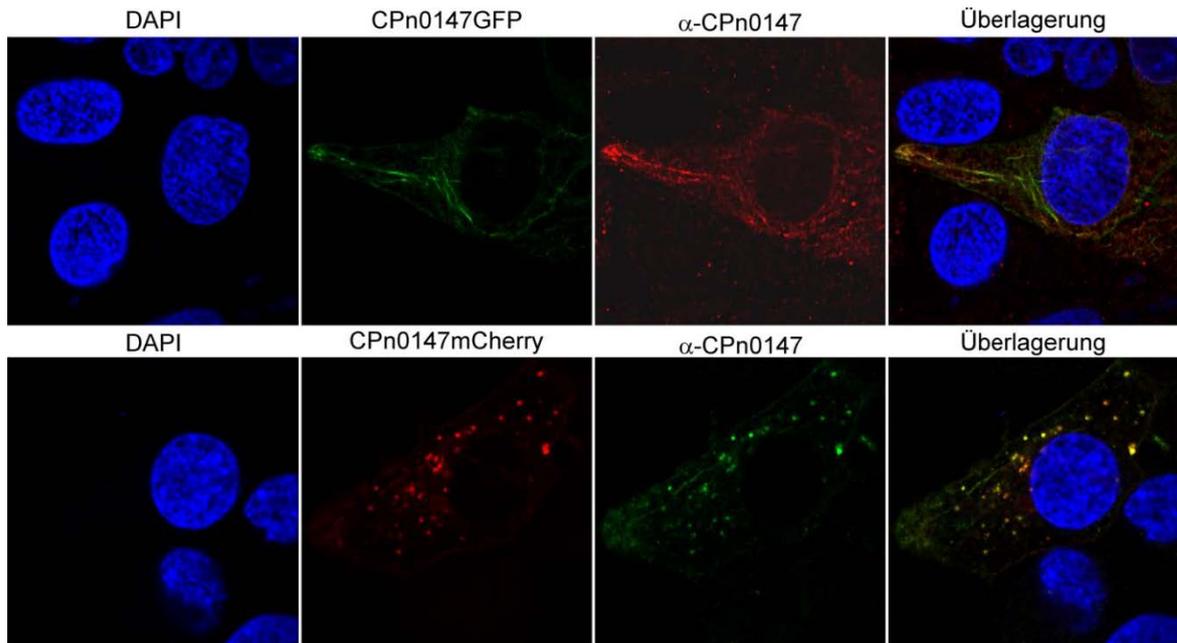


Abbildung 6.5: Färbung der CPn0147GFP- bzw. mCherry-Strukturen mit dem CPn0147-Antikörper

Hep-2-Zellen wurden mit verschiedenen Transfektionskonstrukten zur Expression von CPn0147GFP oder CPn0147mCherry transfiziert. Nach 18 h wurden die Zellen mit 37 °C warmem, 3 %-igem PFA fixiert. Für die Färbung mit dem anti-CPn0147-Antikörper und einem sekundären Alexa-488- (grün) bzw. Alexa-594-konjugierten Antikörper (rot) wurden die Zellen mit Saponin permeabilisiert. Die DNS wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Alle Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Nikon C2 Mikroskop generiert.

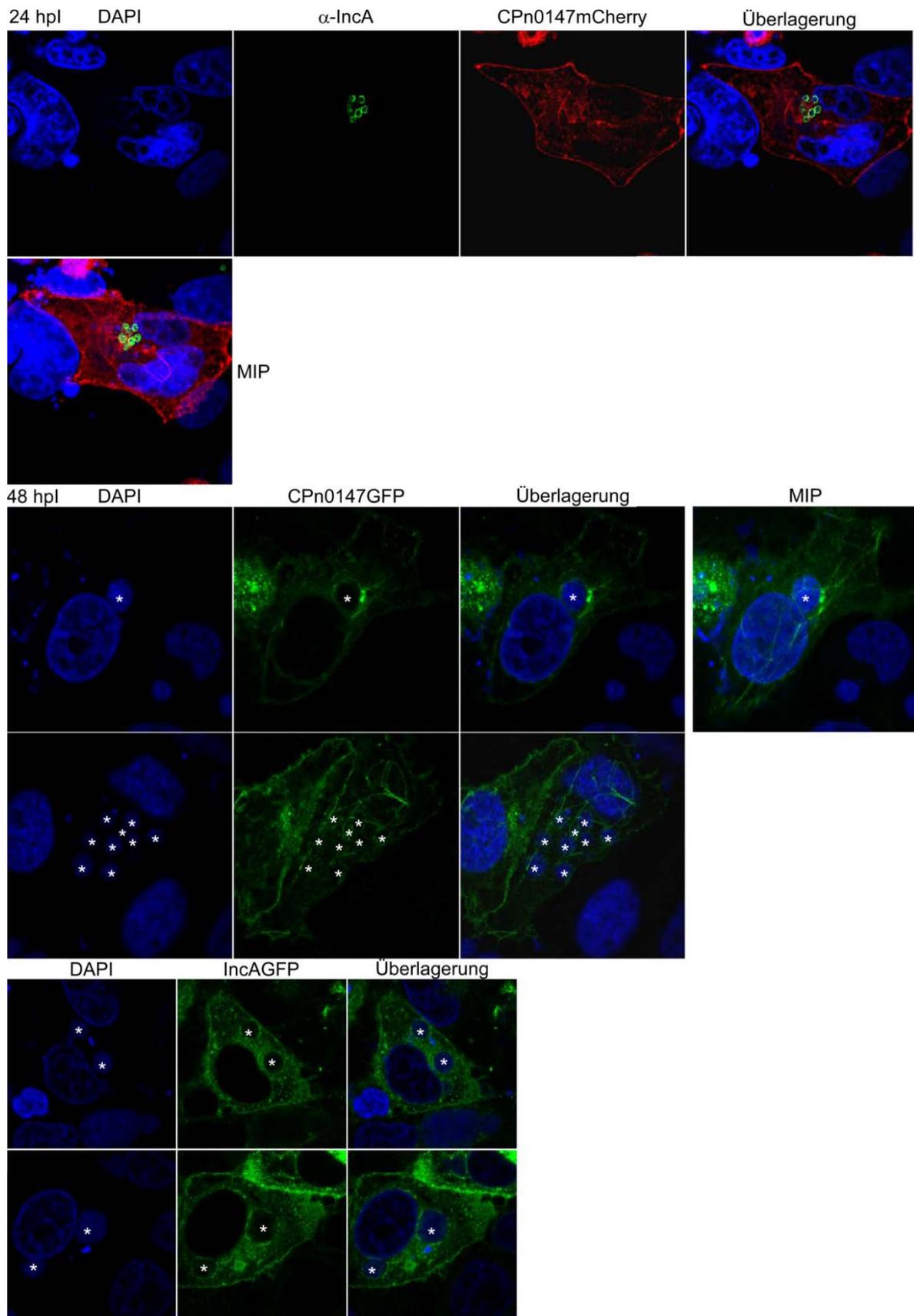


Abbildung 6.6: Infizierte HEp-2-Zellen mit verschiedenen transfiziert mit verschiedenen Transfektionskonstrukten

Gezeigt sind verschiedene Beispiele für infizierte und ectopisch CPn0147mCherry, CPn0147GFP oder IncAGFP exprimierende HEp-2-Zellen. Die Zellen wurden transfiziert. Nach 18 h wurden die Zellen mit gradientengereinigten EBs (MOI=2) infiziert. Nach weiteren 24 h bzw. 48 h wurden die Zellen mit 3 % 37 °C warmen PFA fixiert. Zur Färbung mit einem anti-IncA-Antikörper und einem sekundären Alexa-488-konjugierten Antikörper wurden die Zellen mit Saponin permeabilisiert. Inklusionen, die in Beispielzellen der 48 h Infektion nicht mit einem Inklusionsmembranmarker gefärbt wurden, sind mit einem weißen Stern (*) markiert worden. Die DNS wurde mit DAPI (blau) markiert. Alle Aufnahmen wurden mit einem konfokalen C2 Mikroskop hergestellt.

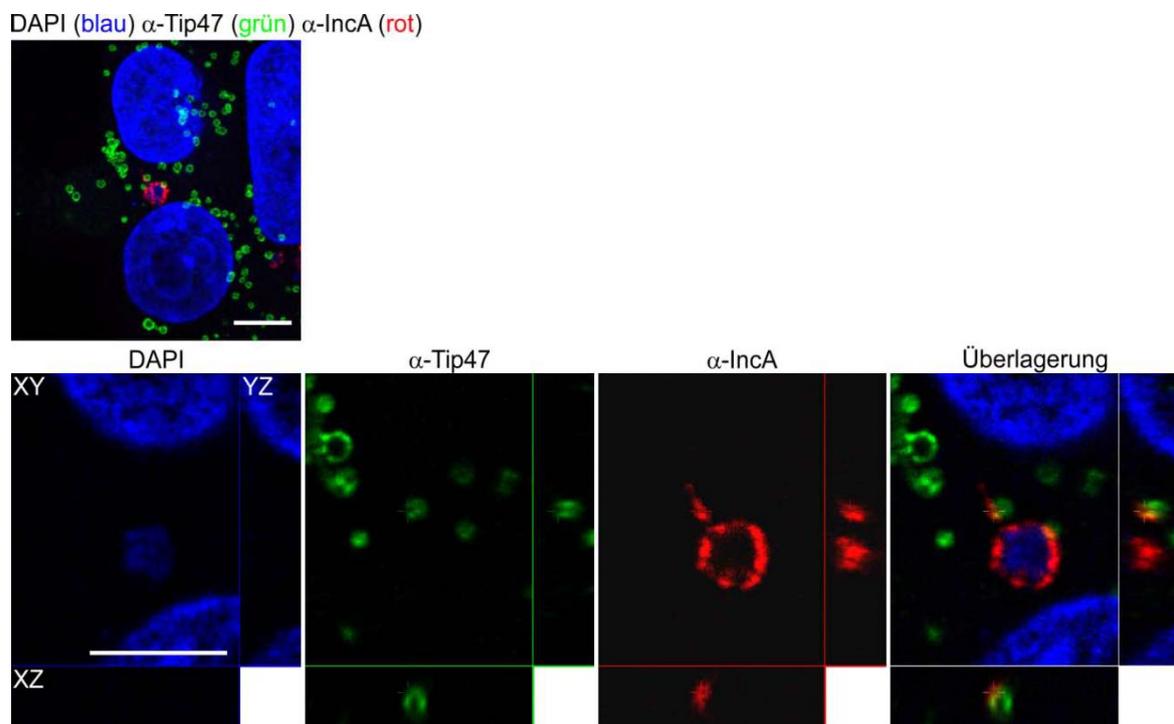


Abbildung 6.7: Kofärbung von IncA und Tip47

HEp-2-Zellen wurden mit einer Suspension gradientengereinigten EBs (MOI=1) infiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit 3 % 37 °C warmen PFA 10 min lang fixiert. Zur Färbung mit einem anti-IncA-Antikörper und einem sekundären Alexa-594-konjugierten Antikörper (rot) und einem anti-Tip47-Antikörper und einem sekundären Alexa-488-konjugierten Antikörper (grün) wurden die Zellen mit Saponin permeabilisiert. Die DNS wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen C2-Mikroskop hergestellt. Oben: MIP-Darstellung der gezeigten Zelle. Unten: vergrößerter Ausschnitt, der eine Inklusion mit IncA-positiven Fäden und assoziierten Lipidtröpfchen zeigt. Maßstabsleiste: 5 μ m

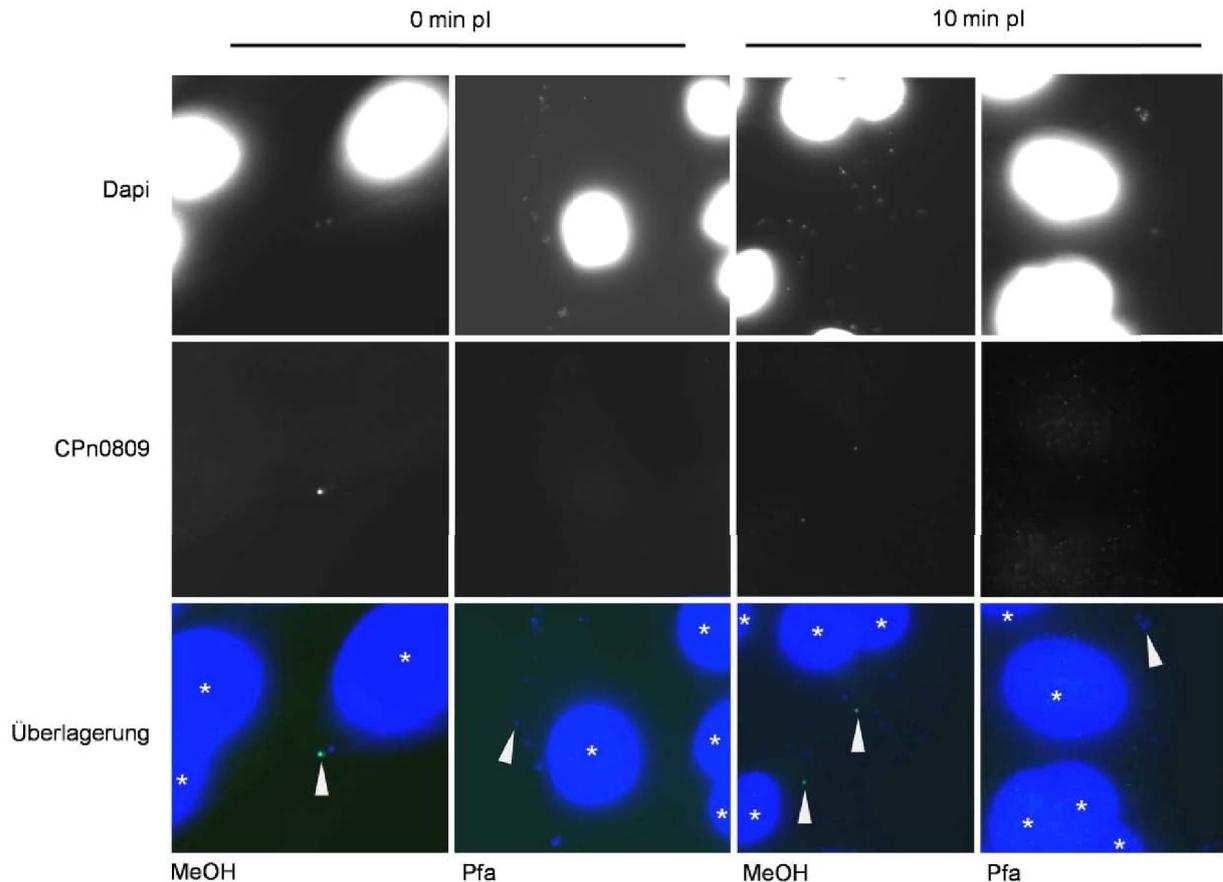


Abbildung 6.8: Färbung von CPn0809 in der frühen Infektion

HEp-2-Zellen wurden wie beschrieben mit einer MOI=1 infiziert (Kapitel 3.4.7). Anschließend wurden die Zellen zu den indizierten Zeitpunkten mit Methanol (**MeOH**) oder Paraformaldehyd (**PFA**) für 10 min bei RT fixiert. Für die Färbung mit dem anti-CPn0809-Antikörper und einem sekundären Alexa-488-konjugierten Antikörper (grün) wurden keine zusätzlichen Permeabilisierungsschritte durchgeführt. Die DNA des Zellkerns und der Chlamydien wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Die Zellkerne wurden mit einem weißen Stern (*) markiert. In den Aufnahmen Methanol-fixierter Zellen wurden CPn0809-positive chlamydiale Partikel mit einem weißen Dreieck markiert und in PFA-fixierten Zellen wurde einer der CPn0809-negativen Partikel mit einem weißen Dreieck markiert.

Literaturverzeichnis

- Abromaitis, S. and Stephens, R. S. (2009). "Attachment and entry of Chlamydia have distinct requirements for host protein disulfide isomerase." *PLoS Pathog* **5**(4): e1000357.
- Aistleitner, K., Heinz, C., Hormann, A., Heinz, E., Montanaro, J., Schulz, F., Maier, E., Pichler, P., Benz, R. and Horn, M. (2013). "Identification and characterization of a novel porin family highlights a major difference in the outer membrane of chlamydial symbionts and pathogens." *PLoS One* **8**(1): e55010.
- Akeda, Y. and Galan, J. E. (2005). "Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion." *Nature* **437**(7060): 911-5.
- Al-Zeer, M. A., Al-Younes, H. M., Kerr, M., Abu-Lubad, M., Gonzalez, E., Brinkmann, V. and Meyer, T. F. (2014). "Chlamydia trachomatis remodels stable microtubules to coordinate Golgi stack recruitment to the chlamydial inclusion surface." *Mol Microbiol*.
- Allmond, L. R., Karaca, T. J., Nguyen, V. N., Nguyen, T., Wiener-Kronish, J. P. and Sawa, T. (2003). "Protein binding between PcrG-PcrV and PcrH-PopB/PopD encoded by the pcrGVH-popBD operon of the Pseudomonas aeruginosa type III secretion system." *Infect Immun* **71**(4): 2230-3.
- Alzhanov, D., Barnes, J., Hruby, D. E. and Rockey, D. D. (2004). "Chlamydial development is blocked in host cells transfected with Chlamydia caviae incA." *BMC Microbiol* **4**: 24.
- Archuleta, T. L., Du, Y., English, C. A., Lory, S., Lesser, C., Ohi, M. D., Ohi, R. and Spiller, B. W. (2011). "The Chlamydia effector chlamydial outer protein N (CopN) sequesters tubulin and prevents microtubule assembly." *J Biol Chem* **286**(39): 33992-8.
- Arnold, R., Brandmaier, S., Kleine, F., Tischler, P., Heinz, E., Behrens, S., Niinikoski, A., Mewes, H. W., Horn, M. and Rattei, T. (2009). "Sequence-based prediction of type III secreted proteins." *PLoS Pathog* **5**(4): e1000376.
- Balla, T. (2013). "Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation." *Physiol Rev* **93**(3): 1019-137.
- Bannantine, J. P., Griffiths, R. S., Viratyosin, W., Brown, W. J. and Rockey, D. D. (2000). "A secondary structure motif predictive of protein localization to the chlamydial inclusion membrane." *Cell Microbiol* **2**(1): 35-47.
- Bannantine, J. P., Stamm, W. E., Suchland, R. J. and Rockey, D. D. (1998). "Chlamydia trachomatis IncA is localized to the inclusion membrane and is recognized by antisera from infected humans and primates." *Infect Immun* **66**(12): 6017-21.
- Barbour, A. G., Amano, K., Hackstadt, T., Perry, L. and Caldwell, H. D. (1982). "Chlamydia trachomatis has penicillin-binding proteins but not detectable muramic acid." *J Bacteriol* **151**(1): 420-8.
- Barta, M. L., Hickey, J., Kemege, K. E., Lovell, S., Battaile, K. P. and Hefty, P. S. (2013). "Structure of CT584 from Chlamydia trachomatis refined to 3.05 Å resolution." *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **69**(Pt 11): 1196-201.
- Bastidas, R. J., Elwell, C. A., Engel, J. N. and Valdivia, R. H. (2013). "Chlamydial intracellular survival strategies." *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**(5): a010256.
- Bavoil, P., Ohlin, A. and Schachter, J. (1984). "Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in Chlamydia trachomatis." *Infect Immun* **44**(2): 479-85.
- Bavoil, P. M. and Hsia, R. C. (1998). "Type III secretion in Chlamydia: a case of déjà vu?" *Mol Microbiol* **28**(4): 860-2.
- Beatty, W. L. (2006). "Trafficking from CD63-positive late endocytic multivesicular bodies is essential for intracellular development of Chlamydia trachomatis." *J Cell Sci* **119**(Pt 2): 350-9.
- Bebear, C. and de Barbeyrac, B. (2009). "Genital Chlamydia trachomatis infections." *Clin Microbiol Infect* **15**(1): 4-10.
- Becker, E. (2013). "Charakterisierung der chlamydialen Pmp Adhäsion Familie."
- Beckman, D. S., De Puyseleyr, L., De Puyseleyr, K. and Vanrompay, D. (2014). "Chlamydial biology and its associated virulence blockers." *Crit Rev Microbiol* **40**(4): 313-28.
- Beckman, D. S. and Vanrompay, D. C. (2009). "Zoonotic Chlamydia psittaci infections from a clinical perspective." *Clin Microbiol Infect* **15**(1): 11-7.

- Beeckman, D. S. and Vanrompay, D. C. (2010). "Bacterial secretion systems with an emphasis on the chlamydial Type III secretion system." Curr Issues Mol Biol **12**(1): 17-41.
- Belland, R. J., Zhong, G., Crane, D. D., Hogan, D., Sturdevant, D., Sharma, J., Beatty, W. L. and Caldwell, H. D. (2003). "Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8478-83.
- Benitez, A. J., Thurman, K. A., Diaz, M. H., Conklin, L., Kendig, N. E. and Winchell, J. M. (2012). "Comparison of real-time PCR and a microimmunofluorescence serological assay for detection of *Chlamydia pneumoniae* infection in an outbreak investigation." J Clin Microbiol **50**(1): 151-3.
- Betts-Hampikian, H. J. and Fields, K. A. (2010). "The Chlamydial Type III Secretion Mechanism: Revealing Cracks in a Tough Nut." Front Microbiol **1**: 114.
- Bimboim, H. C. and Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Research **7**(6): 1513-1523.
- Birkelund, S., Lundemose, A. G. and Christiansen, G. (1990). "The 75-kilodalton cytoplasmic *Chlamydia trachomatis* L2 polypeptide is a DnaK-like protein." Infect Immun **58**(7): 2098-104.
- Birket, S. E., Harrington, A. T., Espina, M., Smith, N. D., Terry, C. M., Darboe, N., Markham, A. P., Middaugh, C. R., Picking, W. L. and Picking, W. D. (2007). "Preparation and characterization of translocator/chaperone complexes and their component proteins from *Shigella flexneri*." Biochemistry **46**(27): 8128-37.
- Blaylock, B., Riordan, K. E., Missiakas, D. M. and Schneewind, O. (2006). "Characterization of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion ATPase YscN and its regulator, YscL." J Bacteriol **188**(10): 3525-34.
- Blocker, A., Gounon, P., Larquet, E., Niebuhr, K., Cabiaux, V., Parsot, C. and Sansonetti, P. (1999). "The tripartite type III secretion system of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes." J Cell Biol **147**(3): 683-93.
- Bodetti, T. J., Jacobson, E., Wan, C., Hafner, L., Pospischil, A., Rose, K. and Timms, P. (2002). "Molecular evidence to support the expansion of the host range of *Chlamydia pneumoniae* to include reptiles as well as humans, horses, koalas and amphibians." Syst Appl Microbiol **25**(1): 146-52.
- Boncompain, G., Muller, C., Meas-Yedid, V., Schmitt-Kopplin, P., Lazarow, P. B. and Subtil, A. (2014). "The intracellular bacteria *Chlamydia* hijack peroxisomes and utilize their enzymatic capacity to produce bacteria-specific phospholipids." PLoS One **9**(1): e86196.
- Brown, W. J., Skeiky, Y. A., Probst, P. and Rockey, D. D. (2002). "Chlamydial antigens colocalize within IncaA-laden fibers extending from the inclusion membrane into the host cytosol." Infect Immun **70**(10): 5860-4.
- Broz, P., Mueller, C. A., Muller, S. A., Philippsen, A., Sorg, I., Engel, A. and Cornelis, G. R. (2007). "Function and molecular architecture of the *Yersinia* injectisome tip complex." Mol Microbiol **65**(5): 1311-20.
- Bulankina, A. V., Deggerich, A., Wenzel, D., Mutenda, K., Wittmann, J. G., Rudolph, M. G., Burger, K. N. J. and Honing, S. (2009). "TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets." Journal of Cell Biology **185**(4): 641-655.
- Bulir, D. C., Waltho, D. A., Stone, C. B., Mwawasi, K. A., Nelson, J. C. and Mahony, J. B. (2014). "*Chlamydia pneumoniae* CopD translocator protein plays a critical role in type III secretion (T3S) and infection." PLoS One **9**(6): e99315.
- Burillo, A. and Bouza, E. (2010). "*Chlamydia pneumoniae*." Infect Dis Clin North Am **24**(1): 61-71.
- Burkinshaw, B. J. and Strynadka, N. C. (2014). "Assembly and structure of the T3SS." Biochim Biophys Acta **1843**(8): 1649-63.
- Button, J. E. and Galan, J. E. (2011). "Regulation of chaperone/effector complex synthesis in a bacterial type III secretion system." Mol Microbiol **81**(6): 1474-83.
- Caldwell, H. D., Kromhout, J. and Schachter, J. (1981). "Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*." Infect Immun **31**(3): 1161-76.
- Carabeo, R. A., Dooley, C. A., Grieshaber, S. S. and Hackstadt, T. (2007). "Rac interacts with Abi-1 and WAVE2 to promote an Arp2/3-dependent actin recruitment during chlamydial invasion." Cell Microbiol **9**(9): 2278-88.

- Carabeo, R. A., Grieshaber, S. S., Fischer, E. and Hackstadt, T. (2002). "Chlamydia trachomatis induces remodeling of the actin cytoskeleton during attachment and entry into HeLa cells." *Infect Immun* **70**(7): 3793-803.
- Carabeo, R. A. and 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): 5899-904.
- Carabeo, R. A., Mead, D. J. and Hackstadt, T. (2003). "Golgi-dependent transport of cholesterol to the Chlamydia trachomatis inclusion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(11): 6771-6.
- Carlson, J. H., Whitmire, W. M., Crane, D. D., Wicke, L., Virtaneva, K., Sturdevant, D. E., Kupko, J. J., 3rd, Porcella, S. F., Martinez-Orengo, N., Heinzen, R. A., Kari, L. and Caldwell, H. D. (2008). "The Chlamydia trachomatis plasmid is a transcriptional regulator of chromosomal genes and a virulence factor." *Infect Immun* **76**(6): 2273-83.
- Chaturvedi, A. K., Gaydos, C. A., Agreda, P., Holden, J. P., Chatterjee, N., Goedert, J. J., Caporaso, N. E. and Engels, E. A. (2010). "Chlamydia pneumoniae infection and risk for lung cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **19**(6): 1498-505.
- Chellas-Gery, B., Wolf, K., Tisoncik, J., Hackstadt, T. and Fields, K. A. (2011). "Biochemical and Localization Analyses of Putative Type III Secretion Translocator Proteins CopB and CopB2 of Chlamydia trachomatis Reveal Significant Distinctions." *Infect Immun* **79**(8): 3036-45.
- Chen, C., Chen, D., Sharma, J., Cheng, W., Zhong, Y., Liu, K., Jensen, J., Shain, R., Arulanandam, B. and Zhong, G. (2006). "The hypothetical protein CT813 is localized in the Chlamydia trachomatis inclusion membrane and is immunogenic in women urogenitally infected with C. trachomatis." *Infect Immun* **74**(8): 4826-40.
- Chen, Y. S., Bastidas, R. J., Saka, H. A., Carpenter, V. K., Richards, K. L., Plano, G. V. and Valdivia, R. H. (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.
- Chi, E. Y., Kuo, C. C. and Grayston, J. T. (1987). "Unique ultrastructure in the elementary body of Chlamydia sp. strain TWAR." *J Bacteriol* **169**(8): 3757-63.
- Chin, E., Kirker, K., Zuck, M., James, G. and Hybiske, K. (2012). "Actin recruitment to the Chlamydia inclusion is spatiotemporally regulated by a mechanism that requires host and bacterial factors." *PLoS One* **7**(10): e46949.
- Clausen, J. D., Christiansen, G., Holst, H. U. and Birkelund, S. (1997). "Chlamydia trachomatis utilizes the host cell microtubule network during early events of infection." *Mol Microbiol* **25**(3): 441-9.
- Clifton, D. R., Fields, K. A., Grieshaber, S. S., Dooley, C. A., Fischer, E. R., Mead, D. J., Carabeo, R. A. and Hackstadt, T. (2004). "A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(27): 10166-71.
- Cocchiario, J. L., Kumar, Y., Fischer, E. R., Hackstadt, T. and Valdivia, R. H. (2008). "Cytoplasmic lipid droplets are translocated into the lumen of the Chlamydia trachomatis parasitophorous vacuole." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(27): 9379-84.
- Cole, N. B., Sciaky, N., Marotta, A., Song, J. and Lippincott-Schwartz, J. (1996). "Golgi dispersal during microtubule disruption: regeneration of Golgi stacks at peripheral endoplasmic reticulum exit sites." *Mol Biol Cell* **7**(4): 631-50.
- Collingro, A., Tischler, P., Weinmaier, T., Penz, T., Heinz, E., Brunham, R. C., Read, T. D., Bavoil, P. M., Sachse, K., Kahane, S., Friedman, M. G., Rattei, T., Myers, G. S. and Horn, M. (2011). "Unity in variety--the pan-genome of the Chlamydiae." *Mol Biol Evol* **28**(12): 3253-70.
- Coombes, B. K. and 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): 447-60.
- Cooper, C. A., Mulder, D. T., Allison, S. E., Pilar, A. V. and Coombes, B. K. (2013). "The SseC translocon component in Salmonella enterica serovar Typhimurium is chaperoned by SscA." *BMC Microbiol* **13**: 221.
- Cornelis, G. R. (2006). "The type III secretion injectisome." *Nat Rev Microbiol* **4**(11): 811-25.

- Cortes, C., Rzomp, K. A., Tvinnereim, A., Scidmore, M. A. and Wizel, B. (2007). "Chlamydia pneumoniae inclusion membrane protein Cpn0585 interacts with multiple Rab GTPases." Infect Immun **75**(12): 5586-96.
- da Cunha, M., Milho, C., Almeida, F., Pais, S. V., Borges, V., Mauricio, R., Borrego, M. J., Gomes, J. P. and Mota, L. J. (2014). "Identification of type III secretion substrates of Chlamydia trachomatis using Yersinia enterocolitica as a heterologous system." BMC Microbiol **14**: 40.
- Damiani, M. T., Gambarte Tudela, J. and Capmany, A. (2014). "Targeting eukaryotic Rab proteins: a smart strategy for chlamydial survival and replication." Cell Microbiol **16**(9): 1329-38.
- Daniell, S. J., Delahay, R. M., Shaw, R. K., Hartland, E. L., Pallen, M. J., Booy, F., Ebel, F., Knutton, S. and Frankel, G. (2001). "Coiled-coil domain of enteropathogenic Escherichia coli type III secreted protein EspD is involved in EspA filament-mediated cell attachment and hemolysis." Infect Immun **69**(6): 4055-64.
- Dasanayake, D., Richaud, M., Cyr, N., Caballero-Franco, C., Pittroff, S., Finn, R. M., Ausio, J., Luo, W., Donnenberg, M. S. and Jardim, A. (2011). "The N-terminal amphipathic region of the Escherichia coli type III secretion system protein EspD is required for membrane insertion and function." Mol Microbiol **81**(3): 734-50.
- Dean, D., Rothschild, J., Ruettger, A., Kandel, R. P. and Sachse, K. (2013). "Zoonotic Chlamydiaceae species associated with trachoma, Nepal." Emerg Infect Dis **19**(12): 1948-55.
- Dean, P. (2011). "Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection." FEMS Microbiol Rev **35**(6): 1100-25.
- Deane, J. E., Roversi, P., Cordes, F. S., Johnson, S., Kenjale, R., Daniell, S., Booy, F., Picking, W. D., Picking, W. L., Blocker, A. J. and Lea, S. M. (2006). "Molecular model of a type III secretion system needle: Implications for host-cell sensing." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(33): 12529-33.
- Delevoye, C., Nilges, M., Dautry-Varsat, A. and Subtil, A. (2004). "Conservation of the biochemical properties of IncA from Chlamydia trachomatis and Chlamydia caviae: oligomerization of IncA mediates interaction between facing membranes." J Biol Chem **279**(45): 46896-906.
- Delevoye, C., Nilges, M., Dehoux, P., Paumet, F., Perrinet, S., Dautry-Varsat, A. and Subtil, A. (2008). "SNARE protein mimicry by an intracellular bacterium." PLoS Pathog **4**(3): e1000022.
- Derré, I., Swiss, R. and Agaisse, H. (2011). "The Lipid Transfer Protein CERT Interacts with the Chlamydia Inclusion Protein IncD and Participates to ER-Chlamydia Inclusion Membrane Contact Sites." PLoS Pathog **7**(6): e1002092.
- Di Paolo, G. and De Camilli, P. (2006). "Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics." Nature **443**(7112): 651-7.
- Dickenson, N. E., Choudhari, S. P., Adam, P. R., Kramer, R. M., Joshi, S. B., Middaugh, C. R., Picking, W. L. and Picking, W. D. (2013). "Oligomeric states of the Shigella translocator protein IpaB provide structural insights into formation of the type III secretion translocon." Protein Sci **22**(5): 614-27.
- DiDonato, D. and Brasaemle, D. L. (2003). "Fixation methods for the study of lipid droplets by immunofluorescence microscopy." J Histochem Cytochem **51**(6): 773-80.
- Diepold, A., Amstutz, M., Abel, S., Sorg, I., Jenal, U. and Cornelis, G. R. (2010). "Deciphering the assembly of the Yersinia type III secretion injectisome." Embo J **29**(11): 1928-40.
- Diepold, A., Wiesand, U. and Cornelis, G. R. (2011). "The assembly of the export apparatus (YscR,S,T,U,V) of the Yersinia type III secretion apparatus occurs independently of other structural components and involves the formation of an YscV oligomer." Mol Microbiol **82**(2): 502-14.
- Doms, R. W., Russ, G. and Yewdell, J. W. (1989). "Brefeldin A redistributes resident and itinerant Golgi proteins to the endoplasmic reticulum." J Cell Biol **109**(1): 61-72.
- Dumoux, M., Clare, D. K., Saibil, H. R. and Hayward, R. D. (2012). "Chlamydiae assemble a pathogen synapse to hijack the host endoplasmic reticulum." Traffic **13**(12): 1612-27.
- Dumoux, M., Nans, A., Saibil, H. R. and Hayward, R. D. (2015). "Making connections: snapshots of chlamydial type III secretion systems in contact with host membranes." Curr Opin Microbiol **23**: 1-7.

- Edqvist, P. J., Broms, J. E., Betts, H. J., Forsberg, A., Pallen, M. J. and Francis, M. S. (2006). "Tetratricopeptide repeats in the type III secretion chaperone, LcrH: their role in substrate binding and secretion." *Molecular Microbiology* **59**(1): 31-44.
- Eierhoff, T., Bastian, B., Thuenauer, R., Madl, J., Audfray, A., Aigal, S., Juillot, S., Rydell, G. E., Muller, S., de Bentzmann, S., Imberty, A., Fleck, C. and Romer, W. (2014). "A lipid zipper triggers bacterial invasion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(35): 12895-900.
- Eissenberg, L. G. and Wyrick, P. B. (1981). "Inhibition of phagolysosome fusion is localized to Chlamydia psittaci-laden vacuoles." *Infect Immun* **32**(2): 889-96.
- Elwell, C. A., Jiang, S., Kim, J. H., Lee, A., Wittmann, T., Hanada, K., Melancon, P. and Engel, J. N. (2011). "Chlamydia trachomatis co-opts GBF1 and CERT to acquire host sphingomyelin for distinct roles during intracellular development." *PLoS Pathog* **7**(9): e1002198.
- Engel, A. (2010). "Identifizierung von Interaktionspartnern des putativen Effektorproteins Cpn0809 von *Chlamydia pneumoniae*."
- Entian, K. D., Schuster, T., Hegemann, J. H., Becher, D., Feldmann, H., Guldener, U., Gotz, R., Hansen, M., Hollenberg, C. P., Jansen, G., Kramer, W., Klein, S., Kotter, P., Kricke, J., Launhardt, H., Mannhaupt, G., Maierl, A., Meyer, P., Mewes, W., Munder, T., Niedenthal, R. K., Ramezani Rad, M., Rohmer, A., Romer, A., Hinnen, A. and 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. and Andersen, A. A. (1999). "Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms." *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 2**: 415-40.
- Fairn, G. D., Schieber, N. L., Ariotti, N., Murphy, S., Kuerschner, L., Webb, R. I., Grinstein, S. and Parton, R. G. (2011). "High-resolution mapping reveals topologically distinct cellular pools of phosphatidylserine." *J Cell Biol* **194**(2): 257-75.
- Farencena, A., Comanducci, M., Donati, M., Ratti, G. and Cevenini, R. (1997). "Characterization of a new isolate of *Chlamydia trachomatis* which lacks the common plasmid and has properties of biovar trachoma." *Infect Immun* **65**(7): 2965-9.
- Faudry, E., Vernier, G., Neumann, E., Forge, V. and Attree, I. (2006). "Synergistic pore formation by type III toxin translocators of *Pseudomonas aeruginosa*." *Biochemistry* **45**(26): 8117-23.
- Fields, K. A., Fischer, E. R., Mead, D. J. and Hackstadt, T. (2005). "Analysis of putative *Chlamydia trachomatis* chaperones Scc2 and Scc3 and their use in the identification of type III secretion substrates." *J Bacteriol* **187**(18): 6466-78.
- Fields, K. A. and Hackstadt, T. (2000). "Evidence for the secretion of *Chlamydia trachomatis* CopN by a type III secretion mechanism." *Mol Microbiol* **38**(5): 1048-60.
- Fields, K. A. and Hackstadt, T. (2002). "The chlamydial inclusion: escape from the endocytic pathway." *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 221-45.
- Fields, K. A., Mead, D. J., Dooley, C. A. and Hackstadt, T. (2003). "*Chlamydia trachomatis* type III secretion: evidence for a functional apparatus during early-cycle development." *Mol Microbiol* **48**(3): 671-83.
- Figueira, R. and Holden, D. W. (2012). "Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors." *Microbiology* **158**(Pt 5): 1147-61.
- Fink, A., Sal-Man, N., Gerber, D. and Shai, Y. (2011). "Transmembrane domains interactions within the membrane milieu: principles, advances and challenges." *Biochim Biophys Acta* **1818**(4): 974-83.
- Flores, R., Luo, J., Chen, D., Sturgeon, G., Shivshankar, P., Zhong, Y. and Zhong, G. (2007). "Characterization of the hypothetical protein Cpn1027, a newly identified inclusion membrane protein unique to *Chlamydia pneumoniae*." *Microbiology* **153**(Pt 3): 777-86.
- Friedman, J. R., Dibenedetto, J. R., West, M., Rowland, A. A. and Voeltz, G. K. (2013). "Endoplasmic reticulum-endosome contact increases as endosomes traffic and mature." *Mol Biol Cell* **24**(7): 1030-40.
- Fujimoto, T., Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M. and Shinohara, Y. (2008). "Lipid droplets: a classic organelle with new outfits." *Histochem Cell Biol* **130**(2): 263-79.

- Fujiwara, T., Oda, K., Yokota, S., Takatsuki, A. and Ikehara, Y. (1988). "Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* **263**(34): 18545-52.
- Gabel, B. R., Elwell, C., van Ijzendoorn, S. C. and Engel, J. N. (2004). "Lipid raft-mediated entry is not required for Chlamydia trachomatis infection of cultured epithelial cells." *Infect Immun* **72**(12): 7367-73.
- Gao, Y. and Sztul, E. (2001). "A novel interaction of the Golgi complex with the vimentin intermediate filament cytoskeleton." *J Cell Biol* **152**(5): 877-94.
- Gebus, C., Faudry, E., Bohn, Y. S., Elsen, S. and Attree, I. (2008). "Oligomerization of PcrV and LcrV, protective antigens of Pseudomonas aeruginosa and Yersinia pestis." *J Biol Chem* **283**(35): 23940-9.
- Geisler, W. M., Suchland, R. J., Rockey, D. D. and Stamm, W. E. (2001). "Epidemiology and clinical manifestations of unique Chlamydia trachomatis isolates that occupy nonfusogenic inclusions." *J Infect Dis* **184**(7): 879-84.
- Gérard, H. C., Mishra, M. K., Mao, G., Wang, S., Hali, M., Whittum-Hudson, J. A., Kannan, R. M. and Hudson, A. P. (2013). "Dendrimer-enabled DNA delivery and transformation of Chlamydia pneumoniae." *Nanomedicine* **9**(7): 996-1008.
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R. and Woods, R. A. (1995). "Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure." *Yeast* **11**(4): 355-60.
- Gophna, U., Ron, E. Z. and Graur, D. (2003). "Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events." *Gene* **312**: 151-63.
- Goure, J., Broz, P., Attree, O., Cornelis, G. R. and Attree, I. (2005). "Protective anti-V antibodies inhibit Pseudomonas and Yersinia translocon assembly within host membranes." *J Infect Dis* **192**(2): 218-25.
- Goure, J., Pastor, A., Faudry, E., Chabert, J., Dessen, A. and Attree, I. (2004). "The V antigen of Pseudomonas aeruginosa is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes." *Infect Immun* **72**(8): 4741-50.
- Goyal, U. and Blackstone, C. (2013). "Untangling the web: mechanisms underlying ER network formation." *Biochim Biophys Acta* **1833**(11): 2492-8.
- Grayston, J. T., Campbell, L. A., Kuo, C.-C., Mordhorst, C. H., Saikku, P., Thorn, D. H. and Wang, S.-P. (1990). "A New Respiratory Tract Pathogen: Chlamydia pneumoniae Strain TWAR." *Journal of Infectious Diseases* **161**(4): 618-625.
- Grayston, J. T., Kuo, C.-C., Campbell, L. A. and Wang, S.-P. (1989). "Chlamydia pneumoniae sp. nov. for Chlamydia sp. Strain TWAR." *International Journal of Systematic Bacteriology* **39**(1): 88-90.
- Greenfield, E. (2013). *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Griehaber, S. S., Griehaber, N. A. and Hackstadt, T. (2003). "Chlamydia trachomatis uses host cell dynein to traffic to the microtubule-organizing center in a p50 dynamitin-independent process." *J Cell Sci* **116**(Pt 18): 3793-802.
- Griehaber, S. S., Griehaber, N. A., Miller, N. and Hackstadt, T. (2006). "Chlamydia trachomatis causes centrosomal defects resulting in chromosomal segregation abnormalities." *Traffic* **7**(8): 940-9.
- Grigoriev, I., Gouveia, S. M., van der Vaart, B., Demmers, J., Smyth, J. T., Honnappa, S., Splinter, D., Steinmetz, M. O., Putney, J. W., Jr., Hoogenraad, C. C. and Akhmanova, A. (2008). "STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER." *Curr Biol* **18**(3): 177-82.
- Gruenbaum, Y. and Aebi, U. (2014). "Intermediate filaments: a dynamic network that controls cell mechanics." *F1000Prime Rep* **6**: 54.
- Gupta, R., Srivastava, P., Vardhan, H., Salhan, S. and Mittal, A. (2009). "Host immune responses to chlamydial inclusion membrane proteins B and C in Chlamydia trachomatis infected women with or without fertility disorders." *Reprod Biol Endocrinol* **7**: 38.
- Hackstadt, T. (2000). "Redirection of host vesicle trafficking pathways by intracellular parasites." *Traffic* **1**(2): 93-9.
- Hackstadt, T., Fischer, E. R., Scidmore, M. A., Rockey, D. D. and Heinzen, R. A. (1997). "Origins and functions of the chlamydial inclusion." *Trends Microbiol* **5**(7): 288-93.

- Hackstadt, T., Rockey, D. D., Heinzen, R. A. and Scidmore, M. A. (1996). "Chlamydia trachomatis interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane." *Embo J* **15**(5): 964-77.
- Hackstadt, T., Scidmore, M. A. and Rockey, D. D. (1995). "Lipid metabolism in Chlamydia trachomatis-infected cells: directed trafficking of Golgi-derived sphingolipids to the chlamydial inclusion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(11): 4877-81.
- Hackstadt, T., Todd, W. J. and Caldwell, H. D. (1985). "Disulfide-mediated interactions of the chlamydial major outer membrane protein: role in the differentiation of chlamydiae?" *J Bacteriol* **161**(1): 25-31.
- Haggerty, C. L., Gottlieb, S. L., Taylor, B. D., Low, N., Xu, F. and Ness, R. B. (2010). "Risk of sequelae after Chlamydia trachomatis genital infection in women." *J Infect Dis* **201 Suppl 2**: S134-55.
- Hahn, D. L. (1999). "Chlamydia pneumoniae, asthma, and COPD: what is the evidence?" *Ann Allergy Asthma Immunol* **83**(4): 271-88, 291; quiz 291-2.
- Hapala, I., Marza, E. and Ferreira, T. (2011). "Is fat so bad? Modulation of endoplasmic reticulum stress by lipid droplet formation." *Biol Cell* **103**(6): 271-85.
- Haraga, A., Ohlson, M. B. and Miller, S. I. (2008). "Salmonellae interplay with host cells." *Nat Rev Microbiol* **6**(1): 53-66.
- Harrington, A., Darboe, N., Kenjale, R., Picking, W. L., Middaugh, C. R., Birket, S. and Picking, W. D. (2006). "Characterization of the interaction of single tryptophan containing mutants of IpaC from Shigella flexneri with phospholipid membranes." *Biochemistry* **45**(2): 626-36.
- Hartley, J. C., Stevenson, S., Robinson, A. J., Littlewood, J. D., Carder, C., Cartledge, J., Clark, C. and Ridgway, G. L. (2001). "Conjunctivitis due to Chlamydia felis (Chlamydia psittaci feline pneumonitis agent) acquired from a cat: case report with molecular characterization of isolates from the patient and cat." *J Infect* **43**(1): 7-11.
- Hatch, G. M. and McClarty, G. (1998). "Phospholipid composition of purified Chlamydia trachomatis mimics that of the eucaryotic host cell." *Infect Immun* **66**(8): 3727-35.
- Hatch, T. P., Allan, I. and Pearce, J. H. (1984). "Structural and polypeptide differences between envelopes of infective and reproductive life cycle forms of Chlamydia spp." *J Bacteriol* **157**(1): 13-20.
- Hayward, R. D., Cain, R. J., McGhie, E. J., Phillips, N., Garner, M. J. and Koronakis, V. (2005). "Cholesterol binding by the bacterial type III translocon is essential for virulence effector delivery into mammalian cells." *Mol Microbiol* **56**(3): 590-603.
- Hayward, R. D. and Koronakis, V. (1999). "Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive Salmonella." *Embo J* **18**(18): 4926-34.
- Hefty, P. S. and Stephens, R. S. (2007). "Chlamydial type III secretion system is encoded on ten operons preceded by sigma 70-like promoter elements." *J Bacteriol* **189**(1): 198-206.
- Heid, H., Rickelt, S., Zimbelmann, R., Winter, S., Schumacher, H. and Dorflinger, Y. (2013). "Lipid droplets, perilipins and cytokeratins--unravelling liaisons in epithelium-derived cells." *PLoS One* **8**(5): e63061.
- Heid, H., Rickelt, S., Zimbelmann, R., Winter, S., Schumacher, H., Dorflinger, Y., Kuhn, C. and Franke, W. W. (2014). "On the formation of lipid droplets in human adipocytes: the organization of the perilipin-vimentin cortex." *PLoS One* **9**(2): e90386.
- Heinzen, R. A. and Hackstadt, T. (1997). "The Chlamydia trachomatis parasitophorous vacuolar membrane is not passively permeable to low-molecular-weight compounds." *Infect Immun* **65**(3): 1088-94.
- Herbst, F. (2011). "Identifizierung und Charakterisierung potentieller neuer Effektorproteine aus Chlamydia pneumoniae."
- Herrmann, M., Schuhmacher, A., Muhldorfer, I., Melchers, K., Prothmann, C. and Dammeier, S. (2006). "Identification and characterization of secreted effector proteins of Chlamydia pneumoniae TW183." *Res Microbiol* **157**(6): 513-24.
- Heuer, D., Rejman Lipinski, A., Machuy, N., Karlas, A., Wehrens, A., Siedler, F., Brinkmann, V. and Meyer, T. F. (2009). "Chlamydia causes fragmentation of the Golgi compartment to ensure reproduction." *Nature* **457**(7230): 731-5.

- Ho, T. D. and Starnbach, M. N. (2005). "The Salmonella enterica serovar typhimurium-encoded type III secretion systems can translocate Chlamydia trachomatis proteins into the cytosol of host cells." *Infect Immun* **73**(2): 905-11.
- Hodinka, R. L., Davis, C. H., Choong, J. and Wyrick, P. B. (1988). "Ultrastructural study of endocytosis of Chlamydia trachomatis by McCoy cells." *Infect Immun* **56**(6): 1456-63.
- Hogan, R. J., Mathews, S. A., Mukhopadhyay, S., Summersgill, J. T. and Timms, P. (2004). "Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm." *Infect Immun* **72**(4): 1843-55.
- Horn, M. (2008). "Chlamydiae as symbionts in eukaryotes." *Annu Rev Microbiol* **62**: 113-31.
- Horn, M., Collingro, A., Schmitz-Esser, S., Beier, C. L., Purkhold, U., Fartmann, B., Brandt, P., Nyakatura, G. J., Droege, M., Frishman, D., Rattei, T., Mewes, H. W. and Wagner, M. (2004). "Illuminating the evolutionary history of chlamydiae." *Science* **304**(5671): 728-30.
- Horton, A. C. and Ehlers, M. D. (2003). "Dual modes of endoplasmic reticulum-to-Golgi transport in dendrites revealed by live-cell imaging." *Journal of Neuroscience* **23**(15): 6188-6199.
- Hower, S., Wolf, K. and Fields, K. A. (2009). "Evidence that CT694 is a novel Chlamydia trachomatis T3S substrate capable of functioning during invasion or early cycle development." *Mol Microbiol* **72**(6): 1423-37.
- Hsia, R. C., Pannekoek, Y., Ingerowski, E. and Bavoil, P. M. (1997). "Type III secretion genes identify a putative virulence locus of Chlamydia." *Mol Microbiol* **25**(2): 351-9.
- Hu, J., Shibata, Y., Voss, C., Shemesh, T., Li, Z., Coughlin, M., Kozlov, M. M., Rapoport, T. A. and Prinz, W. A. (2008). "Membrane proteins of the endoplasmic reticulum induce high-curvature tubules." *Science* **319**(5867): 1247-50.
- Huang, J., Lesser, C. F. and Lory, S. (2008). "The essential role of the CopN protein in Chlamydia pneumoniae intracellular growth." *Nature* **456**(7218): 112-5.
- Huber, F., Boire, A., Lopez, M. P. and Koenderink, G. H. (2014). "Cytoskeletal crosstalk: when three different personalities team up." *Curr Opin Cell Biol* **32C**: 39-47.
- Hueck, C. J. (1998). "Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants." *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(2): 379-433.
- Hume, P. J., McGhie, E. J., Hayward, R. D. and Koronakis, V. (2003). "The purified Shigella IpaB and Salmonella SipB translocators share biochemical properties and membrane topology." *Mol Microbiol* **49**(2): 425-39.
- Hüsgen, K. (2012). "Expression und Reinigung von Cpn0809 aus *Chlamydia pneumoniae*."
- Hybiske, K. and Stephens, R. S. (2007a). "Mechanisms of Chlamydia trachomatis entry into nonphagocytic cells." *Infect Immun* **75**(8): 3925-34.
- Hybiske, K. and Stephens, R. S. (2007b). "Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium Chlamydia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(27): 11430-5.
- Ide, T., Laarmann, S., Greune, L., Schillers, H., Oberleithner, H. and Schmidt, M. A. (2001). "Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic Escherichia coli." *Cell Microbiol* **3**(10): 669-79.
- Iwai, H., Kim, M., Yoshikawa, Y., Ashida, H., Ogawa, M., Fujita, Y., Muller, D., Kirikae, T., Jackson, P. K., Kotani, S. and Sasakawa, C. (2007). "A bacterial effector targets Mad2L2, an APC inhibitor, to modulate host cell cycling." *Cell* **130**(4): 611-23.
- Jackson, M. W. and Plano, G. V. (2000). "Interactions between type III secretion apparatus components from Yersinia pestis detected using the yeast two-hybrid system." *FEMS Microbiol Lett* **186**(1): 85-90.
- Jewett, T. J., Fischer, E. R., Mead, D. J. and Hackstadt, T. (2006). "Chlamydial TARP is a bacterial nucleator of actin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(42): 15599-604.
- Jewett, T. J., Miller, N. J., Dooley, C. A. and Hackstadt, T. (2010). "The conserved Tarp actin binding domain is important for chlamydial invasion." *PLoS Pathog* **6**(7): e1000997.
- Johnson, C. M. and Fisher, D. J. (2013). "Site-specific, insertional inactivation of incA in Chlamydia trachomatis using a group II intron." *PLoS One* **8**(12): e83989.
- Johnson, S., Roversi, P., Espina, M., Olive, A., Deane, J. E., Birket, S., Field, T., Picking, W. D., Blocker, A. J., Galyov, E. E., Picking, W. L. and Lea, S. M. (2007). "Self-chaperoning of the type III secretion system needle tip proteins IpaD and BipD." *J Biol Chem* **282**(6): 4035-44.
- Jones, K. H. and Senft, J. A. (1985). "An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide." *J Histochem Cytochem* **33**(1): 77-9.

- Jorgensen, I. and Valdivia, R. H. (2008). "Pmp-like proteins Pls1 and Pls2 are secreted into the lumen of the Chlamydia trachomatis inclusion." *Infect Immun* **76**(9): 3940-50.
- Kalman, S., Mitchell, W., Marathe, R., Lammel, C., Fan, J., Hyman, R. W., Olinger, L., Grimwood, J., Davis, R. W. and Stephens, R. S. (1999). "Comparative genomes of Chlamydia pneumoniae and C. trachomatis." *Nat Genet* **21**(4): 385-9.
- Kannan, R. M., Gerard, H. C., Mishra, M. K., Mao, G., Wang, S., Hali, M., Whittum-Hudson, J. A. and Hudson, A. P. (2013). "Dendrimer-enabled transformation of Chlamydia trachomatis." *Microb Pathog* **65**: 29-35.
- Kassan, A., Herms, A., Fernandez-Vidal, A., Bosch, M., Schieber, N. L., Reddy, B. J., Fajardo, A., Gelabert-Baldrich, M., Tebar, F., Enrich, C., Gross, S. P., Parton, R. G. and Pol, A. (2013). "Acyl-CoA synthetase 3 promotes lipid droplet biogenesis in ER microdomains." *J Cell Biol* **203**(6): 985-1001.
- Kaufman, R. J. (1999). "Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls." *Genes Dev* **13**(10): 1211-33.
- Kerr, K., Entrican, G., McKeever, D. and Longbottom, D. (2005). "Immunopathology of Chlamydia abortus infection in sheep and mice." *Res Vet Sci* **78**(1): 1-7.
- Knodler, L. A. and Steele-Mortimer, O. (2003). "Taking possession: biogenesis of the Salmonella-containing vacuole." *Traffic* **4**(9): 587-99.
- Kostruykova, E. S., Korobova, F. V., Lazarev, V. N., Shkarupeta, M. M., Titova, G. A., Akopian, T. A. and Govorun, V. M. (2005). "Location of C. trachomatis Inc proteins during expression of their genes in HeLa cell culture." *Bull Exp Biol Med* **139**(5): 600-4.
- Krahmer, N., Guo, Y., Farese, R. V., Jr. and Walther, T. C. (2009). "SnapShot: Lipid Droplets." *Cell* **139**(5): 1024-1024 e1.
- Kumar, S. and Hammerschlag, M. R. (2007). "Acute respiratory infection due to Chlamydia pneumoniae: current status of diagnostic methods." *Clin Infect Dis* **44**(4): 568-76.
- Kumar, Y., Cocchiari, J. and Valdivia, R. H. (2006). "The obligate intracellular pathogen Chlamydia trachomatis targets host lipid droplets." *Curr Biol* **16**(16): 1646-51.
- Kumar, Y. and Valdivia, R. H. (2008). "Actin and intermediate filaments stabilize the Chlamydia trachomatis vacuole by forming dynamic structural scaffolds." *Cell Host Microbe* **4**(2): 159-69.
- Kuo, C. C., Jackson, L. A., Campbell, L. A. and Grayston, J. T. (1995). "Chlamydia pneumoniae (TWAR)." *Clin Microbiol Rev* **8**(4): 451-61.
- Kuo, C. C., Puolakkainen, M., Lin, T. M., Witte, M. and Campbell, L. A. (2002). "Mannose-receptor positive and negative mouse macrophages differ in their susceptibility to infection by Chlamydia species." *Microb Pathog* **32**(1): 43-8.
- Lagkouvardos, I., Weinmaier, T., Lauro, F. M., Cavicchioli, R., Rattei, T. and Horn, M. (2014). "Integrating metagenomic and amplicon databases to resolve the phylogenetic and ecological diversity of the Chlamydiae." *Isme J* **8**(1): 115-25.
- Lane, B. J., Mutchler, C., Al Khodor, S., Grieshaber, S. S. and Carabeo, R. A. (2008). "Chlamydial entry involves TARP binding of guanine nucleotide exchange factors." *Plos Pathogens* **4**(3).
- Lara-Tejero, M., Kato, J., Wagner, S., Liu, X. and Galan, J. E. (2011). "A sorting platform determines the order of protein secretion in bacterial type III systems." *Science* **331**(6021): 1188-91.
- Lee, C., Ferguson, M. and Chen, L. B. (1989). "Construction of the endoplasmic reticulum." *J Cell Biol* **109**(5): 2045-55.
- Li, Z., Chen, C., Chen, D., Wu, Y., Zhong, Y. and Zhong, G. (2008). "Characterization of fifty putative inclusion membrane proteins encoded in the Chlamydia trachomatis genome." *Infect Immun* **76**(6): 2746-57.
- Liechti, G. W., Kuru, E., Hall, E., Kalinda, A., Brun, Y. V., VanNieuwenhze, M. and Maurelli, A. T. (2014). "A new metabolic cell-wall labelling method reveals peptidoglycan in Chlamydia trachomatis." *Nature* **506**(7489): 507-10.
- Lilic, M., Vujanac, M. and Stebbins, C. E. (2006). "A common structural motif in the binding of virulence factors to bacterial secretion chaperones." *Mol Cell* **21**(5): 653-64.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L. C., Bonifacino, J. S. and Klausner, R. D. (1989). "Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER." *Cell* **56**(5): 801-13.

- Longbottom, D. and Coulter, L. J. (2003). "Animal chlamydioses and zoonotic implications." *J Comp Pathol* **128**(4): 217-44.
- Lugert, R., Kuhns, M., Polch, T. and Gross, U. (2004). "Expression and localization of type III secretion-related proteins of *Chlamydia pneumoniae*." *Med Microbiol Immunol* **193**(4): 163-71.
- Lundemose, A. G., Birkelund, S., Larsen, P. M., Fey, S. J. and Christiansen, G. (1990). "Characterization and identification of early proteins in *Chlamydia trachomatis* serovar L2 by two-dimensional gel electrophoresis." *Infect Immun* **58**(8): 2478-86.
- Luo, J., Jia, T., Zhong, Y., Chen, D., Flores, R. and Zhong, G. (2007a). "Localization of the hypothetical protein Cpn0585 in the inclusion membrane of *Chlamydia pneumoniae*-infected cells." *Microb Pathog* **42**(2-3): 111-6.
- Luo, J., Liu, G., Zhong, Y., Jia, T., Liu, K., Chen, D. and Zhong, G. (2007b). "Characterization of hypothetical proteins Cpn0146, 0147, 0284 & 0285 that are predicted to be in the *Chlamydia pneumoniae* inclusion membrane." *BMC Microbiol* **7**: 38.
- Lutter, E. I., Barger, A. C., Nair, V. and Hackstadt, T. (2013). "Chlamydia trachomatis inclusion membrane protein CT228 recruits elements of the myosin phosphatase pathway to regulate release mechanisms." *Cell Rep* **3**(6): 1921-31.
- Lutter, E. I., Martens, C. and Hackstadt, T. (2012). "Evolution and conservation of predicted inclusion membrane proteins in chlamydiae." *Comp Funct Genomics* **2012**: 362104.
- Mabey, D. and Peeling, R. W. (2002). "Lymphogranuloma venereum." *Sex Transm Infect* **78**(2): 90-2.
- Mabey, D. C., Solomon, A. W. and Foster, A. (2003). "Trachoma." *Lancet* **362**(9379): 223-9.
- Mania-Pramanik, J., Kerkar, S., Sonawane, S., Mehta, P. and Salvi, V. (2012). "Current Chlamydia trachomatis Infection, A Major Cause of Infertility." *J Reprod Infertil* **13**(4): 204-10.
- Markham, A. P., Jaafar, Z. A., Kemege, K. E., Middaugh, C. R. and Hefty, P. S. (2009). "Biophysical characterization of *Chlamydia trachomatis* CT584 supports its potential role as a type III secretion needle tip protein." *Biochemistry* **48**(43): 10353-61.
- Markkula, E., Hulkkonen, J., Penttila, T. and Puolakkainen, M. (2013). "Host cell Golgi anti-apoptotic protein (GAAP) and growth of *Chlamydia pneumoniae*." *Microbial Pathogenesis* **54**: 46-53.
- Marlovits, T. C., Kubori, T., Sukhan, A., Thomas, D. R., Galan, J. E. and Unger, V. M. (2004). "Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex." *Science* **306**(5698): 1040-2.
- Martin, S. and Parton, R. G. (2006). "Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(5): 373-8.
- Matsumoto, A., Izutsu, H., Miyashita, N. and Ohuchi, M. (1998). "Plaque formation by and plaque cloning of *Chlamydia trachomatis* biovar trachoma." *J Clin Microbiol* **36**(10): 3013-9.
- Mattei, P. J., Faudry, E., Job, V., Izore, T., Attree, I. and Dessen, A. (2011). "Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon." *FEBS J* **278**(3): 414-26.
- Mäurer, A. P., Mehrlitz, A., Mollenkopf, H. J. and Meyer, T. F. (2007). "Gene expression profiles of *Chlamydia pneumoniae* during the developmental cycle and iron depletion-mediated persistence." *PLoS Pathog* **3**(6): e83.
- McDermott, J. E., Corrigan, A., Peterson, E., Oehmen, C., Niemann, G., Cambronne, E. D., Sharp, D., Adkins, J. N., Samudrala, R. and Heffron, F. (2010). "Computational prediction of type III and IV secreted effectors in gram-negative bacteria." *Infect Immun* **79**(1): 23-32.
- Menard, R., Sansonetti, P., Parsot, C. and Vasselon, T. (1994). "Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*." *Cell* **79**(3): 515-25.
- Misselwitz, B., Kreibich, S. K., Rout, S., Stecher, B., Periaswamy, B. and Hardt, W. D. (2011). "Salmonella enterica serovar Typhimurium binds to HeLa cells via Fim-mediated reversible adhesion and irreversible type three secretion system 1-mediated docking." *Infect Immun* **79**(1): 330-41.
- Mital, J., Miller, N. J., Dorward, D. W., Dooley, C. A. and Hackstadt, T. (2013). "Role for chlamydial inclusion membrane proteins in inclusion membrane structure and biogenesis." *PLoS One* **8**(5): e63426.
- Mital, J., Miller, N. J., Fischer, E. R. and Hackstadt, T. (2010). "Specific chlamydial inclusion membrane proteins associate with active Src family kinases in microdomains that interact with the host microtubule network." *Cell Microbiol* **12**(9): 1235-49.

- Miyashita, N., Kanamoto, Y. and Matsumoto, A. (1993). "The morphology of *Chlamydia pneumoniae*." *J Med Microbiol* **38**(6): 418-25.
- Moelleken, K., Becker, E. and Hegemann, J. H. (2013). "The *Chlamydia pneumoniae* invasin protein Pmp21 recruits the EGF receptor for host cell entry." *PLoS Pathog* **9**(4): e1003325.
- Moelleken, K. and 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): 403-19.
- Moelleken, K., Schmidt, E. and Hegemann, J. H. (2010). "Members of the Pmp protein family of *Chlamydia pneumoniae* mediate adhesion to human cells via short repetitive peptide motifs." *Mol Microbiol* **78**(4): 1004-17.
- Molleken, K., Becker, E. and Hegemann, J. H. (2013). "The *Chlamydia pneumoniae* invasin protein Pmp21 recruits the EGF receptor for host cell entry." *PLoS Pathog* **9**(4): e1003325.
- Montagner, C., Arquint, C. and Cornelis, G. R. (2011). "Translocators YopB and YopD from *Yersinia enterocolitica* form a multimeric integral membrane complex in eukaryotic cell membranes." *J Bacteriol* **193**(24): 6923-8.
- Moon, J. L., Kim, S. Y., Shin, S. W. and Park, J. W. (2012). "Regulation of brefeldin A-induced ER stress and apoptosis by mitochondrial NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase." *Biochem Biophys Res Commun* **417**(2): 760-4.
- Moorhead, A. M., Jung, J. Y., Smirnov, A., Kaufer, S. and Scidmore, M. A. (2010). "Multiple host proteins that function in phosphatidylinositol-4-phosphate metabolism are recruited to the chlamydial inclusion." *Infect Immun* **78**(5): 1990-2007.
- Moremen, K. W., Tiemeyer, M. and Nairn, A. V. (2012). "Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function." *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(7): 448-62.
- Morita-Ishihara, T., Ogawa, M., Sagara, H., Yoshida, M., Katayama, E. and Sasakawa, C. (2006). "Shigella Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery." *J Biol Chem* **281**(1): 599-607.
- Mota, L. J., Journet, L., Sorg, I., Agrain, C. and Cornelis, G. R. (2005). "Bacterial injectisomes: needle length does matter." *Science* **307**(5713): 1278.
- Moulder, J. W. (1966). "The relation of the psittacosis group (*Chlamydiae*) to bacteria and viruses." *Annu Rev Microbiol* **20**: 107-30.
- Mounier, J., Popoff, M. R., Enninga, J., Frame, M. C., Sansonetti, P. J. and Van Nhieu, G. T. (2009). "The IpaC carboxyterminal effector domain mediates Src-dependent actin polymerization during *Shigella* invasion of epithelial cells." *PLoS Pathog* **5**(1): e1000271.
- Mueller, C. A., Broz, P. and Cornelis, G. R. (2008). "The type III secretion system tip complex and translocon." *Molecular Microbiology* **68**(5): 1085-1095.
- Mueller, C. A., Broz, P., Muller, S. A., Ringler, P., Erne-Brand, F., Sorg, I., Kuhn, M., Engel, A. and Cornelis, G. R. (2005). "The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles." *Science* **310**(5748): 674-6.
- Muschiol, S., Normark, S., Henriques-Normark, B. and Subtil, A. (2009). "Small molecule inhibitors of the *Yersinia* type III secretion system impair the development of *Chlamydia* after entry into host cells." *BMC Microbiol* **9**: 75.
- Nans, A., Saibil, H. R. and Hayward, R. D. (2014). "Pathogen-host reorganization during *Chlamydia* invasion revealed by cryo-electron tomography." *Cell Microbiol*.
- Nawrotek, A., Guimaraes, B. G., Velours, C., Subtil, A., Knossow, M. and Gigant, B. (2014). "Biochemical and structural insights into microtubule perturbation by CopN from *Chlamydia pneumoniae*." *J Biol Chem* **289**(36): 25199-210.
- Newhall, W. J. and Jones, R. B. (1983). "Disulfide-linked oligomers of the major outer membrane protein of *Chlamydiae*." *J Bacteriol* **154**(2): 998-1001.
- Neyt, C. and Cornelis, G. R. (1999). "Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD." *Mol Microbiol* **31**(1): 143-56.
- Nhieu, G., Caron, E., Hall, A. and Sansonetti, P. J. (1999). "IpaC induces actin polymerization and filopodia formation during *Shigella* entry into epithelial cells." *Embo J* **18**(12): 3249-62.
- Nichols, B. A., Setzer, P. Y., Pang, F. and Dawson, C. R. (1985). "New view of the surface projections of *Chlamydia trachomatis*." *J Bacteriol* **164**(1): 344-9.
- Nunes, A. and Gomes, J. P. (2014). "Evolution, phylogeny, and molecular epidemiology of *Chlamydia*." *Infect Genet Evol* **23**: 49-64.

- O'Connell, C. M., AbdelRahman, Y. M., Green, E., Darville, H. K., Saira, K., Smith, B., Darville, T., Scurlock, A. M., Meyer, C. R. and Belland, R. J. (2011). "Toll-like receptor 2 activation by *Chlamydia trachomatis* is plasmid dependent, and plasmid-responsive chromosomal loci are coordinately regulated in response to glucose limitation by *C. trachomatis* but not by *C. muridarum*." *Infect Immun* **79**(3): 1044-56.
- Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., Shinohara, Y., Fujita, A. and Fujimoto, T. (2009). "Biogenesis of cytoplasmic lipid droplets: from the lipid ester globule in the membrane to the visible structure." *Biochim Biophys Acta* **1791**(6): 399-407.
- Ohsaki, Y., Maeda, T. and Fujimoto, T. (2005). "Fixation and permeabilization protocol is critical for the immunolabeling of lipid droplet proteins." *Histochem Cell Biol* **124**(5): 445-52.
- Ohsaki, Y., Suzuki, M. and Fujimoto, T. (2014). "Open questions in lipid droplet biology." *Chem Biol* **21**(1): 86-96.
- Ota, T., Gayet, C. and Ginsberg, H. N. (2008). "Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents." *J Clin Invest* **118**(1): 316-32.
- Ouellette, S. P., Abdelrahman, Y. M., Belland, R. J. and Byrne, G. I. (2005). "The *Chlamydia pneumoniae* type III secretion-related *lcrH* gene clusters are developmentally expressed operons." *J Bacteriol* **187**(22): 7853-6.
- Page, A. L. and Parsot, C. (2002). "Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades." *Mol Microbiol* **46**(1): 1-11.
- Pallen, M. J., Beatson, S. A. and Bailey, C. M. (2005). "Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion." *BMC Microbiol* **5**: 9.
- Pallen, M. J., Francis, M. S. and Futterer, K. (2003). "Tetratricopeptide-like repeats in type-III-secretion chaperones and regulators." *Fems Microbiology Letters* **223**(1): 53-60.
- Pascolini, D. and Mariotti, S. P. (2012). "Global estimates of visual impairment: 2010." *Br J Ophthalmol* **96**(5): 614-8.
- Peters, J., Wilson, D. P., Myers, G., Timms, P. and Bavoil, P. M. (2007). "Type III secretion a la *Chlamydia*." *Trends Microbiol* **15**(6): 241-51.
- Peterson, E. M. and de la Maza, L. M. (1988). "Chlamydia parasitism: ultrastructural characterization of the interaction between the chlamydial cell envelope and the host cell." *J Bacteriol* **170**(3): 1389-92.
- Petrovay, F. and Balla, E. (2008). "Two fatal cases of psittacosis caused by *Chlamydophila psittaci*." *J Med Microbiol* **57**(Pt 10): 1296-8.
- Pike, L. J. and Casey, L. (1996). "Localization and turnover of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolin-enriched membrane domains." *J Biol Chem* **271**(43): 26453-6.
- Polack, S., Brooker, S., Kuper, H., Mariotti, S., Mabey, D. and Foster, A. (2005). "Mapping the global distribution of trachoma." *Bull World Health Organ* **83**(12): 913-9.
- Popov, V. L., Shatkin, A. A., Pankratova, V. N., Smirnova, N. S., von Bonsdorff, C. H., Ekman, M. R., Morttinen, A. and Saikku, P. (1991). "Ultrastructure of *Chlamydia pneumoniae* in cell culture." *FEMS Microbiol Lett* **68**(2): 129-34.
- Pospischil, A., Thoma, R., Hilbe, M., Grest, P. and Gebbers, J. O. (2002). "Abortion in woman caused by caprine *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1)." *Swiss Med Wkly* **132**(5-6): 64-6.
- Puolakkainen, M., Kuo, C. C. and Campbell, L. A. (2005). "*Chlamydia pneumoniae* uses the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor for infection of endothelial cells." *Infect Immun* **73**(8): 4620-5.
- Read, T. D., Brunham, R. C., Shen, C., Gill, S. R., Heidelberg, J. F., White, O., Hickey, E. K., Peterson, J., Utterback, T., Berry, K., Bass, S., Linher, K., Weidman, J., Khouri, H., Craven, B., Bowman, C., Dodson, R., Gwinn, M., Nelson, W., DeBoy, R., Kolonay, J., McClarty, G., Salzberg, S. L., Eisen, J. and Fraser, C. M. (2000). "Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39." *Nucleic Acids Res* **28**(6): 1397-406.
- Rockey, D. D. (2011). "Unraveling the basic biology and clinical significance of the chlamydial plasmid." *J Exp Med* **208**(11): 2159-62.
- Rockey, D. D., Grosenbach, D., Hruby, D. E., Peacock, M. G., Heinzen, R. A. and Hackstadt, T. (1997). "*Chlamydia psittaci* IncA is phosphorylated by the host cell and is exposed on the cytoplasmic face of the developing inclusion." *Mol Microbiol* **24**(1): 217-28.

- Rockey, D. D., Heinzen, R. A. and Hackstadt, T. (1995). "Cloning and characterization of a Chlamydia psittaci gene coding for a protein localized in the inclusion membrane of infected cells." *Mol Microbiol* **15**(4): 617-26.
- Rockey, D. D., Scidmore, M. A., Bannantine, J. P. and Brown, W. J. (2002). "Proteins in the chlamydial inclusion membrane." *Microbes Infect* **4**(3): 333-40.
- Roehrich, A. D., Guillosoy, E., Blocker, A. J. and Martinez-Argudo, I. (2013). "Shigella IpaD has a dual role: signal transduction from the type III secretion system needle tip and intracellular secretion regulation." *Mol Microbiol* **87**(3): 690-706.
- Rohde, G., Straube, E., Essig, A., Reinhold, P. and Sachse, K. (2010). "Chlamydial zoonoses." *Dtsch Arztebl Int* **107**(10): 174-80.
- Romano, F. B., Rossi, K. C., Savva, C. G., Holzenburg, A., Clerico, E. M. and Heuck, A. P. (2011). "Efficient isolation of Pseudomonas aeruginosa type III secretion translocators and assembly of heteromeric transmembrane pores in model membranes." *Biochemistry* **50**(33): 7117-31.
- Roth, M. G. (1999). "Snapshots of ARF1: implications for mechanisms of activation and inactivation." *Cell* **97**(2): 149-52.
- Roulis, E., Polkinghorne, A. and Timms, P. (2012). "Chlamydia pneumoniae: modern insights into an ancient pathogen." *Trends Microbiol* **21**(3): 120-8.
- Russell, M., Darville, T., Chandra-Kuntal, K., Smith, B., Andrews, C. W., Jr. and O'Connell, C. M. (2011). "Infectivity acts as in vivo selection for maintenance of the chlamydial cryptic plasmid." *Infect Immun* **79**(1): 98-107.
- Rzomp, K. A., Moorhead, A. R. and Scidmore, M. A. (2006). "The GTPase Rab4 interacts with Chlamydia trachomatis inclusion membrane protein CT229." *Infect Immun* **74**(9): 5362-73.
- Rzomp, K. A., Scholtes, L. D., Briggs, B. J., Whittaker, G. R. and Scidmore, M. A. (2003). "Rab GTPases are recruited to chlamydial inclusions in both a species-dependent and species-independent manner." *Infect Immun* **71**(10): 5855-70.
- Salomon, D. and Sessa, G. (2010). "Identification of growth inhibition phenotypes induced by expression of bacterial type III effectors in yeast." *J Vis Exp*(37).
- Sambrook, J., Maniatis, T. and Fritsch, E. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor laboratory.
- Samudrala, R., Heffron, F. and McDermott, J. E. (2009). "Accurate prediction of secreted substrates and identification of a conserved putative secretion signal for type III secretion systems." *PLoS Pathog* **5**(4): e1000375.
- Schlumberger, M. C. and Hardt, W. D. (2006). "Salmonella type III secretion effectors: pulling the host cell's strings." *Curr Opin Microbiol* **9**(1): 46-54.
- Schoehn, G., Di Guilmi, A. M., Lemaire, D., Attree, I., Weissenhorn, W. and Dessen, A. (2003). "Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in Pseudomonas." *Embo J* **22**(19): 4957-67.
- Schroeder, N., Mota, L. J. and Meresse, S. (2011). "Salmonella-induced tubular networks." *Trends Microbiol* **19**(6): 268-77.
- Schuck, S., Prinz, W. A., Thorn, K. S., Voss, C. and Walter, P. (2009). "Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response." *J Cell Biol* **187**(4): 525-36.
- Scidmore-Carlson, M. A., Shaw, E. I., Dooley, C. A., Fischer, E. R. and Hackstadt, T. (1999). "Identification and characterization of a Chlamydia trachomatis early operon encoding four novel inclusion membrane proteins." *Mol Microbiol* **33**(4): 753-65.
- Scidmore, M. A., Rockey, D. D., Fischer, E. R., Heinzen, R. A. and Hackstadt, T. (1996). "Vesicular interactions of the Chlamydia trachomatis inclusion are determined by chlamydial early protein synthesis rather than route of entry." *Infect Immun* **64**(12): 5366-72.
- Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamano, K., Sasakawa, C. and Abe, A. (2001). "Supermolecular structure of the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20): 11638-43.
- Senn, L., Jatou, K., Fitting, J. W. and Greub, G. (2011). "Does respiratory infection due to Chlamydia pneumoniae still exist?" *Clin Infect Dis* **53**(8): 847-8.
- Shima, K., Kuhlenthal, G. and Rupp, J. (2010). "Chlamydia pneumoniae infection and Alzheimer's disease: a connection to remember?" *Med Microbiol Immunol* **199**(4): 283-9.

- Shirai, M., Hirakawa, H., Kimoto, M., Tabuchi, M., Kishi, F., Ouchi, K., Shiba, T., Ishii, K., Hattori, M., Kuhara, S. and Nakazawa, T. (2000). "Comparison of whole genome sequences of *Chlamydia pneumoniae* J138 from Japan and CWL029 from USA." Nucleic Acids Res **28**(12): 2311-4.
- Shkarupeta, M. M., Kostjukova, E. S., Lazarev, V. N., Levitskii, S. A., Basovskii, Y. I. and Govorun, V. M. (2008). "Localization of *C. trachomatis* Inc proteins in expression of their genes in HeLa cell culture." Bull Exp Biol Med **146**(2): 237-42.
- Siggers, K. A. and Lesser, C. F. (2008). "The Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a versatile model system for the identification and characterization of bacterial virulence proteins." Cell Host Microbe **4**(1): 8-15.
- Silva-Herzog, E., Ferracci, F., Jackson, M. W., Joseph, S. S. and Plano, G. V. (2008). "Membrane localization and topology of the *Yersinia pestis* YscJ lipoprotein." Microbiology **154**(Pt 2): 593-607.
- Sisko, J. L., Spaeth, K., Kumar, Y. and Valdivia, R. H. (2006). "Multifunctional analysis of *Chlamydia*-specific genes in a yeast expression system." Mol Microbiol **60**(1): 51-66.
- Slepenkin, A., Motin, V., de la Maza, L. M. and Peterson, E. M. (2003). "Temporal expression of type III secretion genes of *Chlamydia pneumoniae*." Infect Immun **71**(5): 2555-62.
- Smith, J. L., Haddad, D., Polack, S., Harding-Esch, E. M., Hooper, P. J., Mabey, D. C., Solomon, A. W. and Brooker, S. (2011). "Mapping the global distribution of trachoma: why an updated atlas is needed." PLoS Negl Trop Dis **5**(6): e973.
- Soni, K. G., Mardones, G. A., Sougrat, R., Smirnova, E., Jackson, C. L. and Bonifacino, J. S. (2009). "Coatmer-dependent protein delivery to lipid droplets." J Cell Sci **122**(Pt 11): 1834-41.
- Sorg, I., Wagner, S., Amstutz, M., Muller, S. A., Broz, P., Lussi, Y., Engel, A. and Cornelis, G. R. (2007). "YscU recognizes translocators as export substrates of the *Yersinia injectisome*." Embo J **26**(12): 3015-24.
- Sorkin, A. (2001). "Internalization of the epidermal growth factor receptor: role in signalling." Biochem Soc Trans **29**(Pt 4): 480-4.
- Stallmann, S. (2015). "Identifizierung und Charakterisierung neuer Adhäsiene bei *Chlamydia trachomatis*."
- Stamm, L. M. and Goldberg, M. B. (2011). "Establishing the secretion hierarchy." Science **331**(6021): 1147-8.
- Stebbins, C. E. and Galan, J. E. (2001). "Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion." Nature **414**(6859): 77-81.
- Stephens, R. S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchell, W., Olinger, L., Tatusov, R. L., Zhao, Q., Koonin, E. V. and Davis, R. W. (1998). "Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*." Science **282**(5389): 754-9.
- Stephens, R. S., Myers, G., Eppinger, M. and Bavoil, P. M. (2009). "Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of *Chlamydia* resolved." FEMS Immunol Med Microbiol **55**(2): 115-9.
- Stone, C. B., Sugiman-Marangos, S., Bulir, D. C., Clayden, R. C., Leighton, T. L., Slootstra, J. W., Junop, M. S. and Mahony, J. B. (2012). "Structural characterization of a novel *Chlamydia pneumoniae* type III secretion-associated protein, Cpn0803." PLoS One **7**(1): e30220.
- Stuart, E. S., Webley, W. C. and Norkin, L. C. (2003). "Lipid rafts, caveolae, caveolin-1, and entry by *Chlamydiae* into host cells." Exp Cell Res **287**(1): 67-78.
- Su, H., Raymond, L., Rockey, D. D., Fischer, E., Hackstadt, T. and Caldwell, H. D. (1996). "A recombinant *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 11143-8.
- Subtil, A., Blocker, A. and Dautry-Varsat, A. (2000). "Type III secretion system in *Chlamydia* species: identified members and candidates." Microbes Infect **2**(4): 367-9.
- Subtil, A., Delevoeye, C., Balana, M. E., Tastevin, L., Perrinet, S. and Dautry-Varsat, A. (2005). "A directed screen for chlamydial proteins secreted by a type III mechanism identifies a translocated protein and numerous other new candidates." Mol Microbiol **56**(6): 1636-47.
- Subtil, A., Parsot, C. and Dautry-Varsat, A. (2001). "Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery." Mol Microbiol **39**(3): 792-800.

- Suchland, R. J., Jeffrey, B. M., Xia, M., Bhatia, A., Chu, H. G., Rockey, D. D. and Stamm, W. E. (2008). "Identification of concomitant infection with *Chlamydia trachomatis* IncA-negative mutant and wild-type strains by genomic, transcriptional, and biological characterizations." *Infect Immun* **76**(12): 5438-46.
- Suchland, R. J., Rockey, D. D., Bannantine, J. P. and Stamm, W. E. (2000). "Isolates of *Chlamydia trachomatis* that occupy nonfusogenic inclusions lack IncA, a protein localized to the inclusion membrane." *Infect Immun* **68**(1): 360-7.
- Suchland, R. J., Rockey, D. D., Weeks, S. K., Alzhanov, D. T. and Stamm, W. E. (2005). "Development of secondary inclusions in cells infected by *Chlamydia trachomatis*." *Infect Immun* **73**(7): 3954-62.
- Terasaki, M., Chen, L. B. and Fujiwara, K. (1986). "Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures." *J Cell Biol* **103**(4): 1557-68.
- Thalmann, J., Janik, K., May, M., Sommer, K., Ebeling, J., Hofmann, F., Genth, H. and Klos, A. (2010). "Actin re-organization induced by *Chlamydia trachomatis* serovar D--evidence for a critical role of the effector protein CT166 targeting Rac." *PLoS One* **5**(3): e9887.
- Thanassi, D. G., Bliska, J. B. and Christie, P. J. (2012). "Surface organelles assembled by secretion systems of Gram-negative bacteria: diversity in structure and function." *FEMS Microbiol Rev* **36**(6): 1046-82.
- Tipples, G. and McClarty, G. (1993). "The obligate intracellular bacterium *Chlamydia trachomatis* is auxotrophic for three of the four ribonucleoside triphosphates." *Mol Microbiol* **8**(6): 1105-14.
- Toh, H., Miura, K., Shirai, M. and Hattori, M. (2003). "In silico inference of inclusion membrane protein family in obligate intracellular parasites chlamydiae." *DNA Res* **10**(1): 9-17.
- Troisfontaines, P. and Cornelis, G. R. (2005). "Type III secretion: more systems than you think." *Physiology (Bethesda)* **20**: 326-39.
- Tseng, T. T., Tyler, B. M. and Setubal, J. C. (2009). "Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology." *BMC Microbiol* **9 Suppl 1**: S2.
- van der Goot, F. G., Tran van Nhieu, G., Allaoui, A., Sansonetti, P. and Lafont, F. (2004). "Rafts can trigger contact-mediated secretion of bacterial effectors via a lipid-based mechanism." *J Biol Chem* **279**(46): 47792-8.
- van Ijzendoorn, S. C. (2006). "Recycling endosomes." *J Cell Sci* **119**(Pt 9): 1679-81.
- Vandahl, B. B., Birkelund, S. and Christiansen, G. (2004). "Genome and proteome analysis of *Chlamydia*." *Proteomics* **4**(10): 2831-42.
- Veenendaal, A. K., Hodgkinson, J. L., Schwarzer, L., Stabat, D., Zenk, S. F. and Blocker, A. J. (2007). "The type III secretion system needle tip complex mediates host cell sensing and translocon insertion." *Mol Microbiol* **63**(6): 1719-30.
- Voeltz, G. K., Prinz, W. A., Shibata, Y., Rist, J. M. and Rapoport, T. A. (2006). "A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum." *Cell* **124**(3): 573-86.
- Volceanov, L., Herbst, K., Biniossek, M., Schilling, O., Haller, D., Nolke, T., Subbarayal, P., Rudel, T., Zieger, B. and Hacker, G. (2014). "Septins arrange F-actin-containing fibers on the *Chlamydia trachomatis* inclusion and are required for normal release of the inclusion by extrusion." *MBio* **5**(5): e01802-14.
- von Hertzen, L. C. (2002). "Role of persistent infection in the control and severity of asthma: focus on *Chlamydia pneumoniae*." *European Respiratory Journal* **19**(3): 546-556.
- Wagar, E. A. and Stephens, R. S. (1988). "Developmental-form-specific DNA-binding proteins in *Chlamydia* spp." *Infect Immun* **56**(7): 1678-84.
- Wagner, M. and Horn, M. (2006). "The Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chlamydiae and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance." *Curr Opin Biotechnol* **17**(3): 241-9.
- Wainwright, L. A. and Kaper, J. B. (1998). "EspB and EspD require a specific chaperone for proper secretion from enteropathogenic *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **27**(6): 1247-60.
- Walther, T. C. and Farese, R. V., Jr. (2012). "Lipid droplets and cellular lipid metabolism." *Annu Rev Biochem* **81**: 687-714.
- Wang, J., Chen, L., Chen, F., Zhang, X., Zhang, Y., Baseman, J., Perdue, S., Yeh, I. T., Shain, R., Holland, M., Bailey, R., Mabey, D., Yu, P. and Zhong, G. (2009). "A chlamydial type III-secreted effector protein (Tarp) is predominantly recognized by antibodies from humans

- infected with *Chlamydia trachomatis* and induces protective immunity against upper genital tract pathologies in mice." *Vaccine* **27**(22): 2967-80.
- Wang, Y., Kahane, S., Cutcliffe, L. T., Skilton, R. J., Lambden, P. R. and Clarke, I. N. (2011). "Development of a transformation system for *Chlamydia trachomatis*: restoration of glycogen biosynthesis by acquisition of a plasmid shuttle vector." *PLoS Pathog* **7**(9): e1002258.
- Ward, M. E. and Murray, A. (1984). "Control mechanisms governing the infectivity of *Chlamydia trachomatis* for HeLa cells: mechanisms of endocytosis." *J Gen Microbiol* **130**(7): 1765-80.
- Waterman, S. R. and Holden, D. W. (2003). "Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system." *Cell Microbiol* **5**(8): 501-11.
- Wei, Y., Wang, D., Topczewski, F. and Pagliassotti, M. J. (2006). "Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**(2): E275-81.
- West, S. K., Kohlhepp, S. J., Jin, R., Gleaves, C. A., Stamm, W. and Gilbert, D. N. (2009). "Detection of circulating *Chlamydia pneumoniae* in patients with coronary artery disease and healthy control subjects." *Clin Infect Dis* **48**(5): 560-7.
- WHO (2012). "Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections - 2008."
- Wikstrom, J. D., Israeli, T., Bachar-Wikstrom, E., Swisa, A., Ariav, Y., Weiss, M., Kaganovich, D., Dor, Y., Cerasi, E. and Leibowitz, G. (2013). "AMPK regulates ER morphology and function in stressed pancreatic beta-cells via phosphorylation of DRP1." *Mol Endocrinol* **27**(10): 1706-23.
- Woestyn, S., Allaoui, A., Wattiau, P. and Cornelis, G. R. (1994). "YscN, the putative energizer of the *Yersinia Yop* secretion machinery." *J Bacteriol* **176**(6): 1561-9.
- Wolf, K., Betts, H. J., Chellas-Gery, B., Hower, S., Linton, C. N. and Fields, K. A. (2006). "Treatment of *Chlamydia trachomatis* with a small molecule inhibitor of the *Yersinia* type III secretion system disrupts progression of the chlamydial developmental cycle." *Mol Microbiol* **61**(6): 1543-55.
- Wolf, K., Fischer, E. and Hackstadt, T. (2000). "Ultrastructural analysis of developmental events in *Chlamydia pneumoniae*-infected cells." *Infect Immun* **68**(4): 2379-85.
- Wolf, K., Fischer, E., Mead, D., Zhong, G. M., Peeling, R., Whitmire, B. and Caldwell, H. D. (2001). "*Chlamydia pneumoniae* major outer membrane protein is a surface-exposed antigen that elicits antibodies primarily directed against conformation-dependent determinants." *Infection and Immunity* **69**(5): 3082-3091.
- Wolf, K. and Hackstadt, T. (2001). "Sphingomyelin trafficking in *Chlamydia pneumoniae*-infected cells." *Cell Microbiol* **3**(3): 145-52.
- Wu, M. M., Buchanan, J., Luik, R. M. and Lewis, R. S. (2006). "Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane." *J Cell Biol* **174**(6): 803-13.
- Wu, Y., Li, Q. and Chen, X. Z. (2007). "Detecting protein-protein interactions by Far western blotting." *Nat Protoc* **2**(12): 3278-84.
- Wuppermann, F. N., Hegemann, J. H. and Jantos, C. A. (2001). "Heparan sulfate-like glycosaminoglycan is a cellular receptor for *Chlamydia pneumoniae*." *J Infect Dis* **184**(2): 181-7.
- Wuppermann, F. N., Moelleken, K., Julien, M., Jantos, C. A. and Hegemann, J. H. (2008). "*Chlamydia pneumoniae* GroEL1 protein is cell surface associated and required for infection of HEp-2 cells." *Journal of Bacteriology* **190**(10): 3757-3767.
- Wylie, J. L., Hatch, G. M. and McClarty, G. (1997). "Host cell phospholipids are trafficked to and then modified by *Chlamydia trachomatis*." *J Bacteriol* **179**(23): 7233-42.
- Yang, Y. S. and Strittmatter, S. M. (2007). "The reticulons: a family of proteins with diverse functions." *Genome Biol* **8**(12): 234.
- Yasui, Y., Yanatori, I., Kawai, Y., Miura, K., Suminami, Y., Hirota, T., Tamari, M., Ouchi, K. and Kishi, F. (2012). "Genomic screening for *Chlamydia pneumoniae*-specific antigens using serum samples from patients with primary infection." *FEMS Microbiol Lett* **329**(2): 168-76.
- Yeung, T., Heit, B., Dubuisson, J. F., Fairn, G. D., Chiu, B., Inman, R., Kapus, A., Swanson, M. and Grinstein, S. (2009). "Contribution of phosphatidylserine to membrane surface charge and protein targeting during phagosome maturation." *J Cell Biol* **185**(5): 917-28.

- Zhang, X. and Zhang, K. (2012). "Endoplasmic Reticulum Stress-Associated Lipid Droplet Formation and Type II Diabetes." Biochem Res Int **2012**: 247275.
- Zhu, H., Li, H., Wang, P., Chen, M., Huang, Z., Li, K., Li, Y., He, J., Han, J. and Zhang, Q. (2014). "Persistent and acute chlamydial infections induce different structural changes in the Golgi apparatus." Int J Med Microbiol **304**(5-6): 577-85.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Taxonomie der <i>Chlamydiae</i> -----	2
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von <i>C. pneumoniae</i> -----	10
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Typ-III-Sekretions-systems-----	18
Abbildung 1.4: Interaktionen der Chlamydien mit der Wirtszelle-----	24
Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des CPn0809-----	32
Abbildung 1.6: Darstellung der putativen <i>C. pneumoniae</i> und <i>C. trachomatis</i> Translokation Operons --	34
Abbildung 1.7: Schematische Darstellung des Inc-Proteins CPn0147 -----	36
Abbildung 4.1: Schematischer Vergleich der genomischen Organisation verschiedener Translokation-Operons -----	93
Abbildung 4.2: Grafische Darstellung der Domänenanalyse der Translokationspore-Proteine-----	95
Abbildung 4.3: Abreicherung des antigengereinigten CPn0809-----	97
Abbildung 4.4: Expression von CPn0809 im Verlauf der <i>C. pneumoniae</i> Infektion -----	98
Abbildung 4.5: Lokalisation von CPn0809 in der Infektion-----	100
Abbildung 4.6: Präadsorption des CPn0809-Antikörpers-----	102
Abbildung 4.7: Kofärbung von CPn0809 und IncA-----	103
Abbildung 4.8: Kolokalisation von CPn0809 mit <i>C. pneumoniae</i> Proteinen und der Humanzellmembran -----	106
Abbildung 4.9: Kolokalisation von CPn0809 mit der Plasmamembran von Humanzellen-----	108
Abbildung 4.10: CPn0809-Expression in <i>E. coli</i> führt zur Lyse der Zellen -----	111
Abbildung 4.11: CPn0809-Reinigung und biochemische Analyse des Lipidbindungsverhaltens ----	115
Abbildung 4.12: Protein-Protein-Interaktionsstudien mit CPn0809N -----	117
Abbildung 4.13: Detergenzienbehandlung von isolierten <i>C. pneumoniae</i> EBs-----	119
Abbildung 4.14: CPn0809 kann in der Infektion und in der Transfektion mit Lipidtröpfchen assoziiert werden-----	121
Abbildung 4.15: Mikroskopische Analyse der Präadsorption des CPn0147-Antikörpers -----	124
Abbildung 4.16: Auf CPn0147-Fäden befinden sich weitere chlamydiale Antigene-----	126
Abbildung 4.17: Analyse der bevorzugten Orientierung von CPn0147-positiven Fäden-----	128
Abbildung 4.18: Kolokalisierung der CPn0147-Fäden mit Zellkompartimenten der Humanzelle----	131
Abbildung 4.19: Phänotypen der Kolokalisierung von CPn0147-Fäden und Rab11A-GFP -----	133
Abbildung 4.20: CPn0147-positive Strukturen sind mit LactC2-GFP und mCherry-GPI assoziiert -	136
Abbildung 4.21: Kofärbung von Zytoskelett-Komponenten der Wirtszelle und CPn0147-----	138
Abbildung 4.22: Die ektopische Expression von CPn0147 führt zur Bildung fadenartiger Strukturen -----	141
Abbildung 4.23: Lokalisierung verschiedener CPn0147GFP-Deletionsvarianten -----	144
Abbildung 4.24: Kolokalisation von Humanzellkompartimenten mit ektopisch exprimiertem CPn0147 -----	146
Abbildung 4.25: Kolokalisation von Rab11-GFP-Vesikeln mit CPn0147mCherry-Fäden-----	148
Abbildung 4.26: Die Lokalisierung von Vimentin verändert sich bei der Expression von CPn0147GFP -----	149
Abbildung 4.27: In Transfektionsexperimenten sind CPn0147GFP-Fäden mit WGA- und LactC2-GFP-positiven Vesikeln assoziiert-----	152
Abbildung 4.28: Ektopisch exprimiertes CPn0147 kolokalisiert mit einem ER-Markerprotein-----	154
Abbildung 4.29: Analyse der Kolokalisierung von CPn0147mCherry-Fäden mit STIM-1GFP-positiven Strukturen -----	156
Abbildung 4.30: Mikroskopische Untersuchung der Kolokalisation von STIM-1GFP und IncA-positiven Fäden-----	158

Abbildung 4.31: CPn0147mCherry kolokalisiert partiell mit IncA-positiven Strukturen -----	160
Abbildung 4.32: Die Assoziation von Lipidtröpfchen mit CPn0147-positiven Fäden -----	162
Abbildung 4.33: Lipidtröpfchen sind mit CPn0147-Fäden assoziiert und unterbrechen diese -----	163
Abbildung 4.34: In der Transfektion gebildete CPn0147GFP-Fäden assoziieren mit Lipidtröpfchen	165
Abbildung 4.35: Quantitative Analyse der Bildung CPn0147-positiver Fäden in der Infektion -----	168
Abbildung 5.1: Schema des möglichen Aufbaus der Translokationsporen in <i>C. pneumoniae</i> -----	178
Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der CPn0809- Insertion-----	184
Abbildung 5.3: Orientierung von Retikulons und ektopisch exprimiertem CPn0147 in der ER-Membran-----	192
Abbildung 5.4: Postulierte Interaktion von CIPF und CPn0147 mit Lipidtröpfchen -----	196
Abbildung 5.5: Modell der Entstehung der CIPF unter Beteiligung von CPn0147 -----	204
Abbildung 6.1: Kontrollen verschiedener Transfektionskonstrukte in HEp-2-Zellen -----	206
Abbildung 6.2: Kontrollfärbungen von Zellorganellen der verwendeten HEp-2-Zellen-----	206
Abbildung 6.3: Kontrollfärbungen des Zytoskeletts der verwendeten HEp-2-Zellen -----	207
Abbildung 6.4: Kofärbung und verschiedene Kotransfektionen in HEp-2-Zellen.-----	208
Abbildung 6.5: Färbung der CPn0147GFP- bzw. mCherry-Strukturen mit dem CPn0147-Antikörper -----	209
Abbildung 6.6: Infizierte HEp-2-Zellen mit verschiedenen transfiziert mit verschiedenen Transfektionskonstrukten -----	211
Abbildung 6.7: Kofärbung von IncA und Tip47 -----	211
Abbildung 6.8: Färbung von CPn0809 in der frühen Infektion -----	212

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.4.1: Nadelspitzenkomplexe und Translokationssporen-Proteine (TPP) pathogener Bakterien -	19
Tabelle 2.1.1: Verwendete Chemikalien, biologische Reagenzien und Antibiotika -----	38
Tabelle 2.2.1: Agarosen zur Protein- und Antikörperaufreinigung-----	40
Tabelle 2.3.1: Verwendete Einweg-Gebrauchsartikel-----	40
Tabelle 2.4.1: Verwendete Geräte und Maschinen -----	41
Tabelle 2.5.1: Verwendete Lösungen und Puffer -----	42
Tabelle 2.7.1: Verwendete Primärantikörper-----	45
Tabelle 2.7.2: Verwendete Sekundärantikörper zur Markierung von Primärantikörpern -----	46
Tabelle 2.8.1: Verwendete Farbstoffe für die Mikroskopie-----	47
Tabelle 2.9.1: Verwendete Kits -----	47
Tabelle 2.10.1: Verwendete DNS-Größenstandards für Agarosegele -----	47
Tabelle 2.10.2: Verwendete Protein-Größenstandards für SDS-Gele -----	47
Tabelle 2.11.1: Oligonukleotide zur Amplifikation von DNS-Abschnitten -----	48
Tabelle 2.11.2: Zur Identifizierung positiver Klone verwendete Oligonukleotide-----	49
Tabelle 2.11.3: Verwendete Oligonukleotide zur Sequenzierung neuer Vektorkonstrukte -----	50
Tabelle 2.12.1: Verwendete Plasmide und Vektoren-----	50
Tabelle 2.14.1: Quantitative Zusammensetzung der Aminosäuremischung-----	55
Tabelle 3.5.1: Zusammensetzung verschiedener PCR-Ansätze-----	66
Tabelle 3.5.2: Bedingungen für die PCR mit der <i>Pfx</i> - oder <i>Taq</i> -Polymerase -----	66
Tabelle 3.5.3: Ansatz und Bedingungen einer PCR auf Hefezellen-----	66
Tabelle 3.7.1: Zusammensetzung von Trenngelen verschiedener Prozentigkeit -----	76
Tabelle 3.7.2: Zusammensetzung eines Sammelgels-----	76
Tabelle 3.7.3: Far-Westernblot Puffer mit verschiedenen Guanidin-HCl Konzentrationen -----	79
Tabelle 4.1: Ergebnisse der Proteinsequenzvergleiche verschiedener Translokon-Chaperone-----	91
Tabelle 4.2: Verwendete Marker verschiedener Wirtszellorganellen-----	129

Danksagung

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt und begleitet haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. J. H. Hegemann für die Überlassung des interessanten Themas und für die Möglichkeit an seinem Institut zu arbeiten bedanken. Ferner bedanke ich mich bei ihm für die vielen Gelegenheiten des akademischen Austausches mit nationalen und internationalen Kollegen, die er mir ermöglichte und die die Grenzen meines wissenschaftlichen Denkens erweiterten.

Ich danke auch Herrn Professor Dr. H. Aberle sehr für die bereitwillige Übernahme des Koreferats.

Frau Professor U. Fleig möchte ich meinen Dank aussprechen, da sie vor allem zum Ende dieser Arbeit immer ein offenes Ohr hatte und den ein oder anderen Stein ins Rollen brachte.

Natürlich möchte ich mich auch ganz besonders bei meinen Laborkollegen bedanken. Ich hoffe auch in Zukunft immer wieder so großartige Kollegen zu haben wie euch! Ich bedanke mich bei allen meinen aktuellen Kollegen: Katja, Jan, Alison, Sören, Corinna, Visnja, Natascha, Marina, Anand, Irina, Eva, Inge und Susanne. Und ich danke meinen ehemaligen Kollegen Anne, Frauke, Stefanie, Sandra, Sven Boris, Boris, Ben, Rafat und Gido.

Ein riesiges Dankeschön gilt den lieben Menschen, denen ich während meines Studiums und der Doktorarbeit begegnet bin und ohne die ein wichtiger Abschnitt in meinem Leben nicht halb so wunderbar gewesen wäre. Dafür danke ich Sonja, Sabine, Daniela, Katja, Sebastian und Tim. Die vielen Unternehmungen, Reisen, Spieleabende, natürlich auch so mancher Unsinn und ganz besonders die vielen Gespräche sind die schönsten Erinnerungen.

Ich danke Michaela, Katja, Julia und Petra, die mich schon lange begleiten und deren Freundschaft mir das Wertvollste ist.

Vor allem möchte ich meiner Familie Danken. Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir das Studium fernab der Heimat ermöglichten, mich immer unterstützten und begleiteten. Danke, dass ihr immer an meiner Seite gestanden habt! Meinem Freund Guido danke ich für die Unterstützung, die Geduld und den großen Rückhalt in schwierigen Momenten. Danke für deine Liebe!

Eidesstattliche Erklärung

Düsseldorf, Mai 2015

Ich versichere 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.

Astrid C. Engel

Digitaler Anhang

Alle Translocon B-Proteine im Vergleich:

CPn0808 und YopB:

Range 1: 150 to 272 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	15.4 bits(28)	3.5	Compositional matrix adjust.	34/123(28%)	56/123(45%)	11/123(8%)
Query	196	TEAQAKQSLISGIVN-IVGF-----TVSVGAGIFSAAKGATS-ALKSASFAKETGASAAG				248
		TE AKQ SG+ + I G+ +V +GA + ++ GA + A+ AS A				
Sbjct	150	TEENARQVKKSGMASKIFGWLSAIASVVIGAIMVASGVGAVAGAMMIASGVIGMANMAVK				209
Query	249	GAASKALTSASS-SVQQTMASTAKAATTAASSA---GSAATKAAAANLTDMAAAAASKMAS				304
		AA L S + V + + + A T S+ G +A K A++ + A + +A+				
Sbjct	210	QAAEDGLISQEQAMQVLGPIILTAIEVALTVVSTVMTFGGSALKCLADIGAKLGANTASLAA				269
Query	305	DGA 307				
		GA				
Sbjct	270	KGA 272				

CPn0808 und YopD:

Range 1: 62 to 77 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	14.2 bits(25)	5.8	Compositional matrix adjust.	8/16(50%)	11/16(68%)	3/16(18%)
Query	327	KVSRGMNVV---KTQG 339				
		K S+G+NV K+QG				
Sbjct	62	KPSQGINVALLSKSQG 77				

CPn0808 und PopB:

Range 1: 328 to 349 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	18.9 bits(37)	0.29	Compositional matrix adjust.	7/22(32%)	13/22(59%)	0/22(0%)
Query	189	ANHQASATEAQAKQSLISGIVN 210				
		AN QA E++A + + G++				
Sbjct	328	ANRQADVQESRADLTLQGVIE 349				

CPn0808 und PopD:

Range 1: 195 to 233 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	18.9 bits(37)	0.19	Compositional matrix adjust.	12/39(31%)	22/39(56%)	0/39(0%)
Query	400	SSVYGQQAGQAGQLQEQAMQSFNTALQTLQNIADSQTQT 438				
		SV + AG+A + + A+Q NT +Q+ +A++ Q				
Sbjct	195	DSVALRAAGRAFESRNGALQVANTVIQSFVQMANASVQV 233				

CPn0808 und SipD:

Range 1: 172 to 188 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.9 bits(32)	1.3	Compositional matrix adjust.	9/17(53%)	11/17(64%)	0/17(0%)
Query	348	NALSSSMQMSQLMHGLT	364		
		NALS S+ S L G+T			
Sbjct	172	NALSGSISQSALQLGIT	188		

CPn0808 und SseC:

Range 1: 28 to 142 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.9 bits(32)	1.4	Compositional matrix adjust.	35/146(24%)	60/146(41%)	31/146(21%)
Query	59	ASAQSTGKKEATSSTTKSSKGEKSEKSGKSKSSTSVASASETATAQAVQGPGLRQNNYD	118		
		S+ S GK++ ++T SGK S+ AS A Q + G N+			
Sbjct	28	VSSGSLGKRQHRVNSTFGDGNAAACLLSGK----ISLQEAS-NALKQLLDAVPG----NHK	78		
Query	119	SPSLPTPEAQTINGIVLKKMGTLALLGLVMTLMANAAGESWKASFQSQNQAIRSQVES	178		
		PSLP QT N VL ++ + L++ + N A Q++ Q+E A			
Sbjct	79	RPSLPDF-LQT-NPAVL-----SMMMTSLILNVFGNNA-----QSLCQQLERA	119		
Query	179	PAIGEAIKRQANHQASATEAQAKQSL	204		
		+ A++ N Q + Q +++++			
Sbjct	120	TEVQNALR---NKQVKEYQEIQKAI	142		

CPn0808 und SseD:

Range 1: 149 to 161 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.2 bits(30)	0.97	Compositional matrix adjust.	6/13(46%)	9/13(69%)	0/13(0%)
Query	413	LQEQAMQSFNTAL	425		
		LQ+ QS+N +L			
Sbjct	149	LQQNGAQSYNKSL	161		

Range 2: 12 to 18 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.2 bits(30)	1.0	Compositional matrix adjust.	5/7(71%)	6/7(85%)	0/7(0%)
Query	119	SPSLPTP	125		
		+PSL TP			
Sbjct	12	APSLLTTP	18		

CPn0808 und EspB:

Range 1: 80 to 197 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
-------	--------	--------	------------	-----------	------

26.2 bits(56) 0.001 Compositional matrix adjust. 46/155(30%) 65/155(41%) 51/155(32%)

Query 161 KASFQSQNQAIRSQVESAPA--IGEAIKRQANHQASATEAQAKQSLISGIVNIVG-FTVS 217
 KA F+SQN+AI + A A IG AI S ++ I+G F

Sbjct 80 KAVFESQNKAIDEKKAGATAALIGGAI-----SSVLGILGSF--- 116

Query 218 VGAGIFSAAKGATSALKSASFALAKETGASAAGGAASKALTSASSSV-----QQT 266
 A I SA KGA+ + A+ A++KAL AS + QQT+

Sbjct 117 --AAINSATKGASDVAQQAASAKSIGTVSEASTKALAKASEGIADAADDAAGAMQQT 174

Query 267 ASTAKAATTAASSAGSAAATKAAAANLTDMAAAASK 301
 A+ AKAA+ + +TDD+A +A K

Sbjct 175 ATAACAASRTSG-----ITDDVATSAQK 197

Range 2: 68 to 77 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.8 bits(29)	2.4	Compositional matrix adjust.	5/10(50%)	8/10(80%)	0/10(0%)
Query 413	LQEQAMQSFN 422				
	LQ+Q QS++				
Sbjct 68	LQKQLAQSYD 77				

CPn0808 und EspD:

Range 1: 158 to 231 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
28.5 bits(62)	3e-04	Compositional matrix adjust.	20/74(27%)	33/74(44%)	0/74(0%)
Query 185	IKRQANHQASATEAQAKQSLISGIVNIVGFTVSVGAGIFSAAKGATSALKSASFALAKETGA 244 K+Q Q A E K ++ + +G + A IF+ A A A+ + + A +T				
Sbjct 158	FKKQLEEQQKAEKQKSKIVGQVFGWLGVAATAIAAIFNPALWAVVAISATAMALQTAV 217				
Query 245	SAAGGAASKAL TSA 258 G A +AL +A				
Sbjct 218	DVMGDDAPQALKTA 231				

Range 2: 68 to 86 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
19.6 bits(39)	0.19	Compositional matrix adjust.	9/19(47%)	12/19(63%)	0/19(0%)
Query 303	ASDGASKASGGLFGEVLNK 321 A D SK GG+ GEV ++				
Sbjct 68	AEDVLSKLFGGISGEVTSR 86				

CPn0808 und IpaB:

Range 1: 532 to 551 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
17.7 bits(34)	1.1	Compositional matrix adjust.	7/20(35%)	12/20(60%)	0/20(0%)
Query 396	LKQMSVYGGQAGQAGQLQE 415 ++Q+S + + GQLQE				
Sbjct 532	VEQLSKYISEAIEKFGQLQE 551				

CPn0808 und IpaC:

Range 1: 336 to 367 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.6 bits(26)	6.7	Compositional matrix adjust.	15/50(30%)	20/50(40%)	18/50(36%)
Query	388	QAEAQAQAEVLKQMSVVYQQAGQAGQLQEAMQSFNTALQTLQNIADSQTQ			437
		QAE ++V K+ S	Q+ N +Q L NI DS Q		
Sbjct	336	QAEESQVSKEAS-----QATNQLIQKLLNIIDSINQ			367

CPn0809 und YopB:

Range 1: 222 to 282 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
23.5 bits(49)	0.014	Compositional matrix adjust.	22/63(35%)	32/63(50%)	3/63(4%)
Query	250	MDTVNTVMIASVVAITVISIVAAIFTCGAGLAGLA-AGAAVGAAGAAAGAAATTVAT			308
		M + ++ A+ VA+TV+S V	G+ L LA GA +GA A AA A +		
Sbjct	222	MQVLGPILTAIEVALTVVSTVMTF--GGSALKCLADIGAKLGANTASLAAKGAEFSAKVA			279
Query	309	QIT 311			
		QI+			
Sbjct	280	QIS 282			

Range 2: 79 to 211 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
19.6 bits(39)	0.18	Compositional matrix adjust.	42/145(29%)	64/145(44%)	26/145(17%)
Query	192	TLGEATKSALSNYAS-----TQAQAD----QTNKL--GLE--KQAIKI-DKEREEYQEMK			237
		T G A +SNY S T A D + KL LE ++ IKI D +R Q MK			
Sbjct	79	TRGTAGSQLISNYVSVLTNFTLASPDTFEIELGKLVSNLEEVKDKIADIQRLHEQNMK			138
Query	238	AAEQSKDLEGTMDTVNTVMIASVVAITVISIVAAIFTCGAGLAGLAAGAAVGAAGAAAGGA			297
		E+ + ++ T + V + + + IF + +A + GA + A+ G			
Sbjct	139	KIEENQEKIKETEENAKQVKKS-----GMASKIFGWLSAIASVVIGAIMVASGVGAV			190
Query	298	AGAAAATTVATQITVQAVVQAVKQA 322			
		AGA +A+ + A + AVKQA			
Sbjct	191	AGA---MMIASGVIGMANM-AVKQA 211			

Range 3: 275 to 297 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
19.6 bits(39)	0.21	Compositional matrix adjust.	10/23(43%)	14/23(60%)	0/23(0%)
Query	448	ASKIASKQTGESNEMTQKATKLG 470			
		++K+A TG SN + TKLG			
Sbjct	275	SAKVAQISTGISNTVGNVTKLG 297			

Range 4: 85 to 193 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.1 bits(35)	0.63	Compositional matrix adjust.	25/117(21%)	52/117(44%)	22/117(18%)
Query	385	SSLTSKVVTVGVVVVAAAPALGKGMQLSEMQQNVAQFQKEVQKLAQAADMISMFTQF			444
		S L S +V+V +A+P +++L ++ N+ + +K++ AD+ + Q			
Sbjct	85	SQLISNYVSVLTNFTLASP----DTFEIELGKLVSNLEEVKDKI----KIADIQRLHEQN			136
Query	445	WQQASKIASK-QTGESNEMTQKATKLGAIKAYAAIS-----GAIAGA 487			
		++ + K + E N K + + ++I +AI+ GA+AGA			
Sbjct	137	MKKIEENQEKIKETEENAKQVKKSGMASKIFGWLSAIASVVIGAIMVASGVGAVAGA 193			

CPn0809 und YopD:

Range 1: 110 to 163 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.9 bits(37)	0.24	Compositional matrix adjust.	18/54(33%)	28/54(51%)	0/54(0%)
Query	271	AAIFTCGAGLAGLAAGAAGAAAGGAAGAAAATTVATQITVQAVVQAVKQAVI	324		
		AAI +A + +GA + A A + AA +TV+ ++ V+ VKQ I			
Sbjct	110	AAITAQKEQVAEMVSGAKLMIAMAVVSGIMAATSTVASAFSIAKEVKIVKQEIQI	163		

Range 2: 125 to 140 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
17.3 bits(33)	0.67	Compositional matrix adjust.	7/16(44%)	12/16(75%)	0/16(0%)
Query	470	GAQILKAYAAISGAIA	485		
		GA+++ A A +SG +A			
Sbjct	125	GAKLMIAMAVVSGIMA	140		

Range 3: 56 to 63 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
17.3 bits(33)	0.83	Compositional matrix adjust.	5/8(63%)	6/8(75%)	0/8(0%)
Query	164	ETPELPKP	171		
		+ PEL KP			
Sbjct	56	QVPELIK P	63		

CPn0809 und PopB:

Range 1: 124 to 147 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.8 bits(29)	3.2	Compositional matrix adjust.	10/27(37%)	14/27(51%)	3/27(11%)
Query	29	QQDKLSGNETKQIQQTRQGKNTMESD	55		
		QQ KL E I+Q R+ +ME +			
Sbjct	124	QQKKLKLTE---IEQARKQNLQKMEDN	147		

CPn0809 und PopD:

Range 1: 91 to 119 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
19.6 bits(39)	0.14	Compositional matrix adjust.	12/33(36%)	18/33(54%)	4/33(12%)
Query	26	GVPQQDKLSGNETKQIQQTRQGKNTMESDATI	58		
		GV Q+D NE + I ++ + EM S AT+			
Sbjct	91	GVLQRD----NENQSI IHAQKAQVDEMRS GATL	119		

Range 2: 27 to 38 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.9 bits(32)	0.85	Compositional matrix adjust.	7/12(58%)	9/12(75%)	0/12(0%)

Query 426 KEVGKLQAAADM 437
 + VG QAAAD+
 Sbjct 27 RSVGTPQAAADL 38

Range 3: 83 to 94 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.4 bits(28)	3.0	Compositional matrix adjust.	6/12(50%)	9/12(75%)	0/12(0%)
Query 421	VAQFQKEVGKLQ	432			
	+AQ +E+G LQ				
Sbjct 83	IAQKARELGVLQ	94			

Cpn0809 und SipB:

Range 1: 251 to 394 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
39.3 bits(90)	2e-07	Compositional matrix adjust.	46/161(29%)	85/161(52%)	18/161(11%)
Query 177	SEVIEIGLALAKAIQTLGEATKSALSNYASTQAQADQTNKLGLEKQAIKIDKEREYQEM	236			
	S V + + +A I+ +G+ T+ +L N + N L +QA +++K+ E+QE				
Sbjct 251	SNVARLTMLMAMFIEIVGKNTTEESLQNDLAL-----FNALQEGRQA-EMEKKSAEFQE-	302			
Query 237	KAAEQKSKDLEGTMDTVNTVMIAVSVVAITVISIVAAIFTGAGLAGLAAGAAVGGAAAAGG	296			
	+K+++ M + V+ A+ +T++S+VAA+FT GA L A AAVG A				
Sbjct 303	--ETRKAEEETNRIMGCIGKVLGAL---LTIIVSVVAAVFTGGASL----ALAAVGLAVMVA	353			
Query 297	AAGAAAATTVA-TQITVQAVVQAVKQAVITAVRQAITAAIK	336			
	AAT V+ Q + +++ V + ++ + +AIT A++				
Sbjct 354	DEIVKAATGVSFIQQALNPIMEHVLKPLMELIGKAITKALE	394			

Range 2: 280 to 306 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
19.2 bits(38)	0.41	Compositional matrix adjust.	9/27(33%)	17/27(62%)	0/27(0%)
Query 404	ALGKGIQMQLSEMQQNVAQFQKEVGK	430			
	AL + + + +EM++ A+FQ+E K				
Sbjct 280	ALFNALQEGRQAEMEKKSAEFQEETRK	306			

Range 3: 28 to 47 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.0 bits(27)	7.0	Compositional matrix adjust.	7/20(35%)	12/20(60%)	0/20(0%)
Query 230	REEYQEMKAAEQKSKDLEGT	249			
	R+ +KAA++ KD+ T				
Sbjct 28	RKNTDFLKAADKAFKDVVAT	47			

CPn0809 und SipC:

Range 1: 355 to 399 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
23.1 bits(48)	0.016	Compositional matrix adjust.	14/45(31%)	27/45(60%)	0/45(0%)
Query 443	QFWQQASKIASKQTGESNEMTQKATKLGAIILKAYAAISGAIAGA	487			

Sbjct 355 Q Q +++AS + E+ E ++K+T L ++LK +I+ + A A
 QISQVNNRVASTASDEARESSRKSTSLIQEMLKTMESINQSKASA 399

Range 2: 338 to 391 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
19.2 bits(38)	0.29	Compositional matrix adjust.	24/74(32%)	37/74(50%)	22/74(29%)
Query 58	IAGASGKDKTSSTTKTETAPQQGVAAGKESSESQKAGADTGVSGAAATTASNTATKIAMQ				117
	IAGASG+		AA +E SE Q + + V	A+TAS+ A + + +	
Sbjct 338	IAGASGQ-----YAATQERSEQQISQVNNRV----			ASTASDEARESSRK	377
Query 118	TS--IEEASKSMES	129			
	++ I+E K+MES				
Sbjct 378	STSLIQEMLKTMES	391			

Range 3: 336 to 389 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.8 bits(29)	2.8	Compositional matrix adjust.	15/56(27%)	27/56(48%)	2/56(3%)
Query 295	GGAAGAAAATTVATQITVQAVVQAVKQAVITAVRQAITAAIKAAVKSGIKAFIKTL				350
	GG AGA+		+ + Q + Q + TA +A ++ K+ S I+ +KT+		
Sbjct 336	GGIAGASGQYAATQERSEQQISQVNNRVASTASDEARESSRKST--SLIQEMLKTM				389

Range 4: 81 to 103 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.4 bits(28)	3.7	Compositional matrix adjust.	7/23(30%)	13/23(56%)	0/23(0%)
Query 442	TQFWQQASKIASKQTGESNEMTQ				464
	T Q + +A+ T ++NE+ Q				
Sbjct 81	TDMNQDLNALANNVTTKANEVVQ				103

Range 5: 62 to 80 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #5

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.0 bits(27)	4.9	Compositional matrix adjust.	6/19(32%)	13/19(68%)	0/19(0%)
Query 323	VITAVRQAITAAIKAAVKS				341
	V+T IT+ +KA++++				
Sbjct 62	VLTQTPGTITSFLKASIQN				80

Range 6: 62 to 67 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #6

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.0 bits(27)	5.3	Compositional matrix adjust.	5/6(83%)	5/6(83%)	0/6(0%)
Query 19	VLTSTP				24
	VLT TP				
Sbjct 62	VLTQTP				67

CPn0809 und SseC:

Range 1: 126 to 163 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.2 bits(30)	2.6	Compositional matrix adjust.	13/38(34%)	18/38(47%)	2/38(5%)
Query 451	IASKQTGESNEMTQKATKLGAIQILKA--YAAISGAIAG				486
	+ +KQ E E QKA + + KA + AI I G				

Sbjct 126 LRNKQVKEYQEIQKAIEQEDKARKAGIFGAIFDWITG 163

Range 2: 160 to 191 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.2 bits(30)	2.9	Compositional matrix adjust.	9/32(28%)	15/32(46%)	0/32(0%)
Query 391	WVTVGVGVVVAAPALGKIMQQLSEMQQNVA		422		
	W+T V+ A + +G + +EM VA				
Sbjct 160	WITGIFETVIGALKVVEGFLSGNPAEMASGVA		191		

Range 3: 250 to 259 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.8 bits(29)	3.7	Compositional matrix adjust.	7/10(70%)	8/10(80%)	0/10(0%)
Query 95	ADTGVSGAAA	104			
	A G+SGAAA				
Sbjct 250	ATRGLSGAAA	259			

Range 4: 202 to 218 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.6 bits(26)	9.6	Compositional matrix adjust.	8/17(47%)	10/17(58%)	1/17(5%)
Query 92	KAGADTG-VSGAAATTA	107			
	KAGA+T + GA T				
Sbjct 202	KAGAETAMMCGADHDTC	218			

CPn0809 und SseD:

Range 1: 96 to 133 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
21.2 bits(43)	0.029	Compositional matrix adjust.	15/39(38%)	20/39(51%)	5/39(12%)
Query 268	SIVAAIFTGAGLAG----LAAGAAVGAAAAGGAAGAAA	302			
	++++ + T G G G L AG AVG AGG G A				
Sbjct 96	AMLSGLVTIIGLGA VGGETGLIAGQAVG-HTAGGVMGLGA	133			

Range 2: 163 to 176 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.4 bits(28)	1.9	Compositional matrix adjust.	6/14(43%)	11/14(78%)	0/14(0%)
Query 461	EMTQKATKLGAIIL	474			
	E+ +KAT++ QI+				
Sbjct 163	EIMEKATEIMQQII	176			

CPn0809 und EspB:

Range 1: 112 to 127 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.1 bits(35)	0.48	Compositional matrix adjust.	8/16(50%)	12/16(75%)	0/16(0%)
Query 473	ILKAYAAISGAIAGAA	488			

Sbjct 112 IL ++AAI+ A GA+
ILGSFAAINSATKGAS 127

CPn0809 und EspD:

Range 1: 143 to 176 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.8 bits(29)	3.1	Compositional matrix adjust.	11/34(32%)	16/34(47%)	0/34(0%)
Query 204	YASTQAQADQTNKLGLEKQAIKIDKEREYQEMK		237		
	YA Q +A L +KQ + K E+ Q+ K				
Sbjct 143	YADGQNKALDNKTLEFQKLEEQKAEKAQKSK		176		

Range 2: 328 to 345 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.6 bits(26)	6.0	Compositional matrix adjust.	6/18(33%)	9/18(50%)	0/18(0%)
Query 36	NETKQIQQTRQGKNTMEME		53		
	N T+Q + Q E+E				
Sbjct 328	NLTRQSEYLSQSAKAELE		345		

Range 3: 316 to 321 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.6 bits(26)	7.1	Compositional matrix adjust.	4/6(67%)	6/6(100%)	0/6(0%)
Query 14	NIMSQV		19		
	N++SQV				
Sbjct 316	NVLSQV		321		

CPn0809 und IpaB:

Range 1: 65 to 165 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
35.4 bits(80)	4e-06	Compositional matrix adjust.	31/104(30%)	51/104(49%)	15/104(14%)
Query 166	PELPKPGVTPRSEVIEIQLALAKAIQTLGEATKSALSNYAS---TQAQA-----DQ		213		
	PEL P S ++ L + IQ LGE + +AL+N + +Q QA D+				
Sbjct 65	PELKAPKSLNASS--QLTLLIGNLIQILGEKSLTALTNTKITAWKSQQARQQKNLEFSDK		122		
Query 214	TNKLGLEKQAIKIDKEREYQEMKAAEQKSKDLEGTMDTVNTVM		257		
	N L E + + D E+ + ++K A+ K KDLE ++ + T +				
Sbjct 123	INTLLSETEGLTRDYEK-QINKLKNADSKIKDLENKINQIQTRL		165		

Range 2: 253 to 331 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
26.9 bits(58)	0.002	Compositional matrix adjust.	26/97(27%)	51/97(52%)	23/97(23%)
Query 186	LAKAIQTLGEATKSALSN----YASTQAQADQTNKLGLEKQAIKIDKEREYQEMKAAE-		240		
	+A IQ +G+ + +L N + S Q E + +++++ +EY AAE				
Sbjct 253	MATFIQLVQGNNEESLKNLDLALFQSLQ-----ESRKTEMERKSDEY----AAEV		297		
Query 241	QKSKDLEGTMDTVNTVMIAVSVVAITVISIVAAIFTG		277		
	+K+++L M V ++ A+ +T+++VAA F+ G				

Sbjct 298 RKAEEELNRVMGCVGKILGAL---LTIVSVVAAAFSGG 331

Range 3: 446 to 499[Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.8 bits(29)	4.0	Compositional matrix adjust.	14/60(23%)	30/60(50%)	10/60(16%)
Query 343	IKAFIKTLVKAIKAIKAIKSKGISKV--F--AKGTQMIAKNFKLSKVISSLTSKWVTVGVGV				398
	I F+K + I+ ++++ F A G ++I+K ++IS+ ++ V +G V				
Sbjct 446	IPKFLKNFSSQLDDLITNAVARLNKFLGAAGDEVISK-----QIISTHLNQAVLLGESV				499

Range 4: 86 to 104[Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.6 bits(26)	9.4	Compositional matrix adjust.	6/19(32%)	12/19(63%)	0/19(0%)
Query 315	VVQAVKQAVITAVRQAITA 333				
	++Q + + +TA+ ITA				
Sbjct 86	LIQILGEKSLTALTNKITA 104				

CPn0809 und IpaD:

Range 1: 75 to 189[Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
23.9 bits(50)	0.008	Compositional matrix adjust.	28/115(24%)	55/115(47%)	19/115(16%)
Query 220	EKQAIKIDKEREYQEM--KAAEQKSKDL-----EGTMD----TVNTVMIAVSVAI				264
	+ Q +K+ ++ + E+ + ++K KDL E T+D + N V + +SVA+				
Sbjct 75	DDQLLKLSEQVQHDSEI IARLTDKMKDLSEMSHTLTPENTLDISSLSSNAVSLIISVAV				134
Query 265	TVISIVAAIFTCGAGLAGLAAGAAVGA AAAA----GGAAGAAAATTVATQITVQAV				315
	+ ++ A G+ L+ +A A AA G AA +++ T TQ+ + +				
Sbjct 135	LLSALRTAETKLSQLSLIAFDATKSAENIVRQGLAALSSSITGAVTQVGTGI				189

Range 2: 261 to 304[Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.4 bits(28)	3.9	Compositional matrix adjust.	13/44(30%)	20/44(45%)	0/44(0%)
Query 122	EASKSMESTLESLSLSAAQMKEVEAVVVAALSGKSSGSAKLET				165
	E S+ S SLQ Q + E ++A ++ G A +ET				
Sbjct 261	EHKTSLSPPDISLQDKIDTQRRTYELNLSAQKQONIGRATMET				304

Range 3: 156 to 164[Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.2 bits(25)	10.0	Compositional matrix adjust.	6/9(67%)	7/9(77%)	0/9(0%)
Query 195	EATKSALSN 203				
	+ATKSA N				
Sbjct 156	DATKSAAEN 164				

YopB und YopD:

Range 1: 117 to 155[Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	13.5 bits(23)	9.2	Compositional matrix adjust.	15/46(33%)	21/46(45%)	7/46(15%)
Query	155	KQVKKSGMASKIFGWLSAIASVVIGAIMVASGVGAVAGAMMIASGV		200		
		+QV + +K+ IA V+ IM A+ VA A IA V				
Sbjct	117	EQVAEMVSGAKLM-----IAMAVVSGIMAATST--VASAFSIAKEV		155		

YopB und PopB:

Range 1: 52 to 390 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	260 bits(665)	8e-87	Compositional matrix adjust.	153/357(43%)	233/357(65%)	22/357(6%)
Query	49	GVQLPAPLAVVASQVTEGQQQEITKLLSVTRGTA-GSQLISNYVSVLTFNFTLASPDTFE		107		
		GV L P A ++ + EI L+++V Q++ S L + L SP FE				
Sbjct	52	GVALTPPSAASQORLEVANRAEIASLVQAVGEDVGLARQVVLAGASTLLSAGLMSPPQAFE		111		
Query	108	IELGKLVSNLEEVKDKIADIQRLHEQNMKKIEENQEKIKETEENAKQVKKSGMASKIF		167		
		IEL K+ +E +K +K+ +I+++ +QN++K+E+NQ+KI+E+EE AK+ +KSG+A+KIF				
Sbjct	112	IELAKITGEVENQKKLKLTEIEQARKQNLQKMEDNQKIRESEEAKEAQKSGLAAKIF		171		
Query	168	GWLSAIASVVIGAIMVASGVGAVAGAMMIASGVIGMANMAVKQAAEDGLISQEAMQVLGP		227		
		GW+SAIAS+++GAIMVA+GVGA AGA+MIA GV+G+ + +V+QAA DGLIS+E M+ LGP				
Sbjct	172	GWISAIASIIIVGAIMVATGVGAAAGALMIAGGVMGVVSQVQAAADGLISKEVMEKLG		231		
Query	228	ILTAIEVALTVVSTVMTFGGSALKCLADIGAKLGANTASLAAKGAEFSAKVAQISTGISN		287		
		L IE+A+ +++ V++FGGSA+ LA +GAK+G K AE +A +A				
Sbjct	232	ALMGIEMAVALLAAVVSFGGSAGVGLARLGAKIG-----GKAAEMTASLA-----		276		
Query	288	TVGNAVTKLGGSFGL---TMSHVIRTGSQATQVAVGVSGITQTINNKQADLQHNAD		344		
		+ V LGG FGSL ++SH ++ G Q + + + V +G Q ++ QA + AD				
Sbjct	277	---SKVADLGGKFGSLAGQSLSHSLKLVQVSDLTLDVANGAAQATHSGFQAKAANRQAD		333		
Query	345	LALNKADMAALQSIIDRLKEELSHLSESHQQVMELIFQMINAKGDMHLNLAGRPHTV		401		
		+ ++AD+ LQ +I+RLKEELS + E+ Q++ME IF M+ AKG+ LHNL+ RP +				
Sbjct	334	VQESRADLTLTQGVIERLKEELSRMLEAFQEMERIFAMLQAKGETLHNLSRPAAI		390		

YopB und PopD:

Range 1: 122 to 137 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	17.7 bits(34)	0.50	Compositional matrix adjust.	8/16(50%)	13/16(81%)	0/16(0%)
Query	180	AIMVASGVGAVAGAMM		195		
		A+ V +GVGA+A A++				
Sbjct	122	AMAVIAGV GALASAVV		137		

Range 2: 119 to 138 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	16.5 bits(31)	0.99	Compositional matrix adjust.	9/22(41%)	14/22(63%)	2/22(9%)
Query	181	IMVASGVGAVAGAMMIASGVIG		202		
		+M+A V +AG +AS V+G				
Sbjct	119	LMIAMAV--IAGVGALASAVVG		138		

Range 3: 211 to 232 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	15.0 bits(27)	2.9	Compositional matrix adjust.	9/22(41%)	14/22(63%)	4/22(18%)
Query	192	GAMMIASGVIG----	MANMAVK	209		
		GA+ +A+ VI	MAN +V+			
Sbjct	211	GALQVANTVIQSFVQMANASVQ		232		

YopB und SipB:

Range 1: 295 to 360 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	22.3 bits(46)	0.035	Compositional matrix adjust.	21/69(30%)	33/69(47%)	5/69(7%)
Query	138	KKIEENQEKIKETEENAKQVKKSGMASKIFGWLSAIASVVIGAIM--	VASGVGAVAGAMM	195		
		KK E QE+ ++ EE + + G K+ G L I SVV	+ + AV A+M			
Sbjct	295	KKSAEFQEETRKAETNRIM---GCIGKVLGALLTIVSVVAAVFTGGASLALAAVGLAVM		351		
Query	196	IASGVIGMA	204			
		+A ++ A				
Sbjct	352	VADEIVKAA	360			

YopB und SipC:

Range 1: 383 to 397 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	16.2 bits(30)	1.7	Compositional matrix adjust.	6/15(40%)	10/15(66%)	0/15(0%)
Query	69	QEITKLLLESVTRGTA	83			
		QE+ K +ES+ + A				
Sbjct	383	QEMLKTMESINQSKA	397			

Range 2: 229 to 241 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	14.2 bits(25)	8.3	Compositional matrix adjust.	5/13(38%)	8/13(61%)	0/13(0%)
Query	261	GANTASLAAKGAE	273			
		G N+ L A+G +				
Sbjct	229	GQNSVKLGAEQVD	241			

YopB und SseC:

Range 1: 129 to 211 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	44.7 bits(104)	2e-09	Compositional matrix adjust.	27/87(31%)	46/87(52%)	10/87(11%)
Query	138	KKIEENQEKIKETEENAKQVKKSGMASKIFGWLSAIASVVIGAIMV	VASGVGA-----VA	191		
		K+++E QE+I++ E + +K+G+ IF W++ I VIGA+ V G +	+ +			
Sbjct	129	KQVKEYQEIQKAIEQEDKARKAGIFGAIQDQWITGIFETVIGALKVVEGFLSGNPAEMAS		188		
Query	192	GAMMIASGVIGMANMAVKQAEDGLIS	218			
		G +A+G GM VK AE ++				
Sbjct	189	GVAYMAAGCAGM----VKAGAETAMMC	211			

Range 2: 415 to 453 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
17.7 bits(34)	0.87	Compositional matrix adjust.	11/41(27%)	21/41(51%)	2/41(4%)
Query 109	ELGKLVSNLEEVKDKIADIQRLHEQNMMKIEENQEKIKE		149		
	E K+ +E++ + D +N KKIE Q++++E				
Sbjct 415	EKAKIEKKIEQLITQQRFLDFIMQQTENQKKIE--QKRLEE		453		

Range 3: 437 to 467 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.2 bits(30)	2.1	Compositional matrix adjust.	13/37(35%)	18/37(48%)	8/37(21%)
Query 326	ITQTINNK--QADLQHNNADLALNKADMAALQSIID		360		
	+ QT N KK Q L+ L K AAL+ ++D				
Sbjct 437	MQQTENQKKIEQKRLEE-----LYKGSAAALRDVLD		467		

Range 4: 43 to 67 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.6 bits(26)	7.4	Compositional matrix adjust.	10/27(37%)	12/27(44%)	2/27(7%)
Query 244	TFGGSALKCLADIGAKLGANTASLAAK		270		
	TFG CL + K+ AS A K				
Sbjct 43	TFGDGNAACL--LSGKISLQEASNALK		67		

YopB und SseD:

Range 1: 39 to 189 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
25.0 bits(53)	0.001	Compositional matrix adjust.	38/158(24%)	71/158(44%)	12/158(7%)
Query 104	DTFEIELGKLVSNLEEVKDKIADIQRLHEQNMMKIEENQEKIKETEENAKQVKKSGMA		163		
	D ++L +L L ++ + + + QRL + + + Q K + A + G				
Sbjct 39	DDIWMKLMELAKKLRDIMRSYNV-EKQRLAWELQVNVLQTMKTIDEAFRASMITAGGAM		97		
Query 164	SKIFGWLSAIASVVIGAIMVASGVGAVAGAMMIASGVIGM-ANMAVQAAEDGLIS---Q		219		
	LS + ++ +GA+ +G+ A A GV+G+ A +A +Q+ +D I+ Q				
Sbjct 98	-----LSGVLTIGLGAVGGGTGLIAGQAVGHTAGGVMGLGAGVAQRQSDQDKAIADLQO		151		
Query 220	EAMQVLGPILTAI-EVALTVVSTVMTFGGSALKCLADI		256		
	Q LT I E A ++ ++ G S + LA+I				
Sbjct 152	NGAQSYNKSLTEIMEKATEIMQQIIGVGSLLVTLAEI		189		

Range 2: 129 to 193 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
22.7 bits(47)	0.007	Compositional matrix adjust.	20/77(26%)	35/77(45%)	14/77(18%)
Query 320	VGVGSGITQ--TINNKKQADLQHNNADLALNKADMAALQSIIDRLKEELSHLSESHQQVM		377		
	+G+G+G+ Q + +K ADLQ N A QS L E + +E QQ++				
Sbjct 129	MGLGAGVAQRQSDQDKAIADLQONGA-----QSYNKSLEIMEKATEIMQQII		176		
Query 378	ELIFQMINAKGDMHLNL		394		
	+ ++ ++L L				
Sbjct 177	GVGSSLVTLAEILRAL		193		

Range 3: 14 to 25 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
-------	--------	--------	------------	-----------	------

16.2 bits(30) 0.94 Compositional matrix adjust. 6/12(50%) 8/12(66%) 0/12(0%)

Query 16 SLLPYVETPAPA 27
SLL TP+P+
Sbjct 14 SLLTPSSTPSPS 25

YopB und EspB:

Range 1: 43 to 110 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
19.6 bits(39)	0.13	Compositional matrix adjust.	14/71(20%)	41/71(57%)	3/71(4%)
Query 107	EIELGKLVSNLEEVVRKDIKIADIQRLHEQNMMKIEENQEKIKETEENAKQVKKSGMASKI				166
	+++ KL+ +++++ + + + + Q + + + + Q+ + E++ A KK+G + +				
Sbjct 43	RVDISKLLLEVQKLLREM-VTTLQDYLQKQLAQSIDIQKAVFESQNKAIDEKKAGATAAL				101
Query 167	FGWLSAIASVV	177			
	G AI+SV+				
Sbjct 102	IGG--AISSVL	110			

Range 2: 4 to 14 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.8 bits(29)	1.7	Compositional matrix adjust.	5/11(45%)	9/11(81%)	0/11(0%)
Query 338	LQHNNADLALN	348			
	+ +NNA +A+N				
Sbjct 4	IDNNAAIAVN	14			

Range 3: 234 to 256 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.0 bits(27)	3.9	Compositional matrix adjust.	10/24(42%)	13/24(54%)	1/24(4%)
Query 55	PLAVVASQVTEGQQQEITKLLSV	78			
	P VV S + EG + T + ESV				
Sbjct 234	PFIVVTS-LAEGTKTLPTTISESV	256			

YopB und EspD:

Range 1: 154 to 233 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
33.5 bits(75)	7e-06	Compositional matrix adjust.	24/80(30%)	46/80(57%)	5/80(6%)
Query 139	KIEENQEKIKETEENAKQVKKSGMASKIFGWL----SAIASVVIGAIMVASGVGAVAGAM				194
	K E +++++E ++ ++ +KS + ++FGWL +AIA++ A+ + A A A+				
Sbjct 154	KTLEFKKQLEEQKAEKAKQKSKIVGVVFGWLGVAATAIAAIFNPALWAVVAISATAMAL				213
Query 195	MIASGVIG-MANMAVKQAAE	213			
	A V+G A A+K AA+				
Sbjct 214	QTAVDVMGDDAPQALKTAAQ	233			

Range 2: 94 to 106 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.0 bits(27)	3.7	Compositional matrix adjust.	6/13(46%)	7/13(53%)	0/13(0%)
Query 9	RSTPVTGSLLPYV	21			

Sbjct 94 RST S PY+
RSTQNASSGYPYL 106

YopB und IpaB:

Range 1: 263 to 383 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	22.7 bits(47)	0.027	Compositional matrix adjust.	38/138(28%)	62/138(44%)	25/138(18%)
Query	115	SNLEEVKDKIADIQRLHEQNMKKIEENQEKIKETEENAKQVKKS-----GMASKIF				167
		+N E ++ D+ + Q L E ++E ++++E A +V+K+ G KI				
Sbjct	263	NNEESLKNLAL--FQSLQESRKTEME-----RKSDEYAAEVRKAEELNRVMGCVGKIL				314
Query	168	GWLSAIASVVIGAIMVASGVGAVAGAMMIASGVIGMANMAVKQAAEDGLISQEQAMQVLGP				227
		G L I SVV A+ A + A G+ M A+ QAA ++A L P				
Sbjct	315	GALLTIVSVV-----AAAFSGGASLALAAVGLALMVTDAIVQAATGNSFMEQA---LNP				365
Query	228	ILTA-IEVALTVVSTVMT 244				
		I+ A IE + ++S T				
Sbjct	366	IMKAVIEPLIKLLSDAFT 383				

YopB und IpaC:

Range 1: 158 to 219 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	20.4 bits(41)	0.097	Compositional matrix adjust.	19/70(27%)	31/70(44%)	11/70(15%)
Query	150	TEENAKQVKKSGMA---SKIFGWLSAIASVVIGAIMVASGVGAVAGAMMIASGVIGMANM				206
		T+ A+ + + G+A S I G ++ + IGA SG+ GA+ N+				
Sbjct	158	TKSAAENIVRQGLAALSSSITGAVTVQGITGIGAKKTHSGISDQKGAL-----RKNL				209
Query	207	AVKQAAEDGL 216				
		A Q+ E L				
Sbjct	210	ATAQSLEKEL 219				

Range 2: 76 to 110 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	18.1 bits(35)	0.49	Compositional matrix adjust.	11/38(29%)	21/38(55%)	3/38(7%)
Query	364	EELSHLSESHQVMEIIFQMINAKGDMHLNLAGRPHTV 401				
		++L LSE Q E+I ++ + K + +L+ HT+				
Sbjct	76	DQLLKLSEQVQHDSEI IARLTDKK---MKDLSEMSHTL 110				

Range 3: 221 to 247 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	16.9 bits(32)	1.1	Compositional matrix adjust.	13/42(31%)	17/42(40%)	15/42(35%)
Query	257	GAKLGTASLAAKGAEFSAKVAQISTGISNTVGNVAVTKLGG 298				
		G+KLG N QI T I++ N+ TK G				
Sbjct	221	GSKLGLN-----KQIDTNITSPQTNSTKFLG 247				

Range 4: 341 to 371 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
-------	--------	--------	------------	-----------	------

15.0 bits(27) 4.2 **Compositional matrix adjust.** 10/31(32%) 14/31(45%) 0/31(0%)
 Query 306 SHVIRITGSQATQVAVGVGSGITQTINNKKQA 336
 S V + SQAT + I +IN K +
 Sbjct 341 SQVSKEASQATNQLIQKLLNIIDSINQSKNS 371

YopD und PopB:

Range 1: 205 to 240 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.4 bits(28)	2.3	Compositional matrix adjust.	11/36(31%)	19/36(52%)	0/36(0%)
Query 99	MGLQQRDIENKAAITAQKEQVAEMVSGAKLMIAMAV	134			
	MG+ + ++ AA ++V E + A + I MAV				
Sbjct 205	MGVVSQSVQQAADGLISKEVMEKLGPALMGIEMAV	240			

Range 2: 198 to 225 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.6 bits(26)	4.1	Compositional matrix adjust.	10/28(36%)	15/28(53%)	0/28(0%)
Query 128	LMIAMAVVSGIMAATSTVASAFSIAKEV	155			
	LMIA V+ + + A+ I+KEV				
Sbjct 198	LMIAGGVMGVVSQSVQQAADGLISKEV	225			

YopD und PopD:

Range 1: 27 to 295 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
204 bits(519)	1e-67	Compositional matrix adjust.	113/271(42%)	166/271(61%)	9/271(3%)
Query 43	QAIKSSEASLSRSQVP-----ELIKPSQGINVALLSKSQDNLNGTLSILLLLELARK	95			
	+++ + +A+ QVP EL P Q ++ + + +L+ ++ +LL+L +A+K				
Sbjct 27	RSVGTQPQAAADLPQVPAARADRVELNAPRQVLDPVMEAGSELDSSVELLLILFRIAQK	86			
Query 96	AREMGLQQRDIENKAAITAQKEQVAEMVSGAKLMIAMAVVSGIMAATSTVASAFSIAKEV	155			
	ARE+G+ QRD EN++ I AQK QV EM SGA LMIAMAV++G+ A S V + K				
Sbjct 87	ARELGLVLRDNDENQSI IHAQKAQVDEMRSQATLMIAMAVIAGVGALASAVVGS LGALKNG	146			
Query 156	KIVKQEQLNLSNIAGRDLIDTKMQQMSNTSDKAVSREDIGRIWKPEQVADQNKLALLDK	215			
	K + QE+ L NI GR++LID KMQ + TSD+ R+ +G++W +QV D L +				
Sbjct 147	KAISQEKTLQKNIDGRNELIDAKMQALGKTSDE--DRKIVGKVVAAADQVQDSVALRAAGR	204			
Query 216	EFRMTDSKANAFNAATQPLGQMANSIQVHQGYSQAEVKEKEVNASIAANEKQKAEEMN	275			
	F + N Q QMAN+++QV QG SQA +E EVNA+I ++KQK E+ M+				
Sbjct 205	AFESRNGALQVANTVIQSFVQMANASVQVRQGESQASAREGEVNATIGQSQKQKVEDQMS	264			
Query 276	YNDNFMKDVLRRLIEQYVSSHAMKAAFVV	306			
	++ FMKDV+LI+QY SH A +AA GVV				
Sbjct 265	FDAGFMKDVQLIQYTSQSHNQAWRAAGVV	295			

YopD und SipB:

Range 1: 142 to 169 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
-------	--------	--------	------------	-----------	------

20.0 bits(40) 0.14 Compositional matrix adjust. 9/28(32%) 16/28(57%) 0/28(0%)

Query 212 LLDKEFRMTDSKANAFNAATQPLGQMAN 239
L + + TD+ + ++AAT+ L Q N
Sbjct 142 LYEASIKKTDATAKSVYDAATKLTQAQN 169

Range 2: 23 to 55 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score Expect Method Identities Positives Gaps
16.9 bits(32) 1.2 Compositional matrix adjust. 8/33(24%) 16/33(48%) 0/33(0%)

Query 270 AEEAMNYNDNFMKDVLRLLIEQYVSSHAMKAA 302
A E + N +F+K + + V++ +KA
Sbjct 23 AFEGRKNTDFLKAADKAFKDVVATKAGDLKAG 55

Range 3: 119 to 124 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score Expect Method Identities Positives Gaps
15.0 bits(27) 5.5 Compositional matrix adjust. 4/6(67%) 6/6(100%) 0/6(0%)

Query 97 REMGLQ 102
+EMG+Q
Sbjct 119 KEMGIQ 124

YopD und SipC:

Range 1: 265 to 277 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score Expect Method Identities Positives Gaps
17.7 bits(34) 0.48 Compositional matrix adjust. 7/13(54%) 10/13(76%) 0/13(0%)

Query 223 KANAFNAATQPLG 235
K+NA +AT+ LG
Sbjct 265 KSNAGTSATESLG 277

Range 2: 211 to 220 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score Expect Method Identities Positives Gaps
15.4 bits(28) 2.2 Compositional matrix adjust. 5/10(50%) 9/10(90%) 0/10(0%)

Query 16 SQIDAITTE 25
++ID +TTE+
Sbjct 211 AKIDKLTTES 220

YopD und SseC:

Range 1: 97 to 186 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score Expect Method Identities Positives Gaps
19.6 bits(39) 0.13 Compositional matrix adjust. 21/90(23%) 35/90(38%) 9/90(10%)

Query 219 MTDKAFNAATQPLGQMANSAIQVHOGYSQAEVKEKEVNASIAANEKQKAEAMNYND 278
MT N F Q L Q A +V +VKE + A ++ KA +A +
Sbjct 97 MTLILNVFGNNAQSLCQQLERATEVQNALRNKQVKEYQEIQKAIEQEDKARKAGIFGA 156

Query 279 NF-----MKDVLRLLIEQYVSSHAM 299
F + L+++E ++S + M
Sbjct 157 IFDWITGIFETVIGALKVVEGFLSGNPAEM 186

Range 2: 140 to 149 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	14.2 bits(25)	7.5	Compositional matrix adjust.	5/10(50%)	7/10(70%)	0/10(0%)
Query	188	KAVSREDIGR	197			
		KA+ +ED R				
Sbjct	140	KAIEQEDKAR	149			

YopD und SseD:

Range 1: 13 to 55 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	22.7 bits(47)	0.004	Compositional matrix adjust.	17/49(35%)	24/49(48%)	13/49(26%)
Query	58	PELIKPSQGINVALLSKSQGDLNGTSLILL-----LLELARKAREM	99			
		P L+ PS	G+ GT S+LLL	L+ELA+K R++		
Sbjct	13	PSLLTPSS-----TPSPSGEGMGTESMLLLFDDIWMKLMELAKKLRDI	55			

YopD und EspB:

Range 1: 41 to 129 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	21.9 bits(45)	0.017	Compositional matrix adjust.	26/90(29%)	43/90(47%)	15/90(16%)
Query	80	NGTSLILLLLELARKAREMGL-----QQRDIENKAAITAQKEQVAEMVSGAKL	128			
		+G + I LLE+ + REM	Q DI+ KA +Q + + E +GA			
Sbjct	41	DGRVDISKLLLEVQKLLREMTTLQDYLQKQLAQSYDIQ-KAVFESQNKAIDEKKAGATA	99			
Query	129	MI---AMAVVSGIMAATSTVASAFSIAKEV	155			
		+ A++ V GI+ + + + SA A +V				
Sbjct	100	ALIGGAISSVLGILGSFAAINSATKGASDV	129			

Range 2: 291 to 308 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	14.6 bits(26)	3.0	Compositional matrix adjust.	4/18(22%)	11/18(61%)	0/18(0%)
Query	91	ELARKAREMGLQQRDIEN	108			
		+++ + R+M	RD+ +			
Sbjct	291	DISSRLRDMTTTARDLTD	308			

YopD und EspD:

Range 1: 164 to 170 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	16.5 bits(31)	1.1	Compositional matrix adjust.	6/7(86%)	7/7(100%)	0/7(0%)
Query	266	EKQKAE E	272			
		E+QKAE E				
Sbjct	164	EQQKAE E	170			

Range 2: 62 to 109 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.8 bits(29)	1.5	Compositional matrix adjust.	14/48(29%)	22/48(45%)	1/48(2%)
Query 11	IITTGSQIDAITTTETVGQSGEV-KKTEDTRHEAQAIKSSEASLSRSQV		57		
	++T + D ++ G SGEV +TE T + +S SQV				
Sbjct 62	LVTPSAAEDVLSKLFGGISGEVTSRTEGTEPQRSTQNASSGYPYLSQV		109		

YopD und IpaB:

Range 1: 495 to 504 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.4 bits(28)	3.7	Compositional matrix adjust.	6/10(60%)	7/10(70%)	0/10(0%)
Query 234	LGQMANSAIQ 243				
	LG+ NSA Q				
Sbjct 495	LGESVNSATQ 504				

YopD und IpaC:

Range 1: 67 to 142 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
13.9 bits(24)	6.3	Compositional matrix adjust.	19/90(21%)	42/90(46%)	20/90(22%)
Query 10	PIIITGSQIDAITTTETVGQSGEVKKTEDTRHEAQAIKSSEASLSRSQVPEL-----IKP		63		
	P+++TT T+ +K +E +H+++ I A L+ ++ +L + P				
Sbjct 67	PVLT-----TLNDDQLLKLSEQVQHDSEII----ARLTDKMKMDLSEMSHTLTP		112		
Query 64	SQGINVALLSKSQDNLNGLSILLLELELA 93				
	++++ LS + L ++++LL L A				
Sbjct 113	ENTLDISSLSSNAVSLIISVAVLLSALRTA 142				

PopB und PopD:

Range 1: 116 to 159 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
17.3 bits(33)	0.57	Compositional matrix adjust.	16/50(32%)	24/50(48%)	6/50(12%)
Query 230	GPLMGIEMAVALLAAVVSPFGGSVGGGLARLGAKIGGKAAEMTASLASKV 279				
	G LM +A+A+A V + + VG L GA GKA +L +				
Sbjct 116	GATLM---IAMAVIAGVGALASAVVGS---GALKNGKAISQEKTLQKNI 159				

Range 2: 30 to 43 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.5 bits(31)	0.93	Compositional matrix adjust.	6/14(43%)	7/14(50%)	0/14(0%)
Query 10	GLPYGVADAGDIPA 23				
	G P AD +PA				
Sbjct 30	GTPQAAADLPQVPA 43				

Range 3: 83 to 110 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
-------	--------	--------	------------	-----------	------

13.9 bits(24) 7.6 Compositional matrix adjust. 9/28(32%) 13/28(46%) 0/28(0%)
 Query 275 LASKVADLGGKFGSLAGQSLSHSLKLG 302
 +A K +LG QS+ H+ K V
 Sbjct 83 IAQKARELGLVLRDNEHQSIHAQKAQV 110

PopB und SipB:

Range 1: 542 to 572 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	16.9 bits(32)	1.8	Compositional matrix adjust.	8/31(26%)	19/31(61%)	0/31(0%)
Query	127	KLKLTEIEQARKQNLQKMEDNQKIRESEEA	157			
		+ + +I+Q KQ+++ +NQ+ E ++A				
Sbjct	542	RFAMDQIQWLKQSVEIFGENQKVTAELQKA	572			

Range 2: 295 to 403 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	16.2 bits(30)	2.6	Compositional matrix adjust.	25/109(23%)	47/109(43%)	19/109(17%)
Query	152	RESEEAKEAQKSLAAKIFGWISAI--ASIIVGAIMVATGVGAAAGALMIAGGVMGVVS	209			
		++S E +E +K+ +I G I + A + + +++ A G A+ AL G + V				
Sbjct	295	KKSAEFQEETRKAETNRIMGCIGKVLGALLTIVSVVAAVFTGGASLALAAVGLAVMVD	354			
Query	210	QSVQQAADGLIS-----KEVMEKLGPAL-----MGIEMAVA	241			
		+ V+ A I K +ME +G A+ +G++ A				
Sbjct	355	EIVKAATGVSFIQQALNPIMEHVLKPLMELIGKAITKALEGLGVDKKT	403			

PopB und SipC:

Range 1: 43 to 113 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	18.5 bits(36)	0.35	Compositional matrix adjust.	19/72(26%)	32/72(44%)	14/72(19%)
Query	276	ASKVADLG-----GKFGSLAGQSLSHSLKLGQVSDLTLD---VANGAAQATHSG	322			
		+SKV+DLG G G +++ LK +Q +D+ D +AN +				
Sbjct	43	SSKVSDLGLSPTLSAPAPGVLTQTPG-TITSFCLKASIQNTDMNQDLNALANNVTTKANEV	101			
Query	323	FQAKAANRQADV 334				
		Q + +QA+V				
Sbjct	102	VQTQLREQQAEV 113				

Range 2: 46 to 58 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	15.8 bits(29)	2.5	Compositional matrix adjust.	6/13(46%)	7/13(53%)	0/13(0%)
Query	15	VADAGDIPALGRP 27				
		V+D G P L P				
Sbjct	46	VSDLGLSPTLSAP 58				

Range 3: 382 to 400 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	14.2 bits(25)	7.1	Compositional matrix adjust.	5/19(26%)	12/19(63%)	0/19(0%)
Query	362	FQEIMERIFAMLQAKGETL 380				

Sbjct 382 QE+++ + ++ Q+K L
IQEMLKTMESINQSKASAL 400

PopB und SseC:

Range 1: 120 to 302 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
47.0 bits(110)	6e-10	Compositional matrix adjust.	48/186(26%)	91/186(48%)	20/186(10%)
Query 131	TEIEQARKQNLQKMEDNQKIRESEEAKEAQKSGLAAKIFGWISAIASIIVGAIMVATG				190
	TE++ A + +++++ Q++I+++ E +A+K+G+ IF WI+ I ++GA+ V G				
Sbjct 120	TEVQNALRN--KQVKEYQEIQKAIEQEDKARKAGIFGAIQFDWITGIFETVIGALKVVEG				177
Query 191	VGA-----AAGALMIAGGVMGVV---SQSVQAAAADGLISKEVMEKLGPALMGIEMAVA				241
	+ A+G +A G G+V +++ AD + +++ G E AVA				
Sbjct 178	FLSGNPAEMASGVAYMAAGCAGMVKAGAETAMMCGADHDTQCQAIIDVTSKIQFGCE-AVA				236
Query 242	LLAAVVSFGGS--AVGGLARLGAKI-----GGKAAE-MTASLASKVADLGGKFGSLAGQS				293
	L V G + A GL+ AK+ G + E M + +++ +L KFG +S				
Sbjct 237	LALDVFQIGRAFMATRGLSGAAAKVLDSGFGEEVVERMVGAGEAEIEELAEKFGEEVSES				296
Query 294	LSHSLK 299				
	S +				
Sbjct 297	FSKQFE 302				

Range 2: 272 to 293 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.5 bits(36)	0.45	Compositional matrix adjust.	9/22(41%)	13/22(59%)	0/22(0%)
Query 64	QRLEVANRAEIASLVQAVGEDV 85				
	+R+ A AEI L + GE+V				
Sbjct 272	ERMVGAGEAEIEELAEKFGEEV 293				

Range 3: 415 to 456 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.8 bits(29)	2.6	Compositional matrix adjust.	14/42(33%)	19/42(45%)	11/42(26%)
Query 113	ELAKITGEVE---NQKKLKL-----TEIEQARKQNLQK 143				
	E AKI ++E QQ+ L +IEQ R + L K				
Sbjct 415	EKAKIEKKIEQLITQQRFLDFIMQQTENQKKIEQKRLEELYK 456				

Range 4: 409 to 448 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.4 bits(28)	4.4	Compositional matrix adjust.	12/41(29%)	22/41(53%)	6/41(14%)
Query 118	TGEVENQKKLKLTEIEQARKQN-----LQKMEDNQKIRE 153				
	TG V ++ K++ +IEQ Q + + +NQ+KI +				
Sbjct 409	TGMVNTEKAKIE-KKIEQLITQQRFLDFIMQQTENQKKIEQ 448				

PopB und SseD:

Range 1: 109 to 176 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
-------	--------	--------	------------	-----------	------

27.7 bits(60) 1e-04 Compositional matrix adjust. 25/89(28%) 41/89(46%) 21/89(23%)

```
Query 282 LGGKFGSLAGQSLSHSLKLGQVSDLTLDVANGAAQATHSGFQAKAANRQADVQESRADL 341
+GG+ G +AGQ++ H+ A G G A A RQ+D ++ ADL
Sbjct 109 VGGETGLIAGQAVGHT-----AGGVM-----GLGAGVAQRQSDQDKAIADL 149

Query 342 TTLQGVIERLKEELSRMLEAFQEIMERIF 370
Q + + L+ ++E EIM++I
Sbjct 150 Q--QNGAQSYNKSLEIMEKATEIMQQII 176
```

Range 2: 98 to 131 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
20.0 bits(40)	0.048	Compositional matrix adjust.	13/34(38%)	20/34(58%)	0/34(0%)
Query 174	ISAIASIIIVGAIMVATGVGAAAGALMIAGGVMGV		207		
	+S + +I +GA+ TG+ A AGGVMG+				
Sbjct 98	LSGVLTIGLGAVGGETGLIAGQAVGHTAGGVMGL		131		

PopB und EspB:

Range 1: 44 to 113 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
22.7 bits(47)	0.012	Compositional matrix adjust.	19/71(27%)	43/71(60%)	2/71(2%)
Query 112	IELAKITGEVENQKKLKLTEIEQARKQNLQKMEDNQKIRESEEAKEAQKSG-LAAKI		170		
	++++K+ EV+ +++ +T ++ ++ L + D Q+ + ES+ A + +K+G AA I				
Sbjct 44	VDISKLLLEVQKLLREM-VTTLQDYLQKQLAQSYDIQKAVFESQNKAIDEKKAGATAALI		102		
Query 171	FGWISAIASII	181			
	G IS++ I+				
Sbjct 103	GGAISSVLGIL	113			

Range 2: 174 to 196 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.6 bits(26)	4.5	Compositional matrix adjust.	7/23(30%)	12/23(52%)	0/23(0%)
Query 68	VANRAEIASLVQAVGEDVGLARQ		90		
	+A A+ AS + +DV + Q				
Sbjct 174	IATAAKAASRTSGITDDVATSAQ		196		

PopB und EspD:

Range 1: 159 to 344 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
45.4 bits(106)	9e-10	Compositional matrix adjust.	49/201(24%)	92/201(45%)	22/201(10%)
Query 148	QQKIRESEEAKEAQKSGLAAKIFGWI----	SAIASIIIVGAIMVATGVGAAAGALMIAGG	203		
	++++ E ++A ++AQKS + ++FGW+ +AIA+I A+ + A A AL A				
Sbjct 159	KKQLEQQKAEKKAQKSKIVGQVFGWLGVAATAIAAIFNPALWAVVAISATAMALQTAVD		218		
Query 204	VMGVVSQSVQQAADGLISKEVMEKLGPALMGIEMAVALLAAVVSFSGSAVGGGLARLGAK		263		
	VMG D + + ++ A G+ +A +L A + S + + + K				
Sbjct 219	VMG-----DD--APQALKTAAQAFGGLSLAAGILTAGIGGVSSLSISKVGDVANK		265		
Query 264	IGGKAAEMTASLASKVAD-LGGKFGSLAGQSLSHSLKLGQVSDLTLDVANGAAQATHSG		322		
	+G ++ +LA D + K ++A + S +G V L D A + S				
Sbjct 266	VGSNIVKVVTTLADTFVDNVASKISAVANGLTSSRSIGTTV--LNNDAAAYNVLSQVSA		323		

Query 323 FQAKAANRQADV--QESRADL 341
 F + RQ++ Q ++A+L
 Sbjct 324 FAVENLTRQSEYLSQSAKAEL 344

PopB und IpaB:

Range 1: 288 to 327 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	21.9 bits(45)	0.045	Compositional matrix adjust.	14/44(32%)	24/44(54%)	4/44(9%)
Query	152	RESEEAAKEAQKSGLAAKIFGWISAIASIIVGAIMVATGVGAAA		195		
		R+S+E A E +K+ ++ G + I +GA++ V AAA				
Sbjct	288	RKSDEYAAEVRKAEELNRVMGCVGKI---LGALLTIVSVVAAA		327		

Range 2: 83 to 92 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	15.4 bits(28)	4.7	Compositional matrix adjust.	5/10(50%)	8/10(80%)	0/10(0%)
Query	74	IASLVQAVGE		83		
		I +L+Q +GE				
Sbjct	83	IGNLIQILGE		92		

PopB und IpaC:

Range 1: 173 to 205 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	18.9 bits(37)	0.25	Compositional matrix adjust.	9/33(27%)	17/33(51%)	0/33(0%)
Query	166	LAAKIFGWISAIASIIVGAIMVATGVGAAAGAL		198		
		L++ I G ++ + +GA +G+ GAL				
Sbjct	173	LSSSITGAVTQVGITGIGAKKTHSGISDQKGAL		205		

Range 2: 298 to 320 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	18.9 bits(37)	0.26	Compositional matrix adjust.	7/23(30%)	15/23(65%)	0/23(0%)
Query	266	GKAAEMTASLASKVADLGGKFSGS		288		
		G+A T+++A ++ GG++ S				
Sbjct	298	GRATMETSAVAGNISTSGGRYAS		320		

PopD und SseC:

Range 1: 431 to 462 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	15.8 bits(29)	2.0	Compositional matrix adjust.	10/32(31%)	15/32(46%)	0/32(0%)
Query	88	RELGVLQRDNENQSIHAQKAQVDEMRSATL		119		
		R L + + ENQ I ++ + SGA L				
Sbjct	431	RFLDFIMQQTENQKKIEQKRLEELYKGSAAAL		462		

Range 2: 36 to 45 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	15.8 bits(29)	2.5	Compositional matrix adjust.	5/10(50%)	7/10(70%)	0/10(0%)
Query	243	REGEVNATIG	252			
		R+ VN+T G				
Sbjct	36	RQHRVNSTFG	45			

Range 3: 165 to 174 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	15.0 bits(27)	3.6	Compositional matrix adjust.	6/10(60%)	8/10(80%)	0/10(0%)
Query	206	FESRNGALQV	215			
		FE+ GAL+V				
Sbjct	165	FETVIGALKV	174			

Range 4: 245 to 264 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #4

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	14.6 bits(26)	4.9	Compositional matrix adjust.	8/20(40%)	10/20(50%)	0/20(0%)
Query	203	GRAFESRNGALQVANTVIQS	222			
		GRAF + G A V+ S				
Sbjct	245	GRAFMATRGLSGAAAKVLDS	264			

Range 5: 125 to 143 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #5

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	14.2 bits(25)	6.9	Compositional matrix adjust.	6/19(32%)	12/19(63%)	0/19(0%)
Query	142	ALKNGKAISQEKTLQKNID	160			
		AL+N + ++ +QK I+				
Sbjct	125	ALRNKQVKEYQEIQKAIE	143			

PopD und SseD:

Range 1: 10 to 123 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	18.1 bits(35)	0.14	Compositional matrix adjust.	27/115(23%)	44/115(38%)	15/115(13%)
Query	51	LNAPRQVLDPVRMEAAGSELDSSVELLLILFRIAQKARELGVLRD-----NENQ----	100			
		L AP +L P + E + +LL+ I K EL RD E Q				
Sbjct	10	LPAP-SLLTPSSTPSPSGEGMGTESMLLLFDDIWMKLMELAKKLRDIMRSYNVEKQRLAW	68			
Query	101	----SIIHAQKAQVDEMRSYGATLMIAMAVIAGVVGALASAVVGSGLGALKNGKAISQ	151			
		+++ Q +DE + + A+++GV + VG L G+A+				
Sbjct	69	ELQVNVLQTMKTIDEAFRSMITAGGAMLSGVLTIGLGAVGGETGLIAGQAVGH	123			

Range 2: 111 to 160 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	14.2 bits(25)	2.2	Compositional matrix adjust.	13/50(26%)	18/50(36%)	7/50(14%)
Query	245	GEVNATIGQSQKQKVEDQMSFDAGFM-----KDVQLIQYTTQSHNQA	287			
		GE GQ+ M AG K + L Q QS+N++				
Sbjct	111	GETGLIAGQAVGHTAGGVMGLGAGVAQRQSDQDKAIADLQNGAQSYNKS	160			

Range 3: 117 to 122 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	12.3 bits(20)	9.9	Compositional matrix adjust.	4/6(67%)	6/6(100%)	0/6(0%)
Query	25	AGRSVG	30			
		AG++VG				
Sbjct	117	AGQAVG	122			

PopB und EspB:

Range 1: 80 to 116 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	23.5 bits(49)	0.005	Compositional matrix adjust.	12/44(27%)	24/44(54%)	7/44(15%)
Query	100	QSIIHAQKAQVDEMRS	GATLMIAMAVIAGV	GALASAVVGS	LGAL	143
		+++ +Q +DE ++GAT +	+G	S+V+G	LG+	
Sbjct	80	KAVFESQNKAID	EKKAGATAAL-----	IGGAISSVL	GILGSF	116

PopD und EspD:

Range 1: 93 to 182 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	22.3 bits(46)	0.015	Compositional matrix adjust.	28/104(27%)	45/104(43%)	23/104(22%)
Query	94	QRDNENQSI	IHAQKAQVDEMRS	GATLMIAMAVIAGV	GALASAVVGS	LGALKNGKAISQEK 153
		QR +N S + +QV+ +	A +M MA + + A A V		++KN I	
Sbjct	93	QRSTQNASSGYP	YLSQVNNVDPQAMMM--	MATLLSLDASAQRV----	ASMKNSNEIYA--	144
Query	154	TLQKNIDGRNEL	IDAKMQALGKTS	DEDRK-----	IVGKVV	188
		DG+N+ +D K	K +E +K		IVG+V+	
Sbjct	145	-----DGQNKAL	DNKTLEFKKQLEE	QQKAEKAQKSK	IVGQVF	182

Range 2: 245 to 365 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	16.5 bits(31)	0.84	Compositional matrix adjust.	25/123(20%)	48/123(39%)	2/123(1%)
Query	155	LQKNIDGRNEL	IDAKMQALGKTS	DEDRKIVGKVW	AADQVQDSVALRA	AGRAFESRNGALQ 214
		L I G + LI	K	K+V + AD	D+VA + + A	+
Sbjct	245	LTAGIGGVSSLI	SKVGDVANKVGS	NIVKVVTTL--	ADTFVDNVASKI	SAVANGLTSSRS 302
Query	215	VANTVIQSFVQ	MANASVQVRQGES	QASAREGEVNAT	IGQSQKQKVEDQ	MSFDAGFMKDVL 274
		+ TV+ +	N QV	+ R+ E +	+++ +K ++	A +++
Sbjct	303	IGTTVLNNDAA	YYNVLSQVSAFA	VENLTRQSEYLS	QSAKAELEKAT	LELQNYIQSAS 362
Query	275	QLI	277			
		QL+				
Sbjct	363	QLM	365			

PopD und IpaB:

Range 1: 425 to 443 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
--	--------------	---------------	---------------	-------------------	------------------	-------------

15.4 bits(28) 3.4 Compositional matrix adjust. 7/19(37%) 10/19(52%) 0/19(0%)
 Query 171 QALGKTSDEDRKIVGKVWA 189
 QA K ++ KI+GK
 Sbjct 425 QAAAKLAENIGKIIGKTLT 443

PopD und IpaC:

Range 1: 169 to 209 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
20.8 bits(42)	0.049	Compositional matrix adjust.	14/41(34%)	23/41(56%)	9/41(21%)
Query 128	GVGALASAVVGS-----LGALKNGKAISQEK-TLQKNI		159		
	G+ AL+S++ G+ +GA K IS +K L+KN+				
Sbjct 169	GLAALSSSITGAVTQVGITGIGAKKTHSGISDQKGALRKNL		209		

SipB und SipC:

Range 1: 191 to 238 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.1 bits(35)	0.74	Compositional matrix adjust.	17/48(35%)	25/48(52%)	1/48(2%)
Query 464	GSKLFTQGMQRITSGLGNVGSKMG-LQTNALSKELVGNLTKVALGME		510		
	G+KL +G+Q L + +K+ L T + S + V N N V LG E				
Sbjct 191	GAKLEYKGLQNERGALKHNAAKIDKLTTESHSIKNVNLGQNSVKLGAE		238		

Range 2: 71 to 104 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.2 bits(30)	2.7	Compositional matrix adjust.	10/34(29%)	17/34(50%)	0/34(0%)
Query 140	TDLYEASIKKTD TAKSVYDAATKLLTQAQNKLQS		173		
	T +ASI+ TD + + A T+A +Q+				
Sbjct 71	TSFLKASIQNTDMNQDLNALANNVTTKANEVQT		104		

Range 3: 64 to 101 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.8 bits(29)	3.5	Compositional matrix adjust.	11/39(28%)	19/39(48%)	1/39(2%)
Query 14	TQNPRLAEEAFEGVRKNTDFLKAADKAFKDVVATKAGDL		52		
	TQ P + + +NTD + + A + V TKA ++				
Sbjct 64	TQTPGITTSFLKASIQNTDMNQDLN-ALANNVTTKANEV		101		

Range 4: 250 to 255 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.6 bits(26)	8.9	Compositional matrix adjust.	5/6(83%)	5/6(83%)	0/6(0%)
Query 211	KAGTDA		216		
	K GTDA				
Sbjct 250	KTGTDA		255		

SipB und SseC:

Range 1: 88 to 261 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.5 bits(36)	0.68	Compositional matrix adjust.	49/207(24%)	76/207(36%)	53/207(25%)
Query	251	SNVARLTMLMAMFIEIVGKNTTEESLQNDLALFNALQEGRQAEMEKSAEFQEETRKA---			307
		+N A L+M+M I V N +SL L +Q A K+ E+QE+ +KA			
Sbjct	88	TNPAVLSMMMTSLILNVFGNNAQSLCQQLERATEVQ---NALRNKQVKEYQEIQKAIEQ			144
Query	308	EETNRIMGCIGKVL----GALLTIVSVVAAV--FTGGASLALAAVGLAVMVADE--IVKA			359
		E+ R G G + G T++ + V F G +A+ G+A M A +VKA			
Sbjct	145	EDKARKAGIFGAIQFDWITGIFETVIGALKVVEGFLSGNPAEMAS-GVAYMAAGCAGMVKA			203
Query	360	ATGVSFIQQALNPIMEHVLKPLMELIGKAITKALEGLGVDKKAEMAGSIVGAIVAAIAM			419
		+ + + + + G D T + + I			
Sbjct	204	GAETAMM-----CGADHDTCQAIIDVTSKIQFGCEA			234
Query	420	VAVIVVVAVVGK-----GAAAKL	437		
		VA+ + V +G+ GAAAK+			
Sbjct	235	VALALDVFQIGRAFMATRGLSGAAAKV	261		

Range 2: 47 to 69 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.5 bits(31)	2.6	Compositional matrix adjust.	9/23(39%)	12/23(52%)	0/23(0%)
Query	438	GNALSKMMGETIKKLVPNVVKQL	460		
		GNA + G+ + N LKQL			
Sbjct	47	GNAACLLSGKISLQEASNALKQL	69		

SipB und SseD:

Range 1: 153 to 177 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.0 bits(27)	3.0	Compositional matrix adjust.	7/25(28%)	13/25(52%)	0/25(0%)
Query	362	GVSFIQQALNPIMEHVLKPLMELIG	386		
		G ++L IME + + ++IG			
Sbjct	153	GAQSYNKSLEIMEKATEIMQIIG	177		

SipB und EspB:

Range 1: 92 to 127 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.2 bits(30)	2.5	Compositional matrix adjust.	10/36(28%)	17/36(47%)	0/36(0%)
Query	399	DKKTAEMAGSIVGAIVAAIAMVAVIVVVAVVGKGAA	434		
		+KK A I GAI + + + + + KGA+			
Sbjct	92	EKKAGATAALIGGAISSVLGILGSFAAINSATKGAS	127		

Range 2: 150 to 159 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.4 bits(28)	3.7	Compositional matrix adjust.	6/10(60%)	8/10(80%)	0/10(0%)
Query	387	KAITKALEGL	396		

Sbjct 150 KA+ KA EG+
KALAKASEGI 159

Range 3: 47 to 61 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	14.2 bits(25)	9.1	Compositional matrix adjust.	6/15(40%)	10/15(66%)	0/15(0%)
Query	484	SKMGLQTNALSKELV	498			
		SK+ L+ L +E+V				
Sbjct	47	SKLLLEVQKLLREMV	61			

SipB und EspD:

Range 1: 145 to 220 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	33.9 bits(76)	9e-06	Compositional matrix adjust.	22/76(29%)	43/76(56%)	5/76(6%)
Query	287	EGRQAEMEKKSAEFQ---EETRKAEEETNRIMGCIGKVLGALLTIVSVVAAVFTGG--ASL	341			
		+G+ ++ K+ EF+ EE +KAEE + +G+V G L + +AA+F A +				
Sbjct	145	DGQNKALDNKTLEFFKQLEEQKAAEKAQKSKIVGQVFGWLGVAATAIAAIFNPALWAVV	204			
Query	342	ALAAVGLAVMVADEIV	357			
		A++A +A+ A +++				
Sbjct	205	AISATAMALQTAVDVM	220			

Range 2: 251 to 374 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	23.5 bits(49)	0.013	Compositional matrix adjust.	32/129(25%)	60/129(46%)	15/129(11%)
Query	471	GMQRITSGLGNVSGKMGLO---TNALSKELVGNLTKVALGMEVTNTAAQSAGGVAEGV	526			
		G+ + S +G+V +K+G L+ V N +K++ V N S+ + V				
Sbjct	251	GVSSLSISKVGDVANKVGSNIVKVVTTLADTFVDNVASKIS---AVANGLTSSRSIGTTV	307			
Query	527	FIKNASEALADFMLARFAMDQI---QQWLKQSVEIFGENQKVTAELQ---KAMSSAVQQN	580			
		+A+ ++ FA++ + ++L QS + E +K T ELQ + SA Q				
Sbjct	308	LNNDAAYYNVLSQVSAFAVENLTRQSEYLSQSAK--AELEKATLELQNYIQSASQLM	365			
Query	581	ADASRFILR	589			
		+D++R +R				
Sbjct	366	SDSARVNIR	374			

Range 3: 30 to 76 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	15.0 bits(27)	6.8	Compositional matrix adjust.	14/47(30%)	18/47(38%)	0/47(0%)
Query	47	TKAGDLKAGTKSGESAINTVGLKPPTDAAREKLSSEGQLTLLLGKLM	93			
		T A DL+ + SA T PT A L + +L KL				
Sbjct	30	TSALDLQLVKSTAPSASWTESTALPTPPAGHSILVTPSAEDVLSKLF	76			

SipB und IpaB:

Range 1: 33 to 580 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
--	--------------	---------------	---------------	-------------------	------------------	-------------

361 bits(926) 2e-120 Compositional matrix adjust. 232/561(41%) 347/561(61%) 16/561(2%)

Query	36	AADKAFKDVVATKAGDLKAGTKSGESAINTVGLKPP TDAAREKLSSEGQLTLLGKLMTL	95
		AA+K F +A + T + S N + P A + L++ QLTL+G L+ +	
Sbjct	33	AANKLFSLTIADLTANQNINTNAHSTSNIL---IPELKAPKSLNASSQLTLLIGNLIQI	89
Query	96	LGDVLSLSQLESRLAVWQAMIESQKEMGIQVSKEFQTALGAEAEATDLYEASIKKTD TAKS	155
		LG+ SL+ L +++ W++ +++++ ++ S + T L E + T YE I K A S	
Sbjct	90	LGEKSLTALTNKITAWKSQQQARQQKNEFSDKINTLLSETEGLTRDYEKQINKLKNADS	149
Query	156	VYDAATKKLTQAQNKLSLDPADP---GYAQAEAAVEQAGKEATEAKEALDKATDATVKA	212
		K+ Q Q +L LDP P ++ E + A + + +++ T +	
Sbjct	150	KIKDLENKINQIQTRLSSELDPE SPEKKLSREEIQLTIKKDAAVKDRTLIEQKTL SIHSK	209
Query	213	GTDAKAKAEKADNILT KFGQTANAASQNQVSQGEQDNLSNVARLTMLMAMFIEIVGK NTE	272
		TD + EK + F +N AS Q+S +Q +L+ +A +T LMA FI++VGKN E	
Sbjct	210	LTDKSMQLEKE---IDSFSAFSNTASAEQLS--TQOKSLTGLASVTQLMATFIQLVGKNNE	265
Query	273	ESLQNDLALFNALQEGRQAEMEKSAEFQEE TRKAEETNRIMGCIGKVLGALLTIVSVVA	332
		ESL+NDLALF +LQE R+ EME+KS E+ E RKAEE NR+MGC+GK+LGALLTIVSVVA	
Sbjct	266	ESLKNLALFQSLQESRKTEMERKSDEYAAEVRKAEELNRVMGCVGKILGALLTIVSVVA	325
Query	333	AVFTGGASLALAAVGLAVMVADEIVKAAATGVSF IQQALNP IMEHLVLPMLMELIGKAITKA	392
		A F+GGASLALAAVGLA+MV D IV+AAATG SF++QALNPIM+ V++PL++L+ A TK	
Sbjct	326	AAFSSGASLALAAVGLALMVTDAIVQAATGNSFMEQALNPIMKAVIEPLIKLLSDAFTKM	385
Query	393	LEGLGVDKKAEMAGSIVGAIVAAIAMVAIVVAVVVGKGAALKGNALSKMMGETIKKL	452
		LEGLGVD K A+M GSI+GAI A+ +VA +V+VA VGK AAKL + K++G+T+ L	
Sbjct	386	LEGLGVDSKKAKMIGSILGAIAGALVLVAAVVLVATVGKQAAAKLAENIGKII GKTLTDL	445
Query	453	VPNVLKLQALQNGSKLFTQGMQRITSGLGNVGSKMGLQTNALSKELVGNTLNKVALGMEVT	512
		+P LK + L T + R+ LG G ++ +SK+++ LN+ L E	
Sbjct	446	IPKFLKNFSSQLDDLITNAVARLNKFLGAGDEV-----ISKQIISTHLNQAVLLGESV	499
Query	513	NAAQGSAGGVAEGVF IKNASEALADFM LARFAMDQIQWLKQSVEIFGENQKVTAELQKA	572
		N+A Q+ G VA VF +AS LAD L+++ ++Q+ +++ +++E FG+ Q+V A+L +	
Sbjct	500	NSATQAGGVSASAVFQNSASTNLADLTLSKYQVEQLSKYISEAIEKFGQLQEVIADLLAS	559
Query	573	MSSAVQQNADASRFILRQSRA	593
		MS++ D ++ IL+Q+ A	
Sbjct	560	MSNSQANRTDVAKAILQOTTA	580

SipB und IpaC:

Range 1: 171 to 182 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	15.4 bits(28)	5.0	Compositional matrix adjust.	5/12(42%)	8/12(66%)	0/12(0%)
Query	403	AEMAGSIVGAIV	414			
		A ++ SI GA+				
Sbjct	171	AALSSSITGAVT	182			

SipC und SseC:

Range 1: 53 to 82 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	16.5 bits(31)	1.7	Compositional matrix adjust.	11/37(30%)	22/37(59%)	7/37(18%)
Query	147	LSGKLSLVSFDAAKTTASSMMREGMNALSGSISQSAL	183			
		LSGK+SL AS+ +++ ++A+ G+ + +L				
Sbjct	53	LSGKISL-----QEASNALKQLLDAVPGNHKRPSL	82			

SipC und SseD:

Range 1: 97 to 110 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	14.6 bits(26)	2.6	Compositional matrix adjust.	6/14(43%)	10/14(71%)	0/14(0%)
Query	226	VLNGQNSVKLGAEG	239			
		+L+G ++ LGA G				
Sbjct	97	MLSGVLTIGLGAVG	110			

SipC und EspB:

Range 1: 261 to 300 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	16.9 bits(32)	0.87	Compositional matrix adjust.	10/40(25%)	21/40(52%)	5/40(12%)
Query	280	DSNKQISPEHQAILSKRLESVESDIRLEQNTM-----DMT	314			
		D N+Q + + + + L++ + D+R Q+ + DMT				
Sbjct	261	DINEQRAKSVENLQASNLDTYKQDVRRQAQDDISSRLRDMT	300			

SipC und EspD:

Range 1: 161 to 195 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	20.4 bits(41)	0.097	Compositional matrix adjust.	13/35(37%)	20/35(57%)	9/35(25%)
Query	105	QLREQQ-AE-----VGKFFDISGMSSSAVALL	130			
		QL EQQ AE VG+ F G+++A+A +				
Sbjct	161	QLEEQQKAEEKAQKSKIIVGVFGWLGVAATAIAAI	195			

Range 2: 76 to 111 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	15.8 bits(29)	2.5	Compositional matrix adjust.	11/36(31%)	15/36(41%)	12/36(33%)
Query	338	IAGASGQYAATQERSEQQ-----ISQVNN	361			
		G SG+ + E +E Q +SQVNN				
Sbjct	76	FGGISGEVTSRTEGTEPQRSTQNASSGYPYLSQVNN	111			

Range 3: 289 to 308 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	15.0 bits(27)	4.1	Compositional matrix adjust.	7/20(35%)	13/20(65%)	0/20(0%)
Query	87	LNALANNVTTKANEVVQTQL	106			
		++A+AN +TT + + T L				
Sbjct	289	ISAVANGLTTSSRSIGTTVL	308			

SipC und IpaB:

Range 1: 53 to 63 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	16.9 bits(32)	1.5	Compositional matrix adjust.	6/11(55%)	8/11(72%)	0/11(0%)
Query	217	TTESHSIKNVL	227			
		TT +HS	N+L			
Sbjct	53	TTNAHSTSNIL	63			

Range 2: 488 to 507 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	14.6 bits(26)	9.5	Compositional matrix adjust.	8/20(40%)	12/20(60%)	0/20(0%)
Query	258	NLNDATLKSNAAGTSATESLG	277			
		+LN A L	+ SAT++ G			
Sbjct	488	HLNQAVLLGESVNSATQAGG	507			

SipC und IpaC:

Range 1: 116 to 382 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	148 bits(373)	2e-44	Compositional matrix adjust.	105/296(35%)	169/296(57%)	32/296(10%)
Query	117	FDISGMSSSAVALLAAANTLMLTLNQADSKLSGKLSLVSFDAAKTTASSMMREGMNALSG	176			
		DIS +SS+AV+L+ + L+ L A++KL +LSL++FDA K+ A +++R+G+ ALS				
Sbjct	116	LDISSLSSNAVSLIISVAVLLSALRTAETKLGSQLSLIAFDATKSAENIVRQGLAALSS	175			
Query	177	SISQSALQLGITGVGAKLEYKGLQNERGALKHNAKIDKLTTESHSIKNVLNGQNSVKLG	236			
		SI+ + Q+GITG+GAK + G+ +++GAL+ N A + S++ L G KLG				
Sbjct	176	SITGAVTQVGITGIGAKKTHSGISDQKALRKNLAT-----AQSLKELAGS---KLG	225			
Query	237	AEGVDSLKSLNMKKTGTDATKNLNDATLKSNAAGTSATESLG---IKDSNKQISPEHQAIL	293			
		LN + D + S S+T+ LG + N +S EH+ L				
Sbjct	226	-----LNKQI-----DTNITSPQTNSSTKFLGKNKLPDNLSTEHKTSL	266			
Query	294	SKRLESVESDIRLEQNTMDMTRIDARKMQMTGDLIMKNSVTVGGIAGASGQYAATQERSE	353			
		S S++ I ++ T ++ + A++ Q G M+ S G I+ + G+YA+ E E				
Sbjct	267	SSPDISLQDKIDTQRRTYELNLTLSAQKQKQNIQRATMETSAVAGNISTSGGRYASALEEEE	326			
Query	354	QQISQVNNRVASTASDEARESSRKSTSLIQEMLKTMESINQSKASALAAIAGNIRA	409			
		Q ISQ +++ A AS ++E+S+ + LIQ++L ++SINQSK SA + IAGNIRA				
Sbjct	327	QLISQASSKQAEAEASQVSKEASQATNQLIQKLLNIIDSINQSKNSAASQIAGNIRA	382			

Range 2: 62 to 67 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	16.2 bits(30)	2.0	Compositional matrix adjust.	5/6(83%)	5/6(83%)	0/6(0%)
Query	5	NVGINP	10			
		NVG NP				
Sbjct	62	NVGKNP	67			

SseC und SseD:

Range 1: 46 to 136 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	21.6 bits(44)	0.017	Compositional matrix adjust.	22/91(24%)	45/91(49%)	8/91(8%)
Query	116	LERATEVQNALRN----KQVKEYQEIQI---QKAIEQEDKARKAGIFGAIQDWTGIFETV	168			
		+E A ++++ +R+ KQ ++ Q+ Q ++ D+A +A + A ++G+				
Sbjct	46	MELAKKLRDIMRSYNVEKQRLAWELQVNVLQTMKTIDEAFRASMITAGGAMLSGVLITIG	105			

Query 169 IGALKVVEGFLSGNP-AEMASGVAYMAAGCA 198
 +GA+ G ++G A GV + AG A
 Sbjct 106 LGAVGGETGLIAGQAVGHTAGGVMGLGAGVA 136

Range 2: 170 to 188 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.9 bits(37)	0.15	Compositional matrix adjust.	6/19(32%)	14/19(73%)	0/19(0%)
Query 269	EVVERMVGAGEAEIEELAE	287			
	E+++++G G + + LAE				
Sbjct 170	EIMQQIIGVGSSLVTVLAE	188			

Range 3: 152 to 171 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
17.7 bits(34)	0.33	Compositional matrix adjust.	9/20(45%)	13/20(65%)	4/20(20%)
Query 107	NNAQS----LCQQLERATEV	122			
	N AQS L + +E+ATE+				
Sbjct 152	NGAQSYNKSLTEIMEKATEI	171			

Range 4: 87 to 107 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.2 bits(25)	4.1	Compositional matrix adjust.	12/25(48%)	12/25(48%)	7/25(28%)
Query 246	RAFMATRG---LSGAAAKVLD SGFG	267			
	RA M T G LSG VL G G				
Sbjct 87	RASMITAGGAMLSG----VLTIGLG	107			

SseC und EspB:

Range 1: 59 to 137 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
24.6 bits(52)	0.004	Compositional matrix adjust.	29/87(33%)	45/87(51%)	13/87(14%)
Query 117	ERATEVQNALRNKQVKEYQEIQKAI-EQEDKA---RKAGIFGAIFDWITGIFETVIGAL	172			
	E T +Q+ L+ + + Y IQKA+ E ++KA +KAG A+ I G +V+G				
Sbjct 59	EMVTTLQDYLQKQLAQSYD--IQKAVFESQNKAIIDEKKAGATAAL---IGGAISSVLG--	111			
Query 173	KVVEGFLSGNPAEM-ASGVAYMAAGCA	198			
	++ F + N A AS VA AA +				
Sbjct 112	-ILGSFAAINSATKGASDVAQQAASTS	137			

SseC und EspD:

Range 1: 104 to 195 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
42.4 bits(98)	1e-08	Compositional matrix adjust.	30/94(32%)	50/94(53%)	3/94(3%)
Query 80	PSLPDFLQTNPAVLSMMTSLILNVFGNNAQSLCQQLERATEVQN-ALRNKQVKEYQEIQI	138			
	P L +P + MM T L L+ S+ E + QN AL NK + E+++Q+				
Sbjct 104	PYLSQVNNVDPQAMMMATLLSLDASQRVASMKNSEIYADGQNKALDNKTL-EFKKQL	162			
Query 139	QKAI EQEDKARKAGIFGAIFDWITGIFETVIGAL	172			
	++ + E+KA+K+ I G +F W+ G+ T I A+				

Sbjct 163 EEQQKAEEKAQKSKIVGQVFGWL-GVAATAIAAI 195

Range 2: 154 to 171 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.8 bits(29)	2.7	Compositional matrix adjust.	8/19(42%)	13/19(68%)	1/19(5%)
Query 431	RFLDFIMQQTENQKKIEQK	449			
	+ L+F +Q E Q+K E+K				
Sbjct 154	KTLEF-KKQLEEQQAEEK	171			

SseC und IpaB:

Range 1: 106 to 166 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.1 bits(35)	0.96	Compositional matrix adjust.	15/65(23%)	36/65(55%)	10/65(15%)
Query 422	KIEQLITQQRFLDF-----IMQQTENQKKIEQKRLEELYKGSAAALRDVLDITIDHYSSV	475			
	K +Q QQ+ L+F ++ +TE + +K++ +L K + + ++D+ + I+ +				
Sbjct 106	KSQQARQKNLEFSDKINTLLSETEGLTRDYEQINKL-KNADSKIKDLENKINQ---I	161			
Query 476	QARIA	480			
	Q R++				
Sbjct 162	QTRLS	166			

Range 2: 234 to 243 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.9 bits(32)	2.2	Compositional matrix adjust.	7/10(70%)	8/10(80%)	0/10(0%)
Query 424	EQLITQQRFL	433			
	EQL TQQ+ L				
Sbjct 234	EQLSTQQKSL	243			

Range 3: 497 to 522 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.4 bits(28)	6.1	Compositional matrix adjust.	7/26(27%)	11/26(42%)	0/26(0%)
Query 352	EALEKCVQEGGKFLKKFRNKVLFNM	377			
	E++ Q GG F+N N+				
Sbjct 497	ESVNSATQAGGSVASAVFQNSASTNL	522			

SseC und IpaC:

Range 1: 1 to 42 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
17.7 bits(34)	0.74	Compositional matrix adjust.	13/42(31%)	17/42(40%)	9/42(21%)
Query 364	FLLKKFRNKVLFNMFK-----KILYALLRDCSFKGLQA	396			
	L K+F NK+L + K K L D S K Q+				
Sbjct 1	MLQKQFCNKLLLDTNKENVMEIQNTRPTQTLTYTDISTKQTS	42			

Range 2: 198 to 244 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
-------	--------	--------	------------	-----------	------

17.3 bits(33) 0.85 Compositional matrix adjust. 12/47(26%) 21/47(44%) 4/47(8%)

Query 297 FSKQFEPLEREMAMANEMAEAE---FNRNVENNMTRSAGKSFTK 339
S Q L + +A A + +E A ++ ++ N+T S TK
Sbjct 198 ISDQKALRKNLATAQSLEKELAGSKLGLNKQIDTNTISPQTNSSTK 244

Range 3: 345 to 355[Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.6 bits(26)	7.4	Compositional matrix adjust.	6/11(55%)	8/11(72%)	0/11(0%)
Query 60	QEASNALKQLL	70			
	+EAS A QL+				
Sbjct 345	KEASQATNQLI	355			

SseD und EspB:

Range 1: 45 to 114[Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
27.3 bits(59)	1e-04	Compositional matrix adjust.	21/74(28%)	40/74(54%)	7/74(9%)
Query 40	DIWMKLMELAKKLRDI---	MRSYNVEKQRLAWELQVNVLQTMKTIDEAFRASMITAGGA	96		
	DI L+E+ K LR++ ++ Y ++ +++++Q V ++Q K IDE	A A			
Sbjct 45	DISKLLLEVQKLLREMVTTLQDYLQKLAQSYDIQKAVFESQNKAIIDE---	KKAGATAA	100		
Query 97	MLSGVLTIGLGAVG	110			
	++ G ++ LG +G				
Sbjct 101	LIGGAISSVLGILG	114			

Range 2: 290 to 306[Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.5 bits(36)	0.13	Compositional matrix adjust.	6/17(35%)	10/17(58%)	0/17(0%)
Query 39	DDIWMKLMELAKKLRDI	55			
	DDI +L ++ RD+				
Sbjct 290	DDISSRLRDMTTTARDL	306			

Range 3: 77 to 110[Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.8 bits(29)	0.96	Compositional matrix adjust.	11/39(28%)	21/39(53%)	5/39(12%)
Query 148	DLQQNGAQSYNKSLTEIMEKATEIMQQIIGVSSSLVTVL	186			
	D+Q+ +S NK++ E AT + +G ++ +VL				
Sbjct 77	DIQKAVFESQNKAIIDEKKAGATAAL-----IGGAISSVL	110			

Range 4: 222 to 236[Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
13.9 bits(24)	3.8	Compositional matrix adjust.	5/15(33%)	6/15(40%)	0/15(0%)
Query 102	LTIGLGAVGGETGLI	116			
	T G + G T I				
Sbjct 222	FTAAAGRISGSTPFI	236			

SseD und EspD:

Range 1: 228 to 252 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
19.6 bits(39)	0.065	Compositional matrix adjust.	11/31(35%)	18/31(58%)	6/31(19%)
Query 79	MKTIDEAFRASM	ITAGGAMLSGVLTIGLGAV	109		
	+KT +AF	G ++ +G+LT G+G V			
Sbjct 228	LKTAAQAF-----	GGLSLAAGILTAGIGGV	252		

Range 2: 344 to 373 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.5 bits(31)	0.59	Compositional matrix adjust.	7/30(23%)	17/30(56%)	0/30(0%)
Query 61	VEKQRLAWELQVNV	LQTQMKTIDEAFRASM	90		
	+EK L + Q N +Q+	+ + ++ R ++			
Sbjct 344	LEKATLELQNQANY	IQSASQLMSDSARVNI	373		

Range 3: 345 to 376 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.0 bits(27)	1.7	Compositional matrix adjust.	8/34(24%)	19/34(55%)	2/34(5%)
Query 143	DKAIADLQONGAQS	YNKSLTEIMEKATEIMQQII	176		
	+KA +LQ	+Y +S +++M + + +I+			
Sbjct 345	EKATLELQNQA--	NYIQSASQLMSDSARVNIRIV	376		

Range 4: 231 to 250 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
13.5 bits(23)	5.8	Compositional matrix adjust.	8/20(40%)	10/20(50%)	2/20(10%)
Query 117	AGQAVG--HTAGG	VMLGAG 134			
	A QA G A G++ G G				
Sbjct 231	AAQAFGGLSLAAG	ILTAGIG 250			

SseD und IpaB:

Range 1: 315 to 331 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
13.9 bits(24)	7.2	Compositional matrix adjust.	6/17(35%)	9/17(52%)	0/17(0%)
Query 95	GAMLSGVLTIGLG	AVGG 111			
	GA+L+ V + GG				
Sbjct 315	GALLTIVSVVAAAF	SFGG 331			

SseD und IpaD:

Range 1: 185 to 217 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
13.5 bits(23)	5.7	Compositional matrix adjust.	12/41(29%)	18/41(43%)	8/41(19%)

Query 127 GVMGLGAGVAQRQSDQDKAIADLQQNGAQSYNKSLTEIMEK 167
 G+ G+GA I+D Q GA N + + +EK
 Sbjct 185 GITGIGAKKTH-----SGISD--QKGALRKNLATAQSLEK 217

EspB und EspD:

Range 1: 282 to 355 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
21.6 bits(44)	0.025	Compositional matrix adjust.	23/77(30%)	42/77(54%)	3/77(3%)
Query 13	VNSVLSSTTDSTSTTTSTSSISSSLTDGRVDISKLLLEVQKLLREMTTLQDYLQKQL				72
	V++V S + + TTS+ SI +++L + +L +V E +T +YL Q				
Sbjct 282	VDNVASKISAVANGLTSSRSIGTTVLNNDAA-YYNVLSQVSAFAVENLTRQSEYL-SQS				339
Query 73	AQSYDIQKAVFESQNK 89				
	A++ +++KA E QN+A				
Sbjct 340	AKA-ELEKATLELQNQA 355				

Range 2: 9 to 32 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
20.0 bits(40)	0.083	Compositional matrix adjust.	11/24(46%)	15/24(62%)	0/24(0%)
Query 172	QTIATAAKAASRTSGITDDVATSA 195				
	Q++ + A AA+ TSGI TSA				
Sbjct 9	QSVRSGASAATATSGINQSEV TSA 32				

Range 3: 223 to 279 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.9 bits(37)	0.19	Compositional matrix adjust.	17/57(30%)	26/57(45%)	1/57(1%)
Query 91	DEKKAGATAALIGGAISSVLGIL-GSFAAINSATKGDVAQQAASAKSIGTVSE 146				
	D +A TAA G +S GIL ++S DVA + S K + T+++				
Sbjct 223	DAPQALKTAAQAFGGLSLAAGILTAGIGGVSSLSISKVGDVANKVGSNIVKVVTTLAD 279				

Range 4: 145 to 242 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.9 bits(37)	0.19	Compositional matrix adjust.	24/98(24%)	38/98(38%)	33/98(33%)
Query 84	ESQNKAIDEKK-----AGATAALIGGAISSVL 110				
	+ QNKA+D K A A AA+ A+ +V+				
Sbjct 145	DGQNKALDNKTLFEFKQLEEQKAEKAKQSKIVGVFGWLVAATAIAAIFNPALWAVV 204				
Query 111	GILGSFAAINSATKGDVAQQAASAKSIGTVSEAS 148				
	I + A+ +A D A QA T+A++ G +S A+				
Sbjct 205	AISATAMALQTAVDVMGDDAPQALKTAAQAFGGLSLAA 242				

Range 5: 222 to 279 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #5

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
13.9 bits(24)	6.5	Compositional matrix adjust.	17/58(29%)	27/58(46%)	3/58(5%)
Query 189	DDVATSQAQKASQVAEEAADAQELAQKAGLLSRFTAAAGRIS---GSTPFIVVTSLAE 243				
	DD + + A+Q + AA L G +S + G ++ GS VVT+LA+				
Sbjct 222	DDAPQALKTAAQAFGGLSLAAGILTAGIGGVSSLSISKVGDVANKVGSNIVKVVTTLAD 279				

EspB und IpaB:

Range 1: 391 to 437 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
19.6 bits(39)	0.20	Compositional matrix adjust.	17/55(31%)	29/55(52%)	8/55(14%)
Query	90	IDEKKAGATAALIGGAISSVLGILGSFAAINSATKASDVAQQAASTSAKSIGTV	144		
		+D KKA +IG S+LG + +A +V +QAA+ A++IG +			
Sbjct	391	VDSKKA----KMIG----SILGAIAGALVLAHVAVLVATVQKQAAKLAENIGKI	437		

Range 2: 201 to 302 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.5 bits(36)	0.45	Compositional matrix adjust.	25/102(25%)	44/102(43%)	7/102(6%)
Query	196	QKASQVAEEAADAQELAQKAGLLSRFTAAAGRISGTFIVVITSLAEGTKLPTTISES	255		
		QK + + D + +L ++ S F+ A ST +T LA T+ + T I			
Sbjct	201	QKTLIHSKLTDKSMQLEKEIDSFSAFSNTASAEQLSTQQSLTGLASVTQLMATFIQLV	260		
Query	256	VKSNHDINEQRAKSVENLQASN-----DTYKQDVRRQD	290		
		K+N + + ++LQ S D Y +VR+A++			
Sbjct	261	GKNNEESLKNLALFQSLQESRKTEMERKSDEYAAEVRKAE	302		

Range 3: 108 to 161 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
17.7 bits(34)	0.75	Compositional matrix adjust.	12/54(22%)	31/54(57%)	4/54(7%)
Query	264	EQRAKSVENLQASN----LDYKQDVRRQDDISSRLRDMTTARDLTDLINRM	313		
		+Q+A+ +NL+ S+ L + + + R + ++L++ + +DL + IN++			
Sbjct	108	QQQARQQKNLEFSDKINTLLSETEGLTRDYEQINKLKNADSKIKDLENKINQI	161		

Range 4: 506 to 580 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.2 bits(30)	1.9	Compositional matrix adjust.	22/77(29%)	34/77(44%)	6/77(7%)
Query	103	GGAISSVLGILGSFAAINSA--TKGASDVAQ--QAASTSAKSIGTVSEASTKALAKASEG	158		
		GG+++S + + A+ N A T V Q + S + + G + E LA S			
Sbjct	506	GGSVAS--AVFQNSASTNLADLTLKSYQVEQLSKYISEAIEKFGQLQEV IADLLASMSNS	563		
Query	159	IADAADDAAGAMQQTIA	175		
		A+ D A +QQT A			
Sbjct	564	QANRTDVAKAILQQTIA	580		

EspB und IpaC:

Range 1: 168 to 200 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.1 bits(35)	0.37	Compositional matrix adjust.	11/33(33%)	16/33(48%)	0/33(0%)
Query	157	EGIADAADDAAGAMQQTIIATAAKAASRTSGITD	189		
		+G+A + GA+ Q T A SGI+D			
Sbjct	168	QGLAALSSSITGAVTQVGITGIGAKKTHSGISD	200		

EspD und IpaB:

Range 1: 252 to 328 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
22.3 bits(46)	0.030	Compositional matrix adjust.	21/81(26%)	38/81(46%)	7/81(8%)
Query 119	MMATLLSLDASAQRVASMKNSNEIYA---DGQNKALDNKTLEFKKQLEEQKAEKAQKS				175
	+MAT + L S+KN ++ + + ++ K+ E+ E +KAE +				
Sbjct 252	LMATFIQL-VGKNNEESLKNLALFQSLQESRKTEMERKSDEYAA---EVRKAEELNRVM				307
Query 176	KIVGQVFGWLGVAATAIAAIF 196				
	VG++ G L + +AA F				
Sbjct 308	GCVGKILGALLTIIVSVVAAAF 328				

Range 2: 149 to 158 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.9 bits(32)	1.4	Compositional matrix adjust.	5/10(50%)	8/10(80%)	0/10(0%)
Query 257	SKVGDVANKV 266				
	SK+ D+ NK+				
Sbjct 149	SKIKDLENKI 158				

Range 3: 139 to 167 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.9 bits(32)	1.5	Compositional matrix adjust.	10/34(29%)	19/34(55%)	5/34(14%)
Query 131	QRVASMKNSNEIYADGQNKALDNKTLEFKKQLEE 164				
	+++ +KN AD + K L+NK + + +L E				
Sbjct 139	KQINKLKN-----ADSKIKDLENKINQIOTRLSE 167				

EspD und IpaD:

Range 1: 129 to 229 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.6 bits(26)	5.7	Compositional matrix adjust.	22/107(21%)	48/107(44%)	7/107(6%)
Query 249	IGGVSSLISKVGDVANKVGSNIVKVVTTLADTFVDNVASK-ISAVANGLTSSRSIGTTV 307				
	I V+ L+S + K+GS + + + +N+ + ++A+++ +T + +G T				
Sbjct 129	IISVAVLLSALRTAETKLGSQLSLIAFDATKSAENIVRQGLAALSSSITGAVTQVGITG 188				
Query 308	LNNDAAYYNVLSQVSAFAVENLTRQSEYLSQSAKAELEKATLELQNQ 354				
	+ + + Q A R++ +QS + EL + L L Q				
Sbjct 189	IGAKKTHSGISDQK GAL-----RKNLATAQSLEKELAGSKLGLNKQ 229				

IpaB und IpaC:

Range 1: 91 to 101 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.8 bits(29)	3.1	Compositional matrix adjust.	6/11(55%)	9/11(81%)	0/11(0%)
Query 206	IHSKLTDKSMQ 216				
	I ++LTDK M+				
Sbjct 91	IIARLTDKMK 101				

CT_578 und YopB:

Range 1: 359 to 375 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.9 bits(37)	0.38	Compositional matrix adjust.	6/17(35%)	10/17(58%)	0/17(0%)
Query	223	IDKEREEFFKKMQEIQQK	239		
		ID+ +EE + E Q+			
Sbjct	359	IDRLKEELSHLSESHQQ	375		

Range 2: 139 to 204 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.1 bits(35)	0.57	Compositional matrix adjust.	17/66(26%)	32/66(48%)	7/66(10%)
Query	222	KIDKEREEFFKKMQEIQQ---KSGTNST----MDTVNKVMIGVTVAITVISVVSALFTCGL	274		
		KI++ +E+ K+ +E + KSG S + + V+IG + + + V+			
Sbjct	139	KIEENQEKIKETEENAKQVKKSGMASKIFGWLSAIASVVIGAIMVASGVGAVAGAMMIAS	198		
Query	275	GLIGTA	280		
		G+IG A			
Sbjct	199	GVIGMA	204		

Range 3: 373 to 386 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.6 bits(26)	6.7	Compositional matrix adjust.	5/14(36%)	8/14(57%)	0/14(0%)
Query	173	RQEVMEISLALAKA	186		
		Q+VME+ + A			
Sbjct	373	HQQVMELIFQMINA	386		

CT_578 und YopD:

Range 1: 124 to 141 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.5 bits(36)	0.32	Compositional matrix adjust.	7/18(39%)	14/18(77%)	0/18(0%)
Query	468	TGAQIAKALSAISGALAA	485		
		+GA++ A++ +SG +AA			
Sbjct	124	SGAKLMIAMAVVSGIMAA	141		

Range 2: 143 to 160 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.8 bits(29)	2.2	Compositional matrix adjust.	7/18(39%)	13/18(72%)	0/18(0%)
Query	303	TTVATQVTMQAVVQVVKQ	320		
		+TVA+ ++ V++VKQ			
Sbjct	143	STVASAFSIAKEVKIVKQ	160		

CT_578 und PopB:

Range 1: 345 to 371 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	15.0 bits(27)	5.5	Compositional matrix adjust.	5/27(19%)	16/27(59%)	0/27(0%)
Query	340	QGIKQAIKQAVKAAVKTAKNVGKIFS		366		
		QG+ + +K+ + ++ + + +IF+				
Sbjct	345	QGVIERLKEELSRMLEAFQEIMERIFA		371		

CT_578 und PopD:

Range 1: 114 to 135 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	15.4 bits(28)	2.9	Compositional matrix adjust.	9/22(41%)	16/22(72%)	2/22(9%)
Query	467	KTGAQIAKALSALS--GALAAA		486		
		++GA + A++ I+ GALA+A				
Sbjct	114	RSGATLMIAMAVIAGVGALASA		135		

Range 2: 82 to 98 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	15.0 bits(27)	3.6	Compositional matrix adjust.	6/17(35%)	10/17(58%)	0/17(0%)
Query	419	ELAQIQKEVGALTAQSE		435		
		+AQ +E+G L +E				
Sbjct	82	RIAQKARELGVLQRDNE		98		

CT_578 uns SipB:

Range 1: 253 to 394 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	41.2 bits(95)	5e-08	Compositional matrix adjust.	45/165(27%)	80/165(48%)	28/165(16%)
Query	176	VMEISLALAKAITALGESTQAALN-----FQSTQ-SQSANMNKMSLESQGLKIDKEREFF		230		
		V +++ +A I +G++T+ +L+N F + Q + A M K S E Q EE				
Sbjct	253	VARLTMLMAMFIEIVGKNTEESLQNDLALFNALQEGRQAEMEKKSAEFQ-----EET		304		
Query	231	KKMQEIQQKSGTNSTMDTVNKMVIGVTVAITVISVVSALFTCGLGLIGTAAAGATAAAAG		290		
		+K +E TN M + KV+ + +T++SVV+A+FT G L AA G A				
Sbjct	305	RKAEE-----TNRIMGICIGKVLGAL---LTIVSVVAAVFTGGASL-ALAAVGLAVMVAD		354		
Query	291	ATAAATATSVAATTVATQVTMQAVVQVVKQAIQAVKQAIQAIK		335		
		A T S Q + +++ V + +++ + +AI +A++				
Sbjct	355	EIVKAATGVSF-----IQQALNPIMEHVLKPLMELIGKAITKALE		394		

Range 2: 131 to 139 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	15.8 bits(29)	5.3	Compositional matrix adjust.	6/9(67%)	8/9(88%)	0/9(0%)
Query	188	TALGESTQA		196		
		TALGE+ +A				
Sbjct	131	TALGEAQEA		139		

CT_578 und SipC:

Range 1: 326 to 403 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
21.9 bits(45)	0.042	Compositional matrix adjust.	26/82(32%)	38/82(46%)	4/82(4%)
Query 52	DLSMESDVAVAGTAGKDRAASASQIEGQELIEQQGLAAGKETASADATSLTQSASKGASS				111
	DL M++ V V G AG AS QE EQQ AS + +S+ K S				
Sbjct 326	DLIMKNSVTVGGIAG----ASGQYAATQERSEQQISQVNNRVASTASDEARESSRKSTSL				381
Query 112	QQCIEDTSKSLELSSLSLSSV	133			
	Q + T +S+ S S+L+++				
Sbjct 382	IQEMLKTMESINQSKASALAAI	403			

Range 2: 195 to 247 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.4 bits(28)	4.5	Compositional matrix adjust.	18/66(27%)	26/66(39%)	17/66(25%)
Query 419	ELAQIQKEVGALTAQSEMMKAFILFWQQASKIAAKQTESPSETQ----QQAAKTGAQIAK				474
	E +Q E GAL A+KI TES S Q + K GA+				
Sbjct 195	EYKGLQNERGAL-----KHNAAKIDKLTTESHSIKNVNLNGQNSVKLGAEGVD				241
Query 475	ALSAIS	480			
	+L +++				
Sbjct 242	SLKSLN	247			

CT_578 und SseC:

Range 1: 160 to 181 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.9 bits(32)	1.4	Compositional matrix adjust.	9/23(39%)	12/23(52%)	6/23(26%)
Query 390	WVTILGV-----GALTAVPQLVSG	407			
	W+T G+ GAL V +SG				
Sbjct 160	WIT-GIFETVIGALKVVEGFSLG	181			

CT_578 und SseD:

Range 1: 10 to 22 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
19.2 bits(38)	0.12	Compositional matrix adjust.	7/13(54%)	8/13(61%)	0/13(0%)
Query 160	LETPGLPKPSTTP	172			
	L P L PS+TP				
Sbjct 10	LPAPSLLTPTSSTP	22			

Range 2: 102 to 118 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.8 bits(29)	1.2	Compositional matrix adjust.	6/17(35%)	12/17(70%)	0/17(0%)
Query 391	VTLGVGALTAVPQLVSG	407			
	+T+G+GA+ L++G				

Sbjct 102 LTIGLGAVGGETGLIAG 118

Range 3: 2 to 23 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
13.5 bits(23)	7.2	Compositional matrix adjust.	7/22(32%)	11/22(50%)	0/22(0%)
Query 10	DSSNLKNVLSQVIASTPQGVPN	31			
	++SN+ VL TP P+				
Sbjct 2	EASNVALVLPAPSLLTPTSSTPS	23			

CT 578 und EspB:

Range 1: 50 to 94 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
19.6 bits(39)	0.17	Compositional matrix adjust.	14/52(27%)	26/52(50%)	7/52(13%)
Query 176	VMEISLALAKAITALGESTQAALNFQSTQSQSANMNKMSLESQGLKIDKER	227			
	++E+ L + +T L + Q L +QS ++ K ESQ ID+++				
Sbjct 50	LLEVQKLLREMTTLQDYLQKQL-----AQSIDIQKAVFESQNKAIDEKK	94			

Range 2: 121 to 141 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.8 bits(29)	2.2	Compositional matrix adjust.	10/21(48%)	15/21(71%)	2/21(9%)
Query 104	SASKGAS--SQQCIEDTSKSL	122			
	SA+KGAS +QQ ++KS+				
Sbjct 121	SATKGASDVAQQAASTSAKSI	141			

CT 578 und EspD:

Range 1: 138 to 168 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
25.8 bits(55)	0.002	Compositional matrix adjust.	12/31(39%)	18/31(58%)	0/31(0%)
Query 210	NMNKMSLESQGLKIDKEREFEFKMQEIQQKS	240			
	N N++ + Q +D + EFKK E QQK+				
Sbjct 138	NSNEIYADGQNKALDNKTLEFKKQLEEQQKA	168			

Range 2: 314 to 321 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.8 bits(29)	2.8	Compositional matrix adjust.	6/8(75%)	6/8(75%)	0/8(0%)
Query 14	LKNVLSQV	21			
	NVLSQV				
Sbjct 314	YYNVLSQV	321			

CT 578 und IpaB:

Range 1: 253 to 331 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	28.9 bits(63)	4e-04	Compositional matrix adjust.	24/95(25%)	50/95(52%)	20/95(21%)
Query	183	LAKAITALGESTQAALEN----	FQSTQSQSANMNKMSLESQGLKIDKEREFEFKMQEIQQ	238		
		+A I +G++ + +L+N	FQS Q	ES+ +++++ +E+	E+++	
Sbjct	253	MATFIQLVGNNEESLKNLALFQSLQ-----	ESRKTEMERKSDEYAA--EVRK	299		
Query	239	KSGTNSTMDTVNKVMIGVTVVAITVISVVSALFTCG	273			
		N M V K++ + +T++SVV+A F+ G				
Sbjct	300	AEELNRVMGCVGKILGAL---LTIVSVVAAAFSGG	331			

Range 2: 507 to 552 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	18.1 bits(35)	0.98	Compositional matrix adjust.	12/46(26%)	21/46(45%)	0/46(0%)
Query	191	GESTQAALNFQSTQSQSANMNKMSLESQGLKIDKEREFEFKMQEI	236			
		G A +N ST ++K +E I + E+F ++QE+				
Sbjct	507	GSVASAVFQNSASTNLADLTLSKYQVEQLSKYISEAIEKFGQLQEV	552			

CT_578 und IpaD:

Range 1: 30 to 48 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	20.4 bits(41)	0.092	Compositional matrix adjust.	11/23(48%)	16/23(69%)	4/23(17%)
Query	441	TLFWQQASKIAAKQTESPSETQQ	463			
		TL+ + I+ KQT+S SETQ+				
Sbjct	30	TLY----TDISTKQTQSSSETQK	48			

Range 2: 98 to 142 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	18.9 bits(37)	0.33	Compositional matrix adjust.	14/45(31%)	26/45(57%)	3/45(6%)
Query	231	KKMQEIQQKSGT---NSTMDTVNKVMIGVTVVAITVISVVSALFTC	272			
		KKM+++ + S T +T+D + V++ I+V ++SAL T				
Sbjct	98	KKMKDLSEMSHTLTPENTLDISSLSSNAVSLIISVAVLLSALRTA	142			

CT_579 und YopB:

Range 1: 248 to 301 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	15.8 bits(29)	2.4	Compositional matrix adjust.	20/57(35%)	28/57(49%)	3/57(5%)
Query	255	SALDDVAGTATAVGAKATSGAASAASSAATKLTQNMESASKTLSQTASKSAGGLFG	311			
		SAL +A +GA S AA A +A K+ Q ++ S T+ +K GG FG				
Sbjct	248	SALKCLADIGAKLGANTASLAAKGAEFSA-KVAQ-ISTGISNTVGNVAVTK-LGGSFG	301			

CT_579 und YopD:

Range 1: 227 to 244 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	18.9 bits(37)	0.22	Compositional matrix adjust.	8/18(44%)	13/18(72%)	0/18(0%)
Query	416	FNSALQTLQSI SDSALQT	433			
		FN+A Q L +++SA+Q				
Sbjct	227	FNAATQLGQMANSIQV	244			

Range 2: 62 to 77 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	14.6 bits(26)	4.8	Compositional matrix adjust.	8/16(50%)	11/16(68%)	3/16(18%)
Query	322	KVSRGMNVV---KTQG	334			
		K S+G+NV K+QG				
Sbjct	62	KPSQGINVALLSKSQG	77			

Range 3: 122 to 145 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	13.9 bits(24)	7.3	Compositional matrix adjust.	7/26(27%)	16/26(61%)	2/26(7%)
Query	201	LISGITNIVGFAVSVGGGILSASKSL	226			
		++SG ++ AV GI++A+ ++				
Sbjct	122	MVSGAKLMIAMAVV--SGIMAATSTV	145			

CT_579 und PopB:

Range 1: 246 to 277 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	15.8 bits(29)	2.9	Compositional matrix adjust.	12/33(36%)	16/33(48%)	1/33(3%)
Query	208	IVGFAVSVGGGILSASKSLGGLKSAFTNETAS	240			
		+V F S GG+ +GG K+A T AS				
Sbjct	246	VVSFSGSAVGLARLGAKIGG-KAAEMTASLAS	277			

Range 2: 200 to 206 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	14.6 bits(26)	5.4	Compositional matrix adjust.	5/7(71%)	6/7(85%)	0/7(0%)
Query	365	IVGGVIG	371			
		I GGV+G				
Sbjct	200	IAGGVMG	206			

CT_579 und PopD:

Range 1: 78 to 145 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	16.2 bits(30)	1.3	Compositional matrix adjust.	25/90(28%)	40/90(44%)	24/90(26%)
Query	144	LIMTLAQASAKSWSSSFQQQNQAIQNVAMAPEIGNAIRTQANHQAQATELQAQQLIS	203			
		LI+ +AQ + + +NQ+I I Q +AQ E++ S				
Sbjct	78	LILFRIAQKARELGVLQRDNENQSI-----IHAQ---KAQVDEMR-----S	115			
Query	204	GITNIVGFAVSVGGGILSASK--SLGGLKS	231			
		G T ++ AV G G L+++ SLG LK+				
Sbjct	116	GATLMIAMAVIAGVGLASAVVGSGLGALKN	145			

CT_579 und SipB:

Range 1: 290 to 307 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.6 bits(26)	9.7	Compositional matrix adjust.	4/18(22%)	13/18(72%)	0/18(0%)
Query 398	QAQYASQAQQLQEQSQQS		415		
	QA+ ++ +QE+++++				
Sbjct 290	QAEMEKSAEFQEETRKA		307		

CT_579 und SipC:

Range 1: 90 to 122 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
19.6 bits(39)	0.18	Compositional matrix adjust.	11/34(32%)	19/34(55%)	1/34(2%)
Query 178	IGNAIRTQANHQAQATELQAQQSLISGITNIVGF		211		
	+ N + T+AN Q T+L+ QQ+ + +I G				
Sbjct 90	LANNVTTKANEVVQ-TQLREQQAEVKGFFDISGM		122		

Range 2: 177 to 184 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.0 bits(27)	4.4	Compositional matrix adjust.	7/8(88%)	7/8(87%)	0/8(0%)
Query 425	SISDSALQ		432		
	SIS SALQ				
Sbjct 177	SISQSALQ		184		

Range 3: 213 to 257 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.6 bits(26)	7.2	Compositional matrix adjust.	15/48(31%)	22/48(45%)	3/48(6%)
Query 16	LAQLTQANASASAASTGKNGQVAGAKQENVNDASFEDLLQDAQGTGGSK		63		
	+ +LT ++S G+N GA E VD S + L GT +K				
Sbjct 213	IDKLTTESHSIKNVLNGQNSVKLGA--EGVD-SLKSLNMKKTGTDATK		257		

CT_579 und SseC:

Range 1: 225 to 305 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
26.6 bits(57)	0.001	Compositional matrix adjust.	23/94(24%)	42/94(44%)	17/94(18%)
Query 335	TRAAKFAGRALSSAMNISQMVHGL--TAGIDGIVGGVIGAQVAQE--QRMAGMAEARAEE		390		
	T +F A++ A+++ Q+ T G+ G V+ + +E +RM G EA EE				
Sbjct 225	TSKIQFGCEAVALALDVFQIGRAFMATRGLSGAAAKVLDLDSGFGEVVERMVGAGEAEEIEE		284		
Query 391	LKSLNSVQAQYASQAQQLQEQSQSQSFNSALQTLQ		424		
	L A++ E+ +SF+ + L+				
Sbjct 285	L-----AEKFGEEVSESFQKQFEPL		305		

Range 2: 322 to 336 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
-------	--------	--------	------------	-----------	------

14.2 bits(25) 9.4 Compositional matrix adjust. 6/15(40%) 8/15(53%) 0/15(0%)
 Query 62 SKKATANQTSKSGKS 76
 S+ N T +GKS
 Sbjct 322 SRNVENMTRSAGKS 336

CT 579 und SseD:

Range 1: 149 to 161 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	16.5 bits(31)	0.61	Compositional matrix adjust.	6/13(46%)	9/13(69%)	0/13(0%)
Query	408	LQEQSQSFSNSAL	420			
		LQ+ QS+N +L				
Sbjct	149	LQQNGAQSYNKSL	161			

Range 2: 11 to 16 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	15.8 bits(29)	1.3	Compositional matrix adjust.	5/6(83%)	5/6(83%)	0/6(0%)
Query	11	PDPSSL	16			
		P PSSL				
Sbjct	11	PAPSSL	16			

Range 3: 127 to 175 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	13.1 bits(22)	9.0	Compositional matrix adjust.	13/49(27%)	24/49(48%)	1/49(2%)
Query	361	GIDGIVGGVIGAQVAQEQRMAEAEARAEEL-KSLNSVQAQYASQAQQL	408			
		G+ G+ GV Q Q++ +A + + A+ KSL + + QQ+				
Sbjct	127	GVMGLGAGVAQRQSDQDKAIADLQQNGAQSYNKSLTEIMEKATEIMQQI	175			

CT 579 und EspB:

Range 1: 101 to 113 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	14.2 bits(25)	6.1	Compositional matrix adjust.	6/13(46%)	9/13(69%)	0/13(0%)
Query	208	IVGFAVSVGGGIL	220			
		++G A+S GIL				
Sbjct	101	LIGGAISSVLGIL	113			

CT 579 und EspD:

Range 1: 267 to 338 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	19.2 bits(38)	0.23	Compositional matrix adjust.	22/79(28%)	32/79(40%)	7/79(8%)
Query	326	GMNVVKTQGTAAKFAGRALSSAMNISQMVHGLTAGIDGIVGGVIGAQVAQEQRMAEAE	385			

Sbjct 267 G N+VK T A F A IS + +GLT I V+ A ++ ++
 GSNIVKVVTTLADTFVDNV---ASKISAVANGLTSSRSIGTTVLNNDAAAYNVLSQVSA 323

Query 386 ARAEELKSLNSVQAQYASQ 404
 E L Q++Y SQ

Sbjct 324 FAVENLTR---QSEYLSQ 338

Range 2: 219 to 225 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.9 bits(32)	1.3	Compositional matrix adjust.	5/7(71%)	6/7(85%)	0/7(0%)
Query 5	VRGDNAP	11			
	V GD+AP				
Sbjct 219	VMGDDAP	225			

CT_579 und IpaB:

Range 1: 143 to 154 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.4 bits(28)	5.3	Compositional matrix adjust.	5/12(42%)	8/12(66%)	0/12(0%)
Query 41	KQENVNASFEDL	52			
	K +N D+ +DL				
Sbjct 143	KLKNADSKIKDL	154			

Range 2: 61 to 93 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.4 bits(28)	5.5	Compositional matrix adjust.	11/33(33%)	14/33(42%)	0/33(0%)
Query 9	NAPDPSLLAQLTQNANSASAASTGKNGQVAGAK	41			
	N P L A + NA+S G Q+ G K				
Sbjct 61	NILPELKAPKSLNASSQLTLLIGNLIQILGEK	93			

CT_579 und IpaC:

Range 1: 317 to 364 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.5 bits(36)	0.35	Compositional matrix adjust.	16/51(31%)	27/51(52%)	3/51(5%)
Query 379	RMAGMAEAREAEELKSLNSVQAQYASQAQQLQEQQSQQSFNSALQTLQSI SDS	429			
	R A E + + +S QA+ AS Q+ +++ Q+ N +Q L +I DS				
Sbjct 317	RYASALEEEEEQLISQASSKQAE EAS---QVSKEASQATNQLIQKLLNIIDS	364			

CPn0808:

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 50% :

1. from 382 to 432 (length = 51) with max = 85.8%

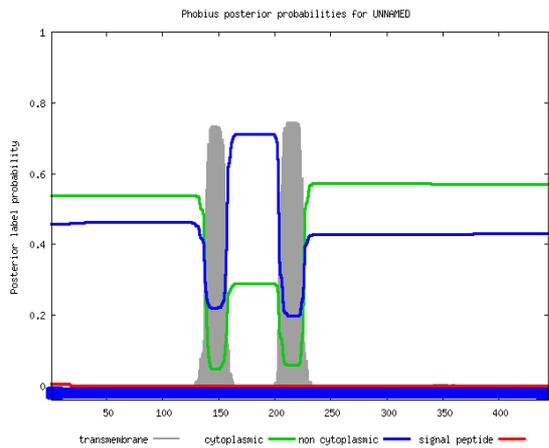
Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

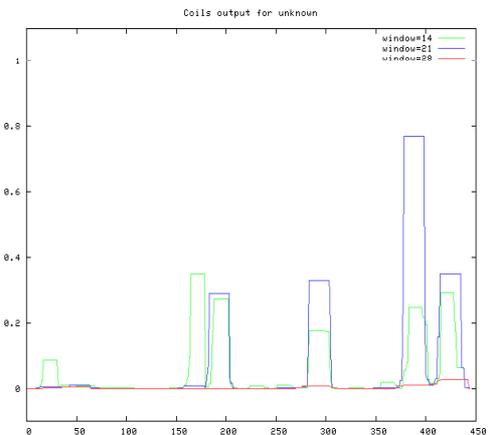
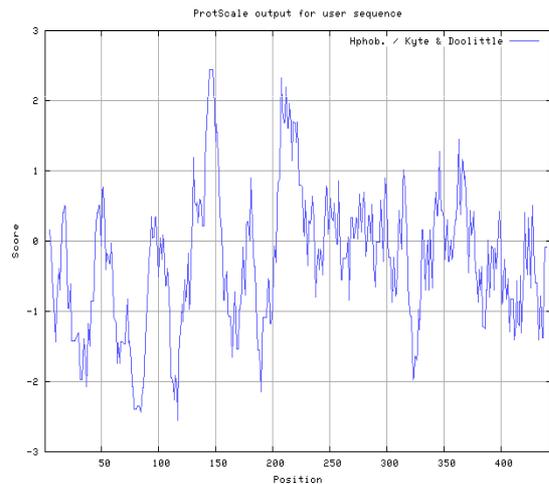
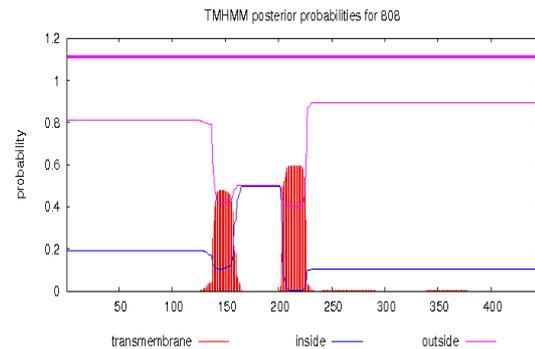
Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 444 NON CYTOPLASMIC.
//
```



```
# 808 Length: 444
# 808 Number of predicted TMs: 0
# 808 Exp number of AAs in TMs: 23.11874
# 808 Exp number, first 60 AAs: 0
# 808 Total prob of N-in: 0.19007
808 TMHMM2.0 outside 1 444
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.



[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
SseC	Secretion system effector C (SseC) like ...	Family	n/a	144	442	144	441	1	305	306	97.8	6.8e-28	n/a	Show

Comments or questions on the site? Send a mail to pfam-help@ebi.ac.uk.
European Molecular Biology Laboratory

CPn0809

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 50% :

1. from 121 to 140 (length = 20) with max = 62.0%
2. from 210 to 247 (length = 38) with max = 87.8%
3. from 411 to 436 (length = 26) with max = 89.6%

Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

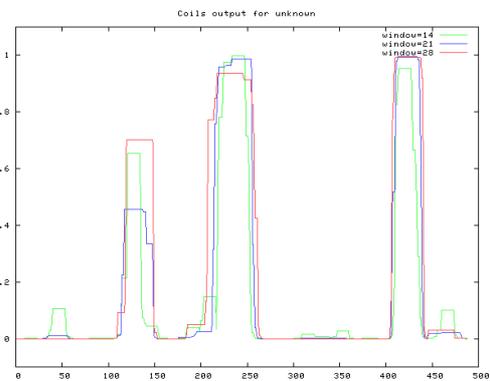
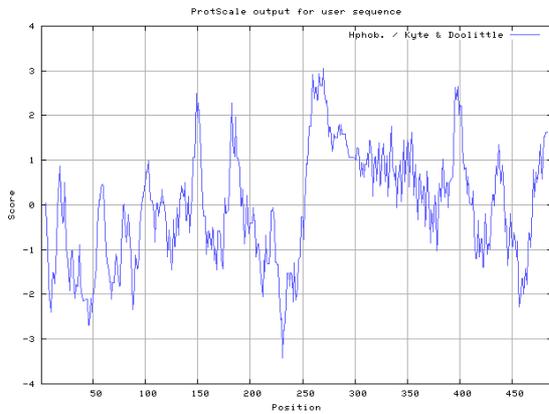
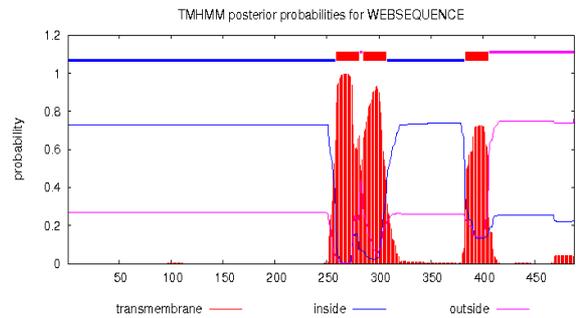
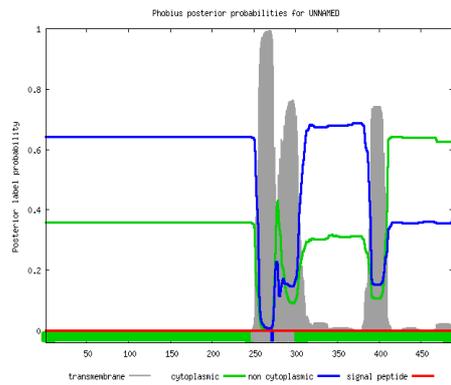
Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 251 CYTOPLASMIC.
FT TRANSMEM 252 274
FT TOPO_DOM 275 279 NON CYTOPLASMIC.
FT TRANSMEM 280 303
FT TOPO_DOM 304 488 CYTOPLASMIC.
//
```

```
# WEBSSEQUENCE Length: 488
# WEBSSEQUENCE Number of predicted TMHs: 3
# WEBSSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 60.52482
# WEBSSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0
# WEBSSEQUENCE Total prob of N-in: 0.73067
WEBSSEQUENCE TMHMM1.0 inside 1 258
WEBSSEQUENCE TMHMM1.0 TMhelix 259 281
WEBSSEQUENCE TMHMM1.0 outside 282 284
WEBSSEQUENCE TMHMM1.0 TMhelix 285 307
WEBSSEQUENCE TMHMM1.0 inside 308 352
WEBSSEQUENCE TMHMM1.0 TMhelix 383 405
WEBSSEQUENCE TMHMM1.0 outside 406 488
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.



[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
SseC	Secretion system effector C (SseC) like ...	Family	n/a	195	488	203	487	13	305	306	105.3	3.7e-30	n/a	Show

Cpn0810:

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 10% :

1. from 25 to 45 (length = 21) with max = 30.3%

Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

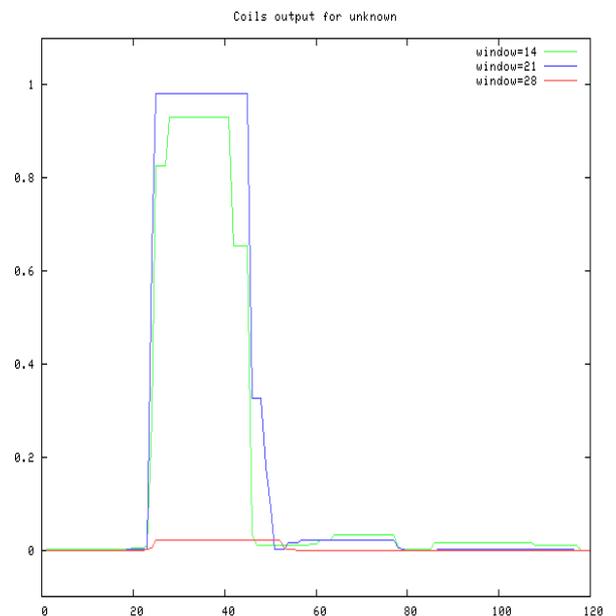
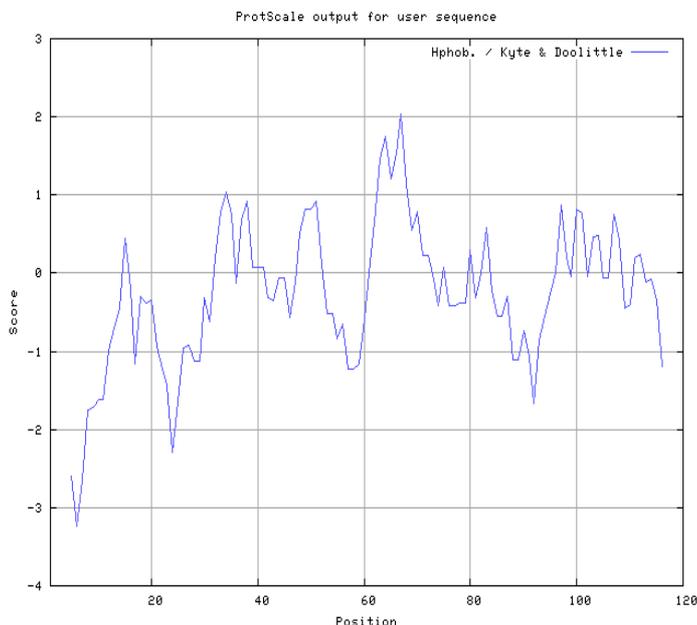
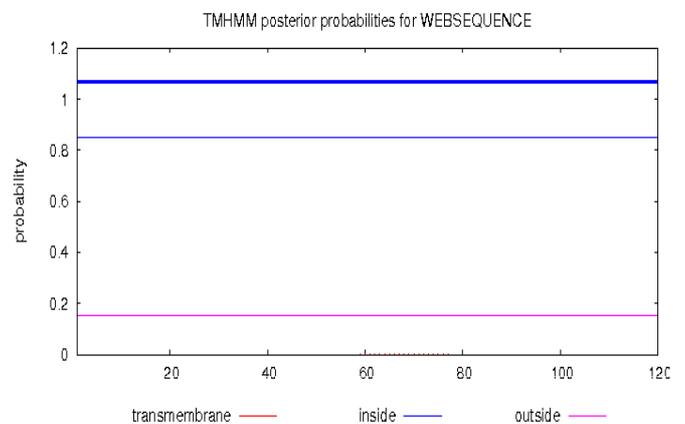
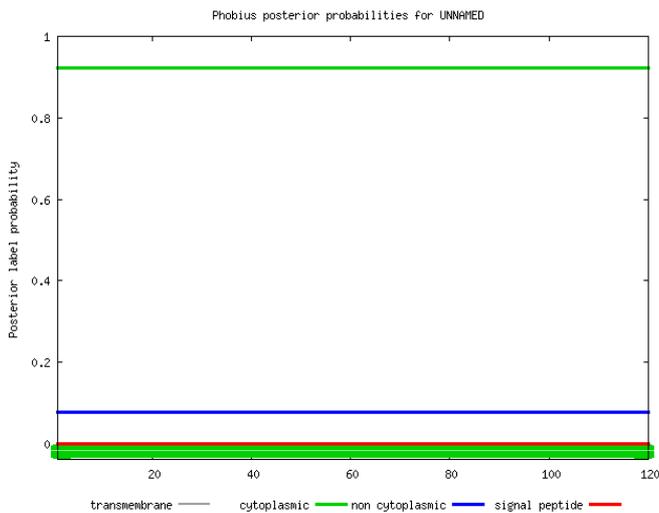
Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 120 CYTOPLASMIC.
//
```

```
# WEBSEQUENCE Length: 120
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 0.00684
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.00058
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.84923
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 inside 1 120
```



Keine
PfamA
Matches

Cpn0811 (LcrH_1):

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 10% :

1. from 20 to 44 (length = 25) with max = 38.8%

Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

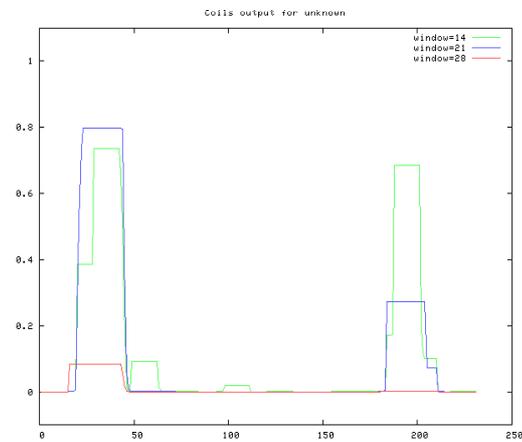
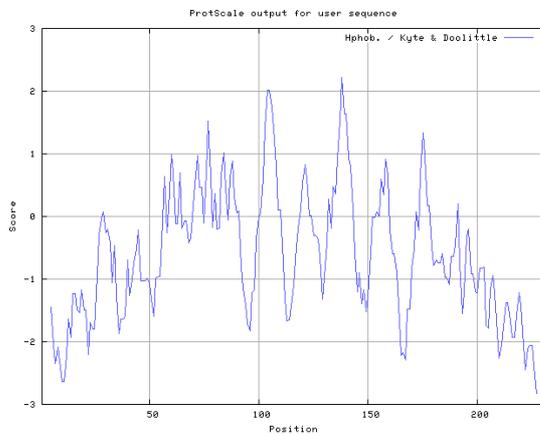
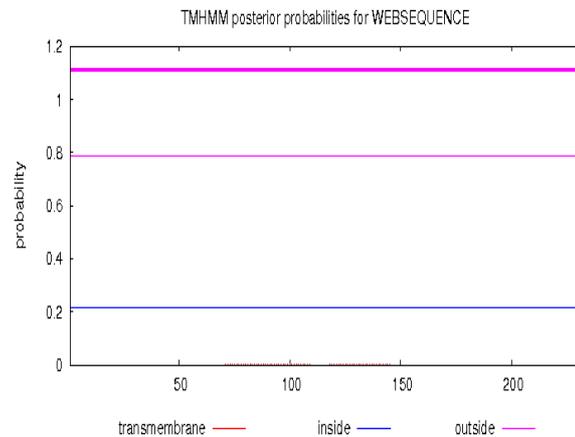
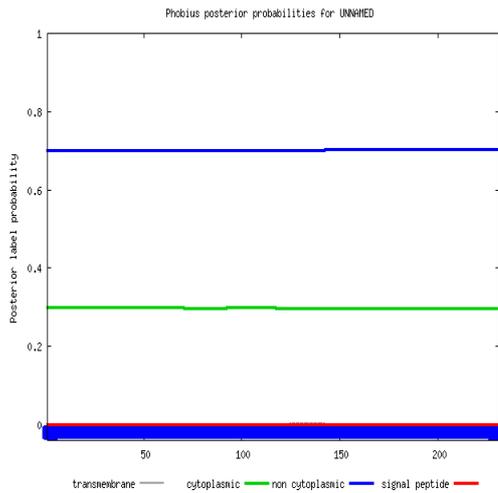
Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 231 NON CYTOPLASMIC.
//
```

```
# WEBSEQUENCE Length: 231
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 0.02976
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.21455
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 231
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.



[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
TPR_3	Tetratricopeptide repeat	Repeat	CL0020	81	114	81	114	1	36	36	42.3	4.4e-11	n/a	Show

Comments or questions on the site? Send a mail to pfam-help@ebi.ac.uk.
European Molecular Biology Laboratory

CPn1019:

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 50% :

1. from 238 to 267 (length = 30) with max = 70.0%

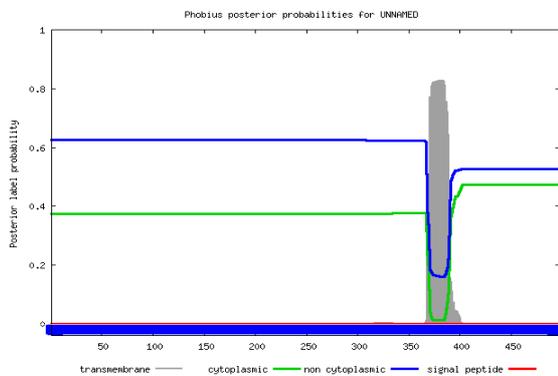
Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

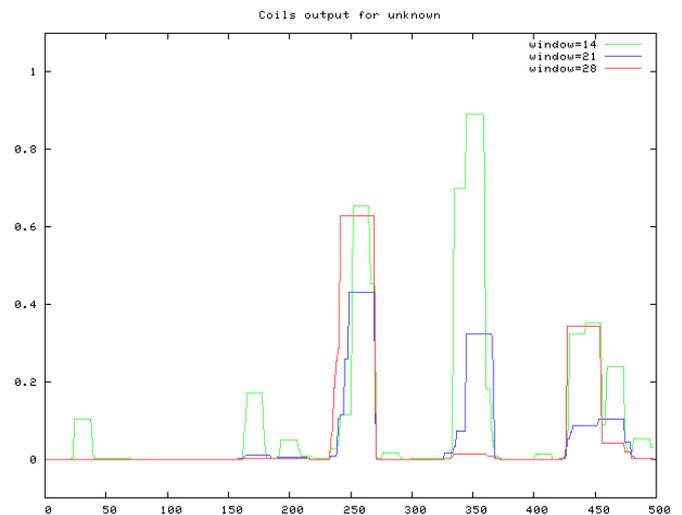
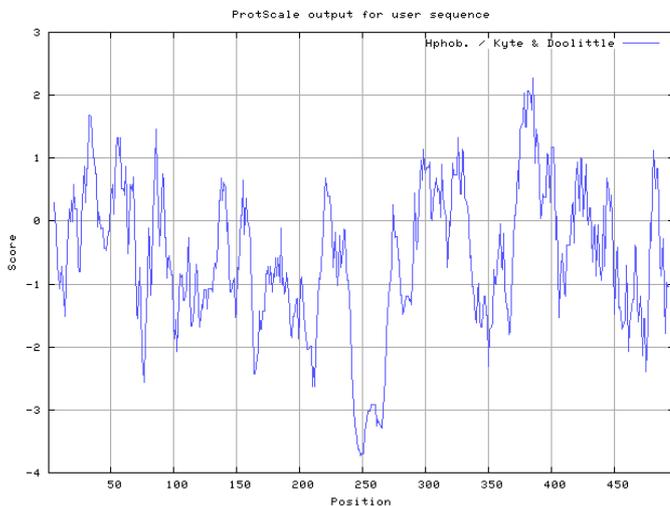
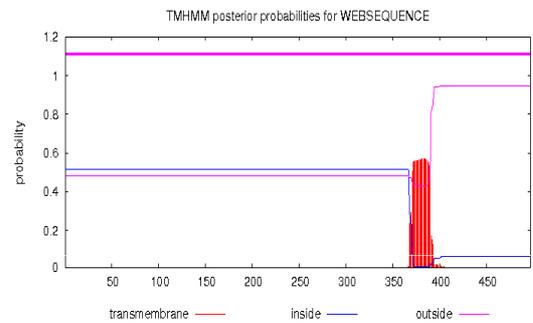
Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 497 NON CYTOPLASMIC.
//
```



```
# WEBSEQUENCE Length: 497
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMs: 12.46033
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.00104
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.51697
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 497
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We did not find any Pfam-A matches to your search sequence. You did not choose to search for Pfam-B matches.

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

CPn1020:

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 50% :

1. from 179 to 207 (length = 29) with max = 59.4%
2. from 446 to 496 (length = 51) with max = 62.3%

Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

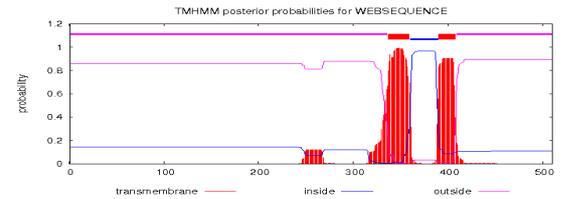
Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

Hat laut NCBI BLASTp doch eine SseC Domäne:

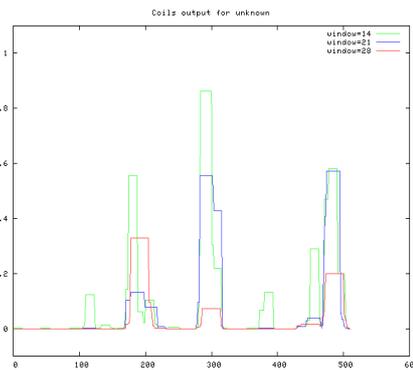
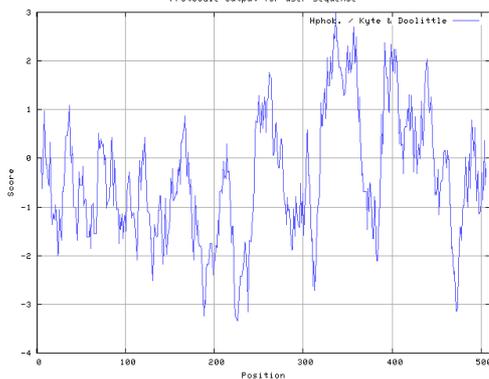
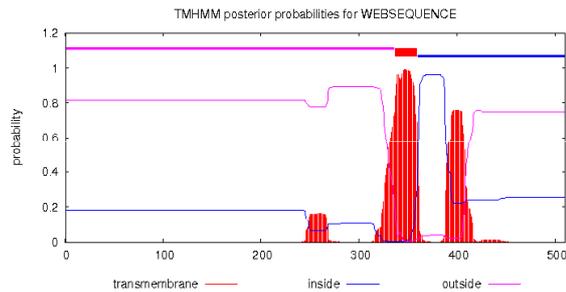
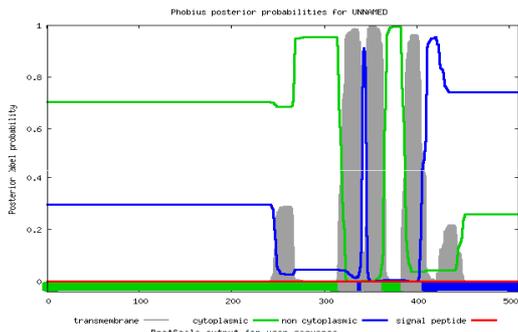
SseC pfam04888 Secretion system effector C (SseC) like family; SseC is a secreted protein that forms a ...
283-351 2.17e-03

```
# WESEQUENCE Length: 510
# WESEQUENCE Number of predicted TMs: 2
# WESEQUENCE Exp number of AAs in TMs: 47.01999
# WESEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0
# WESEQUENCE Total prob of N-in: 0.14004
WESEQUENCE TMHMM1.0 outside 1 336
WESEQUENCE TMHMM1.0 TMhelix 337 359
WESEQUENCE TMHMM1.0 inside 360 389
WESEQUENCE TMHMM1.0 TMhelix 390 405
WESEQUENCE TMHMM1.0 outside 409 510
```



```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 319 CYTOPLASMIC.
FT TRANSMEM 320 340
FT TOPO_DOM 341 345 NON CYTOPLASMIC.
FT TRANSMEM 346 367
FT TOPO_DOM 368 387 CYTOPLASMIC.
FT TRANSMEM 388 410
FT TOPO_DOM 411 510 NON CYTOPLASMIC.
//
```

```
# WESEQUENCE Length: 510
# WESEQUENCE Number of predicted TMs: 1
# WESEQUENCE Exp number of AAs in TMs: 48.70817
# WESEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0
# WESEQUENCE Total prob of N-in: 0.18301
WESEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 336
WESEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 337 359
WESEQUENCE TMHMM2.0 inside 360 510
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We did not find any Pfam-A matches to your search sequence. You did not choose to search for Pfam-B matches.

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

CPn1021 (LcrH_2):

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 10% :

1. from 136 to 146 (length = 11) with max = 12.1%

Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

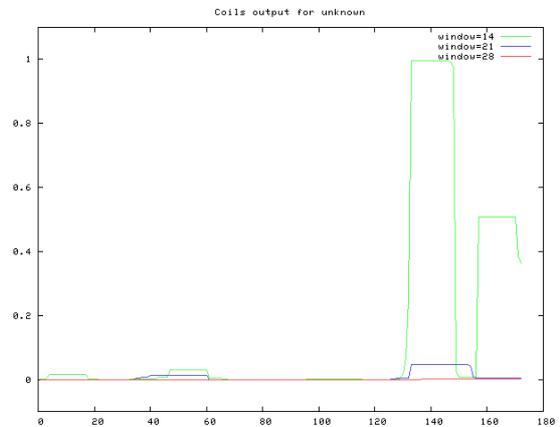
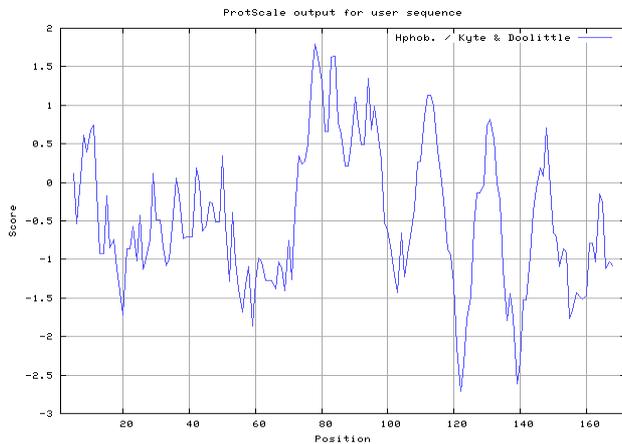
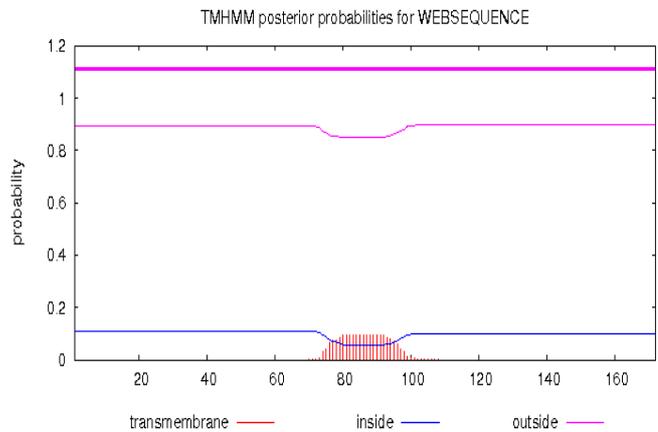
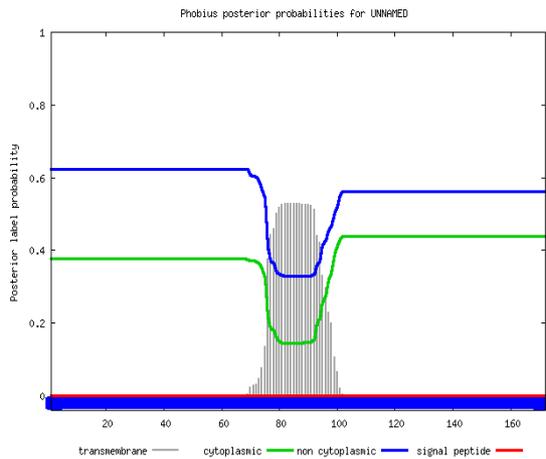
Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 172 NON CYTOPLASMIC.
//
```

```
# WEBSEQUENCE Length: 172
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 2.02037
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.10768
WEBSEQUENCE TMHMM1.0 outside 1 172
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.



[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
TPR_3	Tetratricopeptide repeat	Repeat	CL0020	88	121	88	121	1	36	36	37.7	1.2e-09	n/a	Show

Comments or questions on the site? Send a mail to pfam-help@ebi.ac.uk.

European Molecular Biology Laboratory

CPn1022:

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 90% :

1. from 358 to 389 (length = 32) with max = 96.7%

2. from 431 to 446 (length = 16) with max = 96.2%

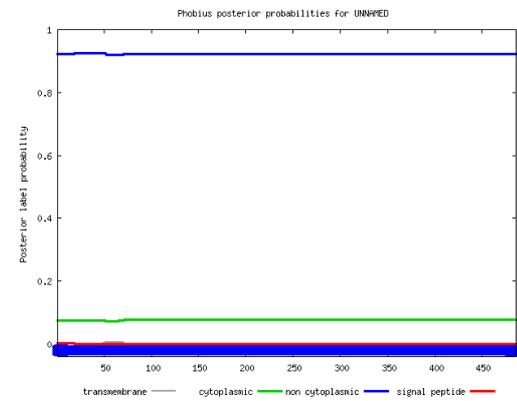
Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

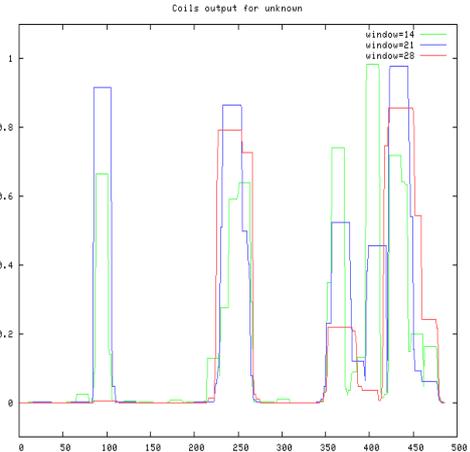
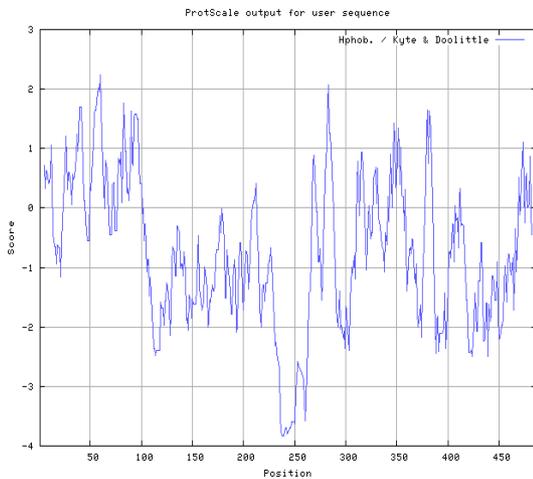
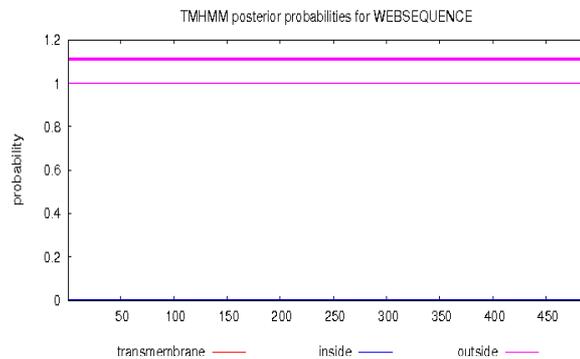
Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 486 NON CYTOPLASMIC.
//
```



```
# WEBSEQUENCE Length: 486
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 0.00148
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.0012
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.00105
WEBSEQUENCE TMHMM1.0 outside 1 486
```



keyword search [Go](#)

Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We did not find any Pfam-A matches to your search sequence. You did not choose to search for Pfam-B matches.

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Comments or questions on the site? Send a mail to pfam-help@ebi.ac.uk.

European Molecular Biology Laboratory

CT_576 (LcrH_1):

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 10% :

1. from 18 to 42 (length = 25) with max = 49.2%

Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

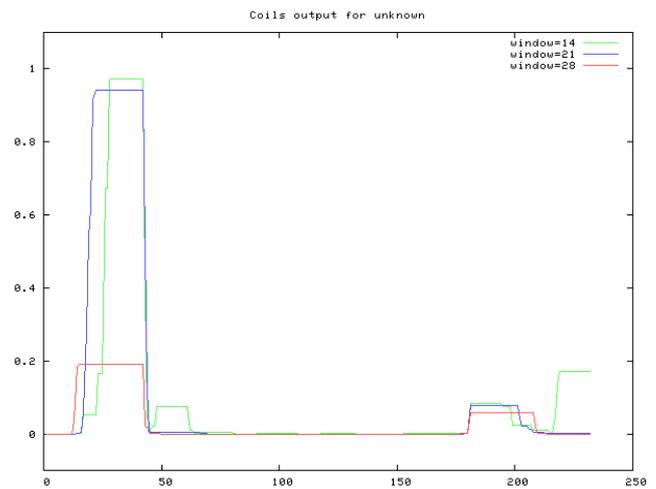
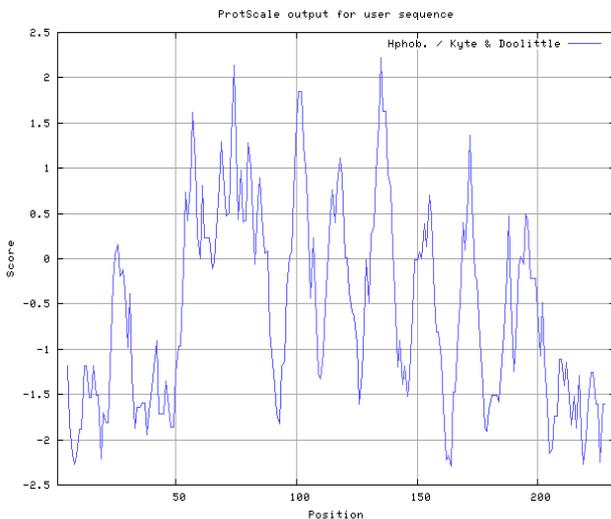
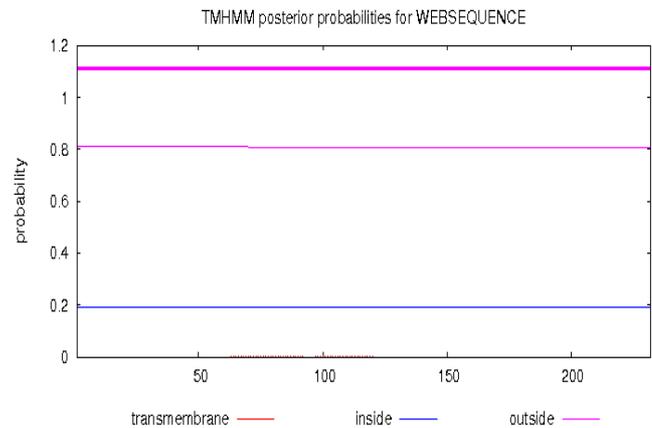
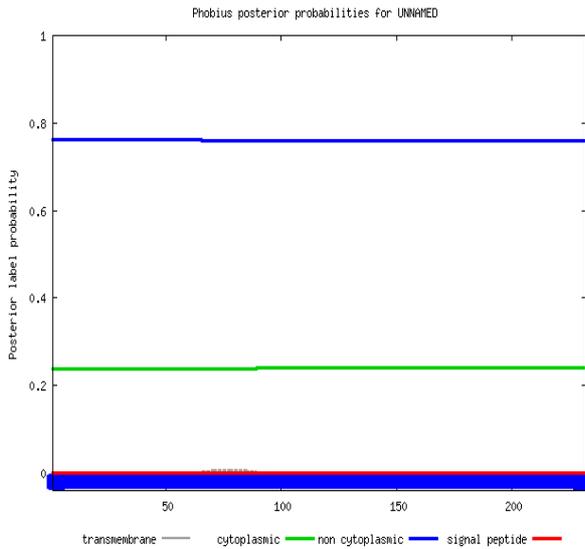
Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 232 NON CYTOPLASMIC.
//
```

```
# WEBSEQUENCE Length: 232
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 0.05263
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.00026
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.18969
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 232
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.



[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
TPR_3	Tetratricopeptide repeat	Repeat	CL0020	78	107	78	105	1	30	36	37,2	1,7e-09	n/a	Show

CT_577:

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 1% :

1. from 48 to 74 (length = 27) with max = 4.7%
2. from 88 to 113 (length = 26) with max = 2.3%

Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

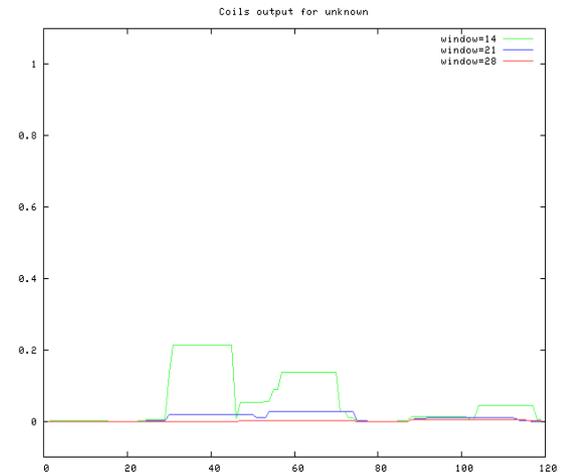
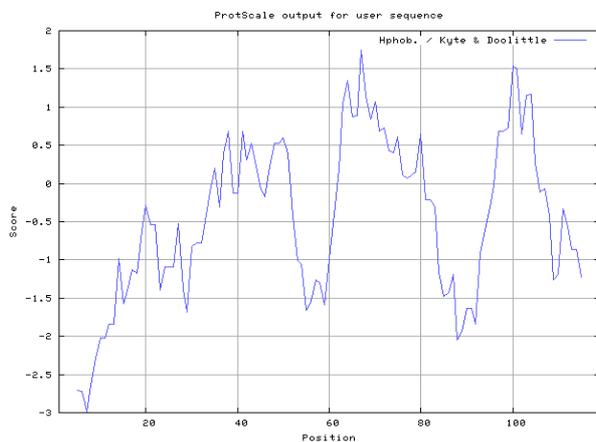
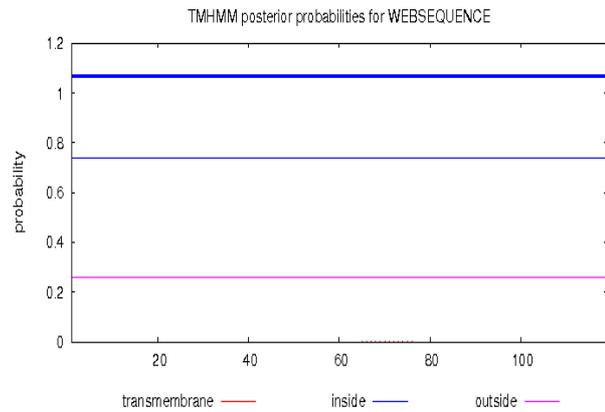
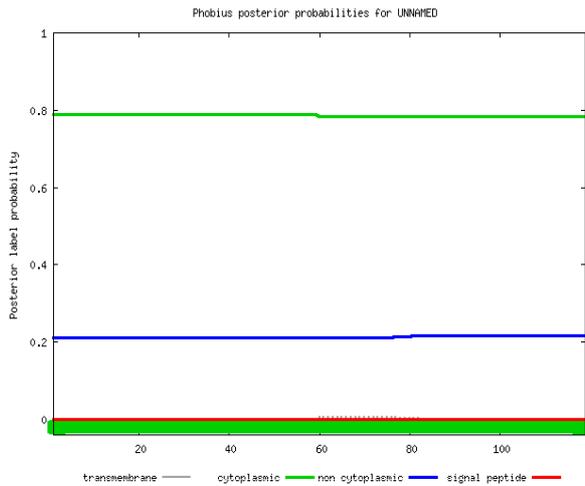
Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

Prediction of UNNAMED

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 119 CYTOPLASMIC.
//
```

```
# WEBSEQUENCE Length: 119
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 0.00266
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.00012
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.74003
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 inside 1 119
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We did not find any Pfam-A matches to your search sequence. You did not choose to search for Pfam-B matches.

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

CT_578 (CopB):

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 90% :

1. from 417 to 427 (length = 11) with max = 92.6%

Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

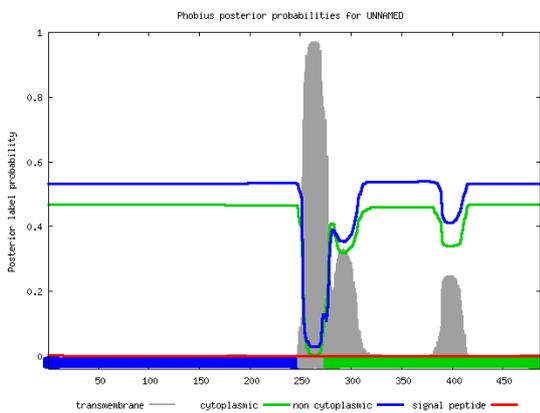
Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

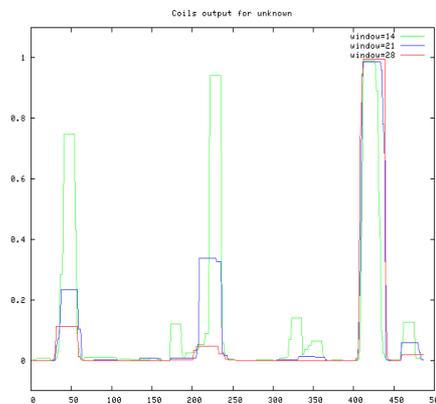
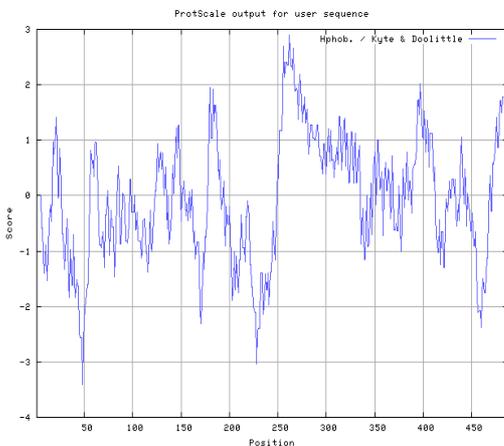
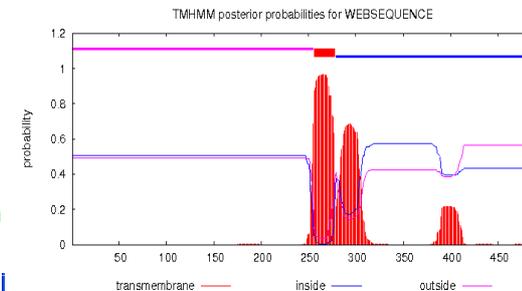
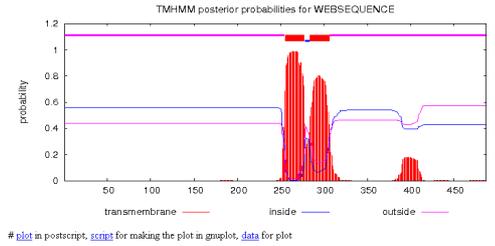
[WebSequence](#) [WebSequence](#)

```
# WEBSSEQUENCE Length: 487
# WEBSSEQUENCE Number of predicted TMHs: 2
# WEBSSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 45.11421
# WEBSSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 9e-05
# WEBSSEQUENCE Total prob of N-in: 0.55960
WEBSSEQUENCE TMHMM1.0 outside 1 254
WEBSSEQUENCE TMHMM1.0 TMHelix 255 277
WEBSSEQUENCE TMHMM1.0 inside 278 283
WEBSSEQUENCE TMHMM1.0 TMHelix 284 306
WEBSSEQUENCE TMHMM1.0 outside 307 487
```

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 251 NON CYTOPLASMIC.
FT TRANSMEM 252 277
FT TOPO_DOM 278 487 CYTOPLASMIC.
//
```



```
# WEBSSEQUENCE Length: 487
# WEBSSEQUENCE Number of predicted TMHs: 1
# WEBSSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 42.85962
# WEBSSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.00018
# WEBSSEQUENCE Total prob of N-in: 0.50848
WEBSSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 255
WEBSSEQUENCE TMHMM2.0 TMHelix 256 278
WEBSSEQUENCE TMHMM2.0 inside 279 487
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.



[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
SseC	Secretion system effector C (SseC) like ...	Family	n/a	194	487	202	485	15	304	306	68.4	6.2e-19	n/a	Show

Comments or questions on the site? Send a mail to pfam-help@ebi.ac.uk.

European Molecular Biology Laboratory

CT_579 (CopD):

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 90% :

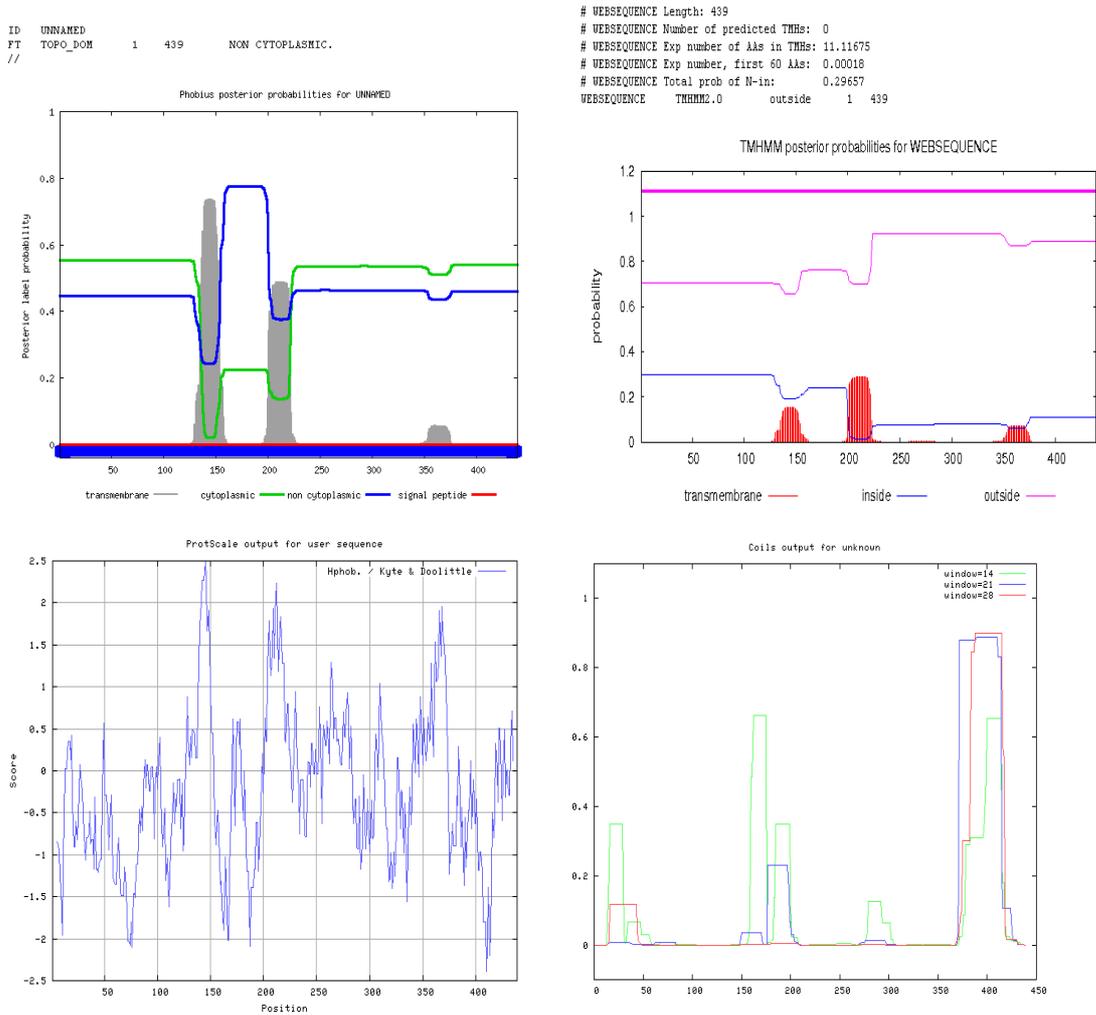
1. from 383 to 414 (length = 32) with max = 99.2%

Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.



[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
SseC	Secretion system effector C (SseC) like ...	Family	n/a	141	437	141	437	1	306	306	139.4	1.5e-40	n/a	Show

CT_863:

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 50% :

1. from 352 to 387 (length = 36) with max = 80.7%
2. from 426 to 472 (length = 47) with max = 85.8%

Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

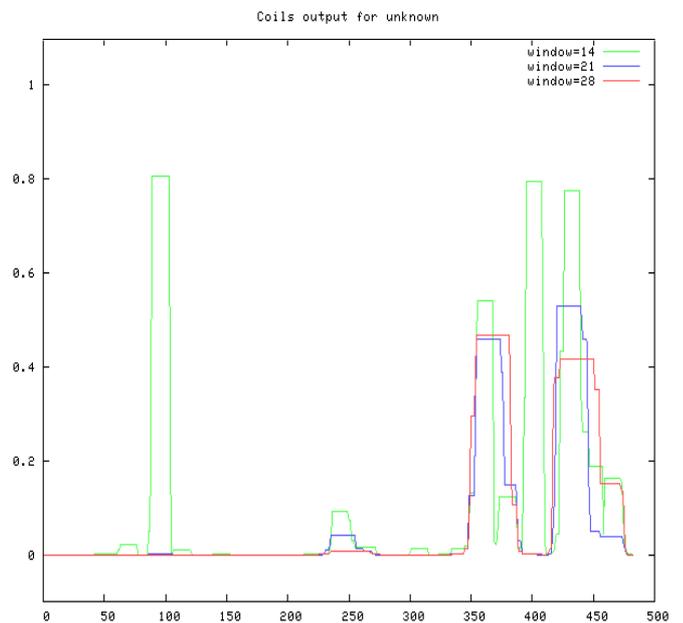
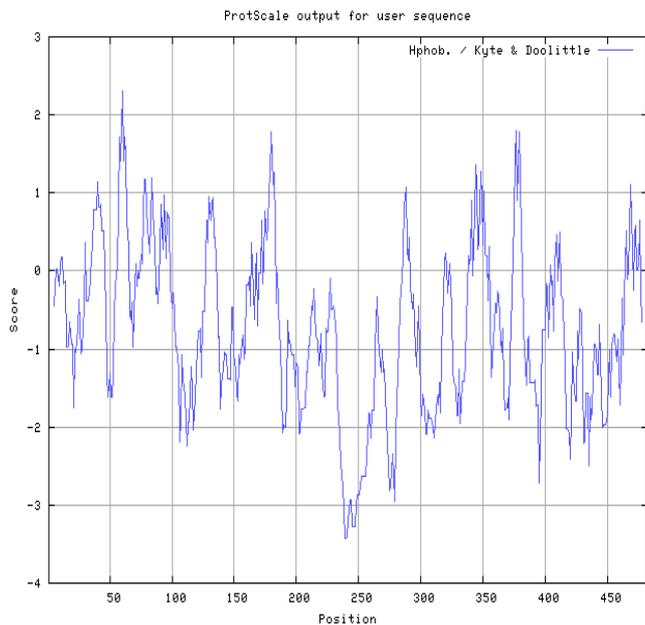
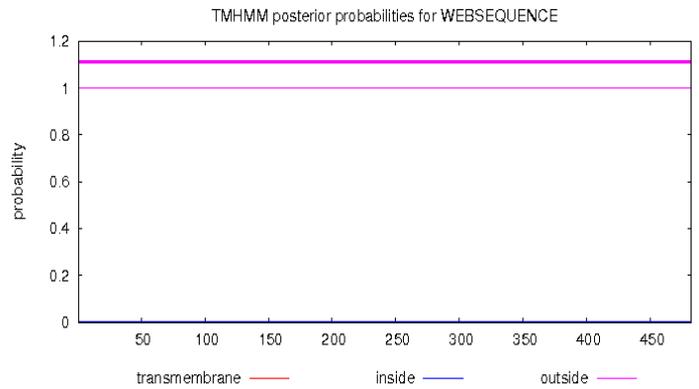
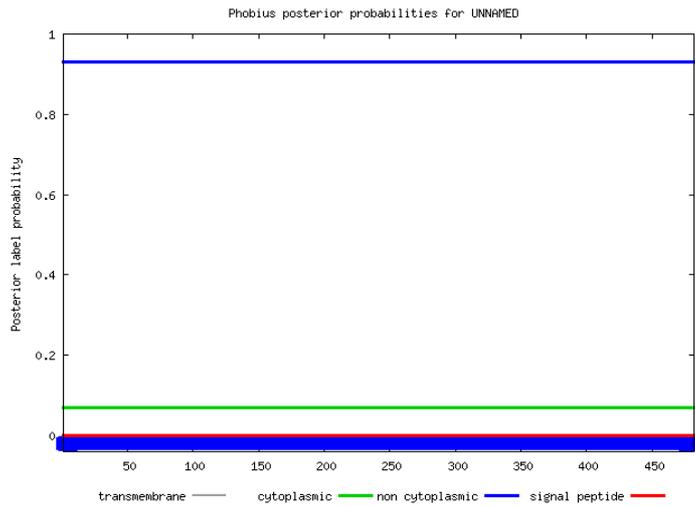
Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 482 NON CYTOPLASMIC.
//
```

```
# WEBSEQUENCE Length: 482
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.00136
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 482
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We did not find any Pfam-A matches to your search sequence. You did not choose to search for Pfam-B matches.

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

CT_862 (LcrH_2):

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 1% :

1. from 165 to 179 (length = 15) with max = 1.5%

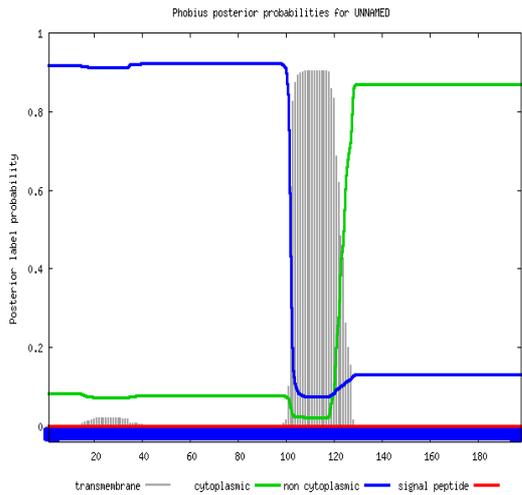
Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

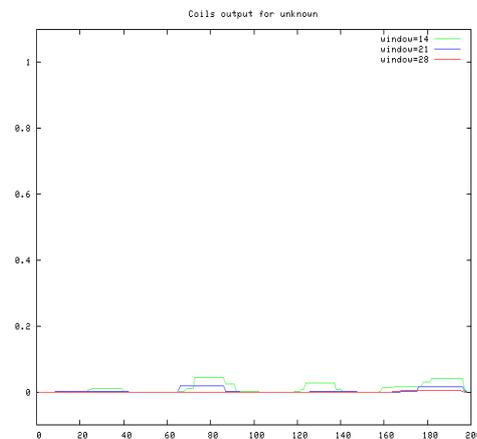
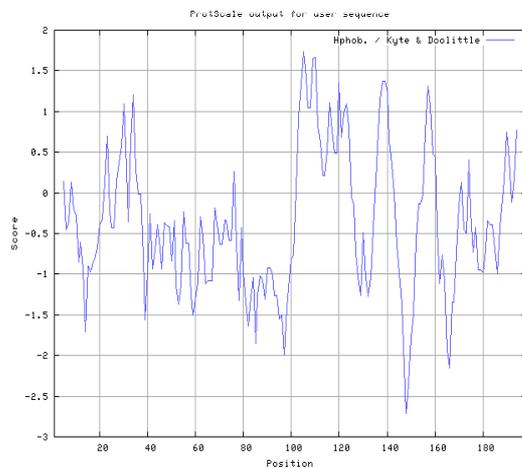
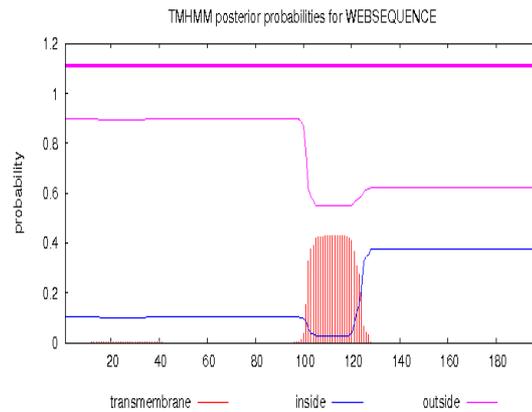
Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 198 NON CYTOPLASMIC.
//
```



```
# WEBSEQUENCE Length: 198
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 9.47608999999999999
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.0887
# WEBSEQUENCE Total prob of N-In: 0.10226
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 198
```



keyword search

Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.



[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
TPR_3	Tetratricopeptide repeat	Repeat	CLO020	114	147	114	147	1	36	36	37.2	1.7e-09	n/a	<input type="button" value="Show"/>

CT_861 (CopB2):

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 50% :

1. from 166 to 198 (length = 33) with max = 94.7%
2. from 474 to 489 (length = 16) with max = 52.5%

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 90% :

1. from 170 to 190 (length = 21) with max = 94.7%

Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

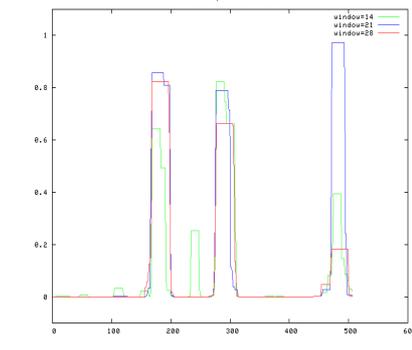
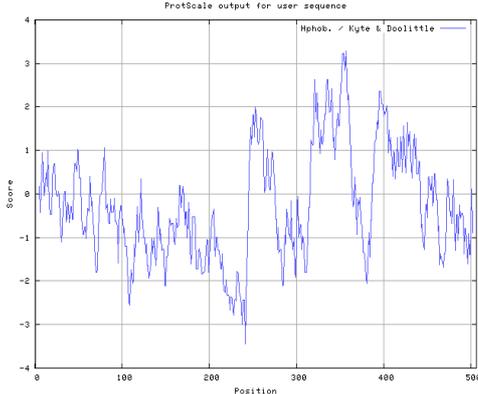
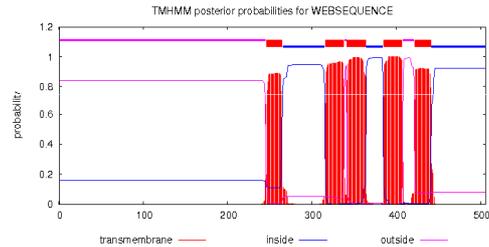
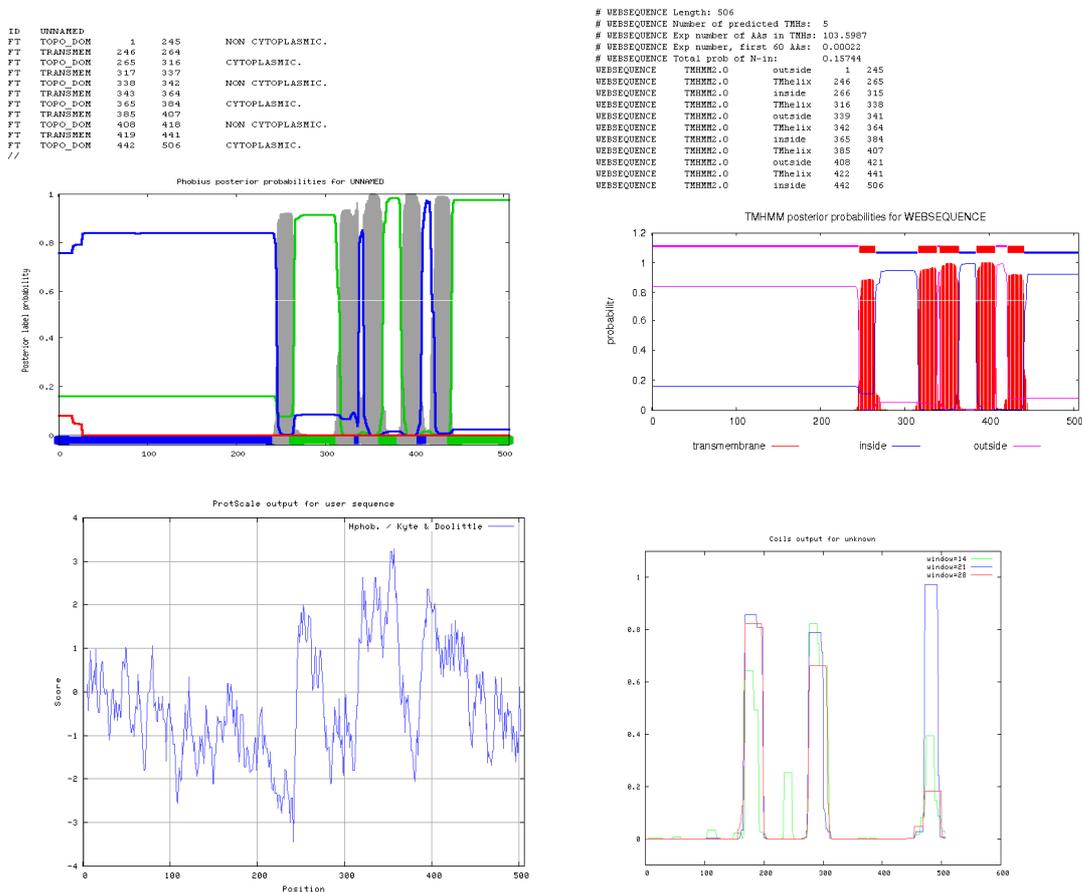
Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

NCBI BLASTp findet noch folgende Domäne:

ATP synthase I chain;



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We did not find any Pfam-A matches to your search sequence. You did not choose to search for Pfam-B matches.

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

CT_860 (CopD2):

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 50% :

1. from 232 to 269 (length = 38) with max = 75.8%

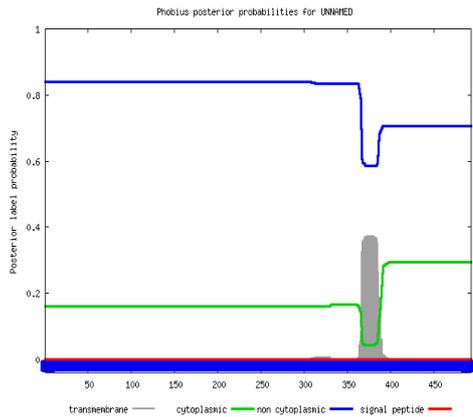
Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

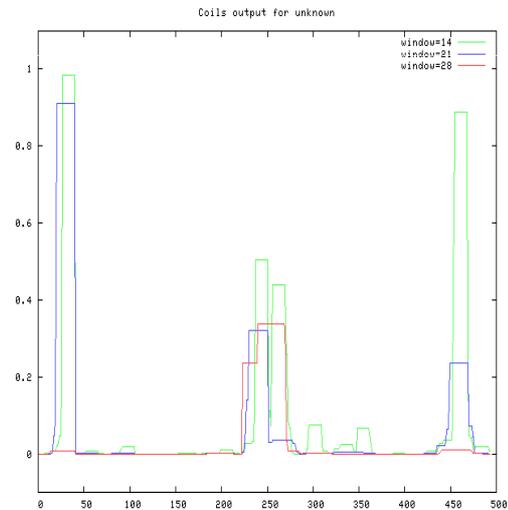
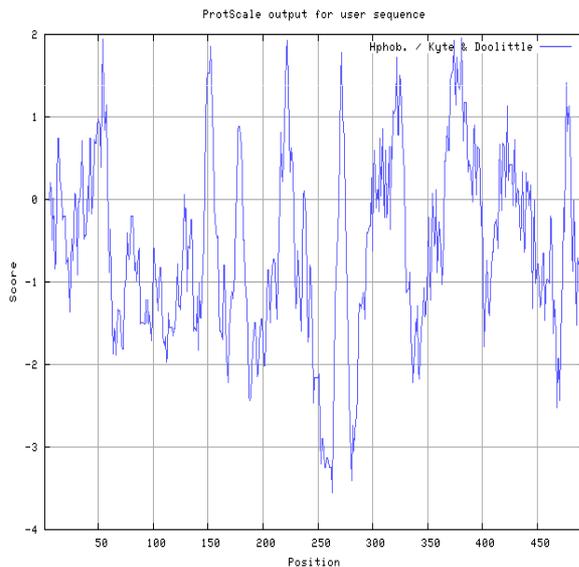
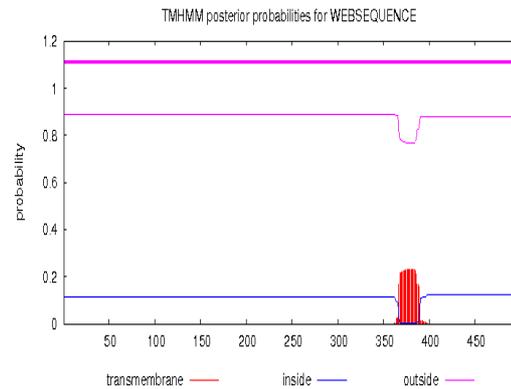
Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 493 NON CYTOPLASMIC.
//
```



```
# WEBSSEQUENCE Length: 493
# WEBSSEQUENCE Number of predicted TMs: 0
# WEBSSEQUENCE Exp number of AAs in TMs: 5.15362
# WEBSSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0
# WEBSSEQUENCE Total prob of N-in: 0.11284
WEBSSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 493
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We did not find any Pfam-A matches to your search sequence. You did not choose to search for Pfam-B matches.

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Comments or questions on the site? Send a mail to pfam-help@ebi.ac.uk.

European Molecular Biology Laboratory

LcrV:

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 50% :

1. from 150 to 167 (length = 18) with max = 82.6%

Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

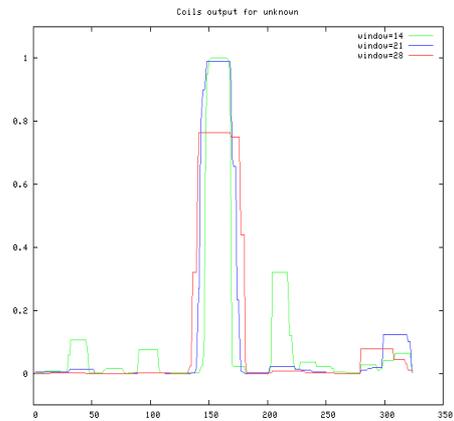
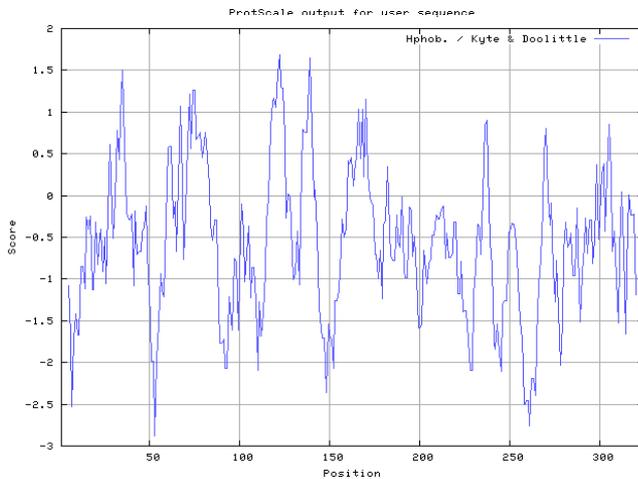
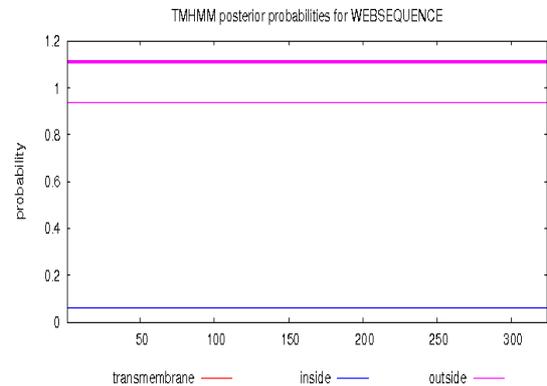
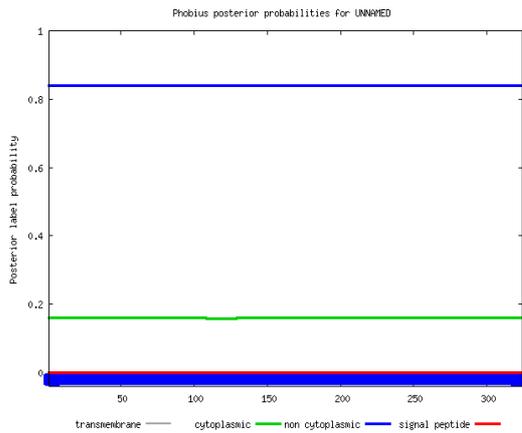
Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale>

Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 324 NON CYTOPLASMIC.
//
```

```
# WEBSSEQUENCE Length: 324
# WEBSSEQUENCE Number of predicted TMs: 0
# WEBSSEQUENCE Exp number of AAs in TMs: 0.00014
# WEBSSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0
# WEBSSEQUENCE Total prob of N-in: 0.06104
WEBSSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 324
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.

[LcrV](#)

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
LcrV	V antigen (LcrV) protein	Family	n/a	1	323	1	323	1	323	323	629.4	9.7e-190	n/a	Show

Comments or questions on the site? Send a mail to pfam-help@ebi.ac.uk.

European Molecular Biology Laboratory

SycD:

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 1% :

1. from 118 to 163 (length = 46) with max = 4.8%

Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

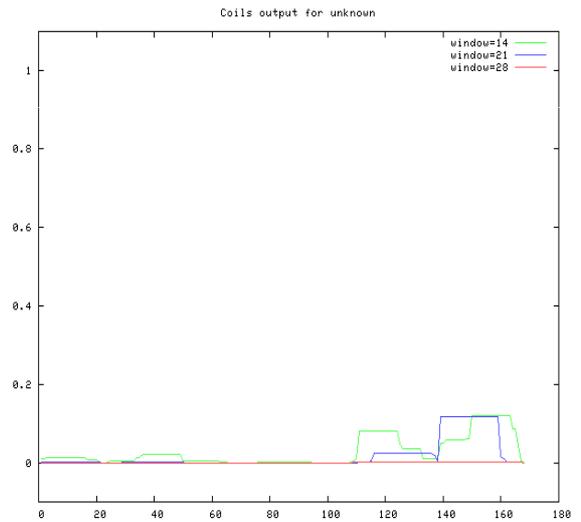
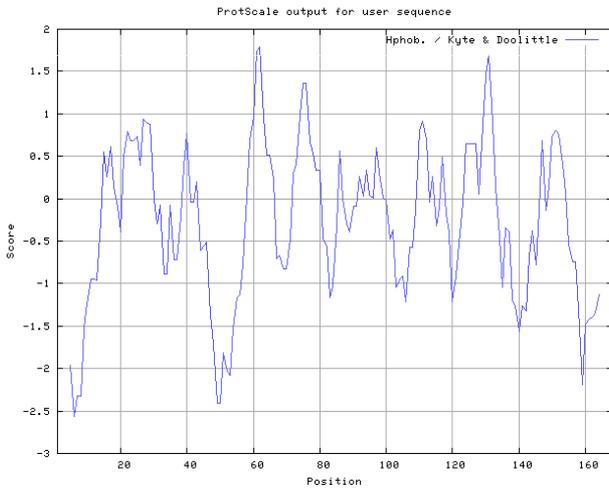
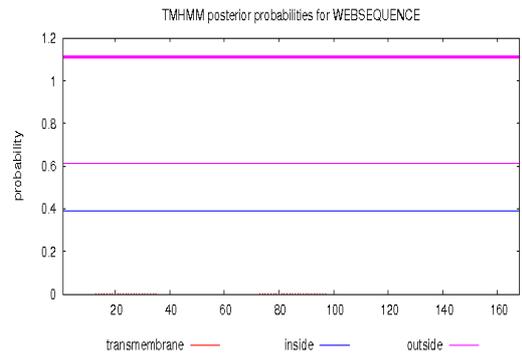
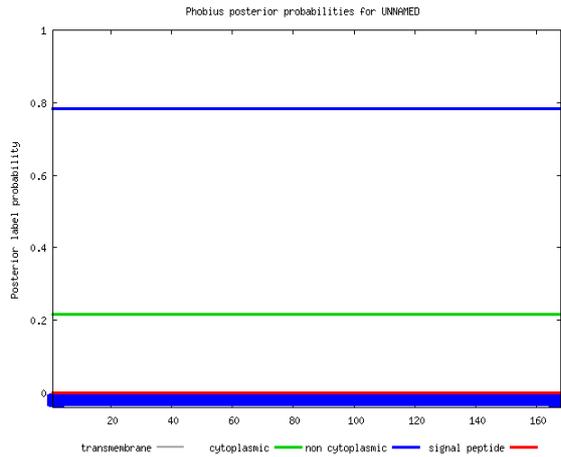
Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 168 NON CYTOPLASMIC.
//
```

```
# WEBSEQUENCE Length: 168
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMs: 0.02259
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.01692
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.38916
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 168
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.



[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
TPR_3	Tetratricopeptide repeat	Repeat	CL0020	36	69	36	69	1	36	36	34.0	1.8e-08	n/a	Show

YopB

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 90%

1. from 128 to 156 (length = 29) with max = 99.8%
2. from 343 to 375 (length = 33) with max = 99.8%

Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

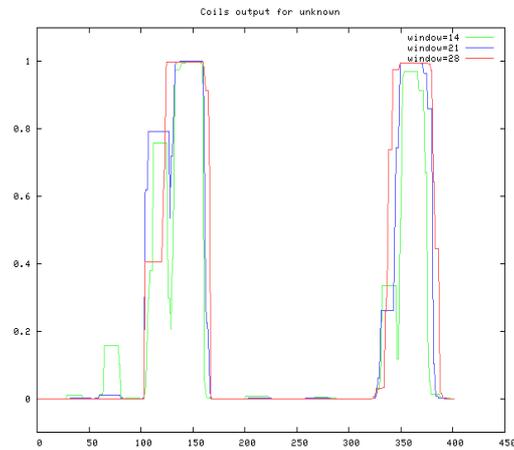
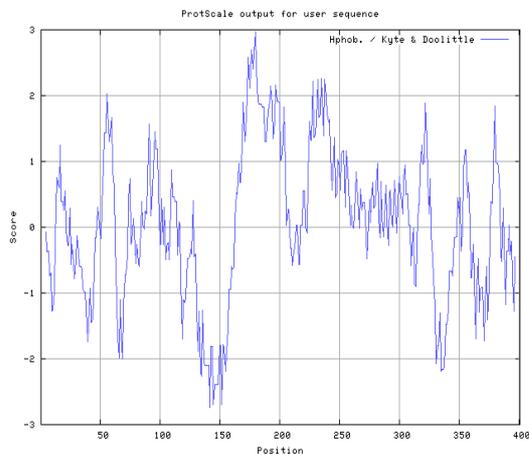
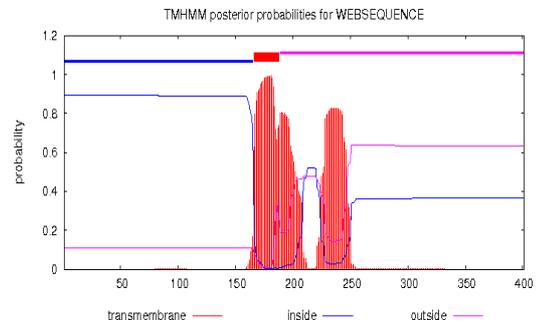
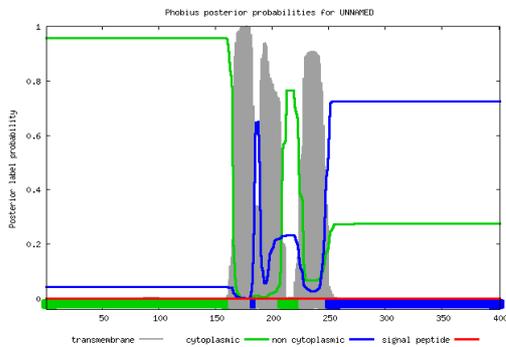
TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```

ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 166 CYTOPLASMIC.
FT TRANSMEM 166 194
FT TOPO_DOM 185 189 NON CYTOPLASMIC.
FT TRANSMEM 190 208
FT TOPO_DOM 209 227 CYTOPLASMIC.
FT TRANSMEM 228 250
FT TOPO_DOM 251 401 NON CYTOPLASMIC.
//
  
```

```

# WEBSEQUENCE Length: 401
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 1
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 52.38513
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.00151
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.89158
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 inside 1 165
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 166 188
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 189 401
  
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.

[SseC](#)

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
SseC	Secretion system effector C (SseC) like ...	Family	n/a	106	398	106	398	1	306	306	228.0	1.5e-67	n/a	Show

YopD:

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 50% :

1. from 263 to 271 (length = 9) with max = 52.6%

Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

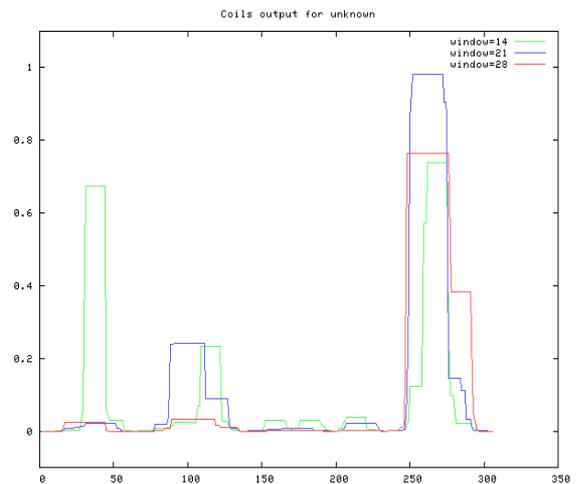
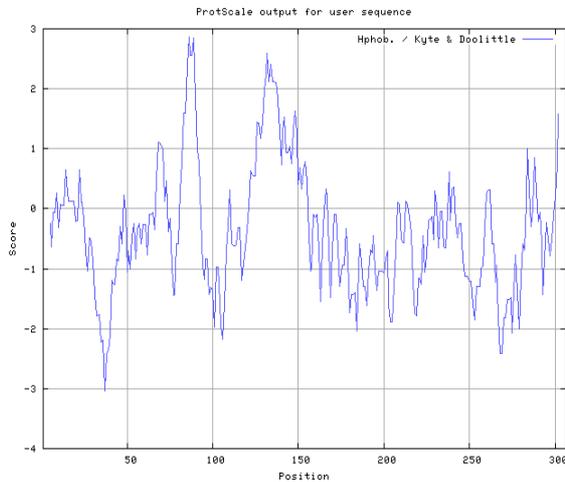
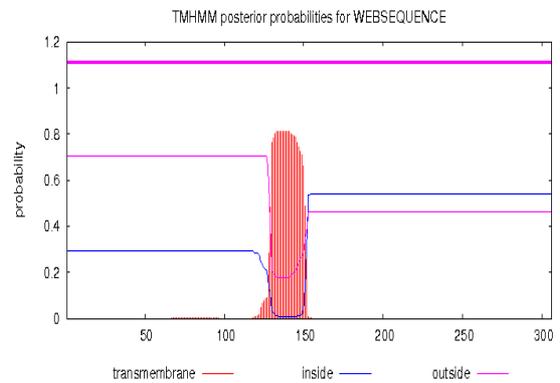
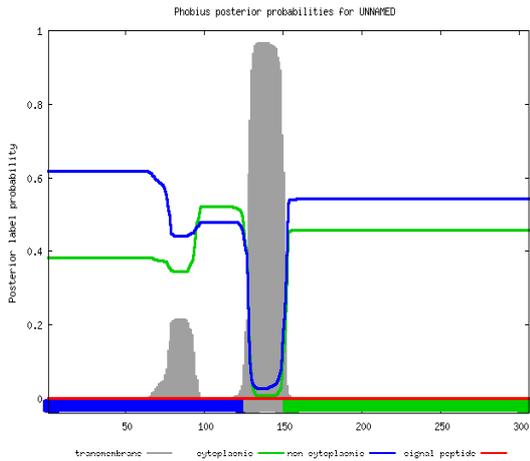
Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 127 NON CYTOPLASMIC.
FT TRANSMEM 128 152
FT TOPO_DOM 153 306 CYTOPLASMIC.
//
```

```
# WEBSEQUENCE Length: 306
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMs: 18.45882
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.00021
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.29482
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 306
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.

YopD

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
YopD	YopD protein	Family	n/a	7	306	13	306	7	298	298	427.2	2.6e-128	n/a	Show

PcrV:

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 50% :

1. from 119 to 146 (length = 28) with max = 83.6%

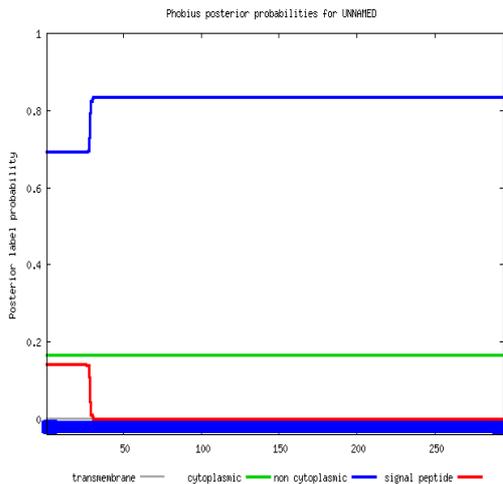
Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

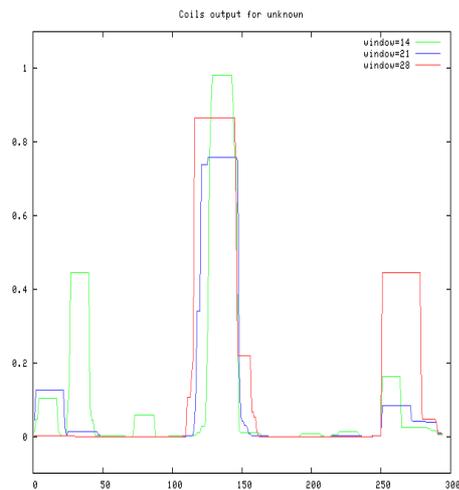
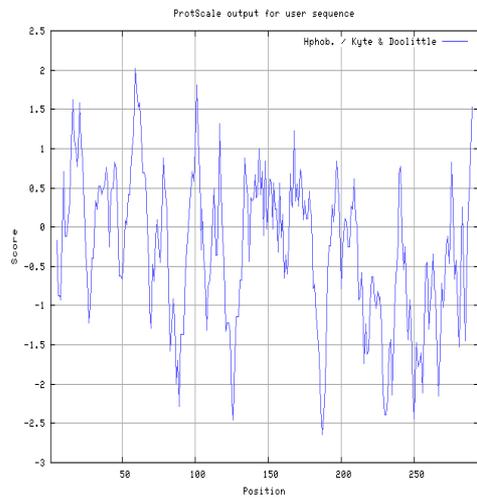
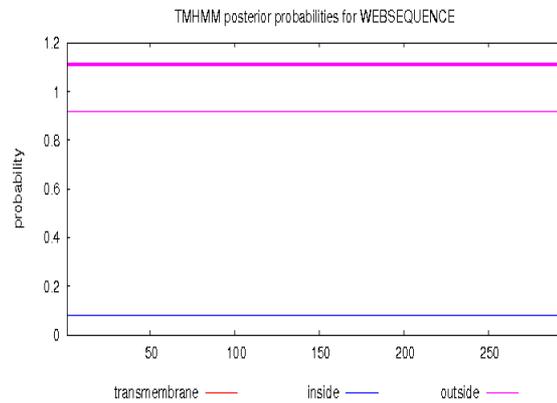
Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 294 NON CYTOPLASMIC.
//
```



```
# WEBSEQUENCE Length: 294
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 0.00278
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.00167
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.08020
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 294
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.

[LcrV](#)

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
LcrV	V antigen (LcrV) protein	Family	n/a	2	294	2	294	1	323	323	502.7	3.6e-151	n/a	Show

PcrH:

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 50% :

1. from 119 to 146 (length = 28) with max = 83.6%

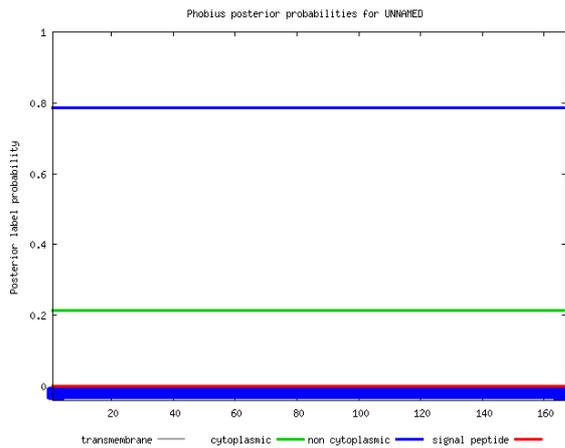
Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

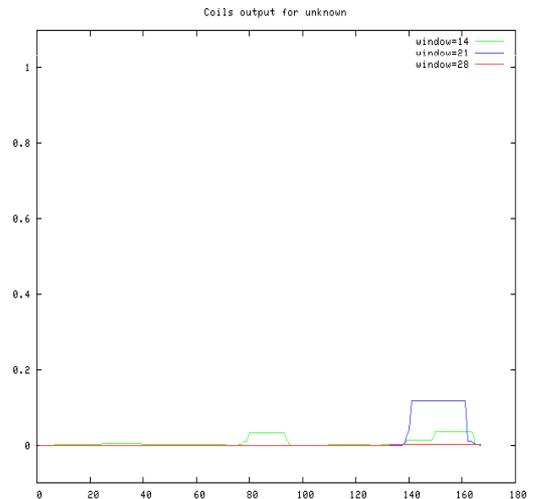
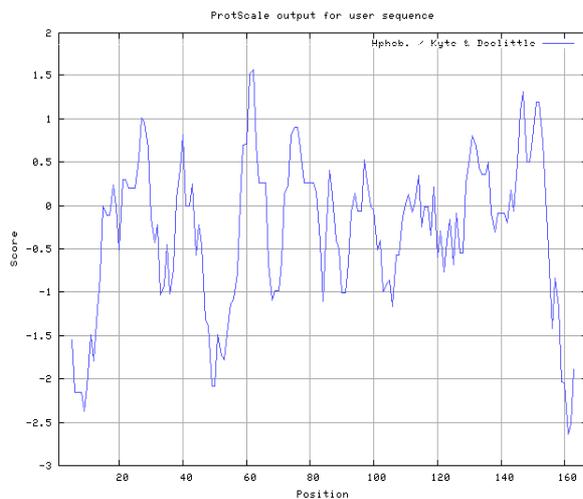
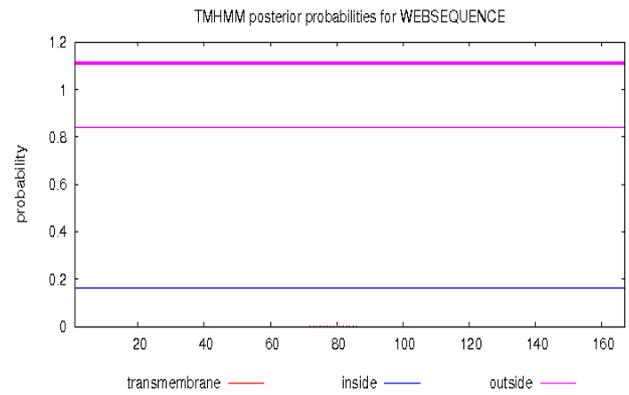
Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 167 NON CYTOPLASMIC.
//
```



```
# WEBSEQUENCE Length: 167
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMs: 0.00472
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.00057
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.16012
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 167
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.



[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
TPR_11	TPR repeat	Repeat	CL0020	34	98	37	94	4	62	69	27.4	1.8e-06	n/a	Show

Comments or questions on the site? Send a mail to pfam-help@ebi.ac.uk.

European Molecular Biology Laboratory

PopB

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 99% :

1. from 132 to 156 (length = 25) with max = 99.9%
2. from 335 to 358 (length = 24) with max = 100.0%

Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

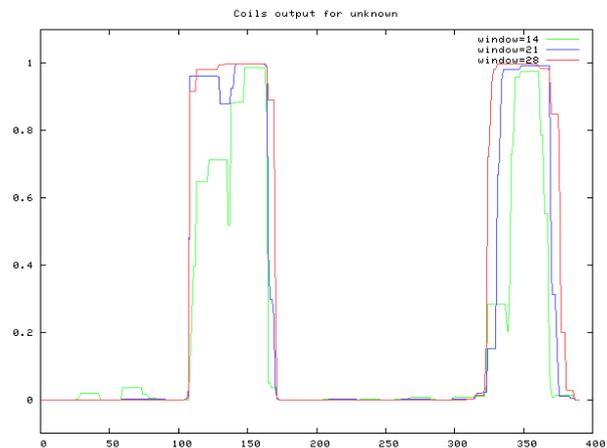
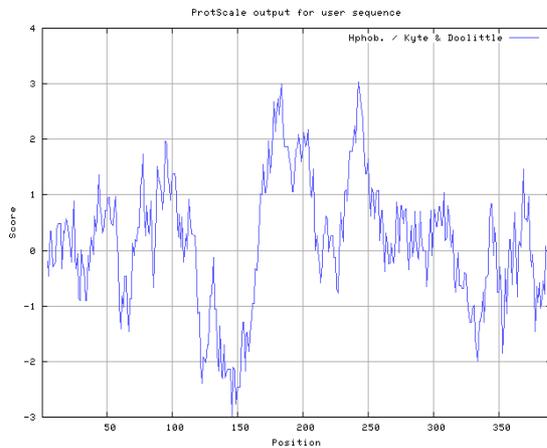
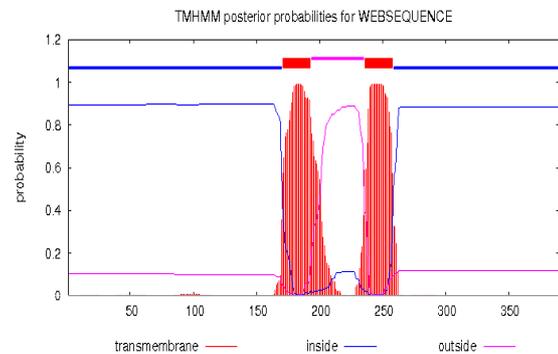
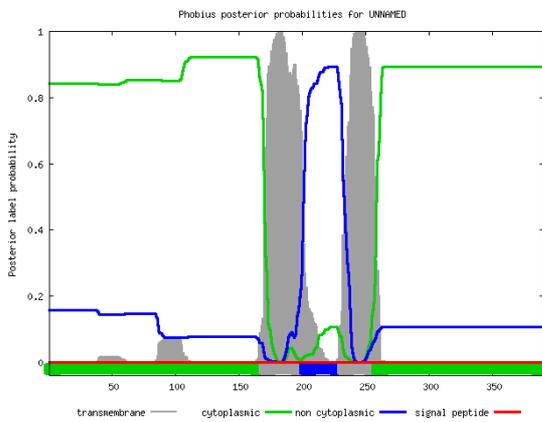
Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 169 CYTOPLASMIC.
FT TRANSMEM 170 201
FT TOPO_DOM 202 231 NON CYTOPLASMIC.
FT TRANSMEM 232 258
FT TOPO_DOM 259 390 CYTOPLASMIC.
//
```

```
# WEBSEQUENCE Length: 390
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 2
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 50.7038
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.05283
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.89448
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 inside 1 170
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 171 193
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 194 235
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 236 258
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 inside 259 390
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.



[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
SseC	Secretion system effector C (SseC) like ...	Family	n/a	110	387	110	387	1	306	306	234.9	1.3e-69	n/a	Show

PopD:

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 1% :

1. from 75 to 77 (length = 3) with max = 1.0%
2. from 80 to 113 (length = 34) with max = 2.9%
3. from 144 to 184 (length = 41) with max = 7.7%
4. from 221 to 286 (length = 66) with max = 4.5%

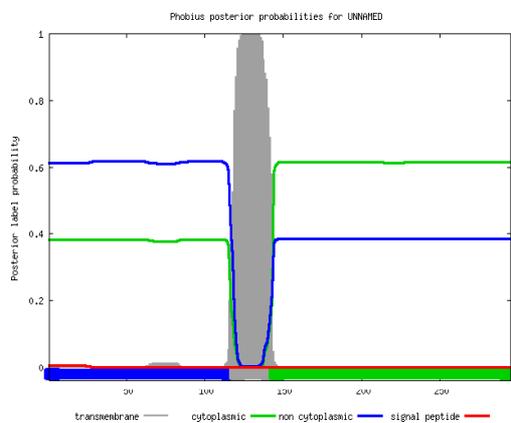
Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

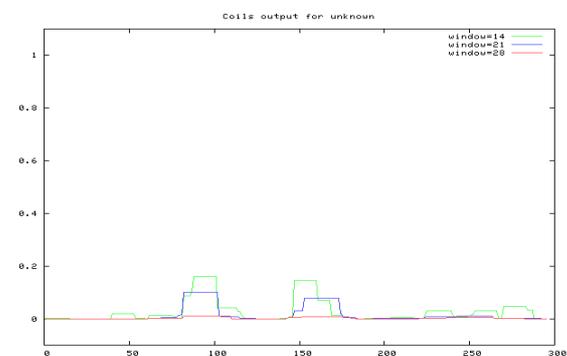
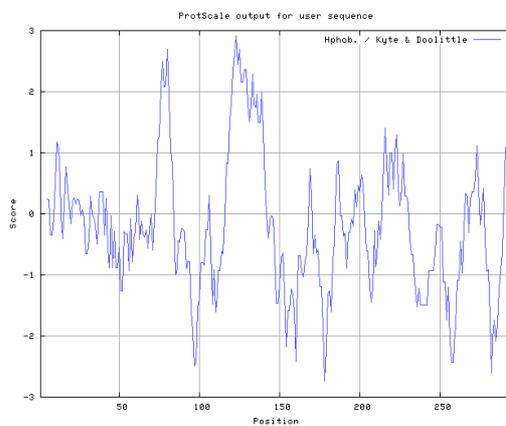
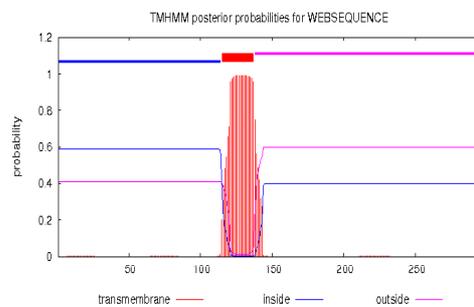
Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 118 NON CYTOPLASMIC.
FT TRANSMEM 119 143
FT TOPO_DOM 144 295 CYTOPLASMIC.
//
```



```
# WEBSEQUENCE Length: 295
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMs: 1
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMs: 22.52978
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.00375
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.58973
WEBSEQUENCE TMHMM:0 inside 1 114
WEBSEQUENCE TMHMM:0 TMhelix 115 137
WEBSEQUENCE TMHMM:0 outside 138 295
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.

[YopD](#)

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
YopD	YopD protein	Family	n/a	1	295	1	295	1	298	298	430.8	2e-129	n/a	Show

SicA:

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 10% :

1. from 129 to 163 (length = 35) with max = 21.0%

Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

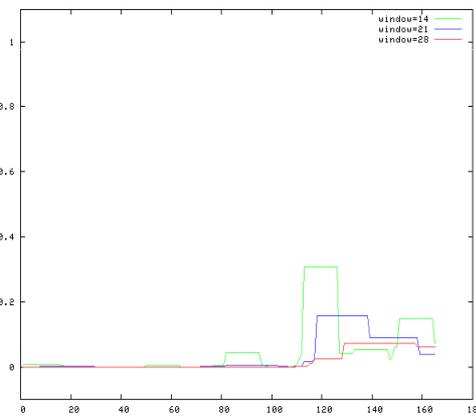
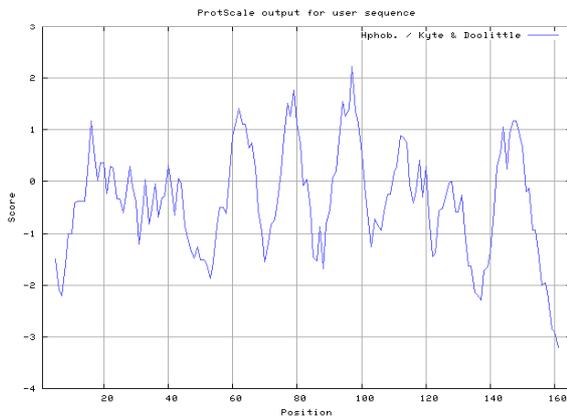
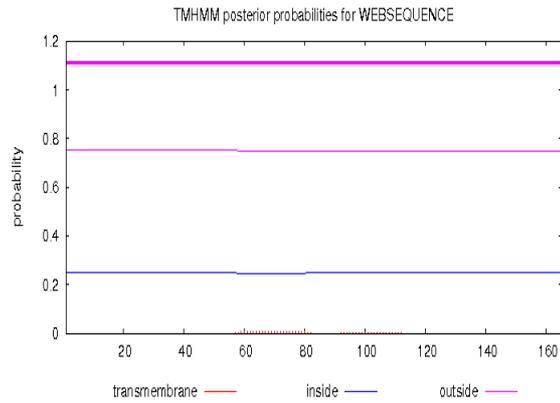
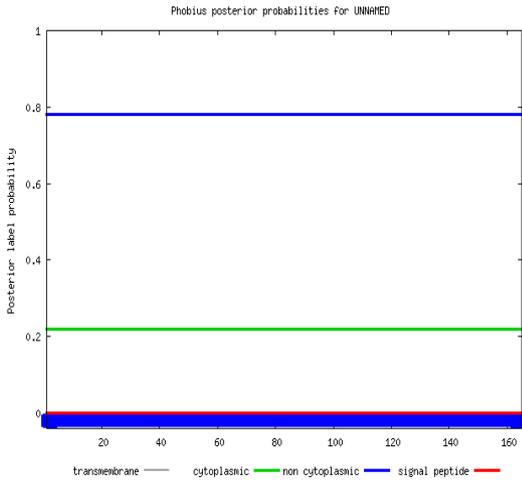
Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 165 NON CYTOPLASMIC.
//
```

```
# WEBSSEQUENCE Length: 165
# WEBSSEQUENCE Number of predicted TMHs: 0
# WEBSSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 0.14237
# WEBSSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.01417
# WEBSSEQUENCE Total prob of N-in: 0.24726
WEBSSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 165
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 2 Pfam-A matches to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.



[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
TPR_3	Tetratricopeptide repeat	Repeat	CL0020	37	70	37	70	1	36	36	48.7	4.3e-13	n/a	Show
TPR_3	Tetratricopeptide repeat	Repeat	CL0020	71	104	71	104	1	36	36	44.2	1.1e-11	n/a	Show

SipB

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 90% :

1. from 103 to 172 (length = 70) with max = 100.0%
2. from 184 to 211 (length = 28) with max = 98.9%
3. from 292 to 305 (length = 14) with max = 92.2%

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 50% :

1. from 101 to 174 (length = 74) with max = 100.0%
2. from 182 to 231 (length = 50) with max = 98.9%
3. from 273 to 311 (length = 39) with max = 92.2%
4. from 560 to 572 (length = 13) with max = 55.2%

Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

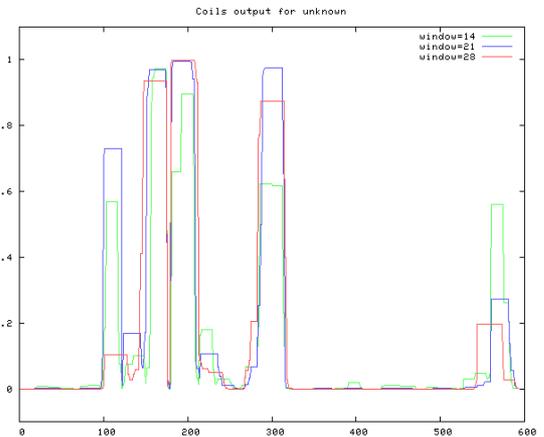
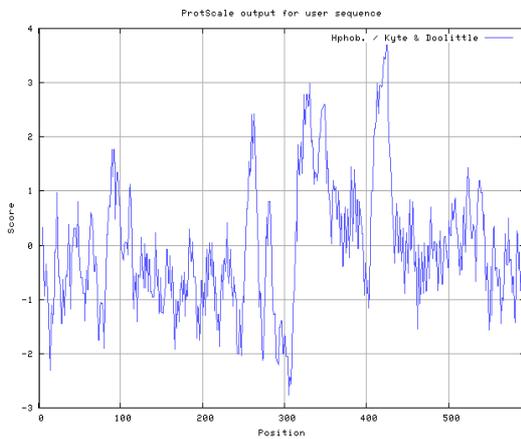
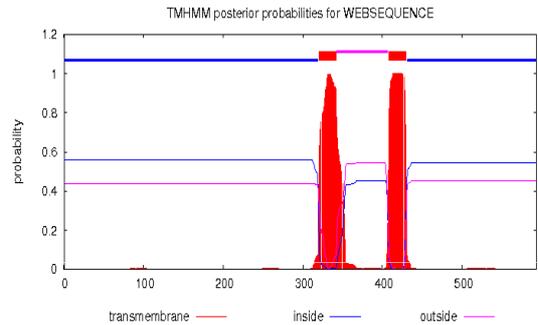
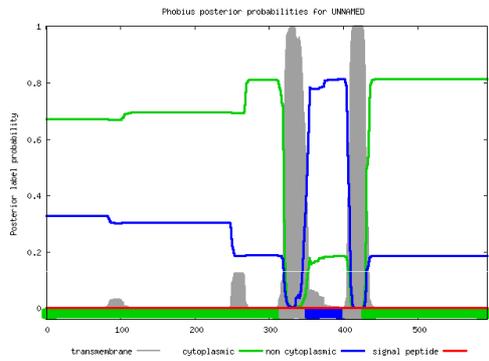
TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```

ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 319 CYTOPLASMIC.
FT TRANSMEM 320 353
FT TOPO_DOM 354 404 NON CYTOPLASMIC.
FT TRANSMEM 405 429
FT TOPO_DOM 430 593 CYTOPLASMIC.
//
  
```

```

# WEBSEQUENCE Length: 593
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMs: 2
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMs: 49.26726
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.56169
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 inside 1 319
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 320 342
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 343 407
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 408 430
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 inside 431 593
  
```



keyword search [Go](#)

Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.



[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
SseC	Secretion system effector C (SseC) like...	Family	r/a	259	591	259	590	1	305	306	239.9	3.7e-71	r/a	Show

SipC:

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 10% :

1. from 79 to 112 (length = 34) with max = 24.3%
2. from 292 to 322 (length = 31) with max = 24.7%
3. from 347 to 404 (length = 58) with max = 41.9%

Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

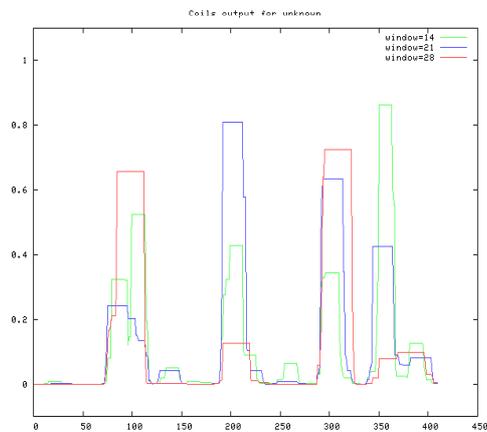
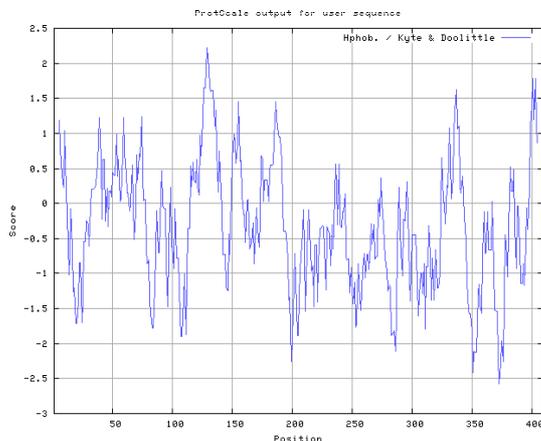
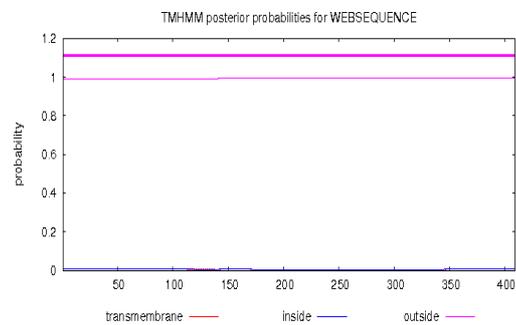
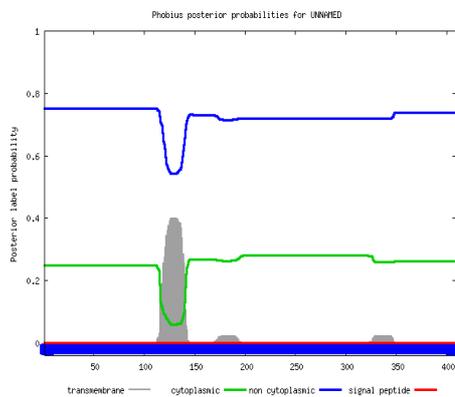
Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 409 NON CYTOPLASMIC.
//
```

```
# VESSEQUENCE Length: 409
# VESSEQUENCE Number of predicted TMs: 0
# VESSEQUENCE Exp number of AAs in TMs: 0.17796
# VESSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.00064
# VESSEQUENCE Total prob of N-in: 0.00777
VESSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 409
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.



[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
IpaC_SipC	Salmonella-Shigella invasin protein C (1...	Family	n/a	45	397	46	397	2	337	337	456.5	4.7e-137	n/a	Show

SipD:

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 50% :

1. from 280 to 324 (length = 45) with max = 79.8%

Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

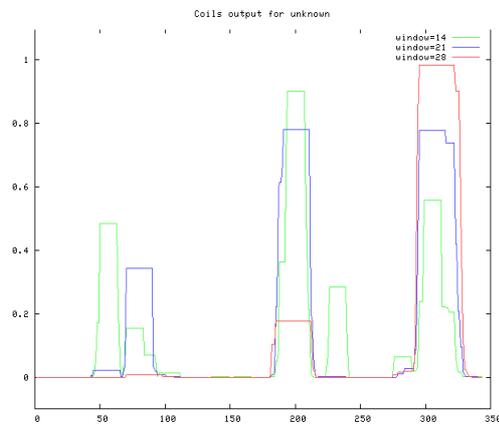
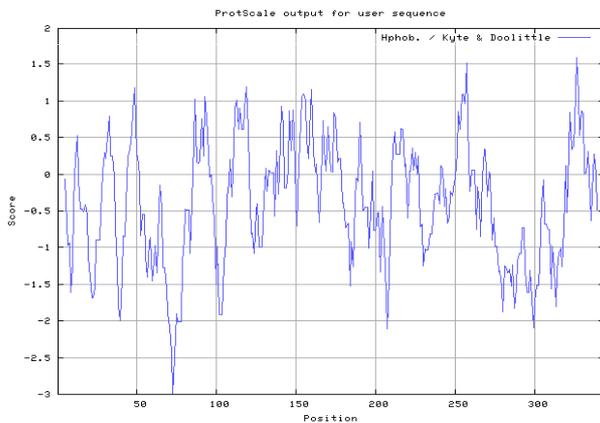
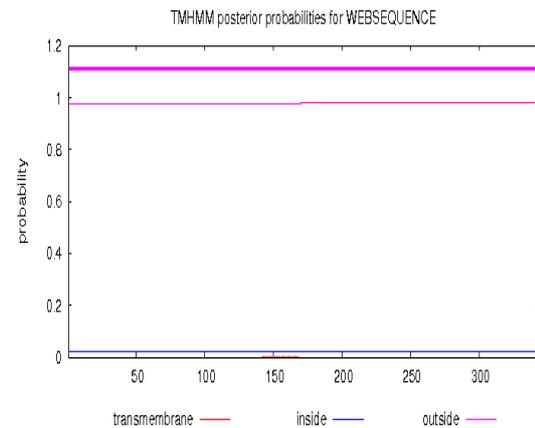
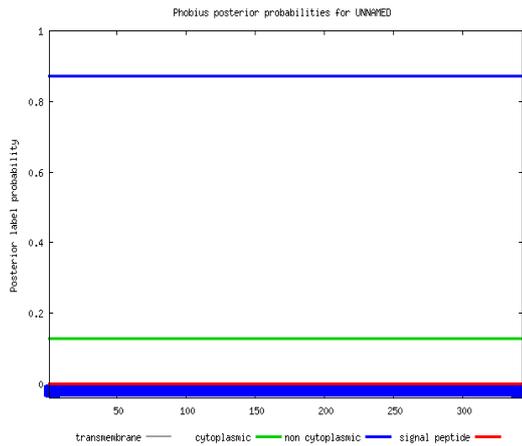
Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```

ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 343 NON CYTOPLASMIC.
//
# WEBSSEQUENCE Length: 343
# WEBSSEQUENCE Number of predicted TMs: 0
# WEBSSEQUENCE Exp number of AAs in TMs: 0.01175
# WEBSSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0
# WEBSSEQUENCE Total prob of N-in: 0.02189
WEBSSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 343
    
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.

IpaD

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
IpaD	Invasion plasmid antigen IpaD	Family	n/a	5	341	5	341	1	337	337	543.3	1.8e-163	n/a	Show

Comments or questions on the site? Send a mail to pfam-help@ebi.ac.uk.

European Molecular Biology Laboratory

SseB:

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 50% :

1. from 161 to 171 (length = 11) with max = 52.0%

Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```

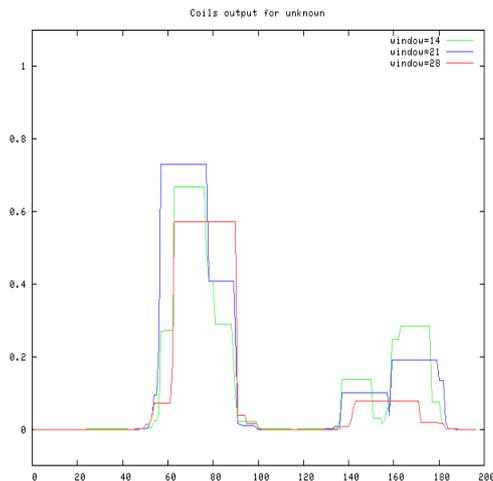
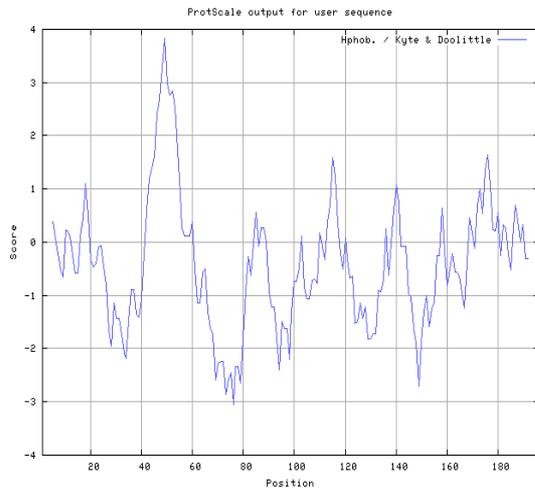
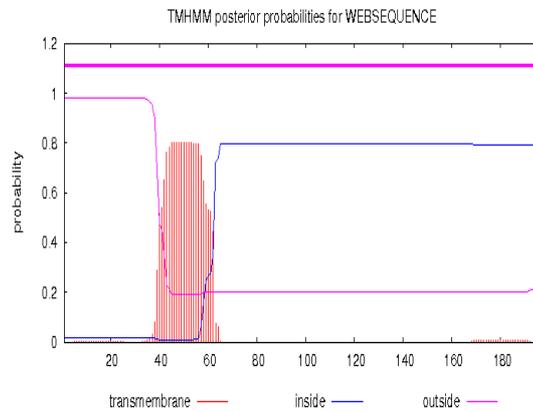
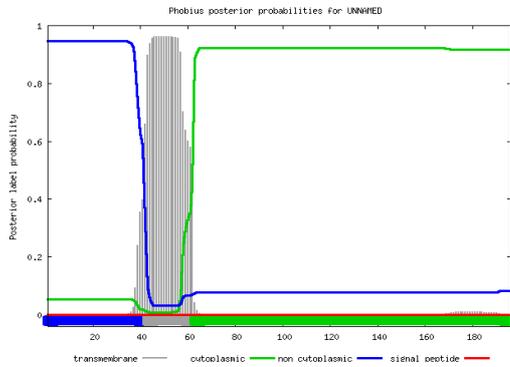
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 42 NON CYTOPLASMIC.
FT TRANSMEM 43 62
FT TOPO_DOM 63 196 CYTOPLASMIC.
//

```

```

# WEBSSEQUENCE Length: 196
# WEBSSEQUENCE Number of predicted TMHs: 0
# WEBSSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 17.03803
# WEBSSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 15.7789
# WEBSSEQUENCE Total prob of N-in: 0.01912
# WEBSSEQUENCE POSSIBLE N-term signal sequence
WEBSSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 196

```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.

[EspA](#)

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
EspA	EspA-like secreted protein	Family	n/a	1	189	1	188	1	187	188	239.8	1.4e-71	n/a	Show

SscA:

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 10% :

1. from 135 to 156 (length = 22) with max = 29.1%

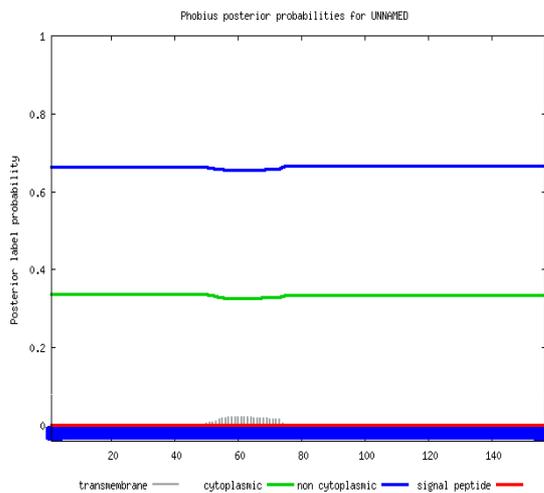
Coiled Coil Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

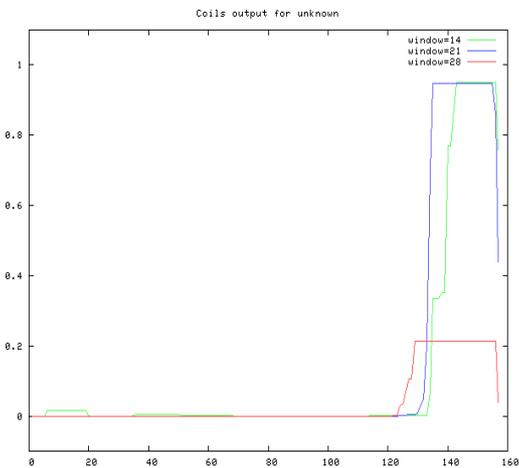
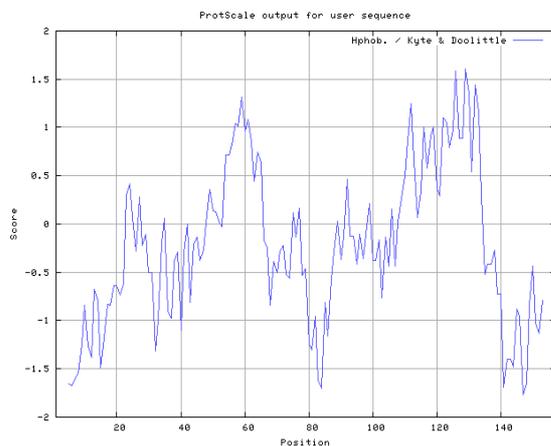
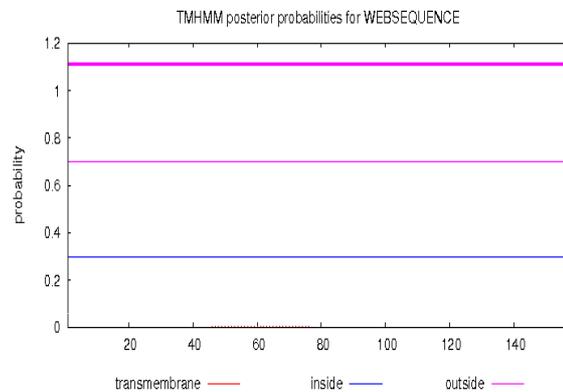
Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 157 NON CYTOPLASMIC.
//
```



```
# WEBSEQUENCE Length: 157
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 0.05898
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.02587
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.29892
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 157
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We did not find any Pfam-A matches to your search sequence. You did not choose to search for Pfam-B matches.

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

SseC

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 90% :

1. from 129 to 144 (length = 16) with max = 96.6%
2. from 417 to 453 (length = 37) with max = 99.7%

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 50% :

1. from 117 to 150 (length = 34) with max = 96.6%
2. from 296 to 327 (length = 32) with max = 78.3%
3. from 413 to 456 (length = 44) with max = 99.7%

Coiled Coil Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

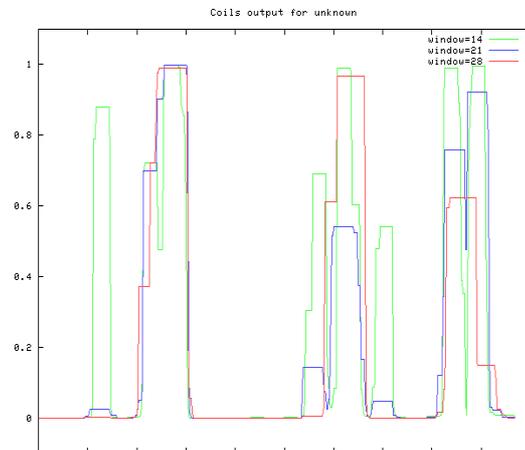
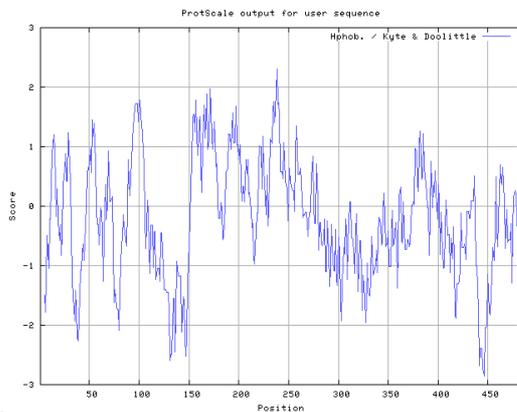
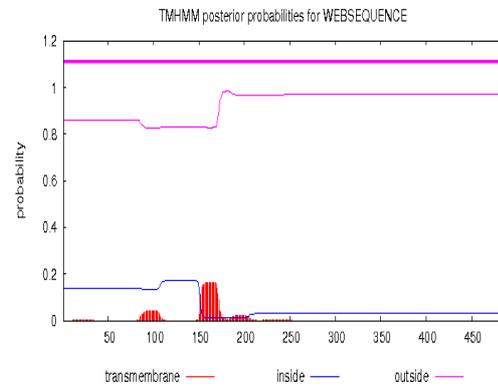
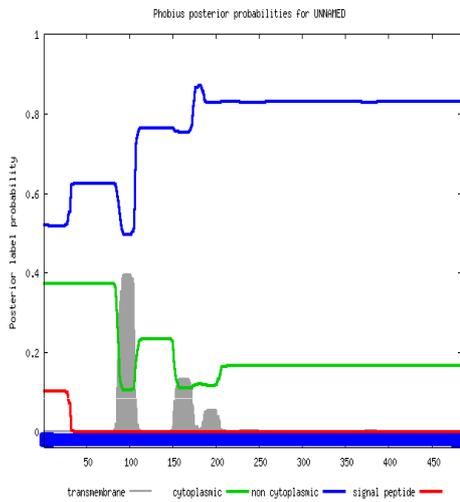
Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 484 NON CYTOPLASMIC.
//
```

```
# WEBSSEQUENCE Length: 484
# WEBSSEQUENCE Number of predicted TMs: 0
# WEBSSEQUENCE Exp number of AAs in TMs: 4.73384
# WEBSSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.01082
# WEBSSEQUENCE Total prob of N-in: 0.13805
WEBSSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 484
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.



[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
SseC	Secretion system effector C (SseC) like ...	Family	n/a	93	403	93	401	1	304	306	205.3	1.3e-60	n/a	Show

SseD:

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 10% :

1. from 44 to 73 (length = 30) with max = 27.5%

2. from 136 to 189 (length = 54) with max = 44.3%

Coiled Coil Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

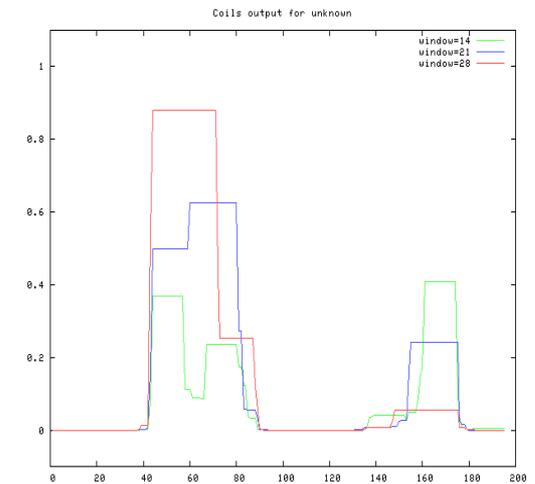
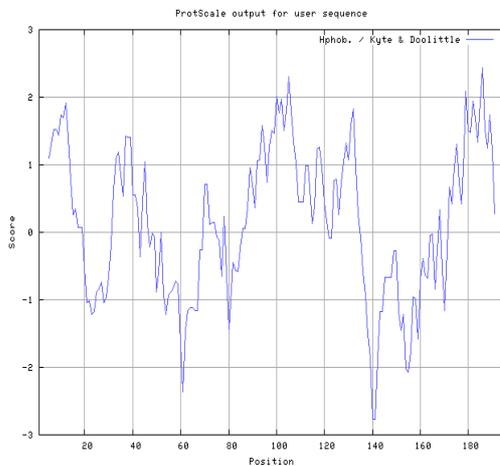
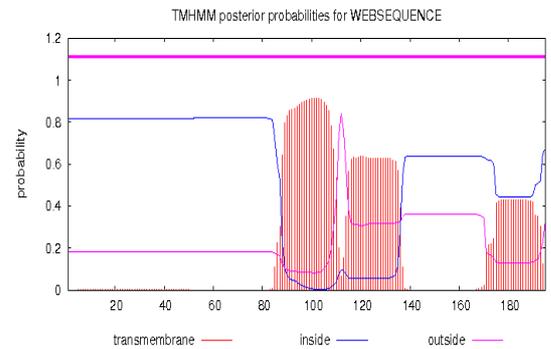
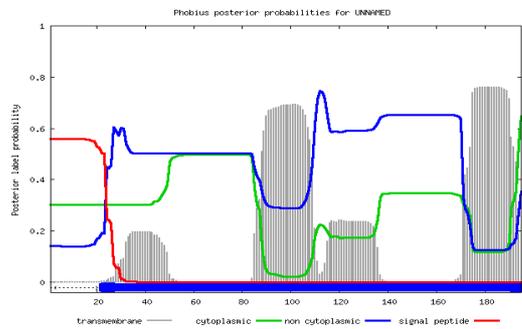
Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT SIGNAL 1 22
FT REGION 1 5 N-REGION.
FT REGION 6 17 H-REGION.
FT REGION 18 22 C-REGION.
FT TOPO_DOM 23 195 NON CYTOPLASMIC.
//
```

```
# WEBSEQUENCE Length: 195
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 43.29826
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.05062
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.81681
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 195
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We did not find any Pfam-A matches to your search sequence. You did not choose to search for Pfam-B matches.

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

SpEL:

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 50% :

1. from 72 to 92 (length = 21) with max = 71.7%

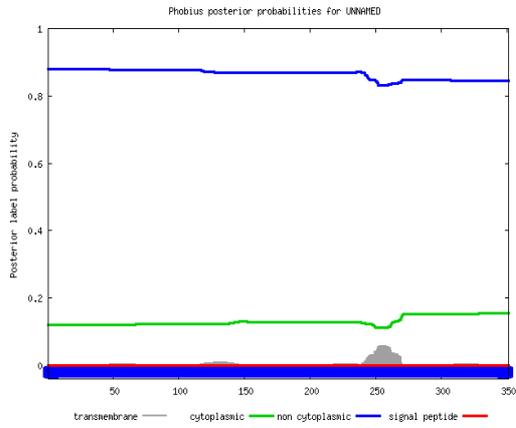
Coiled Coil Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

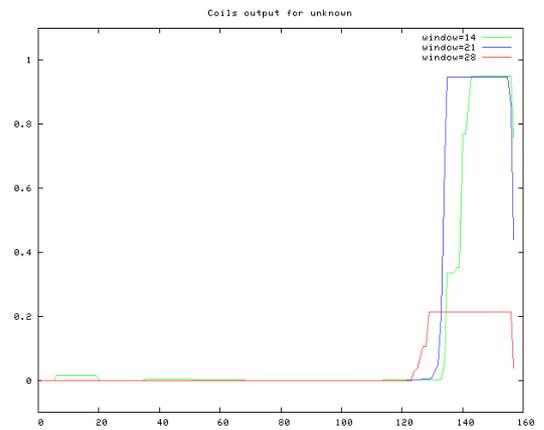
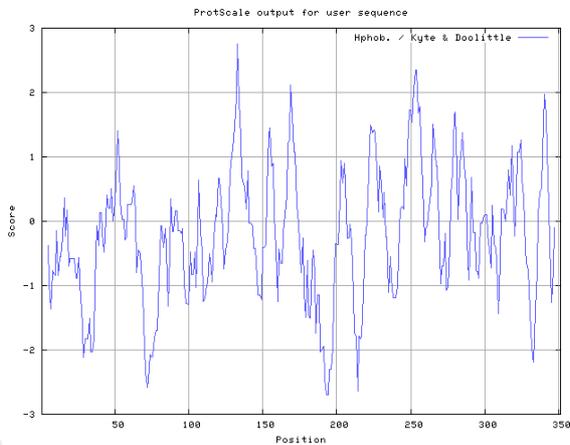
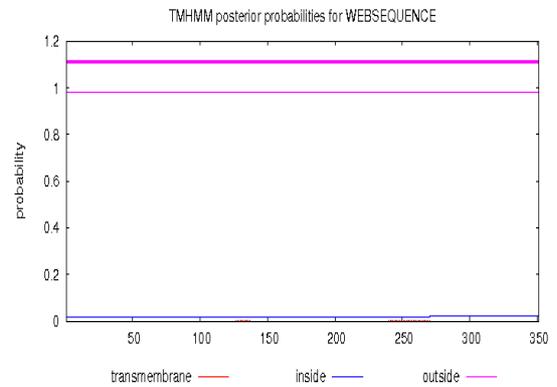
Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 351 NON CYTOPLASMIC.
//
```



```
# WEBSEQUENCE Length: 351
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMs: 0.04424
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.00015
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.01895
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 351
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.



[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
HrpJ	HrpJ-like domain	Domain	n/a	20	213	56	211	2	164	166	84.8	6.2e-24	n/a	Show

Comments or questions on the site? Send a mail to pfam-help@ebi.ac.uk.

European Molecular Biology Laboratory

EspA:

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 50% :

1. from 135 to 177 (length = 43) with max = 81.8%

Coiled Coil Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

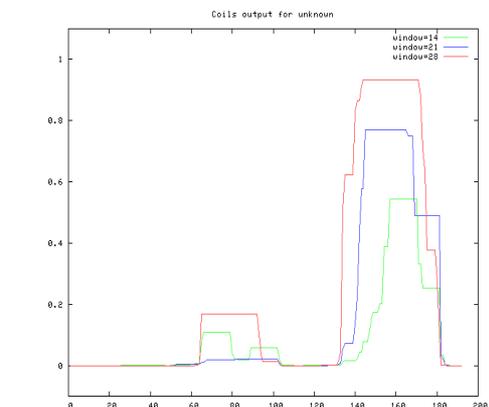
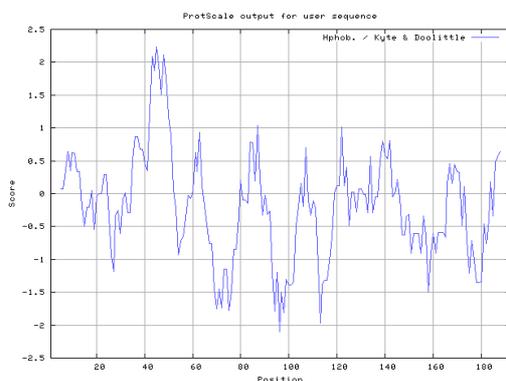
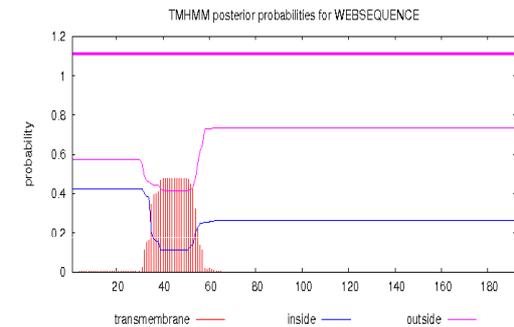
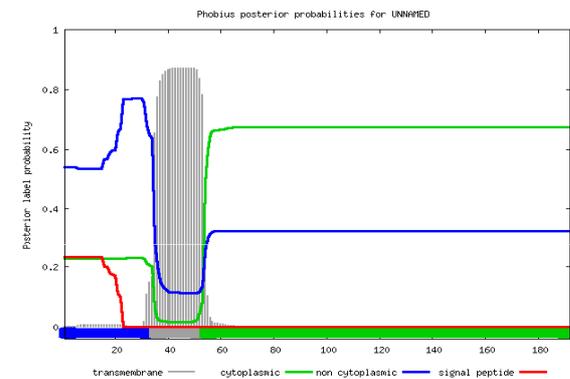
Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 34 NON CYTOPLASMIC.
FT TRANSMEM 35 53
FT TOPO_DOM 54 192 CYTOPLASMIC.
//
```

```
# WEBSEQUENCE Length: 192
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMs: 9.96741
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 9.94839
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.42583
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 192
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.

[EspA](#)

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
EspA	EspA-like secreted protein	Family	n/a	1	187	4	186	4	187	188	195.3	6.3e-58	n/a	Show

Comments or questions on the site? Send a mail to pfam-help@ebi.ac.uk.

European Molecular Biology Laboratory

EspD

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 50% :

1. from 147 to 174 (length = 28) with max = 86.8%
2. from 332 to 365 (length = 34) with max = 76.8%

Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

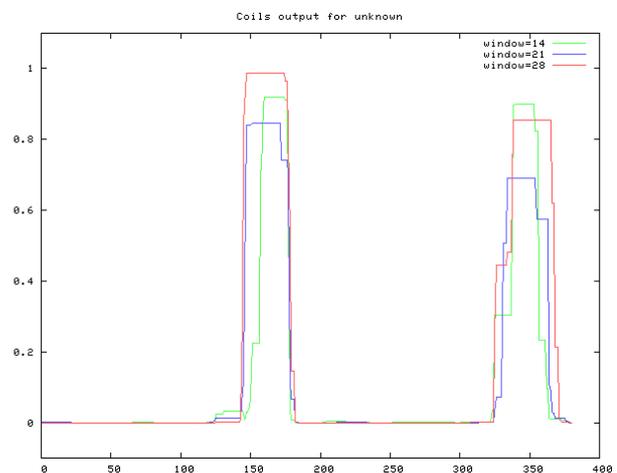
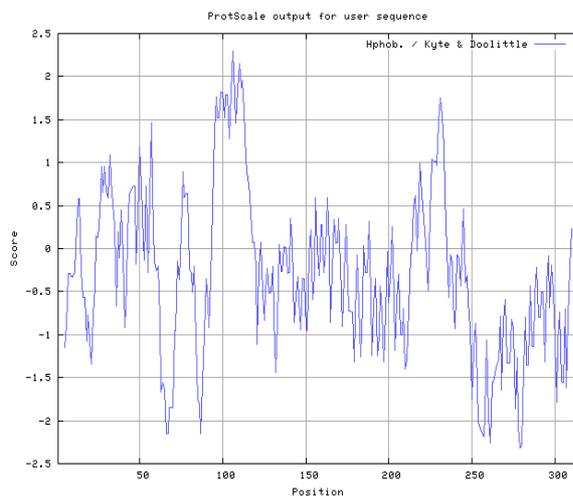
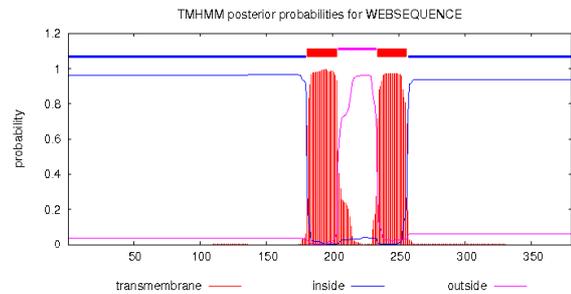
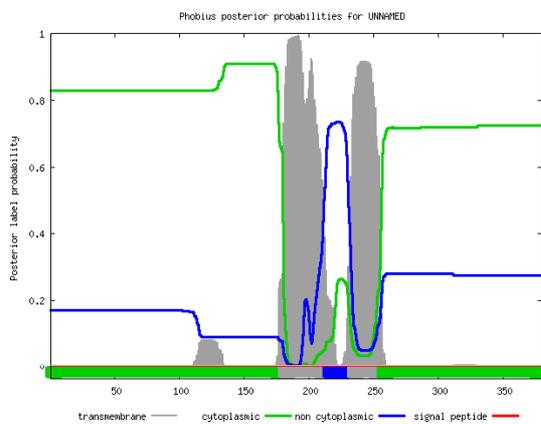
TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```

ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 180 CYTOPLASMIC.
FT TRANSMEM 181 214
FT TOPO_DOM 215 233 NON CYTOPLASMIC.
FT TRANSMEM 234 256
FT TOPO_DOM 257 380 CYTOPLASMIC.
//
  
```

```

# WEBSEQUENCE Length: 380
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMs: 2
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMs: 47.37345
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.00065
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.96243
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 inside 1 180
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 181 203
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 204 233
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 234 256
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 inside 257 380
  
```



keyword search

Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.



[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
SseC	Secretion system effector C (SseC) like ...	Family	n/a	117	310	117	307	1	183	306	106.6	1.5e-30	n/a	<input type="button" value="Show"/>

EspB:

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 90% :

1. from 169 to 212 (length = 44) with max = 97.8%

1. from 135 to 177 (length = 43) with max = 81.8%

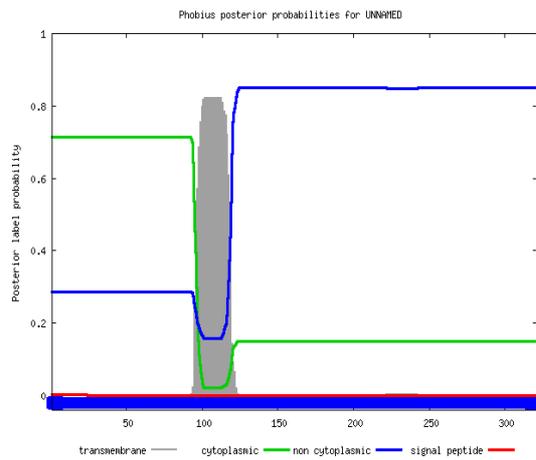
Coiled Coil Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

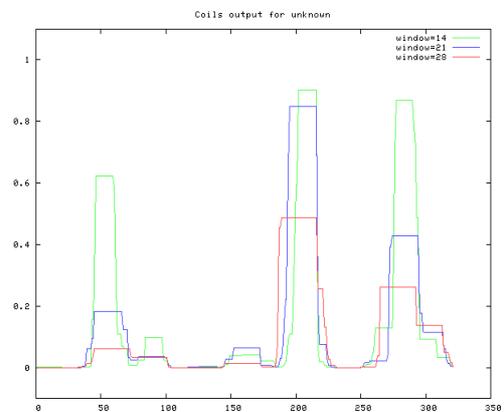
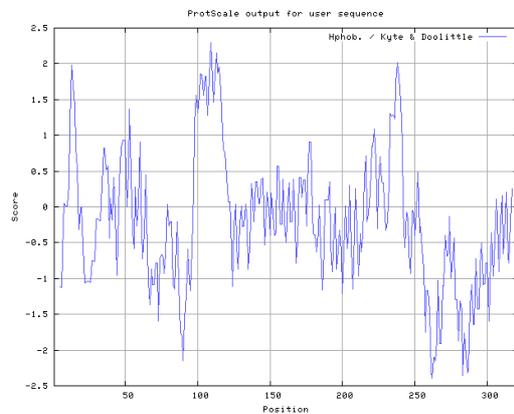
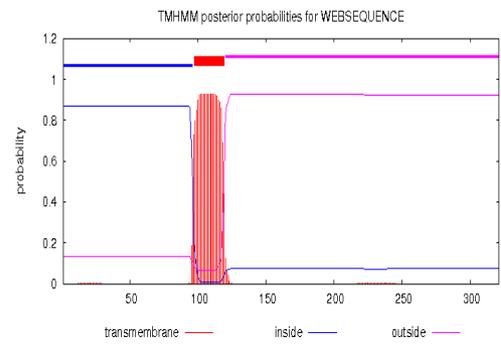
Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 321 NON CYTOPLASMIC.
//
```



```
# WEBSEQUENCE Length: 321
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMs: 1
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMs: 20.99041
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.004
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.86661
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 inside 1 96
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 97 119
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 120 321
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.

EspB

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
EspB	Enterobacterial EspB protein	Family	n/a	1	321	1	321	1	317	317	567.1	7.8e-171	n/a	Show

Comments or questions on the site? Send a mail to pfam-help@ebi.ac.uk.

European Molecular Biology Laboratory

SpgC:

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 1% :

1. from 135 to 181 (length = 47) with max = 300.0%

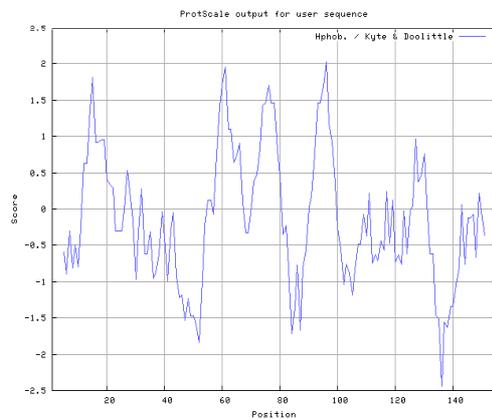
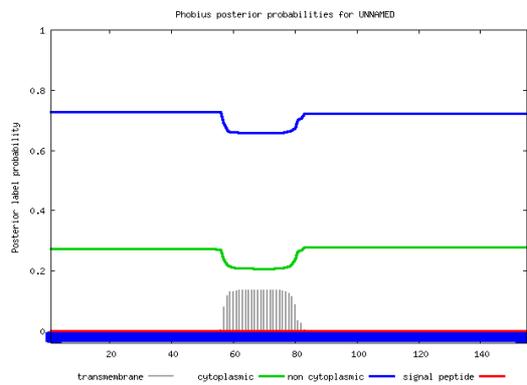
Coiled Coil Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

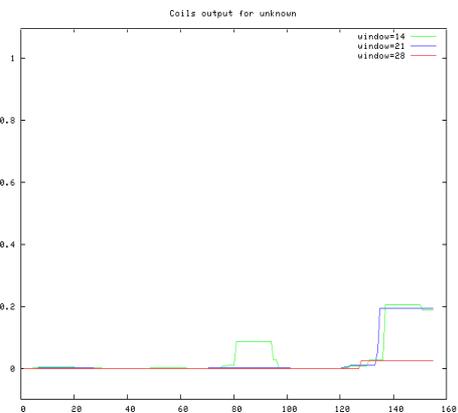
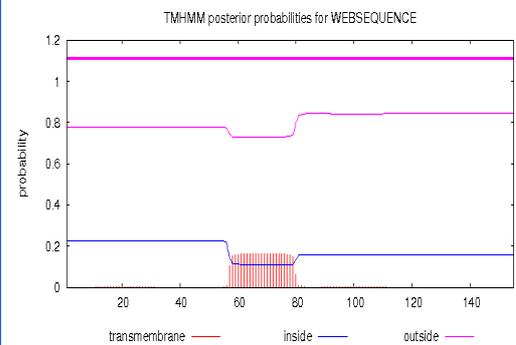
Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 155 NON CYTOPLASMIC.
//
```



```
# WEBSEQUENCE Length: 155
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMs: 3.76044
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.57862
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.22364
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 155
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 2 Pfam-A matches to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.



[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
TPR_3	Tetratricopeptide repeat	Repeat	CL0020	36	69	36	69	1	36	36	51.9	4.3e-14	n/a	Show
TPR_3	Tetratricopeptide repeat	Repeat	CL0020	70	103	71	103	2	36	36	39.3	3.9e-10	n/a	Show

Comments or questions on the site? Send a mail to pfam-help@ebi.ac.uk.

European Molecular Biology Laboratory

IpaB

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 90% :

1. from 97 to 168 (length = 72) with max = 100.0%
2. from 283 to 301 (length = 19) with max = 93.3%
3. from 533 to 558 (length = 26) with max = 96.7%

Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

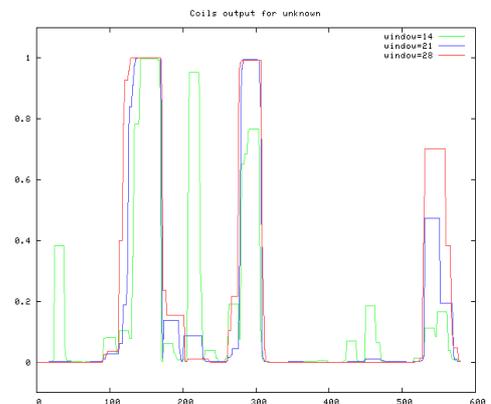
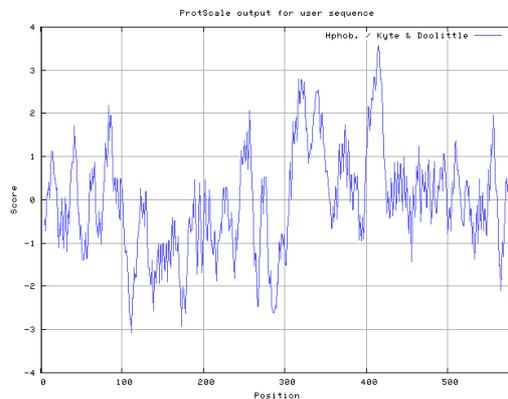
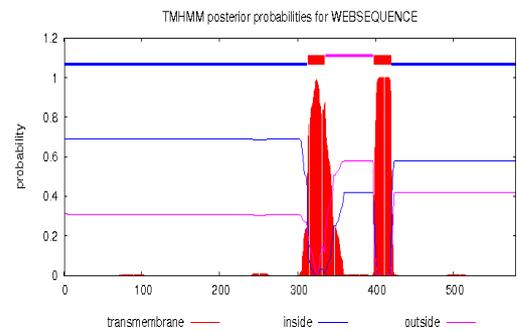
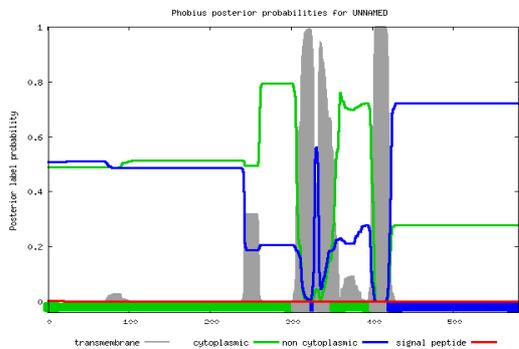
TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```

ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 305 CYTOPLASMIC.
FT TRANSHEM 306 328
FT TOPO_DOM 329 333 NON CYTOPLASMIC.
FT TRANSHEM 334 353
FT TOPO_DOM 354 401 CYTOPLASMIC.
FT TRANSHEM 402 423
FT TOPO_DOM 424 580 NON CYTOPLASMIC.
//
    
```

```

# WEBSSEQUENCE Length: 580
# WEBSSEQUENCE Number of predicted TMs: 2
# WEBSSEQUENCE Exp number of AAs in TMs: 52.50521
# WEBSSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.00219
# WEBSSEQUENCE Total prob of N-in: 0.68983
WEBSSEQUENCE TMHMM2.0 inside 1 312
WEBSSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 313 335
WEBSSEQUENCE TMHMM2.0 outside 336 397
WEBSSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 398 420
WEBSSEQUENCE TMHMM2.0 inside 421 580
    
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.



[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
SseC	Secretion system effector C (SseC) like ...	Family	n/a	252	578	252	577	1	305	306	224.7	1.6e-66	n/a	Show

IpaC:

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 90% :

1. from 338 to 341 (length = 4) with max = 90.7%

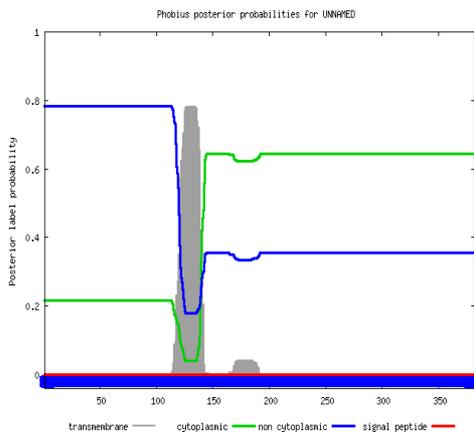
Coiled Coil Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

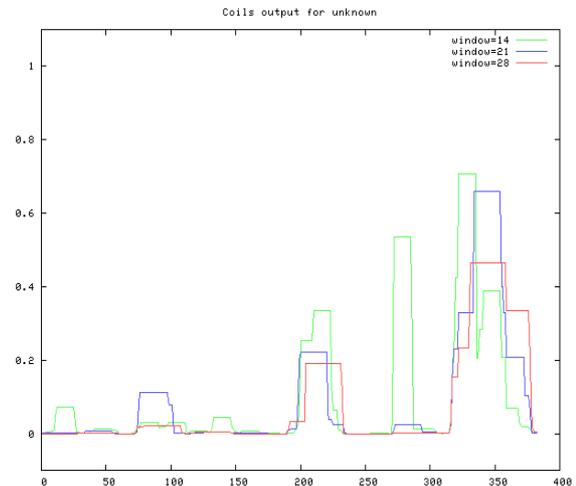
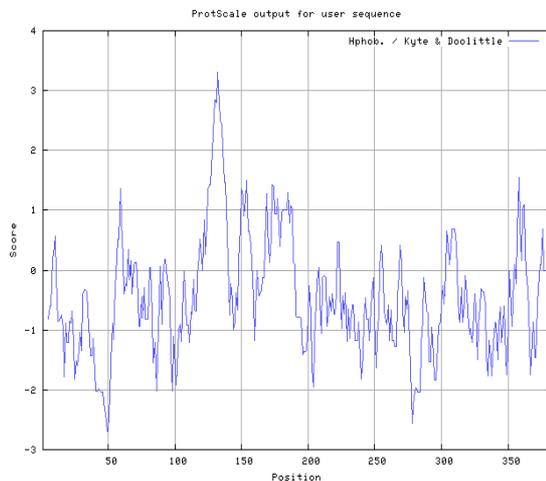
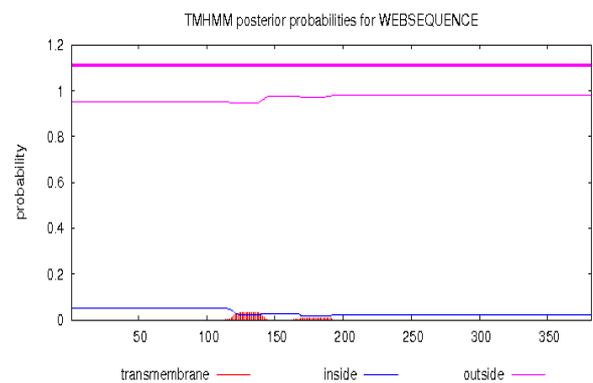
Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

```
ID UNNAMED
FT TOPO_DOM 1 382 NON CYTOPLASMIC.
//
```



```
# WEBSEQUENCE Length: 382
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 0.88794
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 6e-05
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.04931
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 382
```



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.



[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
IpaC_SipC	Salmonella-Shigella invasin protein C (I...	Family	n/a	45	370	46	370	2	337	337	407.9	2.8e-122	n/a	Show

IpaD:

Marcoil (<http://bcf.isb-sib.ch/webmarcoil/webmarcoilC1.html>)

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 50% :

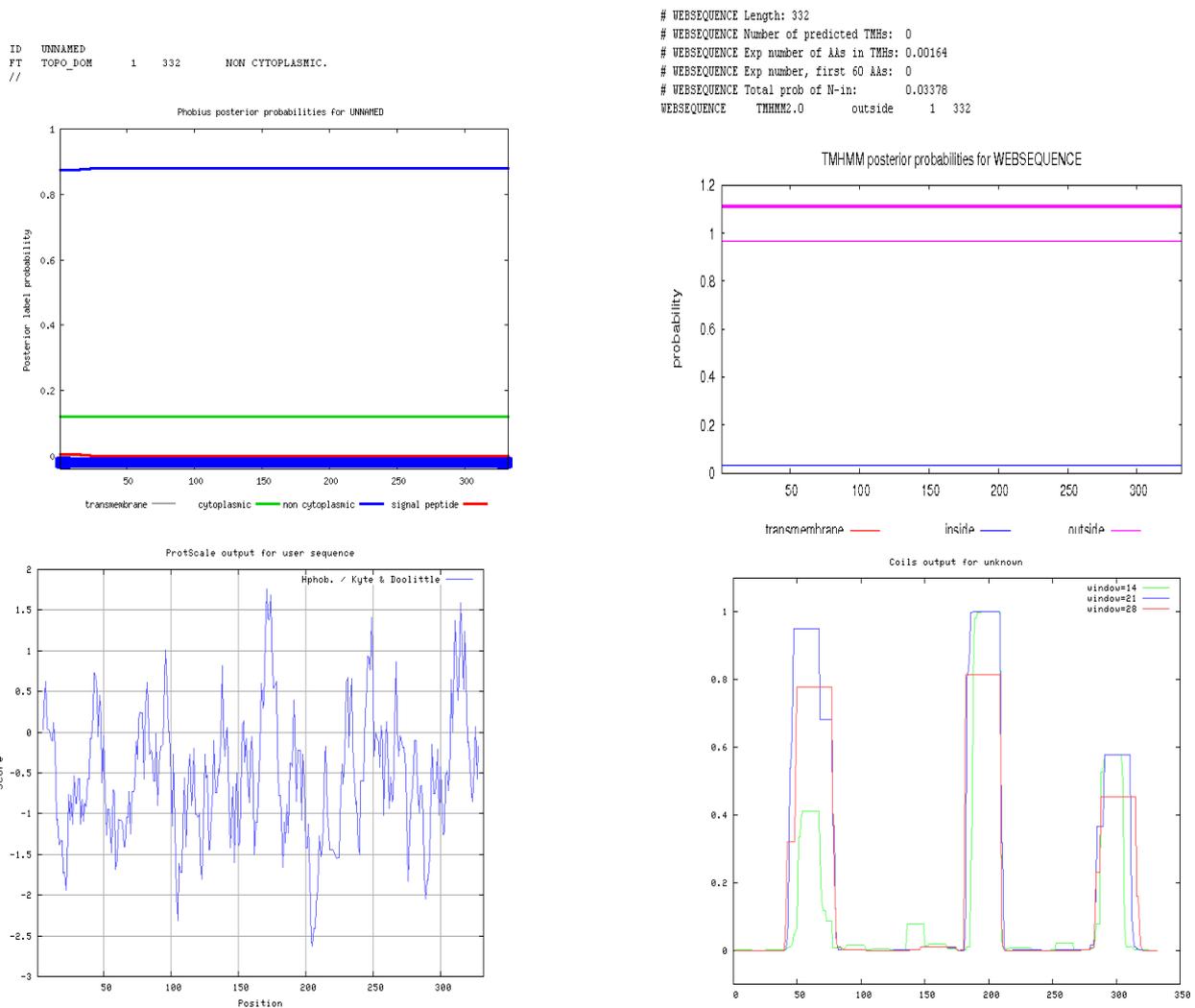
1. from 47 to 77 (length = 31) with max = 72.5%
2. from 189 to 207 (length = 19) with max = 88.2%

Coiled Coil Picture: Coils (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)

Hydrophobicity Plot: <http://web.expasy.org/protscale/>

Phobius: <http://phobius.sbc.su.se/>

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>



Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found 1 Pfam-A match to your search sequence (all significant). You did not choose to search for Pfam-B matches.

IpaD

[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
IpaD	Invasion plasmid antigen IpaD	Family	n/a	1	330	1	330	1	337	337	499.5	3.8e-150	n/a	Show

	Cpn0808	Cpn0809	Cpn0810	Cpn0811 (LcrH1)	Cpn1019	Cpn1020	Cpn1021 (LcrH2)	Cpn1022	CT_578	CT_579	Ct577	LcrH1	CT_861	CT_860	LcrH2	Ct863
Cpn0808		26/43	32/6	53/4	50/2	11/27	---	38/12	---	54/100	45/9	---	29/27	22/30	27/11	62/2
Cpn0809	40/2,8		71/1	38/2	50/8	26/27	---	28/22	52/96	---	32/10	---	45/42	26/16	---	50/2
Cpn0810	53/0,18	100/0,91		37/15	29/35	33/52	28/48	37/25	60/8	---	38/95	83/5	35/29	---	---	44/12
Cpn0811 (LcrH1)	63/0,38	69/4,5	42/9,2		25/23	33/16	23/52	33/19	---	40/4	---	70/96	40/47	46/5	27/65	50/6
Cpn1019	58/2,5	60/0,042	54/0,35	35/0,58		21/30	---	34/20	35/9	50/3	25/10	25/5	29/49	43/58	28/7	42/27
Cpn1020	54/0,055	46/0,005	46/0,41	66/1,2	41/0,08		38/5	28/11	22/20	28/6	50/6	33/8	35/99	28/25	44/6	48/28
Cpn1021 (LcrH2)	---	---	50/0,004	41/5e-08	---	68/0,006		38/29	---	---	---	26/72	---	46/13	67/99	---
Cpn1022	55/0,15	47/0,31	53/0,087	57/0,07	48/0,052	47/1	66/0,074		100/1	83/1	38/11	31/3	50/2	30/18	38/4	42/100
CT_578	---	68/9e-140	80/0,5	---	49/1,6	44/0,054	---	100/3,5		---	54/12	---	42/26	33/20	---	47/8
CT_579	70/1e-123	---	---	70/2,4	68/6,4	62/0,2	---	83/6,6	---		---	44/6	35/33	32/13	56/2	53/5
Ct577	59/0,34	36/0,94	63/4e-24	---	35/0,027	70/2	62/05	62/0,5	84/0,061	---		23/28	56/15	100/5	---	32/22
LcrH1	---	---	100/0,46	83/2e-116	35/0,72	66/1,3	45/3e-12	62/3,9	---	75/3	45/9,2		33/26	31/11	31/64	31/6
CT_861	54/0,17	65/0,035	46/4,1	53/0,02	51/0,08	55/5e-88	---	70/5	62/0,2	55/0,015	61/0,16	56/0,072		---	45/9	29/22
CT_860	41/0,32	50/0,6	---	61/5,2	65/1e-78	35/0,48	76/0,87	45/0,014	42/0,72	52/0,17	100/1,6	42/2	---		38/10	58/6
LcrH2	37/4,4	---	---	39/1e-12	43/7,8	75/0,11	80/4e-86	66/0,098	---	66/7,4	---	46/2e-16	63/3	52/2,8		---
Ct863	67/0,21	66/5,9	66/4,7	81/0,061	50/0,16	71/0,055	---	58/9e-103	64/0,9	60/1,7	45/0,72	62,24	42/0,36	66/0,81	---	

	Cpn0808	Cpn0809	CT_578	CT_579	YopB	YopD	PopB	PopD	SipB	SipC	SseC	SseD	EspB	EspD	IpaB	IpaC
Cpn0808					28/25	50/2	32/4	31/8	---	53/3	24/32	46/4	30/34	27/20	35/4	30/11
Cpn0809	Siehe Tabelle Ähnlichkeit der <i>C. pn</i> und <i>C. tr</i> Translocon Operons				35/47	33/15	37/5	36/10	29/38	31/36	34/17	38/10	50/3	32/11	30/38	24/30
CT_578					35/14	39/7	19/5	41/7	27/32	32/29	39/3	54/10	27/14	39/8	25/18	48/13
CT_579					35/12	44/12	36/9	28/20	22/4	32/20	24/23	46/15	46/2	28/19	42/10	31/11
YopB	45/3,5	50/ 0,014	58/0,38	49/2,4		33/11	43/88	50/7	30/16	40/6	31/42	24/59	20/26	30/21	28/32	27/44
YopD	68/5,8	51/0,24	77/0,32	72/0,22	45/9,2		31/18	42/86	32/21	54/7	23/29	35/13	29/24	86/17	60/3	21/27
PopB	59/0,29	51/3,2	59/5,5	48/2,9	65/ 8e-87	52/2,3		32/22	26/29	26/23	26/53	28/31	27/23	24/49	32/13	27/14
PopD	56/0,19	54/0,14	72/2,9	44/1,3	81/0,5	61/ 1e-67	48/0,57		---	---	31/27	23/50	27/14	27/62	37/6	34/10
SipB	---	52/ 2e-07	48/ 5e-08	72/9,7	47/ 0,035	57/0,14	61/1,8	---		35/21	24/35	28/4	285/10	29/39	41/94	42/2
SipC	64/1,3	66/ 0,016	46/ 0,042	55/0,18	66/1,7	76/0,48	44/0,35	---	52/0,74		30/9	43/3	25/8	37/16	55/7	35/73
SseC	41/1,4	47/2,6	52/1,4	44/ 0,001	52/ 2e-09	38/0,13	48/ 6e-10	46/2	36/0,68	59/1,7		24/27	33/16	32/23	23/17	31/17
SseD	69/0,97	51/ 0,029	61/0,12	69/0,61	44/ 0,001	48/ 0,004	46/ 1e-04	38/0,14	52/3	71/2,6	49/ 0,017		28/60	35/51	35/8	29/21
EspB	41/ 0,001	75/0,48	50/0,17	69/6,1	57/0,13	47/ 0,017	60/ 0,012	54/ 0,005	47/2,5	52/0,87	51/ 0,004	54/ 1e-04		30/64	31/63	33/10
EspD	44/ 3e-04	47/3,1	58/ 0,002	40/0,23	57/ 7e-06	100/1,1	45/ 9e-10	43/ 0,015	56/ 9e-06	57/ 0,097	53/ 1e-08	58/ 0,065	54/ 0,025		26/23	21/27
IpaB	60/1,1	49/ 4e-06	52/ 4e-04	66/5,3	44/ 0,027	70/3,7	54/ 0,045	52/3,4	61/ 2e-120	72/1,5	55/0,96	52/7,2	52/0,2	46/0,03		55/1
IpaC	40/6,7	47/ 0,008	69/ 0,092	52/0,35	44/ 0,097	46/6,3	51/0,25	56/ 0,049	66/5	57/ 2e-44	40/0,74	43/5,7	48/0,37	44/5,7	81/3,1	

Identität in %/ Abdeckung in %

	Cpn0811	Cpn1021	CT_576	CT_862	SycD	PcrH	SicA	SscA	SpgC	
Homologie in %/ Erwartungswert	Cpn0811	Siehe Tabelle Ähnlichkeit der <i>C. pn</i> und <i>C. tr</i> Translocon Operons				28/56	29/50	22/64	25/51	26/45
	Cpn1021					30/81	22/72	21/67	24/55	23/52
	CT_576					30/61	28/50	25/54	23/63	24/53
	CT_862					28/66	29/58	23/51	27/38	23/61
SycD	49/ 1e-15	48/ 1e-17	52/ 2e-17	48/ 9e-17		59/97	26/83	27/83	27/94	
PcrH	51/ 2e-14	45/ 4e-11	50/ 1e-14	51/ 1e-14	77/ 6e-69		29/81	29/83	26/84	
SicA	49/ 2e-10	42/ 3e-09	49/ 5e-10	43/ 2e-08	47/ 2e-15	48/ 6e-17		24/69	60/89	
SscA	40/ 5e-11	47/ 4e-10	40/ 8e-10	49/ 2e-08	45/ 2e-17	48/ 1e-16	42/ 5e-07		24/61	
SpgC	54/ 2e-14	41/ 9e-07	54/ 3e-15	46/ 8e-11	45/ 7e-18	47/ 2e-17	80/ 1e-69	40/ 7e-06		

Identität in %/ Abdeckung in %

Homologie in %/ Erwartungswert

	Cpn0811	Cpn1021	CT_576	CT_862	SycD	PcrH	SicA	SscA	SpgC
Cpn0811		23/52	70/96	27/65	28/56	29/50	22/64	25/51	26/45
Cpn1021	41/ 5e-08		26/72	67/99	30/81	22/72	21/67	24/55	23/52
CT_576	83/ 2e-116	45/ 3e-12		31/64	30/61	28/50	25/54	23/63	24/53
CT_862	39/ 1e-12	80/ 4e-86	46/ 2e-16		28/66	29/58	23/51	27/38	23/61
SycD	49/ 1e-15	48/ 1e-17	52/ 2e-17	48/ 9e-17		59/97	26/83	27/83	27/94
PcrH	51/ 2e-14	45/ 4e-11	50/ 1e-14	51/ 1e-14	77/ 6e-69		29/81	29/83	26/84
SicA	49/ 2e-10	42/ 3e-09	49/ 5e-10	43/ 2e-08	47/ 2e-15	48/ 6e-17		24/69	60/89
SscA	40/ 5e-11	47/ 4e-10	40/ 8e-10	49/ 2e-08	45/ 2e-17	48/ 1e-16	42/ 5e-07		24/61
SpgC	54/ 2e-14	41/ 9e-07	54/ 3e-15	46/ 8e-11	45/ 7e-18	47/ 2e-17	80/ 1e-69	40/ 7e-06	

BLASTp mit CPn0809 Volllänge:

secretion system effector C (SseC) like family protein [Bacteroides fragilis str. S6L5]

Range 1: 1 to 482 [GenPeptGraphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
427 bits(1097)	2e-141	Compositional matrix adjust.	270/499(54%)	347/499(69%)	29/499(5%)
Query 1	MSISSSSGPDN--QKNIMSQVLTSTPQGVPQDQLSGNETKQIQQTRQGKNTMESDATI				58
Sbjct 1	MS+SSS GPDN KNI+SQV+ S+PQGVP QDK++GNETKQIQQ RQGKNTMES++ +				59
Query 59	AGASGDKTSSSTTKTETAPQQGVAAGKESSES-----QKAGADTGVSGAAATTASNTAT				112
Sbjct 60	AG GK+K E QQG+AAGKE S KAG + ++GA				107
Query 113	KIAMQTSIEEASKSMESTLESLSLQSLSAQMKEVEAVVVAALSGKSSGS-AKLETPELPKP				171
Sbjct 108	M+ EE SK+ E++L SL S+SA+ +++ +V A SG S+ S LETPELPKP				164
Query 172	GVTPRSEVIEIGLALAKAIQTLGEATKSALSNYASTQAQADQTNKLGLEKQAIKIDKERE				231
Sbjct 165	VTPR +V EI LALAKAI LGEAT SALS+Y STQAQA +++ LE Q +KID ER				224
Query 232	EYQEMKAAEQSKDLEGTMDTVNTVMIASVAITVISIVAAIFTCGAGLAGLAAGAAVGA				291
Sbjct 225	E+++M+ QK T++TVNTVM+AVS+ ITVIS+VAA+FTCG GL G AA A A				283
Query 292	AAAGGAAGA---AAATVATQITVQAVVQAVKQAVITAVRQAITAAIKAAVKSGIKAFIK				348
Sbjct 284	AA A + AT+VATQ+TVQAV+QA+KQAVI AV+QA+ AIKA +K IK IK				343
Query 349	TLVKAIKAIKISKGISKVFAKGTQMIAKNFPKLSKVISSLTSKWVTVGVVVVAAPALGKG				408
Sbjct 344	T+VK + K +SK I K+F G +AK +P LSKVI++L SK T+ +G +VA P L KG				403
Query 409	IMQMQLSEMQQNVAQFQKEVQKGLQAAADMISMFTQFWQQASKIASKQTGESNEMTQKATK				468
Sbjct 404	I ++LS++Q +A+ Q+ GKL A A+M++MFTQFWQQASKIASKQ ++EM Q+ATK				463
Query 469	LGAQILKAYAAISGAIAGA 487				
Sbjct 464	LGAQI KA++AIS +A A				482

pathogenicity island 1 effector protein SipB [Chromobacterium violaceum]

Range 1: 225 to 347 [GenPeptGraphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
43.9 bits(102)	0.27	Compositional matrix adjust.	44/138(32%)	72/138(52%)	16/138(11%)
Query 153	LSGKSSGSAKLETPELPGVTPRSEVIEIGLALAKAIQTLGEATKSALSN-YASTQAQA				211
Sbjct 225	L+GK G A + K G S V ++ L +A ++ +G+ ++ +L N A QA				283
Query 212	DQTNKLGLEKQAIKIDKEREYQEMKAAEQSKDLEGTMDTVNTVMIASVAITVISIVA				271
Sbjct 284	+ K ++DK+ EYQE +K+++L TM + ++ A+ +TV+S+VA				329
Query 272	AIFTCGAGLAGLAAGAAV 289				
Sbjct 330	A FT GA LA A G A+				347

Chaperons im Vergleich:

CPn0811 und SycD:

Range 1: 36 to 168 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	58.5 bits(140)	1e-15	Compositional matrix adjust.	37/133(28%)	66/133(49%)	2/133(1%)
Query	81	LEEIYTVAYTFYSQGYNEAVGLFQLLAAAQPQNYKYLGLSSCYHQLHLYNEAAFGFLL				140
Sbjct	36	LE++Y++A+ Y GKY +A +FQ L + ++ LGL +C + Y+ A +				95
Query	141	AFDAQPDNPIPYYIADSLKLLQPEESNNFLDVTMDCGNNPEFKILKERCQIMKQSI-				199
Sbjct	96	GAIMDIKEPRFPFHAAECLLQKGELEAEESGLFLAQELIADKPEFKELSTRVSSMLEAIK				155
Query	200	-EKQMAGETTKAP 211				
Sbjct	156	+K+M E P LKKEMEHECVDNP 168				

CPn0811 und PcrH:

Range 1: 4 to 117 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	55.1 bits(131)	2e-14	Compositional matrix adjust.	34/117(29%)	60/117(51%)	3/117(2%)
Query	46	PVPTREEIKKALGNIFEGLSNGLDLQQLGLSDYLLEEIYTVAYTFYSQGYNEAVGLFQ				105
Sbjct	4	P P++ + ++AL L +G L + GLS+ LE++Y + + Y GK+++A +FQ				60
Query	106	LLAAAQPQNYKYLGLSSCYHQLHLYNEAAFGFLLAFDAQPDNPIPYYIADSLKLL				162
Sbjct	61	L + +Y LGL +C L LY +A + + P P++ A+ L+L ALCMLDHYDARYFLGLGACRQSLGLYEQALQSYSYGALMDINEPRFPFHAAEHLQL				117

CPn0811 und SicA:

Range 1: 16 to 131 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	44.3 bits(103)	2e-10	Compositional matrix adjust.	25/116(22%)	57/116(49%)	0/116(0%)
Query	60	IFEGLSNGLDLQQLGLSDYLLEEIYTVAYTFYSQGYNEAVGLFQLLAAAQPQNYKYL				119
Sbjct	16	I++ +S G L+ + G+ +++ +Y AY FY+QG+ +EA F+ L N Y +				75
Query	120	GLSSCYHQLHLYNEAAFGFLLAFDAQPDNPIPYYIADSLKLLQPEESNNFLDVT				175
Sbjct	76	GL++ + +A + +AF ++ P ++ L +++ ++ ++ GLAAVCQLKKQFQKACDLYAVAFLLKNDYRPFVFTGQCQLLMRKAARQCFELV				131

Range 2: 114 to 147 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	13.9 bits(24)	2.0	Compositional matrix adjust.	9/34(26%)	17/34(50%)	0/34(0%)
Query	28	AELAAQKAKADDLEQVHPVPTREEIKKALGNIF 61				
Sbjct	114	+L +K AKA ++ TE+E +A ++ CQLLMRKAARQCFELVNERTEDESLRKALVY 147				

CPn0811 und SscA:

Range 1: 35 to 153 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	45.4 bits(106)	5e-11	Compositional matrix adjust.	30/119(25%)	48/119(40%)	0/119(0%)
Query	81	LEEIYTVAYTFYSQGYNEAVGLFQLLAAAPQNYKMLGLSSCYHQLHLYNEAAFQFFL				140
		L +Y A ++ A LFQLL ++ Y L C + EA + +				
Sbjct	35	LNTLYRYATQLMEVKEFAGAARLFQLLTIYDAWSFDYWFRLGECQAQKHGWEAIYAYGR				94
Query	141	AFDAQPDNPIPPYYIADSLKLOQPEESNNFLDVTMDICGNNPEFKILKERCQIMKQSI				199
		A + D P P+ A+ L + L + ICG E +IL++R + M Q +				
Sbjct	95	AAQIKIDAPQAPWAAAECYLACDNVCAIKALKAVVVICGEVSEHQILRQRAEKMLQQQL				153

CPn0811 und SpgC:

Range 1: 15 to 120 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	55.1 bits(131)	2e-14	Compositional matrix adjust.	28/106(26%)	58/106(54%)	0/106(0%)
Query	60	IFEGLSNGLDLQOILGLSDYLLEEIYTVAYTFYSQGYNEAVGLFQLLAAAPQNYKML				119
		+ + +++G L+ I + D ++++IY+ AY FY++G+ EA F+ L N Y++				
Sbjct	15	VIDAINSGATLKDINAIPDDMMDDIYSAYDFYNKGRIEEEAEVFFRFLCIYDFYNVDYIM				74
Query	120	GLSSCYHQLHLYNEAAFQFFLAFDAQPDNPIPPYYIADSLKLOQP				165
		GL++ Y + +AA + +AF ++ P ++ L+L+ P				
Sbjct	75	GLAAIYQIKEQFQQAADLYAVAFALGKNDYTPVFHTGQCQLRLKAP				120

CPn0811 und Spel:

Range 1: 9 to 19 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	14.6 bits(26)	2.7	Compositional matrix adjust.	4/11(36%)	7/11(63%)	0/11(0%)
Query	13	QKPSASFNKKT	23			
		Q P++ FN +				
Sbjct	9	QNPASVFNSNS	19			

CPn1021 und SycD:

Range 1: 15 to 147 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	62.8 bits(151)	1e-17	Compositional matrix adjust.	42/141(30%)	69/141(48%)	8/141(5%)
Query	25	LESYLEGYVDPKNIALDITYQKIFKISSEDLKVVYKEGYHAYLDKDYAKSITVFRWLVFVN				84
		+ES+L+G IA+ + +ISS+ LE++Y ++ Y Y + VF+ L +				
Sbjct	15	MESFLKG---GGTIAM-----LNEISSDTLEQLYSLAFNQYQSGKYEDAHKVFQALCVLD				66
Query	85	PFVSKFWSLGLASLHMSEQYSQALHAYGVTAVLRDKDPYPHYAYICYTLTNEHEEAEKA				144
		+ S+F+ LGA QY A+H+Y A++ K+P ++A C E EAE				
Sbjct	67	HYDSRFFLGLGACRQAMGQYDLAIHSYSYGAIMDIKEPRFPFHAAECLLQKGEAEESG				126
Query	145	LEMAWVRAQHKPLYNELKEEI	165			

Sbjct 127 L +A KP + EL +
LFLAQELIADKPEFKELSTRV 147

CPn1021 und PcrH:

Range 1: 6 to 126 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
44.7 bits(104)	4e-11	Compositional matrix adjust.	28/125(22%)	57/125(45%)	4/125(3%)
Query 20	PFDDLESYLEGYVPDKNIALDTYQKIFKISSE				
	P D + LE ++ D T + +S + LE++Y G++ Y + + +F+				
Sbjct 6	PSDTDQQQALEAFLRDGG----TLAMLRGLSEDTLEQLYALGFNQYQAGKWDDAQKIFQA				61
Query 80	LVFFNPFVSKFWFSLGASLHMSEQYSQALHAYGVTAVLRDKDPYPHYAYICYTLTNEHE				139
	L + + +++++ LGA Y QAL +Y A++ +P ++A C+ + +				
Sbjct 62	LCMLDHYDARYFLGLGACRQSLGLYEQALQSYSGALMDINEPRFPFHAAECHLQLGLDL				121
Query 140	EAEKA 144				
	AE				
Sbjct 122	GAESG 126				

CPn1021 und SicA:

Range 1: 25 to 140 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
40.0 bits(92)	3e-09	Compositional matrix adjust.	24/116(21%)	49/116(42%)	0/116(0%)
Query 42	TYQKIFKISSE				
	T + + I + ++ +Y Y Y ++ T FR+L ++ + + L A +				
Sbjct 25	TLKDVHGIPQDMMDGLYAHAYEFYNGRQLDEAETFFRFLCIYDFYNPDYTMGLAAVCQLK				84
Query 102	EQYSQALHAYGVTAVLRDKDPYPHYAYICYTLTNEHEEAEKALEMAWVRAQHKPL				157
	+Q+ +A Y V L D P ++ C L + +A + E+ R + + L				
Sbjct 85	KQFQKACDLYAVAFLLKNDYRPVFFTGQCQLLMRKAAKARQCFELVNERTEDESL				140

CPn1021 und SscA:

Range 1: 32 to 127 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
42.0 bits(97)	4e-10	Compositional matrix adjust.	23/96(24%)	46/96(47%)	0/96(0%)
Query 51	SEDLKVKYKEGYHAYLDKDYAKSITVFRWL				
	++ L +Y+ K++A + +F+ L ++ + +WF LG + + +A+++				
Sbjct 32	TQPLNTLYRYATQLMEVKEFAGAARLFQLLT				91
Query 111	YGVTAVLRDKDPYPHYAYICYTLTNEHEEAEKALE		146		
	YG A ++ P + A CY + A KAL+				
Sbjct 92	YGRAAQIKIDAPQAPWAAAECYLACDNVCYAIKALK		127		

CPn1021 und SpgC:

Range 1: 24 to 113 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
32.7 bits(73)	9e-07	Compositional matrix adjust.	21/90(23%)	37/90(41%)	0/90(0%)
Query 42	TYQKIFKISSEDELEKVKYKEGYHAYLKDKYAKSITVFRWLVFNFVSKFWFSLGASLHMS				101
	T + I I + ++ +Y Y Y ++ FR+L ++ + + L A +				
Sbjct 24	TLKDINAIPDDMMDDIYSYAYDFYNGRIIEAEVFFRFLCIYDFYNVDYIMGLAAIYQIK				83
Query 102	EQYSQALHAYGVTAVLRDKDPYPHYAYIC		131		
	EQ+ QA Y V L D P ++ C				
Sbjct 84	EQFQQAADLYAVAFALGKNDYTPVFHTGQC		113		

CT_576 und SycD:

Range 1: 19 to 159 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
63.2 bits(152)	2e-17	Compositional matrix adjust.	43/144(30%)	75/144(52%)	4/144(2%)
Query 61	LSNGLTLQQIILGLSDVLLLEEIYTVAYTFYSQGYQEAIGLFQILTASKPQCYKYLGLSS				120
	L G T+ + +S LE++Y++A+ Y GKY++A +FQ L ++ LGL +				
Sbjct 19	LKGGGTIAMLNEISSDTLEQLYSLAFNQYQSGKYEDAHKVQALCVLDHYDSRFFLGLGA				78
Query 121	CYHQLKMYDEAAFGLFADFAPENPIPPYYIADSLMKLNQPEESQDFLDITIDMCKNKP				180
	C + YD A + + P P++ A+ L++ + E++ L + ++ +KP				
Sbjct 79	CRQAMGQYDLAIHSYSYGAIMDIKEPRFPFHAAECLLQKGELAEAESGLFLAQELIADKP				138
Query 181	EYKVLKDRCSIMKQSLDAV-LKKE		203		
	E+K L R S M L+A+ LKKE				
Sbjct 139	EFKELSTRVSSM---LEAIKLLKKE		159		

CT_576 und PcrH:

Range 1: 4 to 118 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
55.8 bits(133)	1e-14	Compositional matrix adjust.	33/118(28%)	59/118(50%)	3/118(2%)
Query 43	PVPTEEETKQVLMDILQGLSNGLTLQQIILGLSDVLLLEEIYTVAYTFYSQGYQEAIGLFQ				102
	P P++ + +Q L L+ +G TL + GLS+ LE++Y + + Y GK+ +A +FQ				
Sbjct 4	PTPSDTDQQALEAF LR--DGGTLAMLRGLSEDTLEQLYALGFNQYQAGKWDDAQKIFQ				60
Query 103	ILTASKPQCYKYLGLSSCYHQLKMYDEAAFGLFADFAPENPIPPYYIADSLMKLN				160
	L +Y LGL +C L +Y++A + P P++ A+ ++L				
Sbjct 61	ALCMLDHYDARYFLGLGACRQSLGLYEQALQSYSYGALMDINEPRFPFHAAECHLQLG				118

CT_576 und SicA:

Range 1: 8 to 110 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
42.7 bits(99)	5e-10	Compositional matrix adjust.	27/106(25%)	52/106(49%)	3/106(2%)
Query 46	TEEETKQVLMDILQGLSNGLTLQQIILGLSDVLLLEEIYTVAYTFYSQGYQEAIGLFQILT				105

Sbjct 8 +EE +++ D +S G TL+ + G+ +++ +Y AY FY+QG+ EA F+ L
 SEERVAEMIWD---AVSEGATLKDVGIPQDMMDGLYAHAYEFYNQGRLEAETFFRFLC 64

Query 106 ASKPQCCKYIILGLSSCYHQLKMYDEAAFQFFLAFDAQPENPIPPYY 151
 Y +GL++ K + +A + +AF + P ++

Sbjct 65 IYDFYNPDYTMGLAAVCQLKKQFQKACDLYAVAFATLLKNDYRPFVFF 110

Range 2: 114 to 139 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
11.9 bits(19)	8.3	Compositional matrix adjust.	7/26(27%)	13/26(50%)	0/26(0%)
Query 25	AEIAAQKKAKAEDLEQKYPVPTTEET		50		
	++ +K AKA + TE+E+				
Sbjct 114	CQLLMRKAARQCFELVNERTEDES		139		

CT_576 und SscA:

Range 1: 6 to 153 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
42.0 bits(97)	8e-10	Compositional matrix adjust.	35/149(23%)	61/149(40%)	3/149(2%)
Query 50	TKQVLMIDILQGLSNGLTLLQILGLSDVLL--LEEIYTVAYTFYSQGYQEAIGLFIILTAS		107		
	T Q D ++ G +L+ +L DV L +Y A ++ A LFQ+LT				
Sbjct 6	TLQQAHDTRMFRFRGGSLRMLLD--DDVTQPLNTLYRYATQLMEVKEFAGAARLFQLLTIY		64		
Query 108	KPQCCKYIILGLSSCYHQLKMYDEAAFQFFLAFDAQPENPIPPYYIADSLMKLNQPEESQD		167		
	+ Y L C K + EA + + A + + P P+ A+ + +				
Sbjct 65	DAWSFDYWFRLGECQAQKHWEAIIYAYGRAAQIKIDAPQAPWAAAECYLACDNVYCAIK		124		
Query 168	FLDITIDMCKNKPEYKVLKDRCSIMKQSL		196		
	L + +C E+++L+ R M Q L				
Sbjct 125	ALKAVVRICGEVSEHQILRQRAEKMLQQL		153		

CT_576 und SpgC:

Range 1: 7 to 131 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
57.0 bits(136)	3e-15	Compositional matrix adjust.	30/125(24%)	68/125(54%)	0/125(0%)
Query 49	ETKQVLMIDILQGLSNGLTLLQILGLSDVLLLEEIYTVAYTFYSQGYQEAIGLFIILTAS		108		
	E + + ++G TL+ I + D ++++IY+ AY FY++G+ +EA F+ L				
Sbjct 7	ENESISTAVIDAINSGATLKDINAIPDDMMDDIYSYAYDFYNKGRIEEADEVFRFLCIYD		66		
Query 109	PQCCKYIILGLSSCYHQLKMYDEAAFQFFLAFDAQPENPIPPYYIADSLMKLNQPEESQDF		168		
	YI+GL++ Y + + +AA + +AF + P ++ ++L P ++++				
Sbjct 67	FYNVDYIMGLAAIYQIQEQQAADLYAVAFALGKNDYTPVFHTGQCQLRLKAPLKAKEC		126		
Query 169	LDITI		173		
	++ I				
Sbjct 127	FELVI		131		

CT_862 und SycD:

Range 1: 24 to 147 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
60.8 bits(146)	9e-17	Compositional matrix adjust.	35/124(28%)	60/124(48%)	0/124(0%)
Query 68	TYQKIFKLSSEDL	EQVYKEGYNAYLQGDY	EESSTAFYWLIF	FNPFVSKFWFSLGASLHML	127
Sbjct 24	T + ++SS+ LEQ+Y	+N Y G YE++ F L + + S+F+ LGA +			
Query 128	QKYQQALHAYGVA	ALLREKDPYPHY	YAYICYTLLNNP	EAEKALDLAWQKV	TSSAYSSL 187
Sbjct 84	+Y A+H+Y A++ K+P ++A C			EAE L LA + + + L	
Query 188	KEEI 191				
Sbjct 144	STRV 147				

Range 2: 88 to 94 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
13.1 bits(22)	3.1	Compositional matrix adjust.	5/7(71%)	6/7(85%)	0/7(0%)
Query 192	LAIKSYA 198				
Sbjct 88	LAIHSYS 94				

CT 862 und PcrH:

Range 1: 24 to 126 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
54.7 bits(130)	1e-14	Compositional matrix adjust.	30/103(29%)	53/103(51%)	0/103(0%)
Query 68	TYQKIFKLSSEDL	EQVYKEGYNAYLQGDY	EESSTAFYWLIF	FNPFVSKFWFSLGASLHML	127
Sbjct 24	T + LS + LEQ+Y	G+N Y G ++++ F L + + ++++ LGA L			
Query 128	QKYQQALHAYGVA	ALLREKDPYPHY	YAYICYTLLNNP	EAEKA 170	
Sbjct 84	GLYEQALQSYSYG	ALMDINEPRFPFHAAE	CHLQGLDLDGAESG	126	

Range 2: 53 to 65 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
11.9 bits(19)	8.3	Compositional matrix adjust.	3/13(23%)	6/13(46%)	0/13(0%)
Query 35	DKIARSYHHMCP	L 47			
Sbjct 53	DDAQKIFQALCML 65				

CT 862 und SicA:

Range 1: 25 to 138 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
38.1 bits(87)	2e-08	Compositional matrix adjust.	26/114(23%)	50/114(43%)	13/114(11%)
Query 68	TYQKIFKLSSEDL	EQVYKEGYNAYLQGDY	EESSTAFYWLIF	FNPFVSKFWFSLGASLHML	127
Sbjct 25	T + + + + ++ +Y	Y Y Y QG +E+ T F +L ++ + + L A +			
Query 128	QKYQQALHAYGVA	ALLREKDPYPHY	YAYICITLLNNP	EAE 168	
Sbjct 85	+++Q+A Y VA L + D P ++			A C+ L+N E E	

CT_862 und SscA:

Range 1: 50 to 126 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
37.7 bits(86)	2e-08	Compositional matrix adjust.	21/77(27%)	38/77(49%)	0/77(0%)
Query 95	DYEEStAFYWLIFFNPFVSKFWFSLGASLHMLQKYQQALHAYGVAALLREKDPYPHYA				154
	++ ++ F L ++ + +WF LG + + +A++AYG AA ++ P + A				
Sbjct 50	EFAGAARLFQLLTIYDAWSFDYWFRLGECQAQKHWGEATYAYGRAAQIKIDAPQAPWAA				109
Query 155	YICYTLLNNPEEA EKAL	171			
	CY +N A KAL				
Sbjct 110	AECYLACDNVCYAIKAL	126			

CT_862 und SpgC:

Range 1: 24 to 152 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
44.3 bits(103)	8e-11	Compositional matrix adjust.	30/129(23%)	60/129(46%)	7/129(5%)
Query 68	TYQKIFKLSSSEDLQVYKEGYNAYLQGDYEEStAFYWLIFFNPFVSKFWFSLGASLHML				127
	T + I + + ++ +Y Y+ Y +G EE+ F +L ++ + + L A +				
Sbjct 24	TLKDINAIPDDMMDDIYSAYDFYNGRIEEAEVFFRFLCIYDFYNVDYIMGLAAIYQIK				83
Query 128	KYQQALHAYGVAALLREKDPYPHYAYICYTLLNNPEEA EKALDLAWQ-----KVKT				180
	+++QQA Y VA L + D P ++ C L P +A++ +L Q K+K				
Sbjct 84	EQFQQAADLYAVAFALGKNDYTPVFHTGQCQLRLKAPLKAKECFELVIQHSNDEKLIKIA				143
Query 181	SSAYSSLKE	189			
	S +++++				
Sbjct 144	QSYLDAIQD	152			

SycD und PcrH:

Range 1: 1 to 163 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
197 bits(501)	6e-69	Compositional matrix adjust.	96/163(59%)	126/163(77%)	0/163(0%)
Query 1	MQQETTDQEQYLAMESFLKGGGTIAMLNEISSDTLEQLYSLAFNQYQSGKYEDAHKVFQ				60
	M Q T + Q A+E+FL+ GGT+AML +S DTLEQLY+L FNQYQ+GK++DA K+FQ				
Sbjct 1	MNQPTPSDDTQQQALEAFRLDGGTLAMLRLGSEDTLEQLYALGFNQYQAGKWDDAQKIFQ				60
Query 61	ALCVLDHYDSRFFLGLGACRQAMQYDLAIHSYSYGAIMDIKEPRFPFHAAECLLQKGEL				120
	ALC+LDHYD+R+FLGLGACRQ++G Y+ A+ SYSYGA+MDI EPRFPFHAAEC LQ G+L				
Sbjct 61	ALCMLDHYDARYFLGLGACRQSLGLYEALQSYSGALMDINEPRFPFHAAECHLQLGDL				120
Query 121	AEAESGLFLAQELIADKPEFKELSTRVSSMLEAIKLLKEMEHE	163			
	AESG + A+ L A +P + L+ R +MLEA+ +K+ +E				
Sbjct 121	DGAESGFYSARALAAAQPAHEALAAARAGAMLEAVTARKDRAYE	163			

SycD und SicA:

Range 1: 23 to 159 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
56.2 bits(134)	2e-15	Compositional matrix adjust.	37/141(26%)	67/141(47%)	4/141(2%)
Query 22	GGTIAMLNEISSDTLEQLYSLAFNQYQSGKYEDAHKVFQALCVLDHYDSRFFLGLGACRQ				81
Sbjct 23	G T+ ++ I D ++ LY+ A+ Y G+ ++A F+ LC+ D Y+ + +GL A Q				
Query 82	AMGQYDLAIHSYSYGAIMDIKEPRFPFHAAECLLQKGELEAEESGLFLAQELIADKPEFK				141
Sbjct 83	Q+ A Y+ + + R F +C L + A+A EL+ ++ E +				
Query 142	ELSTRVSSMLEAIKLLKEMEH	162			
Sbjct 139	L + LEA+K + +H				
Query 142	ELSTRVSSMLEAIKLLKEMEH	162			
Sbjct 139	SLRAKALVYLEALKTAETEQH	159			

SycD und SscA:

Range 1: 14 to 153 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
62.4 bits(150)	2e-17	Compositional matrix adjust.	38/140(27%)	64/140(45%)	0/140(0%)
Query 15	MESFLKGGGTIAMLNEISSDTLEQLYSLAFNQYQSGKYEDAHKVFQALCVLDHYDSRFFL				74
Sbjct 14	M F +GG +L++ + L LY A + ++ A ++FQ L + D + ++				
Query 75	GLGACRQAMGQYDLAIHSYSYGAIMDIKEPRFPFHAAECLLQKGELEAEESGLFLAQELI				134
Sbjct 74	LG C QA + AI++Y A + I P+ P+ AAEC L + A L +				
Query 135	ADKPEFKELSTRVSSMLEAI	154			
Sbjct 134	+ E + L R ML+ +				
Query 135	ADKPEFKELSTRVSSMLEAI	154			
Sbjct 134	GEVSEHQILRQRAEKMLQQL	153			

SycD und SpgC:

Range 1: 1 to 155 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
63.5 bits(153)	7e-18	Compositional matrix adjust.	43/160(27%)	73/160(45%)	6/160(3%)
Query 1	MQOETTDTOEYQLAMESFLKGGGTIAMLNEISSDTLEQLYSLAFNQYQSGKYEDAHKVFQ				60
Sbjct 1	M T+ + A+ + G T+ +N I D ++ +YS A++ Y G+ E+A F+				
Query 61	ALCVLDHYDSRFFLGLGACRQAMGQYDLAIHSYSYGAIMDIKEPRFPFHAAECLLQ-KGE				119
Sbjct 61	LC+ D Y+ + +GL A Q Q+ A Y+ + + FH +C L+ K				
Query 120	LAEAESGLFLAQELIADKPEFKELSTRVSSMLEAIKLLKKE	159			
Sbjct 121	L E EL+ ++L + S L+AI+ KE				
Query 120	LAEAESGLFLAQELIADKPEFKELSTRVSSMLEAIKLLKKE	159			
Sbjct 121	LKAKECF-----ELVIQHSNDEKLIKAKQSYLDIAIQDIKE	155			

PcrH und SicA:

Range 1: 20 to 151 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	60.8 bits(146)	6e-17	Compositional matrix adjust.	39/136(29%)	66/136(48%)	4/136(2%)
Query	19	LRDGGTLAMLRLGSLSEDTLEQLYALGFNQYQAGKWDDAQKIFQALCMLDHYDARYFLGLGA				78
		+ +G TL + G+ +D ++ LYA + Y G+ D+A+ F+ LC+ D Y+ Y +GL A				
Sbjct	20	VSEGATLKDVHGIPQDMMDGLYAHAYEFYNGRLDEAETFFRFLCIYDFYNPDYTMGLAA				79
Query	79	CRQSLGLYEQALQSYSYGALMDINEPRFPFHAAECHLQLGDLGDAESGFYSARALAAAQP				138
		Q +++A Y+ + N+ R F +C L + A F L +				
Sbjct	80	VCQLKKQFQKACDLYAVAFLLKNDYRPVFFTGQCQLLMRKAARQCF----ELVNERT				135
Query	139	AHEALAAARAGAMLEAV	154			
		E+L A+A LEA+				
Sbjct	136	EDESLRAKALVYLEAL	151			

PcrH und SscA:

Range 1: 16 to 156 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	60.1 bits(144)	1e-16	Compositional matrix adjust.	41/143(29%)	69/143(48%)	5/143(3%)
Query	18	FLRDGGTLAMLRLGSLSEDT---LEQLYALGFNQYQAGKWDDAQKIFQALCMLDHYDARYFL				74
		F R GG+L ML L +D L LY + ++ A ++FQ L + D + Y+				
Sbjct	16	FFRRGGSLRML--LDDVDTQPLNTLYRYATQLMEVKEFAGAARLFQLLLTIYDAWSFDYWF				73
Query	75	GLGACRQSLGLYEQALQSYSYGALMDINEPRFPFHAAECHLQLGDLGDAESGFYSARALA				134
		LG C Q+ + +A+ +Y A + I+ P+ P+ AAEC+L ++ A + +				
Sbjct	74	RLGECQAQKHGWEAIYAYGRAAQIKIDAPQAPWAAAECYLACDNVCYAIAKALKAVVRIC				133
Query	135	AAQPAHEALAAARAGAMLEAVTAR	157			
		H+ L RA ML+ ++ R				
Sbjct	134	GEVSEHQILRQRAEKMLQQLSDR	156			

PcrH und SpgC:

Range 1: 19 to 155 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	61.6 bits(148)	2e-17	Compositional matrix adjust.	36/141(26%)	67/141(47%)	4/141(2%)
Query	19	LRDGGTLAMLRLGSLSEDTLEQLYALGFNQYQAGKWDDAQKIFQALCMLDHYDARYFLGLGA				78
		+ G TL + + +D ++ +Y+ ++ Y G+ ++A+ F+ LC+ D Y+ Y +GL A				
Sbjct	19	INSGATLKDINAIPTDMMDDIYSAYDFYNGRIIEAEVFFRFLCIYDFYNVDYIMGLAA				78
Query	79	CRQSLGLYEQALQSYSYGALMDINEPRFPFHAAECHLQLGDLGDAESGFYSARALAAAQP				138
		Q ++QA Y+ + N+ FH +C L+L A+ F L				
Sbjct	79	IYQIKEQFQQAADLYAVAFALGKNDYTPVFTGQCQLRLKAPLKAKECF----ELVIQHS				134
Query	139	AHEALAAARAGAMLEAVTARKD	159			
		E L +A + L+A+ K+				
Sbjct	135	NDEKLIKAKQSYLDIAIQDIKE	155			

SicA und SscA:

Range 1: 35 to 153 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
--	-------	--------	--------	------------	-----------	------

33.1 bits(74) 5e-07 Compositional matrix adjust. 29/119(24%) 50/119(42%) 4/119(3%)

```

Query 37 MDGLYAHAYEFYFNQGRLEAETFFRFLCIYDFYNPDYTMGLAAVCQLKKQFQKACDLYAV 96
++ LY +A + A F+ L IYD ++ DY L CQ +K + +A Y
Sbjct 35 LNTLYRYATQLMEVKEFAGAARLFQLLLTIYDAWSFDYWFRLGECCQAQKHWGEAIYAYGR 94

Query 97 AFTLLKNDYRPFVFFTGQCQLLMRKAARQCFELV----NERTEDSLRAKALVYLEAL 151
A + + + + +C L A + + V E +E + LR +A L+ L
Sbjct 95 AAQIKIDAPQAPWAAAECYLACDNVCAIKALKAVVTRICGEVSEHQILRQRAEKMLQQL 153

```

SicA und SpgC:

Range 1: 4 to 151 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
198 bits(504)	1e-69	Compositional matrix adjust.	89/148(60%)	119/148(80%)	1/148(0%)
Query 6		NVSE-ERVAEMIWDVAVSEGATLKDVGIPQDMMDGLYAHAYEFYFNQGRLEAETFFRFLC	64		
		N++E E ++ + DA++ GATLKD++ IP DMD +Y++AY+FYN+GR++EAE FFRFLC			
Sbjct 4		NITENESISTAVIDAINSGATLKDINAIPDDMMDDIYSYAYDFYNGRIEEAEVFFRFLC	63		
Query 65		IYDFYNPDYTMGLAAVCQLKKQFQKACDLYAVAFSTLLKNDYRPFVFFTGQCQLLMRKAACA	124		
		IYDFYN DY MGLAA+ Q+K+QFQ+A DLYAVAF L KNDY PVF TGQCQL ++ KA			
Sbjct 64		IYDFYNVDYIMGLAAIYQIKEQFQQAADLYAVAFALGKNDYTPVFHTGQCQLRLKAPLKA	123		
Query 125		RQCFELVNERTEDSLRAKALVYLEALK	152		
		++CFELV + + DE L+ KA YL+A++			
Sbjct 124		KECFELVIQHSNDEKLKIKAQSYLDAIQ	151		

SscA und SpgC:

Range 1: 20 to 127 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
29.6 bits(65)	7e-06	Compositional matrix adjust.	27/111(24%)	45/111(40%)	18/111(16%)
Query 18		RRGSLRML--LDDDVTQPLNLTLYRYATQLMEVKEFAGAARLFQLLLTIYDAWSFDYWFRL	75		
		G +L+ + + DD+ ++ +Y YA A F+ L IYD ++ DY L			
Sbjct 20		NSGATLKDINAIPDDM---MDDIYSYAYDFYNGRIEEAEVFFRFLCIYDFYNVDYIMGL	76		
Query 76		GECCQAQKHWGEA--IYAYGRAAQIKIDAP-----QAPWAAAECY	113		
		Q ++ + +A +YA A P +AP A EC+			
Sbjct 77		AAIYQIKEQFQQAADLYAVAFALGKNDYTPVFHTGQCQLRLKAPLKAKECF	127		

Secretion in Heterologous Secretion System

Putative substrates for TTS	CT/Cya chimera	Secretion in <i>ipaB</i>	Secretion in <i>mxiD</i>	TTS
CPn0808	CT579	+	-	+
CPn0809	CT578	+	-	+
CPn1019	CT860	+	-	+
CPn1020	CT861	+	-	+
CPn1022	CT863	+	-	+

Subtil et al. 2005

Secretion-Prediction by Prediction With effector.org

Settings:

Eukaryotic-like domain identification with minscore = 4.0

Type III Effector prediction with animal set and Cutoff = 0.9999

SignalP settings for bacterial type: gram-

Protein name	Description	is Sec secreted (NN/HMM scores)		is T3 secreted (EffectiveT3 score)		Euk. domains	
Cpn0809			0	0	+	1	
Cpn0808			0	0	+	1	
Cpn1022			0	0	+	1	
Cpn1020			0	0	+	0.99998	
Cpn1019			0	0		0.99931	
Cpn0810			0	0		0.00001	

← just 0,00059 points off cutoff, maybe also secreted ?

Prediction-Result

Settings:

Eukaryotic-like domain identification with minscore = 4.0

Type III Effector prediction with animal set and Cutoff = 0.9999

SignalP settings for bacterial type: gram-

Protein name	Description	is Sec secreted (NN/HMM scores)		is T3 secreted (EffectiveT3 score)		Euk. domains	
lcrH1			0	0	+	1	PF07720
lcrH2			0	0		0.00002	PF07720

Alle Sequenzen aus PubMed bzw. von eigener Sequenzierung des *C. pneumoniae* GiD

CPn0808:

MTSGVSGSSSQDPTLAAQLAQSSQKAGNAQSGHDTKNVTKQGAQAEVAAGGFEDLIQDASAQSTGKKEATSSTTK
SSKGEKSEKSGKSKSSTSVASASETATAQAVQGPGLRQNNYDSPSLPTPEAQTINGIVLKKGMGT LALLGLVMT
LMANAAGESWKASFQSQNQAIRSQVESAPAI GEAIKRQANHQASATEAQAKQSLISGIVNIVGFTVSVGAGIFSA
AKGATSALKSASFAKETGASAAGGAASKALTSASSSVQQTMASTAKAATTAASSAGSAATKAAAANLTDMAAAAAS
KMASDGASKASGGLFGEVLNKPNSWSEKVS SRGMNVVKTOGARVASFAGNALSSSMQMSQLMHGLTAAVEGLSAGQT
GIEVAHHQRLAGQAEAQAEVLKQMS SVYGOQAGQAGQLQEAMQSFNTALQTLQNIADSQTTSAIFN

CPn0809:

MSISSSSGPDNQKNIMSQVLTSTPQGVPPQDKLSGNETKQIQQTRQGKNTMESDATIAGASGKDKTSSTTKTET
APQQGVAAGKESSESQKAGADTGVSGAAATTASNTATKIAMQTSIEEASKSMESTLESLSLAAQMKEVEAVVV
AALSGKSSGSAKLETPELPGVTPRSEVIEIGLALAKAIQTLGEATKSALSNYASTQAQADQTNKLGLEKQAIK
IDKEREYYQEMKAAEQKSKDLEGMTDVTNVMIAVSVAITVIVSIVAAIFTCGAGLAGLAAGAAVAAAAGGAAGA
AAATTVATQITVQAVVQAVKQAVITAVRQAITAAIKA AVKSGIKAFIKTLVKAIKAIKSKGISKVFAKGTQMIK
NFPKLSKVISSSLTSKWVTVG VGVVVAAPALGKGIMQMLSEMQQNVAQFQKEVGLQAAAADMI SMFTQFWQQASK
IASKQTESNEMTQKATKLGAQILKAYAAISGAIAGAA

CPn1019:

MTVSYQSI STPPPGEFDFIVDGNATEEAVVAAEVQVALPAGEQYAMLRATSELCFGILTQSECALTO
ALPPKEKPLQEEQFLVKNIGILMRSTSLPNLKPQSQQTSLASHRNPLAQOSTSSNSTGKASTETTSSS
FPPFSCKAPEGDSSVDKFTTVSVQTPKAQEQQEASASQSQAQFHVRSYSSSTIKEHSAKEKVSQSTKS
AETQKHTQTKSDATLSPMSLYSTLHKEVPQALSSTKSQOKDEEHRDQRQQEGYEQQEQEQEGKKKTPW
CTVESLQQTSSSNQVYESYTP IIPDPIVEFALSQSLSVLGKRVTNLDVLRICTELMKMLKSRAND
TMTRLEERELMEREAEHLAASYSRQAKYARWLG IATATLGI LGAIAPMVGEISGDSILGFVQRI SGRF
KDATAKTFFKGIGKVF TSLSQLTEAASKVHELSESAVRVAEYRKEVFRMRQDEVTRTIEEVKDNWKS
MDNFLNLIQTEHDAARSLYQ

CPn1020:

MSSWLSQASEVLLNQDPYIPDAPRSQESSVPKISYSITVAPQEAQKSLPKFFFTQKFQSQCKSEPPITH
HKTFI IATPRERILRFSSSFESQLHNTSQAQTSSPWNLF SQKNSTEASKALMQELTMPKSPEKTSEKA
LDKNLSSKQEGSCKNFDTLHLQOHLKLF GTVDSLYSQSLDSEQQELLSRREERSETYANQQSSEKKI
ETKVQIKDLCKDLFSQDQDSNQKQKSPFQODTSRKNRIAKAAQAVPVIPPPSIGVFTLSYLLTKQGI
LSDFSSYGCHKDSVESTQRELDALHEKRIETIKVSIEKEKRERLWGLSDIIGWLAPFVSI GIGIVAI
LSGGGIFAFAGFFAGLISLVIKCLEKLFWDWLEKHLPIKNEELRRIITIIQWVVYLTVPVILSICTL
KVENLGFSP IIEGAIKGIQPAIESTMAALRCAILFSQAEIYKLGKLTKIQLDIELKSFDRDDHYERS
QELLDNMESSFEALSRI LNYMRELDQVYLHSLRG

CT_578:

MSLSSSSSSDSSNLKNVLSQVIASSTPQGVPNADKLTDNQVKVQVQQTRQNRDDL SMESDVAVAGTAGKDRA
ASASQIEGQELIEQQGLAAGKETASADATSLTQSASKGASSQQCIEDTSKSLELSSLSLSSVDATHLQE
IQSIVSSAMGATNELSLTNLETPGLPKPSTTPRQEVMEISLALAKAITALGESTQAALENFQSTQSQSAN
MNKMSLESQGLKIDKEREFFKKMQEIQQKSGTNSTMDTVNKVMIGVTVAITVIVSVVSALFTCGLGLIGTA
AAGATAAAAAGATAAATTATS VATTVATQVTMQAVVQVVKQAI IQAVKQAI VQAIKQGIKQGIKQAIKQAV

KAAVKTLAKNVGKIFSAGKNAVSKSFPKLSKVINTLGSKWVTLGVGALTAVPQLVSGITSLQLSDMQKEL
AQIQKEVGALTAQSEMMKAFTLFWQQASKIAAKQTESPSETQQQAQAKTGAQIAKALSAISGALAAAA

CT_579:

MTTGVRGDNAPDP SLLAQLTQNANSASAASTGKNGQVAGAKQENVDASFEDLLQDAQGTGGSKKATANQT
SKSGKSEKAQASSGTSTTTT SVAQASQTATAQAVHGARDSGFNSDGSATLP SPTGTEVNGVVLKGMGTLA
LMGLIMTLLAQASAKSWSSSFQQQNQAIQONQVAMAPEIGNAIRTQANHQAQATELQAQQSLISGITNIVG
FAVSVGGGILSASKSLGGLKSAFTNETASATTSATSSLAKTATSALDDVAGTATAVGA KATSGAASAAS
SAATKLTQNMAESASKTLSQTASKSAGGLFGQALNTPSWSEKVS RGMNVVKTQGTRAAKFAGRALSSAMN
ISQM VHGLTAGIDGIVGGVIGAQVAQE QRMAGMAEARAEELKSLNSVQAQYASQAQQQLQE QSQSFSNSAL
QTLQSI SDSALQTTASMFN

CT_861:

MSSWFAQATDVALSQTLDLPDASLAIQTEKFPYSCSISKESAPSCIQKIFAHLASQKESAPLSFSRLQPT
TPKERILFFGSSPSSQLSSTVRTTTSSPWNLFNSQTRNSTRKLSEKLFHFSSELSARDSTKPSSEPIKP
SENLLHTPEHHKELFSSLKKNLSPIMEEIDSFS AETESLEERLVTQKKEETVAQE QKHP LLRTSTPPSK
ASGESQDSSEHSSKEDPHSQQP SHKIQRKERAKRVVPIIIPPTVGFISLSYLLTKQGI LADFSAYSAYK
DNLETTQQELTMLHQERIEQVQKIVDKSKTTRFWDSLASIVATIIPWIEMGVAVTI IALGGGILSWCSLF
AALIMIVLSLLEAFD GWRAIAKHLPGNDLEKKMRYLGYVKLALTVFSCLLSLSALYVAKLGMSP LLEGVV
KSIAPALSGMLGLTQGVALYLQSSSQKIRACCTQIDARIELINWERDEYFLRAEQLLDSMQTSFEQLTET
LQLQREIDQTF TDALR

CT_860:

MTITVPQETPLSLQTIATGEQVETSCEEASALSNEIQLLEPGQAAILRSLSDLCLSVIEQTEKTLPHSKH
SPSFRESCPLKYL SQQTSASSRTQESATAEQQLTPTPTPQKTPQT LHNKPS TPI SHKSFVQGRVQTSP
QHSTPLRSIPV IISLPNTQQALTDREPIQNSNCNPTLSVTIFNKENSSSSKKDSSASKEQSSSHSSSLQK
NLSSPRAALLSPMALFETTAQKETLAREGLLHEREDLSQEGDRDHHQSDQQQEEKEDLAISASF LSHSKK
RREHHFDPEYLP EEIREFALSEAQLSLLHIRLNHL DILRICA EIMKMLNSREQDLLERRSTRTHFMQE
AKKIADSF AKQARITKWLGIATATLGIFGGISPIIGELGGEGLLN VIRKATGGWQQASSKTF FEGMGKVC
SSLSELAKVSSTVYDLRANAVRTIAESYKELFRLEHDEMLRSIEELKDHWRNMDSFL LQIILQTHDAVRS
LYQ

YopB:

MSALITHDRSTPVTGSLLPYVETPAPAPLQTTQQVAGELKDKNGGVSSQGVQLPAPLAVVASQVTEGQQQE
ITKLLSVTRGTAGSQLISNYVSVLTNFTLASPDTFEIELGKLVSNLEEVKDKIKIADIQRLHEQNMKKI
EENQEKIKETEENAKQVKKSGMASKIFGWLSAIASVVIGAIMVASGVGAVAGAMMIASGVIGMANMAVKQ
AAEDGLISQEQVLGPIILTAIEVALTVVSTVMTFGGSALKCLADIGAKLGANTASLAAKGAEFS AKVAQ
ISTGISNTVGNVTKLGGSFGLTMSHVIRTGSQATQVAVGVGSGITQT INNKKQADLQHNNADLALNKA
DMAALQSIIDRLKEELSHLSESHQQVMELIFQMINAKGDMLHNLAGRPHTV

YopD:

MTINIKTDSPIIT TGSQIDAIT TETVQSGEVKKTEDTRHEAQAIKSSEASLSRSQVPELIKPSQGINVA
LLSKSQGDLNGTLSILLLLLLELARKAREMGLQQRDIENKAAITAQKEQVAEMVSGAKLMIAMAVVSGIMA
ATSTVASAFSIAKEVKIVKQEQILNSNIAGR DQLIDTKMQMSNTSDKAVSREDIGRIWKPEQVADQNKL
ALLDKEFRMTDSKANAFNAATQPLGQMANS AIQVHQGYSQAEVKEKEVNASIAANEKQKAEEMNYDNF
MKDVLRLIEQYVSSHTHAMKAAFVGV

PopB:

MNPITLERAGLPYGVADAGDIPALGRPVARDVESLRVERLAAPAAASASGTGVALTPP SAASQQORLEVAN
RAEIASLVQAVGEDVGLARQVVLGASTLLSAGLMSPQAFEIELAKITGEVENQQKKLKLTEIEQARKQN
LQKMEDNQKIRESEEAKEAQKSGLAAKIFGWI SAIAS IIVGAIMVATGVGAAAGALMIAGGVMGVVSO
SVQQAADGLISKEVMEKLG PALMGIEMAVALLA AVVSFGGS AVGGLARLGAK IGGKAAEMTASLASKVA
DLGGKFGSLAGQSLSHSLKLG VQVSDLTLDVANGAAQATHSGFQAKAANRQADVQESRADLTTLQGVIER
LKEELSRMLEAFQEIMERIFAMLQAKGETLHNLSSRPAAI

PopD:

MIDTQYSLAATQAAIPSEPIAPGAAGRSVGTQAAAADLPQVPAARADRVELNAPRQVLDPVRMEAAAGSEL
DSSVELLLLILFRIAQKARELGVLRDNNENQSI IHAQKAQVDEMRS GATLMIAMAVIAGV GALASAVVGS
LALKNGKAI S QEKT LQKNIDGRNELIDAKMQALGKTSDEDRKIVGKVWAADQVQDSVALRAAGRAFESRN
GALQVANTVIQSFVQMANASVQVRQGESQASAREGEVNATIGQSQKQKVEDQMSFDAGFMKDVLLIQQY
TQSHNQAWRAAGVV

SipB:

MVNDASSISRSYGTQNPRLAEAAFEQVVRKNTDFLKAADKAFKDVVATKAGDLKAGTKSGESAINTVGLKP
PTDAAREKLSSEGLTLLGLKMLTLLGDVLSLSQLESRLAVWQAMIESQKEMGIQVSKEFQTALGEAQEAT
DLYEASIKKTD TAKSVYDAATKKL TQAQNKLSLDPADPGYAQAEAAVEQAGKEATEAKEALDKATDATV
KAGTDAKAKAEKADN I LTKFQGTANAASQNVQSQGEQDNLSNVARLTMLMAMFIEIVGKNTEESLQNDLA
LFNALQEGRQAE MEKKS AEFQEETRKA EETNRIMGCIGKVLGALLTIVSVVAAVFTGGASLALAAVGLAV
MVADEIVKAATGVSF IQQALNP IMEHVLKPLMELIGKAITKALEGLGVDKKTAE MAGSIVGAI VAAIAMV
AVIVVAVVVGKAAAKLGNALSKMMGETIKKLVNVLKQLAQNGSKLFTQGMQRITSGLGNVSGSKMGLQT
NALSKELVGNTLNKVALGMEVTNTAAQSAGGVAEGVF IKNASEALADFM LARFAMDQIQQWLKQSVEIFG
ENQKVTAELQKAMSSAVQQNADASRFILRQSR

SipC:

MLISNVGINPAAYLNNHNSVENSSQTASQSVSAKDI LNSIGISSKVSDDLGLSPTLSAPAPGVLTQTPGTI
TSFLKASI QNTDMNQDLNALANNVTTKANEVVQTQLREQQAEVKGFFDISGMSSSAVALLAAANTLMLTL
NQADSKLSGKLSLVSFDAAKTTASMMREGMNALSGSISQSALQLGITGVGAKLEYKGLQNERGALKHNA
AKIDKLTTESHSIKNVLNGQNSVKLGAEGVDLSKLSLNMKKTGTDATKNLNDATLKSNA GTSATESLGIKD
SNKQISPEHQAILSKRLESVESDIRLEQNTMDMTRIDARKMQMTGDLIMKNSVTVGGIAGASGQYAAATQE
RSEQQISQVNNRVASTASDEARESSRKSTSLIQEMLKTMESINQSKASALAAIAGNIRA

SseC:

MNRIHSNSDSAAGVTAL THHHL SNVSCVSSGSLGKRQHRVNSTFGDGNAAACLLSGKISLQEASNALKQLL
DAVPGNHKRPSLPDFLQTNPAVLSMMMTSLILNVFGNNAQSLCQQLERATEVQNALRNKQVKEYQEIQK
AIEQEDKARKAGIFG AIFDWITGIFETVIGALKVVEGFLSGNPAEMASGVAYMAAGCAGMVKAGAE TAMM
CGADHDTCQAIIDVTSKI QFGCEAVALALDVFI GRAFMATRGLSGAAAKVLD SGFGEEVVERMVGAGEA
EIEELA EKFGEEVSEFSKQFEPLEREMAMANEMAEAAEF SRNVENNMTRSAGKSFTKEGVKAMAKEAA
KEALEKCVQEGGKFLKFRNKVLFNMFKKILYALLRDCSFKGLQAIRCATEGASQMNTGMVNTEKAKIE
KKIEQLITQQRFLDFIMQQTENQKKIEQKRLEELYKGS GAALRDVLDTIDHYSSVQARIAGYRA

SseD:

MEASNVALVLPAPSLLTSPSTPSPSGEGMGTESMLLLFDDIWMKLMELAKKLRDIMRSYNVEKQRLAWEL
QVNVLTQTMKTIDEAFRSMITAGGAMLSGVLTI GLGAVGGETGLIAGQAVGHTAGGVMGLGAGVAQRQS
DQDKAIADLQONGAQSYNKS LTEIMEKATEIMQOIIIGVSSSLVTVLAEILRALTR

EspB:

MNTIDNNAIAIVNSVLSSTTDSTSTTTSTSSISSSLLTDGRVDISKLLLEVQKLLREMVTTLQDYLOK
QLAQSIDIQKAVFESQNKAIIDEKKAGATAALIGGAISSVLGILGSFAAINSATKGASDVAQQAASTSAKS
IGTVSEASTKALAKASEGIADAADDAAGAMQQT IATAAKAASRTSGITDDVATSAQKASQVAEEAADAQ
ELAQKAGLLSRFTAAAGRISGSTPFI VVTS LAEGTKLPTTISESVKSNH DINEQRAKSVENLQASNLDT
YKQDVRRAQDDISSRLRDMTTTTARDLTDLINRMGQAARLAG

EspD:

MLNVNNDIQSVRSGASAAATATSGINQSEVTSALDLQLVKSTAPSASWTESTALPTPPAGHSLVTPSAAED
VLSKLFGGISGEVTSRTEGTEPQRSTQNASSGYPYLSQVNNVDPQAMMMATLLSLDASAQRVASMKNSN
EIIYADGQNKALDNKTLFQKQLEEQKAEKAKQKSKIVGQVFGWLGVAATAIAAIFNPALWAVVAISATA
MALQTAVDVMGDDAPQALKTAAQAFGGLSLAAGILTAGIGGVSSLSKVGDVANKVGSNIVKVVTTLADT
FVDNVASKISAVANGLTSSRSIGTTVLNNDAAAYNVLSQVSAFAVENLTRQSEYLSQSAKAELEKATLE
LQNQANYIQSASQLMSDSARVNI RIVSGRV

IpaB:

MHNVSTTTTGFPLAKILTSTELGDNTIQAANDAANKLFSLTIADLTANQNINTTNAHSTSNILIPELKAP
KSLNASSQLTLLIGNLIQILGEKSLTALTNKITAWKSQQQARQQKNLEFSDKINTLLSETEGLTRDYEQ
INKLKNADSKIKDLENKINQIQTRLSELDPESEPKKLSREEIQLTIKKDAAVKDRTLIEQKTL SIHSL
TDKSMQLEKEIDSFSAFSNTASAEQLSTQOKSLTGLASVTQLMATFIQLVGKNNEESLKNDLALFQSLQE
SRKTEMERKSDEYAAEVRKAEELNRVMGCVGKILGALLTIVSVVAAAFSGGASLALAAVGLALMVTDAIV
QAATGNSFM EQALNPIMKAVIEPLIKLLSDAFTKMLEGLGVD SKKAKMIGSILGAIAGALVLVAAVVLVA
TVGKQAAAKLAENIGKII GKTLLD LIPKFLKNFSSQLDDLI TNAVARNKFLGAAGDEVI SKQIISTHLN
QAVLLGESVNSATQAGGSVASAVFQNSASTNLADLTL SKYQVEQLSKYI SEAI EKFGQLQEV IADLLASM
SNSQANRTDVAKAILQOTTA

IpaC:

MLQKQFCNKLLLD TNKENVMEIQNTKPTQTLYTDISTKQTQSSSETQKSQNYQQIAAHIPLNVGKNPVL
TTLNDDQLLKLSEQVQHDSEIIARLTDKMKDLSEMSHTLTPENTLDISSLSSNAVSLIISVAVLLSALR
TAETKLSQLSLIAFDATKSAENIVRQGLAALSSITGAVTQVGTGIGAKKTHSGISDQK GALRKNLA
TAQSLEKELAGSKLGLNKQIDTNI TSPQTNSSTKFLGKNKLAPDNISLSTEHKTSLSSPDISLQDKIDTQ
RRTYELNTLSAQQKQNI GRATMETS AVAGNISTSGGRYASALEEEEEQLISQASSKQAEESQVSKEASQA
TNQLIQKLLNIIDSINQSKNSAASQIAGNIRA

Alle Sequenzen aus PubMed bzw. von eigener Sequenzierung des *C. pneumoniae* GiD

CPn0808:

MTSGVSGSSSQDPTLAAQLAQSSQKAGNAQSGHDTKNVTKQGAQAEVAAGGFEDLIQDASAQSTGKKEATSSTTK
SSKGEKSEKSGKSKSSTSVASASETATAQAVQGPKGLRQNNYDSPSLPTPEAQTINGIVLKKGMGTLALLGLVMT
LMANAAGESWKASFQSQNQAIRSQVESAPAIGEAIKRQANHQASATEAQAKQSLISGIVNIVGFTVSVGAGIFSA
AKGATSALKSASFAKETGASAAGGAASKALTSASSSVQQTMASTAKAATTAASSAGSAATKAAAANLTDMAAAA
KMASDGASKASGGLFGEVLNKPNSWSEKVSRRGMNVVKTQGARVASFAGNALSSSMQMSQLMHGLTAAVEGLSAGQT
GIEVAHHQRLAGQAEAQAQAEVLKQMSVYGOQAGQAGQLQEAMQSFNTALQTLQNIADSQTTSAIFN

CPn0809:

MSISSSSGPDNQKNIMSQVLTSTPQGVPPQDKLSGNETKQIQQTRQGKNTMESDATIAGASGKDKTSSTTKTET
APQQGVAAGKESSESQKAGADTGVSGAAATTASNTATKIAMQTSIEEASKSMESTLESLSLAAQMKEVEAVVV
AALSGKSSGSAKLETPELPGVTPRSEVIEIIGLALAKAIQTLGEATKSALSNYASTQAQADQTNKLGLEKQAIK
IDKEREYYQEMKAAEQKSKDLEGTMDTVNTVMIAVSVAITVISIVAAIFTGAGLAGLAAGAAVAAAAGGAAGA
AAATTVATQITVQAVVQAVKQAVITAVRQAITAAIKAAVKSGIKAFIKTLVKAIKAIKSKGISKVFAKGTQMIK
NFPKLSKVISLTSKWVTVGVGVVVAAPALGKGIMQMLSEMQQNVAQFQKEVQKGLQAAADMISMFQFWQQASK
IASKQGTGESNEMTQKATKLGAIKAYAAISGAIAGAA

CPn0810:

MNKKPKKTKKAVQSKAAPVKRVPEESQEAAIQQLELAVSDLYKELPLAQTFASLTDKNQINSIIAALSGLTLESLH
LEELTQGLFQSAQEDANFAKELSSVVHGLKLNLTVVNKQMVKGAE

CPn0811 (LcrH_1):

MSKPSRPNANQPQKPSASFNKKTRSRLAELAAQKKAKADDLEQVHPVPTEEEIKKALGNIFEGLSNGLDLQQIILG
LSDYLLEEIYTVAYTFYSQKGYNEAVGLFQLLAAAQPNYKMYLGLSSCYHQLHLYNEAAFQFFLAFDAQPDNP I
PPYYIADSLKLLQPEESNNFLDVTMDICGNNPEFKILKERCQIMKQSIKQMQAGETKKAPTKKPKAGSKTTTNK
KSGKKR

CPn1019:

MTVSYQSI STPPPGEFDFDIFVDGNATEEAVVAAEVQVALPAGEQYAMLRATSELFCGILTQSECALTQ
ALPPKEKPLQEEQFLVKNIGILMRSTSLPNLKPQSQQTSLASHRNPLAQQSTSSNSTGKASTETTSSS
FPPFFSCKAPEGDSSVDKFTFTVSVQTPKAQEQQEASASQSQAQFHVRSYSSSTIKEHSAKEKVSQSTKS
AETQKHTQTKSDATLSPMSLYSTLHKEVPQALSSTKSQQKDEEHRDQRQQEGYEQEQEQEKGKKTPW
CTVESLQQTSSSNQVYESYTP IIPDPIVEFALSQSLSVLGKRVTNLDVLRICTELMKMLKSRAND
TMTRLEERELMEREAEHLAASYSRQAKYARWLG IATATLGI LGAIAPMVGEISGDSILGFVQRI SGRF
KDATAKTFFKGIGKVF TSLSQLTEAASKVHELSESAVRVAEYRKEVFRMRQDEVTRTIEEVKDNWKS
MDNFLNINILQTEHDAARSLYQ

CPn1020:

MSSWLSQASEVLLNQDPYIPDAPRSQESSVPKISYSITVAPQEAQKSLPKFFFTQKFQSQCKSEPPITH
HKTF I IATPRERILRFGSSSFESQLHNTSQAQTSSPWNLFSQKNSTEASKALMQELTMPKSPEKTSEKA
LDKNLSSKQEGSCKNFDTLHLQOHLKLFGTVDLSYQSLDSEQQELLSRREERSETYANQQSSEKKI
ETKVQIKDLCKDLFSQDQDSNQKQKSPFQODTSRKNRIAKAAQAVPVIPPPSIGVFTLSYLLTKQGI

LSDFSSYGCHKDSVESTQRELDALHEKRIETIKVSIEKEKRERLWGSLSDIIGWLAPFVSIIGIVAI
LSGGGIFAFAGFFAGLISLVIKCLEKLFWDWLEKHLPIKNEELRRKIITI IQWVVYLTPVILSICTL
KVENLGFSPIIIEGAIKGIQPAIESTMAALRCAILFSQAEIYKLGKLTQIQLDIELKSFDRDDHYERS
QELLDNMESSFEALSRIILNYMRELDQVYLHSLRG

CPn1021 (LcrH_2):

MSHLNYLLEKIAAASSKEDFFPPDDLESYLEGYVPDKNIALDITYQKIFKISSLEKVVYKEGYHAYLDK
DYAKSITVFRWL VFFNPFVSKFWFSLGASLHMSEQYSQALHAYGVTAVLRDKDPYPHYAYICYTLTN
EHEEA EKALEMAWVRAQH KPLYNELKEEILD IRKHK

CPn1022:

MNMPVPSAVPSANITLKEDSSTVSTASGILKTATGEVLVSC TALEGSSSTDALISLALGQIILATQQE
LLLQSTNVHQLLFLPPEVVELEIQVVDLLVQLEHAETITSEPQETQTQSRSEQTLPOQSSSKQSALSP
RSLKPEISDSKQQQALQTPKDSAVRKHSEAPSPETQARASLSQASSSSQ RSLPPQESAPERTLLEQQK
ASSFSPLSQFSAEKQKEALTTSKSHELYKERDQDRQQREQHDKHDQEEDAESKKKKKKRGLGVEAVA
EEPGENLDIAALIFSDQMRPPAEETS KKETTFKKKLPSPMSVFSRFIPSKNPLSVGSSIHGPIQTPKV
ENVFLRFMKLMARILGQAEAEANELYMRVKQRTDDVDTLTVLISKINNEK KDIDWSENEEMKALLNRA
KEIGVTIDKEKYTWTEEEKRLLKENVQMRKENMEKITQ MERTDMQRHLQEISQCHQARSNVL KLLKEL
MDTFIYNLRP

C. trachomatis

CT_576 (LcrH_1):

MSTPSSNNSKKPSASFNKKSRSLAEIAAQKKAKAEDLEQKYPVPTEEETKQVLM DILQGLSNGLTLQQI
LGLSDVLLLEEIYTVAYTFYSQGYQEAIGLFQILTASPKQCYKYLGLSSCYHQLKMYDEAAFGFFLAFD
AQPENPIPPYYIADSLMKLNQPEESQDFLDITIDMCKNKPEYKVLKDRCSIMKQSLDAVLKKEKSAKGSE
TQASSPKNTKAKKAASNKKKAK

CT_577:

MSKKHKHKQAHTSSKPKVEPAYVSKKESPALQELQNAMISFSQDLPLAQMFSEIQDEKQLAKMMAALSGM
LDSL PVETLTKGVFDNPKKEEAQLSQEISSIFLGLKHLTETV NKHIADEK

CT_578:

MSLSSSSSSDSSNLKNVLSQVIAS TPQGVPNADKLT DNQVKVQVQOTRQNRDDL SMESDVAVAGTAGKDRA
ASASQIEGQELIEQQGLAAGKETASADATSLTQSASKGASSQOCIEDT SKSLELSSLSLSSVDATHLQE
IQSIVSSAMGATNELSLTNLETPGLPKPSTTPRQEVMEISLALAKAITALGESTQAALENFQSTQSOSAN
MNKMSLESQGLKIDKEREFEFKMQEIQQKSGTNTMDTVNKVMIGVTVAITVISVVSALFTCGLGLIGTA
AAGATAAAAAGATAAATTATS VATTVATQVTMQAVVQVVKQAI IQAVKQAI VQAIKQGIKQAIKQAV
KAAVKTLAKNVGKIFSAGKNAVSKSFPKLSKVINTLGSKWVTLG VGALTAVPQLVSGITSLQLSDMQKEL
AQIQKEVGALTAQSEMMKAFTLFWQQASKIAAKQTESPSETQQQAAKTGAQIAKALSAISGALAAAA

CT_579:

MTTGVRGDNAPDPSELLAQLTQNANSASAASSTGKNGQVAGAKQENVVDASFEDLLQDAQGTGGSKKATANQT
SKSGKSEKAQASSGTSTTTTVAQASQTATAQAVHGARDSGFNSDGSATLPSPTGTEVNGVVLKMGMTLA
LMGLIMTLLAQASAKSWSSSFQQQNQAIQNQVAMAPEIGNAIRTQANHQAQATELQAQQSLISGITNIVG
FAVSVGGGILSASKSLGGLKSAFTNETASATTSATSSSLAKTATSALDDVAGTATAVAGAKATSGAASAAS
SAATKLTQNMAESASKTLSQTASKSAGGLFGQALNTPSWSEKVS RGMNVVKTQGTRAAKFAGRALSSAMN
ISQMVHGLTAGIDGIVGGVIGAQVAQE QRMAGMAEARAEELKSLNSVQAQYASQAQQQLQEQSQSFSNSAL
QTLQSI SDSLQTTASMFN

CT_863:

MDTPTPLSSVPTNASLKGEPGSSSQFSSAEKGVKTSVGDVVLSQSIEDGGNETQISLVGVVNINMAQEE
LPTLVSPRTFIFLPPETVELEIQIAEMFQALEETPSSDSRSLQQKETSAPPPAPSGKVSIFSLQAQGS
QTRSLPSSQESLSPQQPARAIQGLNTPFSPAARCTIRAVPLSIVPHRRANPTSSQSVSHHSSRTYQTGHS
TGTAQLSSQEWEFSSQTVKTCSTGREKRDGQQRHSDQEQNSDHSYQEEEDLSDDMQVSSSKRSSHPEDEN
TEEVFVSVSHFAYHAAPHPSSNLDQESNQSTFQKRPPSPMSLFSQONATEEAPKEARVENVFLRFMRMAR
ILGQAEAEAEHELRLRVKERTDNVDALTLKSKINNEKGAIDWNQDEEMRALVDQAKKLGVPIGDSYDWE
EGKLLKENIQMRKENMEKITQLERTDMQRHLQEVVSQCHQARSNVLKLLKELMDTFIYNMRP

CT_862 (LcrH_2):

MPPSKIQCLETFRKTYGHLYLQHASLMRHLAYLLDKIARSYHHMCPDPDNMEAYFENYIPNKDIPLDTYQ
KIFKLSSEDLQVYKEGYNAYLQGDYEESSSTAFYWLIFFPNFVSKFWFSLGASLHMLQKYQQALHAYGVA
ALLREKDPYPHYAYICYTLLNNPEEA EKALDLAWQKVKTSSAYSSLKEEILAIKSYA

CT_861:

MSSWFAQATDVALSQTLDLPDASLAIQTEKFPYSCSISKESAPSCIQKIFAHLASQKESAPLSFSRLQPT
TPKERILFFGSSPSSQLSSTVTRTTTSSPWNLFNSQTRNSTRKLSKLFHFSSELSARDSTKPPSSSEPIKP
SENLLHTPEHHKELFSSLKKNLSPIMEEIDSFSAETESLEERLVTQKKEETVAQE QKHP LLRTSTPPSK
ASGQSSEHSSKEDPHSQQP SHKIQRKRAKRVVPIIPPTVGFIFSLSYLLTKQILADFSAYSAYK
DNLETTQQELTMLHQERIEQVQKIVDKSKTTRFWD SLASIVATIIPWIEMGVAVTIIALGGGILSWCSLF
AALIMIVLSLLEAFD GWRAIAKHLPGNDLEKKMRYLGYVKLALTVF SCLLSLSALYVAKLGMSP LLEGVV
KSIAPALSGMLGLTQGVALYLQSSSQKIRACCTQIDARIELINWERDEYFLRAEQLLDSMQTSFEQLTET
LQLQREIDQTFTDALR

CT_860:

MTITVPQETLPSLQTIATGEQVETSCEEASALSNEIQLLEPGQAAILRSLSDLCLSVIEQTEKTLPHSKH
SPSFRESCPLKYLSSQTSASSRTQESATAEQQLTPTPTPQKTPQTTLHNKPSPI SHKSFVQGRVQTSF
QHSTPLRSIPVIIISLPNTQQALTDREPIQNSNCNPTLSVTIFNKENSSSSKKDSSASKEQSSSHSSSLQK
NLSSPRAALLSPMALFETTAQKETLAREGLLHEREDLSQEGDRDHHQSDQQQEEKEDLAISASF LSHSKK
RREHHFDPEYLP EEIFEALSEAQLSLLHIRLNHLDILRICAEMKMLNSREQDLLERRSTRTHFMQE
AKKIADSFQARITKWLGIATATLGIFGGISPIIGELGGEGLLNVIRKATGGWQQASSKTFEFGMGKVC
SSLSELAKVSSTVYDLRANAVRTIAESYKELFRLEHDEMLRSIEELKDHWRNMSFLLQILQTHDAVRS
LYQ

Yersinia:

LcrV:

MIRAYEQNPQHFIEDLEKVRVEQLTGHGSSVLEELVQLVKDKKIDISIKYDPKDKSEVFAERVITDDIEL
LKKILAYFLPEDAILKGGHYDNQLQNGIKRVKEFLESSPNTQWELRAFMAVMHFSLTADRIDDDILKVIV
DSMNHGHDARSKLREELAE LTAELKIYSVIAEQAEINKYLSNSGTINIHDKSINLMDKNLYGYTDEEIFKAS
AEYKILEKMSQTTIKEGETEKKIVSIKNFLESENKRTGALGNLKNSSYNKDNNELSHFATACSDKSRPL
NDLVSQKTTQLSDITSRFN SAIEALNRFIQKYDSVMQRLLDDTR

SycD (Chaperon):

MQQETTDTQEYQLAMESFLKGGGTIAMLNEISSDTLEQLYSLAFNQYQSGKYEDAHKVFQALCVLDHYDS
RFFLGLGACRQAMGQYDLAIHSYSYGAIMDIKEPRFPFHAAECLLQKGEAEAEGLFLAQELIADKPEF
KELSTRVSSMLEAIKLLKEMEHECVDNP

YopB:

MSALITHDRSTPVTGSLLPYVETPAPAPLQTQQVAGELKDKNGGVSSQGVQLPAPLAVVASQVTEGQQQE
ITKLESVTRGTAGSQLISNYVSVLTNFTLASPDTFEIELGKLVSNLEEVKDIKIADIQRLHEQNMKKI
EENQEKIKETEENAKQVKKSGMASKIFGWLSAIASVVGAIMVASGVGAVAGAMMIASGVIGMANMAVKQ
AAEDGLISQEQAMQVLGPIILTAIEVALTVVSTVMTFSGSALKCLADIGAKLGANTASLAAKGAEFSAKVAQ
ISTGISNTVGNVAVTKLGGSFGLTMSHVIRTGSQATQVAVGVGSGITQTINNKKQADLQHNNADLALNKA
DMAALQSIIDRLKEELSHLSESHQVMELIFQMINAKGDMLHNLAGRPHTV

YopD:

MTINIKTDSPIITTGSQIDAITTETVQSGEVKKTEDTRHEAQAIKSSEASLSRSQVPELIKPSQGINVA
LLSKSQGDLNGTSLISLLLLLELARKAREMGLQORDIENKAAITAQKEQVAEMVSGAKLMIAMAVVSGIMA
ATSTVASAFSIAKEVKIVKQEQILNSNIAGRDQLIDTKMQQMSNTSDKAVSREDIGRIWKPEQVADQNKL
ALLDKEFRMTDSKANAFNAATQPLGQMANSIAIQVHQGYSQAEVKEKEVNASIAANEKQKAEEMNYDNF
MKDVLRLIEQYVSSHTHAMKAAFVGV

Pseudomonas:

PcrV:

MEVRNLNAARELFLDELLAASAAPASAEQEELLALLRSERIVLAHAGQPLSEAQVLKALAWLLAANPSAP
PGQGLEVLREVLQARRQPGAQWDLREFLVSAFYSLHGRLEDVIGVYKDVLTQDQGRKALLDELKALTA
ELKVYSVIQSQINAALSQKQIRIDAGGIDLVDPTLYGYAVGDPRWKDSPEYALLSNLDTFSGKLSIKDF
LSGSPKQSGELKGLSDEYPFKDNPNVGNFATTVSDRSRPLNDKVNKTTLLNDTSSRYNSAVEALNRFI
QKYDSVLRDILSAI

PcrH (Chaperon):

MNQPTPSDTDQQQALEAFRLRDGGTLAMLRLGSEDLEQLYALGFNQYQAGKWDDAQKIFQALCMLDHYDA
RYFLGLGACRQSLGLYEALQSYSGALMDINEPRFPFHAAECHLQLGDLGDGAESGFYSARALAAAQPAH
EALAARAGAMLEAVTARKDRAYESDNA

PopB:

MNPITLERAGLPYGVADAGDIPALGRPVARDVESLRVERLAAPAAASASGTGVALTPPSAASQQRLEVAN
RAEIASLVQAVGEDVGLARQVVLGASTLLSAGLMSPOAFEIELAKITGEVENQQKLLKLTEIEQARKQN
LQKMEDNQKIRESEEAKEAQKSGLAAKIFGWIISAIASIVGAIMVATGVGAAAGALMIAGGVMGVVSQ
SVQQAADGLISKEVMEKLGPALMGIEMAVALLAAVVSFGGSVAVGLARLGAKIGGKAAEMTASLASKVA
DLGGKFGSLAGQSLSHSLKLVQVSDLTLDVANGAAQATHSGFQAKAANRQADVQESRADLTTLQGVIER
LKEELSRMLEAFQEIMERIFAMLQAKGETLHNLSSRPAAI

PopD:

MIDTQYSLAATQAAIPSEPIAPGAAGRSVGTPOAAADLPQVPAARADRVELNAPRQVLDPVMEAGSEL

DSSVELLLLILFRIAQKARELGVLQRDNENQSI IHAQKAQVDEMRS GATLMIAMAVIAGVGALASAVVGS L
GALKNGKAISQEKTLQKNIDGRNELIDAKMQALGKTSDEDRKIVGKVWAADQVQDSVALRAAGRAFESRN
GALQVANTVIQS FVQMANASVQVRQGESQASAREGEVNATIGQS QKQKVEDQMSFDAGFMKDVLQLIQQY
TQSHNQAWRAAGVV

Salmonella SP-11:

SicA (Chaparon):

MDYQNNVSEERVAEMIWDVAVSEGATLKDVHGIPQDMMDGLYAHAYEFYNQGR LDEAETFFRFLCIYDFYN
PDYTMGLAAVCQLKKQFQKACDLYAVAF TLLKNDYRPVFFFTGQCQLLMRKA AKARQCFELVNERTEDESL
RAKALVYLEALKTAETE QHSEQEKE

SipB:

MVNDASSISRSGYTQNPRLAEAAFE GVRKNTDFLKAADKAFKDVVATKAGDLKAGTKSGESAIN TVGLKP
PTDAAREKLSSEGLTLLLGKLM TLLGDVLSQLESRLAVWQAMIESQKEMGIQVSKEFQTALGEAQEAT
DLYEASIKKTD TAKSVYDAATKKL TQAQNKLSLDPADPGYAQAEAAVEQAGKEATEAKEALDKATDATV
KAGTDAKAKAEKADNILT KFGQTANAASQNVQSQGEQDNLSNVARLTMLMAMFIEIVGKNTEESLQNDLA
LFNALQEGRQAEMEKKS AEFQEETRKA EETNRIMGCIGKVLGALLTIVSVVAAVFTGGASLALAAVGLAV
MVADEIVKAATGVSF IQQALNP IMEHVLKPLMELIGKAITKALEGLGVDKKTAEMAGSIVGAI VAAIAMV
AVIVVVAVVGKAAAKLGNALSKMMGETIKKLVPNVLKQLAQNGSKLFTQGMQRITSG LGNVGSKMGLQT
NALSKELVGNTL NKVALGMEVTNTAAQSAGGVAEGVF IKNASEALADFMLARFAMDQIQQWLKQSVEIFG
ENQKVTAELQKAMSSAVQQNADASRFILRQSR A

SipC:

MLISNVGINPAAYLNNH SVENSSQTASQSVSAKDILNSIGISSSKVSDLGLSPTLSAPAPGVLTQTPGTI
TSFLKASI QNTDMNQDLNALANNVTTKANEV VQTQLREQQAEV GKFFDISGMSSSAVALLAAANTLMLTL
NQADSKLSGKLSLVSFDAAKTTASSMMREGMNALSGSISQSALQLGITGVGAKLEYKGLQNERGALKHNA
AKIDKLTTESHS IKNVLNGQNSVKLGAE GVDLSKLSLNMKKTGTDATKNLNDATLKS NAGTSATESLGIKD
SNKQISPEHQAILSKRLESVESDIRLEQNTMDMTRIDARKMQMTGDLIMKNSVTVGGIAGASGQY AATQE
RSEQQISQVNNRVASTASDEARESSRKSTSLIQEMLKTMESINQSKASALAAIAGNIRA

SipD:

MLNIQNY SASPHPGIVAERPQTPSASEHVETAVVPSTTEHRGTDIISLSQAATKI HQAQQTLQSTPPISE
ENNDERTLARQQLTSSLNALAKSGVLSAEQENENLRSAFSAPTSALFSASPMAQPRTTISDAE IWDMV SQ
NISAI GDSYLG VYENVVAVYTD F YQAFSDILSKMGGWLLPGKDGNTVKLDV TSLKNDLNSLVNKYNQINS
NTVLFPAQSGSGVKVATEAEARQWLSELNLPNSCLKSYGSGYVVTVDLTP LQKMVQDIDGLGAPGKDSKL
EMDNAKYQAWQSGFKAQEENMKTTLQTLTQKYSNANS LYDNLVKVLSSTISSSLETAKSFLQ

Salmonella SP-12:

SseB.

MSSGNILWGSQNP I VFKNSFGVSNADTGSQDDLSQQNPFAEGYGVLLI LLMVIQAIANNKFIEVQKNAER
ARNTQEKSNE MDEVI AKA AKGDAKTKEEVPEDVIK YMRDNGILIDGMTIDDYMAKYGDH GKLDKGG LQAI
KAALDNDANRNTDLMSQGQITIQKMSQELNAVL TQLTGLISKWGEISSMIAQKTYS

SscA (Chaparon):

MKKDPTLQQAHD TMRFFRRGGS LRMLLDDDDVTQPLNTLYRYATQLMEVKEFAGAARLFQLLTIYDAWSFD

YWFRLGECQAQKHGWEAIYAYGRAAQIKIDAPQAPWAAAECYLACDNVCYAIKALKAVVRICGEVSEHQ
ILRQRAEKMLQQLSDRS

SseC:

MNRIHSNSDSAAGVTALTHHLSNVSCVSSGSLGKRQHRVNSTFGDGNAAACLLSGKISLQEASNALKQLL
DAVPGNHKRPSLPDFLQTNPAVLSMMMTSLILNVFGNNAQSLCQQLERATEVQNALRNKQVKEYQEIQK
AIEQEDKARKAGIFGAIFDWITGIFETVIGALKVVEGFLSGNPAEMASGVAYMAAGCAGMVKAGAE TAMM
CGADHDTCAIIDVTSKIQFGCEAVALALDVFQIGRAFMATRGLSGAAAKVLD SGFGEEVVERMVGAGEA
EIEELA EKFGEEVSESF SKQFEPLEREMAMANEMAEAAEF SRNVENNMTRSAGKSFTKEGVKAMAKEAA
KEALEKCVQEGGKFLKFRNKVLFNMFKKILYALLRDCSFKGLQAIRCATEGASQMNTGMVNTEKAKIE
KKIEQLITQQRFLDFIMQQTENQKKIEQKRLEELYKGSAAALRDVLDTIDHYSSVQARIAGYRA

SseD:

MEASNVALVLPAPSLTSPSTPSGEGMGTESMLLLFDDIWMKLMELAKKLRDIMRSYNVEKQRLAWEL
QVNVLQTMKTIIDEAFRASMITAGGAMLSGVLTIIGLAVGGETGLIAGQAVGHTAGGVMGLGAGVAQRQS
DQDKAIADLQQNGAQSYNKSLEIMEKATEIMQOIIGVGS SLVTVLAEILRALTR

E. coli:

SpeL (regulatorisches Protein):

MANGIEFNQNPASVFNNSLDFELESQQLTQKNSSNTSSPLINLQNELAMITSSSLSETIEGLSLGYRKG
SARKEEEGTTIEKLLNEMQELLTLTDSKIKELSLKNSGLLEQHDPTLAMFGNMPKGEIVALISSLLQSK
FVKIELKKKYAKLLLDLLGEDDWELALLSWLGVGELNQEIQKIKKLYEKAKDEDESENGASLLDWFMEIK
DLPEREKHLKVIIRALSFDLSYMS SFEDKVRTSSII SDLCRIIFLSLNNYTDIIAISIKKDKDVI LNEM
LSIIEHVWLTEDWLES SRV SIVEDKHVYFHLLEKFFASLPDACFIDNEQRSNTLLMIGKVIDYKEDV
M

EspA:

MDTSTTASVASANASTSTSMAYDLGSMKDDVIDL FNKLGVFQAAILMFAYMYQAQSDLSIAKFADMNEA
SKESTTAQKMANLVDAKIADVQSSSDKNAKAQLPDEVI SYINDPRNDITISGIDNINAQLGAGDLQTVKA
AISAKANNLT TTVNNSQLEIQQMSNTLNLTSARS DMQSLQYRTISGISLGK

EspD:

MLNVNNDIQSVRSGASAATATSGINQSEVTSALDLQLVKSTAP SASWTESTALPTPPAGHSLVTPSAAED
VLSKLFGGISGEVTSRTEGTEPQRSTQNASSGYPYLSQVNNVDPQAMMMMATLLSLDASAQRVASMKNSN
EIIYADGQNKALDNKTLEFKKQLEEQQKAEKAQKSKI VGVFQWLGVAATAIAAIFNPALWAVVAISATA
MALQTAVDVMGDDAPQALKTAAQAFGGSLAAGILTAGIGGVSSLSKVGDVANKVGSNIVKVVTTLADT
FVDNVASKISAVANGLTSSRSIGTTVLNNDAAAYNVLSQVSAFAVENLTRQSEYLSQSAKAELEKATLE
LQNQANYIQSASQLMSDSARVNIRIVSGRV

EspB:

MNTIDNNAIAIVNSVLSSTTDSTSTSTSSISSLLTDGRVDISKLLLEVQKLLREMVTTLQDYLQK
QLAQSYDIQKAVFESQNKAIIDEKKAGATAALIGGAISSVLGILGSFAAINSATKGASDVAQQAASTSAKS
IGTVSEASTKALAKASEGIADAADDAAGAMQQT IATAAKAASRTSGITDDVATSAQKASQVAEEAADAQ
ELAQAAGLLSRFTAAAGRISGSTPFIVVTS LAEGTKLPTTISESVKSNHDINEQRAKSVENLQASNLDT
YKQDVRRAQDDISSRLRDMTTTARDLTDLINRMGQAARLAG

Shigella:

SpgC (Chaperon):

MSLNITENESI STAVIDA INSGATLKD INAIPDDMMDDIYSYAYDFYNKGRIEEAEVFFRFLCIYDFYNV
DYIMGLAAIYQIKEQFQQAADLYAVAFALGKNDYTPVFHTGQCQLRLKAPLKAKECFELVIQHSNDEKLLK
IKAQSYLDAIQDIKE

IpaB:

MHNVSTTTTGFP LAKILTSTELGDNTIQAANDAANKLFSLT IADLTANQNINTTNAHSTSNILIPELKAP
KSLNASSQLTLLIGNLIQILGEKSLTALTNKITAWKSQQQARQQKNLEFSDKINTLLSETEGLTRDYEQ
INKLKNADSKIKDLENKINQIQTRLSELDPESPEKKLSREEIQLTIKKDAAVKDRTLIEQKTL SIHSLK
TDKSMQLEKEIDSFSAFSNTASAEQLSTQOKSLTGLASVTQLMATFIQLVGKNNEESLKNDLALFQSLQE
SRKTEMERKSDEYAAEVRKAEELNRVMGCVGKILGALLTIVSVVAAAFSGGASLALAAVGLALMVTDAIV
QAATGNSFMEQALNPIMKAVIEPLIKLLSDAFTKMLEGLGVD SKKAKMIGSILGAIAGALVLA VAVLVA
TVGKQAAAKLAENIGKIIIGKTLTDLIPKFLKNFSSQLDDLI TNAVARLNKFLGAAGDEVI SKQIISTHLN
QAVLLGESVNSATQAGGSVASAVFQNSASTNLADLTLSKYQVEQLSKYISEAIEKFGLQEV IADLLASM
SNSQANRTDVAKAILQQT TA

IpaC:

MLQKQFCNKLLLD TNKENVMEIQNTKPTQTLYTDISTKQTQSSETQKSQNYQQIAAHIPLNVGKNPVLT
TTLNDDQLLKLSEQVQHDSEIIARLTDKMKMDLSEMSHTLTPENTLDISSLSNAVSLIISVAVLLSALR
TAETKLSQLSLIAFDATKSAENIVRQGLAALSSSITGAVTQVGITGIGAKKTHSGISDQK GALRKNLA
TAQSLEKELAGSKLGLNKQIDT NITSPQTNSSTKFLGKNKLAPDNISLSTEHK TSLSSPDISLQDKIDTQ
RRTYELNTLSAQKQONIGRATMETS AVAGNISTSGGRYASALEEEEEQLISQASSKQAE EASQVSKEASQA
TNQLIQKLLNIIDSINQSKNSAASQIAGNIRA

IpaD:

MNITTLTNSISTSSFPNNTNGSSTETVNSDIKTTTSSHPVSSLTMLNDTLHNI RTTNQALKKELSQKTL
TKTSLEEIALHSSQISMDVNKSAQLLDILSRNEYPI NKDARELLHSAPKEAELDGDQMI SHRELWAKIAN
SINDINEQYLKVYEHAVSSYTQMYQDFSAVLSLAGWISPGGNDGNSVKLQVNSLKKALEELKEKYKDKP
LYPANNTVSQEQANKWLTELGGTIGKVSQKNGGYVVSINMTPIDNMLKSLDNLGGNGEVVLDNAKYQAWN
AGFSAEDET MKNNLQTLVQKYSNANSIFDNLVKVLSSTISSCTD TDKLFLHF

Alle Sequenzen aus PubMed bzw. von eigener Sequenzierung des *C. pneumoniae* GiD

CPn0811 (LcrH_1):

MSKPSPRNANQPQKPSASFNKKTRSRLAELAAQKKAKADDLEQVHPVPTREEIKKALGNIFEGLSNGLDLQQILGLSDYLLLEEIYTVAYTFYSQGKYNEAVGLFQLLAAAQPQNYKYMLGLSSCYHQLHLYNEAAF'GFF'LAFDAQPDNPIPYYIADSLKLLQQPPEESNNFLDVTMDICGNNPEFKILKERQCQIMKQSIKQOMAGETKKAPTKKPKAGKSKTTTNK KSGKKR

CPn1021 (LcrH_2):

MSHLNYLLEKIAAASSKEDFFPDDLESYLEGYVPDKNIALDITYQKIFKISSDLEKVVYKEGYHAYLDKDYAKSITVFRWL'VFFNPFVSKFWF'SLGASLHMSEQYSQALHAYGVTAVLRDKDPYPHYAYICYTLTNEHEEA'EKALEMAWVRAQHKPLYNELKEEILD'IRKHK

C. trachomatis

CT_576 (LcrH_1):

MSTPSSNNSKKPSASFNKKRSRLAEIAAQKKAKAEDLEQKYPVPTEEETKQVLMIDLQGLSNGLT'LLQQILGLSDVLLLEEIYTVAYTFYSQGKYQEAI'GLFQILTASKPQCYKYILGLSSCYHQLKMYDEAAF'GFF'LAFDAQPENIP'PPYYIADSLM'KLNQPEESQDFLDITIDMCKNKPEYKVLKDRCSIMKQSLDAV'LKKEKSAKSE TQASSPKNTKAKKAASNKKKAK

CT_862 (LcrH_2):

MPPSKIQCLET'FKRTYGHLYLQHASLMRHLAYLLDKIARSYHHMCP'LPDNMEAYFENYIPNKDIP'LDITYQKIFKLSSDLEQVYKEGYNAYLQGDYEESS'AFYWL'IFFNPFVSKFWF'SLGASLHMLQKYQ'QALHAYGVA ALLREKDPYPHYAYICYTLLN'NPEEA'EKALDLAWQKVKTSSAYS'SLKEEILAIKSYA

Yersinia:

SycD (Chaperon):

MQQETTD'TQEYQLAMESFLKGGGTIAMLNEISSD'TLEQLYSLAFN'QYQSGKYEDAHKVFQALCVLDHYDS RFF'LGLGACRQSLG'LYEQALQSYSYGALMDINEPRFP'FHAAECLLQKGELAEAESGLF'LAQELIADKPEF KELSTRVSSMLEAIK'KKEMEHECVDNP

Pseudomonas:

PcrH (Chaperon):

MNQPTPSD'TDQQQALEAF'LRDGGTLAMLRGLSEDTLEQLYALGFN'QYQAGKWDDAQKIFQALCMLDHYDAR'YFLGLGACRQSLG'LYEQALQSYSYGALMDINEPRFP'FHAAE'CHLQ'LGDL'DGAESGFY SARALAAAQPAHEALAARAGAMLEAVTARKDRAYESDNA

Salmonella SP-I1:

SicA (Chaparon):

MDYQNNVSEERVAEMIWDVAVSEGATLKDVHGIPQDMMDGLYAHAYEFYNGRLDEAETFFRFLCIYDFYN
PDYTMGLAAVCQLKKQFQKACDLYAVAFLLKNDYRPVFFFTGQCQLLMRKA AKARQCFELVNERTEDSL
RAKALVYLEALKTAETE QHSEQEKE

SscA (Chaparon):

MKKDPTLQQAHD TMRFFRRGGSLRMLLDDDVTQPLNTLYRYATQLMEVKEFAGAARLFQLLTIYDAWSFD
YWFRLGECCQAQKHWEAIYAYGRAAQIKIDAPQAPWAAAECYLACDNVCYAIKALKAVVRICGEVSEHQ
ILRQRAEKMLQQLSDRS

Shigella:

SpgC:

MSLNITENESISTAVIDA INSGATLKDINAIPDDMMDDIYSYAYDFYNKGRIEEAEVFFRFLCIYDFYNV
DYIMGLAAIYQIKEQFQQAADLYAVAFALGKNDYTPVFHTGQCQLRLKAPLKAKECFELVIQHSNDEK LK
IKAQSYLD AIQDIKE

Vergleich der Translokon Proteine mittels BLAST:

CPn0808 und CPn0809:

Range 1: 162 to 364 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	16.2 bits(30)	2.8	Compositional matrix adjust.	58/221(26%)	89/221(40%)	45/221(20%)
Query	116	NYDSPSLP----	TPEAQTIN-GIVLKKMGMTLALLGLVMTLMANAAGESWKASFQSQNQA	170		
		++P LP	TP ++ I G+ L K + TL		GE+ K++ S +	
Sbjct	162	KLETPPELPKPGVTPRSEVIEIQLALAKAIQTL-----	-----	-----	GEATKSAL-SNYAS	206
Query	171	IRSQVESAPAIG---EAIK----	RQANHQASATEAQAKQSLISGI---VNIVGFTVSVG-	219		
		++Q + +G +AIK	R+ + A E ++K + G VN V VSV			
Sbjct	207	TQAQADQTNKLGLEKQAIKIDKEREYQEMKAAEQKSKD--	LEGTMDTVNTVMIAVSVAI	264		
Query	220	-----AGIFSAAKGATSALKSASFAKETGASAAGGAASKALTSASSSVQQTMASTAKAA	273			
		A IF+ G A+ A A GAA+ + +VQ + + +A				
Sbjct	265	TVISIVAAIFTGAGLAGLAAGAA-VGAAAAGGAAGAAAATTVATQITVQAVVQAVKQAV	323			
Query	274	TTAASSAGSAATKAAAN-----	LTDDMAAAASKMASDGASK	309		
		TA A +AA KAA	+ A +K S G SK			
Sbjct	324	ITAVRQAITAAIKAAVKSGIKAFIKTLVKAIKAIKISKISK	364			

CPn0808 und CPn0810:

Range 1: 82 to 103 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	17.7 bits(34)	0.18	Compositional matrix adjust.	9/28(32%)	15/28(53%)	6/28(21%)
Query	221	GIFSAAKGATSALKSASFALAKETGASAAG	248			
		G+F +A+ + A+FAKE + G				
Sbjct	82	GLFPSAQ-----	EDANFAKELSSVVHG	103		

CPn0808 und CPn0811:

Range 1: 16 to 34 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	17.7 bits(34)	0.38	Compositional matrix adjust.	10/19(53%)	12/19(63%)	0/19(0%)
Query	235	SASFAKETGASAAGGAASK	253			
		SASF K+T + A AA K				
Sbjct	16	SASFNKTRSLAELAAQK	34			

CPn0808 und CPn1019:

Range 1: 5 to 16 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	16.2 bits(30)	2.5	Compositional matrix adjust.	6/12(50%)	7/12(58%)	0/12(0%)
Query	117	YDSPSLPTPEAQ	128			
		Y S S P P E +				
Sbjct	5	YQSISTPPPEGE	16			

CPn0808 und CPn1020:

Range 1: 307 to 343 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	21.6 bits(44)	0.055	Compositional matrix adjust.	10/37(27%)	20/37(54%)	3/37(8%)
Query	195	ATEAQAKQSLISGIVNIVGFT---VSVGAGIFSAAKG	228			
		+ E + ++ L + +I+G+ VS+G GI + G				
Sbjct	307	SIEKEKRERLWGSLSLDIIGWLAPFVVSIGIGIVAILSG	343			

Range 2: 22 to 37 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	16.5 bits(31)	2.0	Compositional matrix adjust.	8/16(50%)	9/16(56%)	0/16(0%)
Query	170	AIRSQVESAPAIGEAI	185			
		A RSQ S P I +I				
Sbjct	22	APRSQESSVPKISYSI	37			

CPn0808 und CPn1022:

Range 1: 276 to 303 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	20.0 bits(40)	0.15	Compositional matrix adjust.	11/29(38%)	16/29(55%)	1/29(3%)
Query	42	GAQAEVAAGGFEDLIQDASAQSTGKKEAT	70			
		G ++AA F D ++ A+ T KKE T				
Sbjct	276	GENLDIAALIFSDQMR-PPAEETSKKETT	303			

Range 2: 353 to 365 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	18.9 bits(37)	0.36	Compositional matrix adjust.	8/13(62%)	10/13(76%)	0/13(0%)
Query	384	RLAQAEAEAEVL	396			
		R+ GQAEA+A L				
Sbjct	353	RILGQAEAEANEL	365			

Range 3: 22 to 35 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	17.7 bits(34)	0.91	Compositional matrix adjust.	7/14(50%)	8/14(57%)	0/14(0%)
Query	215	TVSVGAGIFSAAKG	228			
		TVS +GI A G				
Sbjct	22	TVSTASGILKTATG	35			

CPn0808 und CT 577:

Range 1: 30 to 51 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.5 bits(31)	0.34	Compositional matrix adjust.	10/22(45%)	13/22(59%)	2/22(9%)
Query	424	ALQTLQN--IADSQTQTSAIF	443		
		ALQ LQN I+ SQ + +F			
Sbjct	30	ALQELQNAMISFSQDLPLAQM	51		

Range 2: 64 to 85 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
12.7 bits(21)	6.8	Compositional matrix adjust.	6/22(27%)	10/22(45%)	0/22(0%)
Query	295	MAAAASKMASDGASKASGGLFG	316		
		MAA + + S + G+F			
Sbjct	64	MAALSGMLDLPVETLTKGVFD	85		

CPn0808 und CT 579 (CopD):

Range 1: 1 to 439 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
359 bits(921)	1e-123	Compositional matrix adjust.	241/444(54%)	311/444(70%)	5/444(1%)
Query	1	MTSGVSGSSSQDPTLAAQLAQSSQKAGNAQSGHDTKNVTKQGAQAEVAAGGFEDLIQDAS	60		
		MT+GV G ++ DP+L AQL Q++ A A +G KN GA+ E FEDL+QDA			
Sbjct	1	MTTGVRGDNAPDPSLLAQLTQANASAASTG---KNGQVAGAKQENVNASFEDLLQDAQ	57		
Query	61	AQSTGKKEATSSSTTKSSKGEKSEKSGKSSSTSVASASETATAQAVQGPKGLRQNNYDSP	120		
		KK + T+KS K EK++ S + ++TVA AS+TATAQAV G + N+ S			
Sbjct	58	GTGGSKKATANQTSKSGKSEKAQASSGTSTTTSVAQASQTATAQAVHGARDSGFNDSGSA	117		
Query	121	SLPTPEAQTINGIVLKKMGTLALLGLVMTLMANAAGESWKASFQSQNQAIRSQVESAPA	180		
		+LP+P +NG+VL+KMGTLAL+GL+MTL+A A+ +SW +SFQ QNQAI++QV AP			
Sbjct	118	TLPSPTGTEVNGVVLKMGTLALMGLIMTLAQASAKSWSSSFQQQNQAIQNQVAMAPE	177		
Query	181	IGEAIKRQANHQASATEAQAKQSLISGIVNIVGFTVSVGAGIFSAAK GATSALKSASF	240		
		IG AI+ QANHQ A TE QA+QSLISGI NIVGF VSVG GI SA+K + LKSA+F			
Sbjct	178	IGNAIRTQANHQATLQAQSLISGITNIVGFAVSVGGGILSASK-SLGGGLKSAAF	236		
Query	241	ETGASAAGGAASKALTSASSSVQQTMASTAKAATTAASSAGSAAATKAAANLTDMMAAAAS	300		
		ET ++ +S A T A+S++ + A S A SAA+ AA LT +MA +AS			
Sbjct	237	ETASATTSATSSSLAKT-ATSALDDVAGTATAVGAKATSGAASAASSAATKLTQNMESAS	295		
Query	301	KMASDGASKASGGLFGEVLNKPWNSEKVS RGMNVVKTQGARVASFAGNALSSSQMSQLM	360		
		K S ASK++GGLFG+ LN P+WSEKVS RGMNVVKTQG R A FAG ALSS+M +SQ++			
Sbjct	296	KTLSQTASKSAGGLFGQALNTPSWSEKVS RGMNVVKTQGTAAKFAGRALSSAMNISQMV	355		
Query	361	HGLTAAVEGLSAGQTGIEVAHHQRLAQAEAEVLKQMSVYGGQAGQAGQLQEQAQMS	420		
		HGLTA ++G+ G G +VA QR+AG AEA+AE LK ++SV Q A QA QLQE+ QS			
Sbjct	356	HGLTAGIDGIVGGVIGAQAQVQEQRMAGMAEAREELKSLNSVQAQYASQAQQLQEESQSS	415		
Query	421	FNTALQTLQNIADSQTQTSAIFN	444		
		FN+ALQTLQ+I+DS QTT+++FN			
Sbjct	416	FNSALQTLQSIDSDSALQTTASMFN	439		

CPn0808 und CT863:

Range 1: 350 to 362 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	19.6 bits(39)	0.21	Compositional matrix adjust.	8/13(62%)	10/13(76%)	0/13(0%)
Query	384	RLAGQAEAEQAEVL	396			
		R+ QQAEA+A L				
Sbjct	350	RILGQAEAEAEHEL	362			

CPn0808 und CT 862:

Range 1: 147 to 183 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	14.2 bits(25)	4.4	Compositional matrix adjust.	10/37(27%)	14/37(37%)	1/37(2%)
Query	305	DGASKASGGLFGEVLNKNPNWSEK-VSRGMNVVKTQGA	340			
		D + +LN P +EK + VKT A				
Sbjct	147	DPYPHYAYICYTLLNPEEAEKALDLAWQKVKTSSA	183			

Range 2: 178 to 190 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	13.1 bits(22)	9.6	Compositional matrix adjust.	5/13(38%)	10/13(76%)	0/13(0%)
Query	56	IQDASAQSTGKKE	68			
		++ +SA S+ K+E				
Sbjct	178	VKTSSAYSSLKEE	190			

CPn0808 und CT 861:

Range 1: 459 to 506 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	20.0 bits(40)	0.17	Compositional matrix adjust.	15/51(29%)	28/51(54%)	4/51(7%)
Query	377	IEVAHHQRLAGQAEAEQAE-VLKQMSSVYQQAGQAGQLQEAMQSFNTALQ	426			
		IE+ + +R + +AE +L M + + +Q + QLQ + Q+F AL+				
Sbjct	459	IELINWER--DEYFLRAEQLLDSMQTSF-EQLTETLQLQREIDQFTDALR	506			

Range 2: 210 to 265 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	15.8 bits(29)	3.6	Compositional matrix adjust.	17/70(24%)	30/70(42%)	14/70(20%)
Query	161	KASFQSQNQAIARSQVESAPAI GEAIKRQANHQASATEAQAKQSLISGIVNIVGFTVSVGA	220			
		KAS +SQ+ + S E + +Q +H+ + +AK+ +V +				
Sbjct	210	KASGESQDSSEHSSKEDPHS-----QQPSHKIQRRKERAKR-----VVP I I I P P T V	255			
Query	221	GIFSAAKGAT	230			
		GIFS + T				
Sbjct	256	GIFSLSYLLT	265			

CPn0808 und CT 860:

Range 1: 279 to 408 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	19.2 bits(38)	0.32	Compositional matrix adjust.	30/137(22%)	57/137(41%)	16/137(11%)
Query	110	KGLRQNNYDSPSLPTP-----EAQTINGIVLK-KGMGTLALLGLVMTLMANAAGESWK		161		
		K R++++D LP EAQ + ++ + L + +M LM N+ +				
Sbjct	279	KKRREHHFDPEYLPPEIREFALSEAQLSOLLHRLNHLDLIRICAEIMKMLNSREQDL-		337		
Query	162	ASFQSQNQAIRSQ-VESAPAIGEAIKRQANHQASATEAQAKQSLISGIVNIVGFTVSVGA		220		
		+ ++ R+ ++ A I ++ +QA A A + GI I+G G				
Sbjct	338	----LERRSTRTHFMQEAKKIADSFQAKARITKWLGIATATLGIFFGGISPIIGEL--GGE		391		
Query	221	GIFSAAKGATSALKSAS	237			
		G+ + + AT + AS				
Sbjct	392	GLLNVIRKATGGWQQAS	408			

Range 2: 304 to 310 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	17.3 bits(33)	1.1	Compositional matrix adjust.	5/7(71%)	7/7(100%)	0/7(0%)
Query	355	QMSQLMH	361			
		Q+SQL+H				
Sbjct	304	QLSLLH	310			

Range 3: 481 to 490 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	16.2 bits(30)	3.0	Compositional matrix adjust.	5/10(50%)	8/10(80%)	0/10(0%)
Query	164	FQSQNQAIRS	173			
		Q+Q+ A+RS				
Sbjct	481	LQTQHDVRS	490			

CPn0809 und CPn0810:

Range 1: 63 to 69 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	15.4 bits(28)	0.91	Compositional matrix adjust.	5/7(71%)	7/7(100%)	0/7(0%)
Query	149	VVAALSG	155			
		++AALSG				
Sbjct	63	IIAALSG	69			

CPn0809 und CPn0811:

Range 1: 215 to 227 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	14.2 bits(25)	4.5	Compositional matrix adjust.	5/13(38%)	9/13(69%)	0/13(0%)
Query	61	ASGKDKTSSTTKT	73			
		+GK KT++ K+				
Sbjct	215	PAGKSKTTTNKKS	227			

CPn0809 und CPn1019:

Range 1: 411 to 430 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
21.9 bits(45)	0.042	Compositional matrix adjust.	10/20(50%)	12/20(60%)	0/20(0%)
Query	353	AIKAISKGISKVFAKGTQM	372		
		A AK KGI KVF +Q+			
Sbjct	411	ATAKTFKIGIKVFTSLSQL	430		

Range 2: 185 to 204 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.1 bits(35)	0.71	Compositional matrix adjust.	9/20(45%)	13/20(65%)	0/20(0%)
Query	54	SDATIAGASGDKTSSTTKT	73		
		S +TI S K+K S +TK+			
Sbjct	185	SSSTIKEHSAKEKVSQSTKS	204		

CPn0809 und CPn1020:

Range 1: 288 to 356 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
25.0 bits(53)	0.005	Compositional matrix adjust.	21/81(26%)	38/81(46%)	15/81(18%)
Query	206	STQAQADQTNKLGLEKQAIKIDKEREYQEMKAAEQKSKDLEGTM-DTVNTVMIAVSVAI	264		
		STQ + D ++ +E + I+KE+ E L G++ D + + VS+ I			
Sbjct	288	STQRELDALHEKRIETIKVSIEKEKRE-----RLWGSLSDIIGWLAPFVSI	335		
Query	265	TVISIVA--AIFTCGAGLAGL	283		
		+++I++ IF AGL			
Sbjct	336	GIVAILSGGGIFAFAGFFAGL	356		

Range 2: 320 to 338 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.9 bits(37)	0.40	Compositional matrix adjust.	8/20(40%)	15/20(75%)	1/20(5%)
Query	380	LSKVISSLTSKWVTVGVGVV	399		
		LS +I L + +V++G+G+V			
Sbjct	320	LSDIIGWL-APFVSIIGIV	338		

Range 3: 170 to 203 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.6 bits(26)	8.1	Compositional matrix adjust.	11/34(32%)	17/34(50%)	0/34(0%)
Query	15	IMSQVLTSTPQGVPQDKLSGNETKQIQQTRQGK	48		
		+ SQ L S Q + Q + +ET QQ+ + K			
Sbjct	170	LYSQSLDSEQELLQSRREERSETYANQQSSEKK	203		

CPn0809 und CPn1021:

Range 1: 334 to 416 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
19.2 bits(38)	0.31	Compositional matrix adjust.	24/85(28%)	40/85(47%)	6/85(7%)
Query 171	PGVTPRSEVIEIIGLALAKAI-QTLGEATKSALSNYASTQAQADQTNKLGLEKQAI---KI				226
	P TP+ E + L K + + LG+A A Y + + D + L + I K				
Sbjct 334	PIQTPKVE--NVFLRFMKLMARILGQAEAEANELYMRVKQRTDDVDTLTVLISKINNEK				391
Query 227	DKEREEYQEMKAAEQKSKDLEGTMD	251			
	D + E +EMKA ++K++ T+D				
Sbjct 392	DIDWSENEEMKALLNRAKEIGVTID	416			

Range 2: 444 to 456 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.9 bits(32)	1.6	Compositional matrix adjust.	5/13(38%)	11/13(84%)	0/13(0%)
Query 409	IMQMQLSEMQQNV	421			
	I QM+ ++MQ+++				
Sbjct 444	ITQMERTDMQRHL	456			

Range 3: 85 to 122 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.0 bits(27)	6.5	Compositional matrix adjust.	10/38(26%)	21/38(55%)	1/38(2%)
Query 178	EVIEIGLALAKAIQTLGEEA-TKSALSNYASTQAQADQT	214			
	EV+E+ + + + L A T ++ TQ++++QT				
Sbjct 85	EVVELEIQVVDLLVQLEHAETITSEPQETQTSRSEQT	122			

Range 4: 18 to 34 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.6 bits(26)	7.8	Compositional matrix adjust.	7/17(41%)	12/17(70%)	0/17(0%)
Query 53	ESDATIAGASGDKTSS	69			
	E +T++ ASG KT++				
Sbjct 18	EDSSTVSTASGILKTAT	34			

CPn0809 und CT_577:

Range 1: 56 to 96 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.4 bits(28)	0.94	Compositional matrix adjust.	13/41(32%)	15/41(36%)	0/41(0%)
Query 88	SESQKAGADTGVSGAAATTASNTATKIAMQTSIEEASKSME	128			
	E Q A +SG + T TK EEA S E				
Sbjct 56	DEKQLAKMMAALSGMLDSLPEVETLTKGVFDNPKKEAQLSQE	96			

Range 2: 84 to 92 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
12.7 bits(21)	8.1	Compositional matrix adjust.	4/9(44%)	5/9(55%)	0/9(0%)

Query 226 IDKEREYYQ 234
 D +EE Q
 Sbjct 84 FDNPKEEAQ 92

CPn0809 und CT 578:

Range 1: 13 to 481 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
404 bits(1037)	9e-140	Compositional matrix adjust.	251/482(52%)	331/482(68%)	23/482(4%)
Query 11	NQKNIMSQVLTSTPQQVPPQDKLSGNETKQIQQTRQGKNT-EMESDATIAGASGKDKTSS				69
Sbjct 13	N KN++SQV+ STPQVVP DKL+ N+ KQ+QQTRQ ++ MESD +AG +GKD+ +S NLKNVLSQVIASTPQQVPNADKLTNDNQVKVQVQTRQNRDDLSMESDVAVAGTAGKDRAAS				72
Query 70	TTKTE---TAPQQGVAAGKESSESQKAGADTVSFGAAATTASNTATKIAM-QTSIEE-AS				124
Sbjct 73	++ E QQG+AAGKE+ A AD AT+ + +A+K A Q IE+ + ASQIEGQELIEQQGLAAGKET-----ASAD-----ATSLTQSASKGASSQQCIEDTSK				120
Query 125	KSMESTLESLSLSAAQMKEVEAVVVAALSQKSSGS-AKLETPPELPGVTPRSEVIEIG				183
Sbjct 121	S+L SL S+ A ++E+++V +A+ + S LETP LPKP TPR EV+EI SLELSLSLSLSDVATHLQEIQSIVSSAMGATNELSLTNLETPGLPKPSTTPRQEVMEIS				180
Query 184	LALAKAIQTLGEATKSALSNYASTQAQADQTNKLGLEKQAIKIDKEREYQEMKAAEQKS				243
Sbjct 181	LALAKAI LGE+T++AL N+ STQ+Q+ NK+ LE Q +KIDKERE+++M+ +QKS LALAKAITALGESTQAALNFQSTQSQSANMNKMSLESQGLKIDKEREFFKKMQEIQKKS				240
Query 244	KDLEGTMDTVNTVMIAVSVAITVISIVAAIFTCGAGL---AGLAAGAAVGAAGGAAGA				300
Sbjct 241	TMDTVN VMI V+VAITVIS+V+A+FTCG GL A A AA A A -GTNSTMDTVNKVMIGVTVAITVISVVSALFTCGGLGGLIGTAAAGATAAAAGATAAATTAT				299
Query 301	AAATTVATQITVQAVVQAVKQAVITAVRQAITAAIKAAVKSQIKAFIKTLVKAIKAIKSK				360
Sbjct 300	+ ATTVATQ+T+QAVVQ VKQA+I AV+QAI AIK +K GIK IK VKA K ++K SVATTVATQVTMQAVVQVVKQAI IQAVKQAIQAIKQGIKQAIKQAVKAAVKTAK				359
Query 361	GISKVFAKGTQMIAKNFPKLSKVISLTSKWTGVTGVTGVAAPALGKIMQMLSEMQQN				420
Sbjct 360	+ K+F+ G ++K+FPKLSKVI++L SKWVT+GVG + A P L GI +QLS+MQ+ NVGKIFSAGKNAVSKSFPKLSKVIINTLGSKWTGVTGVTGVAAPALGKIMQMLSEMQQN				419
Query 421	VAQFQKEVGLQAAADMISMFTQFWQQASKIASKQTGESNEMTQKATKLGAIKAYAAI				480
Sbjct 420	+AQ QKEVG L A ++M+ FT FWQQASKIA+KQT +E Q+A K GAQI KA +AI LAQIQKEVGALTAQSEMMAFTLFWQQASKIAAKQTESPSETQQQAAKTGAQIAKALSAL				479
Query 481	SG 482				
Sbjct 480	SG 481				

CPn0809 und CT 863:

Range 1: 399 to 410 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.0 bits(27)	5.9	Compositional matrix adjust.	6/12(50%)	8/12(66%)	0/12(0%)
Query 208	QAQADQTNKLGL 219				
Sbjct 399	+A DQ KLG+ RALVDQAKKLG 410				

CPn0809 und CT 861:

Range 1: 327 to 344 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
22.3 bits(46)	0.035	Compositional matrix adjust.	9/20(45%)	13/20(65%)	2/20(10%)
Query 391	WVTVGVGVVVAAPALGKGM	410			
	W+ +GV V + ALG GI+				
Sbjct 327	WIEMGVAVTII--ALGGGIL	344			

Range 2: 327 to 428 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.5 bits(36)	0.64	Compositional matrix adjust.	20/103(19%)	41/103(39%)	1/103(0%)
Query 257	MIAVSVAITVISIVAAIFTTCGAGLAGLAGLAAGAAVGAAGAAAGAAATTVATQITVQAVV	316			
	I + VA+T+I++ I + + A L + A A A + +				
Sbjct 327	WIEMGVAVTIIALGGGILSWCSLFALIM-IVLSLLEAFDGWRAIAKHLPGNDLEKKMRY	385			
Query 317	QAVKQAVITAVRQAITAAIKAAVKSGIKAFIKTLVKAIKAKIS	359			
	+ +T ++ + K G+ ++ +VK+IA A+S				
Sbjct 386	LGYVKLALTVFSCLLSLSALYVAKLGMSPLLLEGVVKSIAPALS	428			

Range 3: 295 to 320 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
17.3 bits(33)	1.4	Compositional matrix adjust.	11/34(32%)	15/34(44%)	8/34(23%)
Query 418	QQNVAQFQKEVVKLQAAADMISMFTQFWQQASKI	451			
	Q+ + Q QK V K S T+FW + I				
Sbjct 295	QERIEQVQKIVDK-----SKTTRFWDSLASI	320			

Range 4: 21 to 71 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.9 bits(32)	1.7	Compositional matrix adjust.	17/54(31%)	23/54(42%)	5/54(9%)
Query 55	DATIAGASGDKTSSSTKTETAPQ--QGVAAGKESSESQKAGADTGVSGAAATT	106			
	DA+++ + K S + E+AP Q + A SQK A S TT				
Sbjct 21	DASLAIQTEKFPYSCSISKESAPSCIQKIFAHL---ASQKESAPLSFSRLQPTT	71			

Range 5: 203 to 221 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #5

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.8 bits(29)	4.3	Compositional matrix adjust.	6/19(32%)	10/19(52%)	0/19(0%)

Query	72	KTETAPQQGVAAGKESSES	90
		+T T P + ++SSE	
Sbjct	203	RTSTPPSKASGESQDSSEH	221

CPn0809 und CT 860:

Range 1: 308 to 355 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.5 bits(36)	0.60	Compositional matrix adjust.	13/50(26%)	25/50(50%)	8/50(16%)

Query	409	IMQMQLSEMQQNVAQFQKEVGKL-----QAAADMISMFTQFWQQASKIA	452
		++ ++L+ + ++ + E+ KL Q + S T F Q+A KIA	
Sbjct	308	LLHIRLNHL--DILRICAIEIMKMLNSREQDLLERRSTRTHFMQEAKKIA	355

Range 2: 7 to 35 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.2 bits(30)	3.1	Compositional matrix adjust.	9/29(31%)	16/29(55%)	0/29(0%)

Query	128	ESTLESLSLSAAQMKEVEAVVVAALSGK	156
		+ TL SLQ+++ + E +ALS +	
Sbjct	7	QETLPSLQTIATGEQVETSCEEASALSNE	35

Range 3: 22 to 30 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.4 bits(28)	5.5	Compositional matrix adjust.	6/9(67%)	8/9(88%)	0/9(0%)

Query	116	MQTSIEEAS	124
		++TS EEAS	
Sbjct	22	VETSCEEAS	30

Range 4: 385 to 408 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.0 bits(27)	7.2	Compositional matrix adjust.	9/24(38%)	14/24(58%)	2/24(8%)

Query	428	VGKL--QAAADMISMFTQFWQQAS	449
		+G+L + ++I T WQQAS	

Sbjct 385 IGELGGEGLLNVIRKATGGWQQAS 408

CPn0810 und CPn0811:

Range 1: 34 to 52 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
11.5 bits(18)	9.2	Compositional matrix adjust.	7/19(37%)	8/19(42%)	0/19(0%)

Query	9	KKAVQSKAAPVKRVPEESQ	27
		KKAVQSKAAPVKRVPEESQ	27
Sbjct	34	KKAKADDLEQVHPVPTEEE	52

CPn0810 und CPn1019:

Range 1: 195 to 235 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.9 bits(32)	0.35	Compositional matrix adjust.	12/42(29%)	23/42(54%)	1/42(2%)

Query	7	KTKKAVQSKAAPVKRVPEESQEAAIQQLELAVSDLYKELPLA	48
		KK + +K+A ++ + +A + + L S L+KE+P A	48
Sbjct	195	KEKVSQSTKSAETQKHTQTKSDATLSPMSL-YSTLHKEVPQA	235

CPn0810 und CPn1020.

Range 1: 120 to 162 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.5 bits(31)	0.41	Compositional matrix adjust.	14/43(33%)	20/43(46%)	1/43(2%)

Query	76	LEELTQGLFPPSAQEDANFAKELSSVVHG-LKNLTTVVNKQMVK	117
		++ELT P + K LSS G KN T+ +Q +K	117
Sbjct	120	MQELTMPKSPEKTSEKALDKNLSSKQEGSCKNFDTLHLQQLK	162

Range 2: 337 to 367 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
-------	--------	--------	------------	-----------	------

15.0 bits(27) 1.4 Compositional matrix adjust. 14/45(31%) 19/45(42%) 14/45(31%)

```
Query 63 IIAALSGTLES LHLEELTQGLFPSAQEDANFAKELSSVVHGLKNL 107
      I+A LSG           G+F A      FA +S V+ L+ L
Sbjct 337 IVAILSGG-----GIFAF A---GFFAGLISLVIKCLEKL 367
```

Range 3: 125 to 132 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.2 bits(25)	2.6	Compositional matrix adjust.	5/8(63%)	6/8(75%)	0/8(0%)

```
Query 1 MNKKPKKT 8
      M K P+KT
Sbjct 125 MPKSPEKT 132
```

CPn0810 und CPn1021 (LcrH 2):

Range 1: 3 to 48 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
21.2 bits(43)	0.004	Compositional matrix adjust.	13/46(28%)	23/46(50%)	3/46(6%)

```
Query 75 HLEELTQGLFPSAQEDANFAKELSSVVHGL---KNLTTVVNKQMVK 117
      HL L + + S++ED F +L S + G KN+ +++ K
Sbjct 3 HLNYLEKIAASSKEDFPFPDDLESYLEGYVPDKNIALDITYQKIFK 48
```

Range 2: 60 to 74 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
12.7 bits(21)	2.3	Compositional matrix adjust.	4/15(27%)	8/15(53%)	0/15(0%)

```
Query 49 QTFASLTDKNQINSI 63
      + + + DK+ SI
Sbjct 60 EGYHAYLDKDYAKSI 74
```

CPn0810 und CPn1022:

Range 1: 88 to 117 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
-------	--------	--------	------------	-----------	------

18.5 bits(36) 0.087 Compositional matrix adjust. 11/30(37%) 16/30(53%) 0/30(0%)

Query 33 QLELAVSDLYKELPLAQT FASLTDKNQINS 62
+LE+ V DL +L A+T S + Q S
Sbjct 88 ELEIQVVDLLVQLEHAETITSEFQETQTS 117

Cpn0810 und CT 576:

Range 1: 162 to 167 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.4 bits(28)	0.46	Compositional matrix adjust.	5/6(83%)	6/6(100%)	0/6(0%)

Query 23 PEESQE 28
PEESQ+
Sbjct 162 PEESQD 167

CPn0810 und CT 577:

Range 1: 1 to 115 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
78.2 bits(191)	4e-24	Compositional matrix adjust.	44/115(38%)	73/115(63%)	0/115(0%)

Query 1 MNKKPKTKKAVQSKAAPVKRVPEESQEAAIQLELAVSDLYKELPLAQT FASLTDKNQI 60
M+KK K + SK + + A+Q+L+ A+ ++LPLAQ F+ + D+ Q+
Sbjct 1 MSKHKHKQAHTSSPKVEPAYVSKKESPALQELQNAMISFSQDLPLAQMFSEIQDEKQL 60

Query 61 NSIIAALSGTLESLHLEELTQGLFPSAQEDANFAKELSSVVHGLKNLTTVVNKQM 115
++AALSG L+SL +E LT+G+F + +E+A ++E+SS+ GLK+LT VNK +
Sbjct 61 AKMMAALSGMLDPLVETLTKGVFDNPKKEAQLSQEITSSIFLGLKHLTETV NKHI 115

CPn0810 und CT 578:

Range 1: 411 to 420 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.2 bits(30)	0.50	Compositional matrix adjust.	6/10(60%)	8/10(80%)	0/10(0%)

Query 36 LAVSDLYKEL 45
L +SD+ KEL
Sbjct 411 LQLSDMQKEL 420

CPn0810 und CT 863:

Range 1: 177 to 185 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
13.5 bits(23)	4.7	Compositional matrix adjust.	4/9(44%)	6/9(66%)	0/9(0%)
Query	15	KAAPVKRVP	23		
		+A P+ VP			
Sbjct	177	RAVPLSIVP	185		

Range 2: 145 to 150 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
13.1 bits(22)	5.1	Compositional matrix adjust.	4/6(67%)	5/6(83%)	0/6(0%)
Query	84	FPSAQE	89		
		PS+QE			
Sbjct	145	LPSSQE	150		

CPn0810 und CT 861:

Range 1: 1 to 18 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
13.5 bits(23)	4.6	Compositional matrix adjust.	9/26(35%)	12/26(46%)	8/26(30%)
Query	47	LAQTFASLTDKNQINSIIAALSGTLE	72		
		++ FA TD ALS TL+			
Sbjct	1	MSSWFAQATD-----VALSQTLD	18		

Range 2: 155 to 187 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
13.1 bits(22)	6.0	Compositional matrix adjust.	12/33(36%)	15/33(45%)	2/33(6%)
Query	51	FASLTDKN--QINSIIAALSGTLES LHLEELTQ	81		
		F+SL N I I + S ESL +TQ			
Sbjct	155	FSSLKKNLSPIMEEIDSFSAETESLEERLVTQ	187		

CPn0811 (LcrH_1) und CPn1019:

Range 1: 45 to 72 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
17.3 bits(33)	0.58	Compositional matrix adjust.	7/28(25%)	10/28(35%)	0/28(0%)
Query	125	YHQLHLYNEAAF G FFLAFDAQPDNPIPP	152		
		Y L +E FG + +PP			
Sbjct	45	YAMLRATSEL C FGILTQSECAL T QALPP	72		

Range 2: 195 to 221 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.0 bits(27)	3.2	Compositional matrix adjust.	9/27(33%)	12/27(44%)	0/27(0%)
Query	189	KERCQIMKQSI E KQ M AGETKKAPT K KP	215		
		KE+ +S E Q +TK T P			
Sbjct	195	KEKVSQSTKSA E TQKHTQTKSDATLSP	221		

Cpn0811 (LcrH_1) und CPn1020:

Range 1: 260 to 271 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.2 bits(30)	1.2	Compositional matrix adjust.	4/12(33%)	8/12(66%)	0/12(0%)
Query	84	IYTVAYTFYSQG	95		
		++T++Y QG			
Sbjct	260	VFTLSYLLTKQG	271		

Range 2: 222 to 247 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.2 bits(25)	4.8	Compositional matrix adjust.	10/27(37%)	18/27(66%)	3/27(11%)
Query	7	RNANQPQKPSASFNKKT--RSRLAELA	31		
		+++NQ QK S F + T ++R+A+ A			
Sbjct	222	QDSNQKQKSP-FQQDTSRKNRIAKAA	247		

CPn0811 (LcrH 1) und CPn1021 (LcrH 2):

Range 1: 44 to 165 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
37.4 bits(85)	5e-08	Compositional matrix adjust.	28/122(23%)	51/122(41%)	0/122(0%)
Query 71		QQILGLSDYLLEEIYTVAYTFYSQGKYNEAVGLFQLLAAAQPQNYKYLGLSSCYHQLHL	130		
		Q+I +S LE++Y Y Y Y +++ +F+ L P K+ L + H			
Sbjct 44		QKIFKISSLEDLEKVYKEGYHAYLDKDYAKSITVFRWLVFVNFVSKFWFSLGASLHMSEQ	103		
Query 131		YNEAAFQFFLAFDAQPDNPIPPYYIADSLKLLQQPEESNNFLDVTMDICGNNPEFKILKE	190		
		Y++A + + + +P P YY + EE+ L++ + P + LKE			
Sbjct 104		YSQALHAYGVTAVLRDKDPYPHYAYICYTLTNEHEEAKEKALEMAWVRAQHKPLYNELKE	163		
Query 191	RC	192			
Sbjct 164	EI	165			

CPn0811 (LcrH 1) und CPn1022:

Range 1: 411 to 443 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
20.0 bits(40)	0.070	Compositional matrix adjust.	11/33(33%)	19/33(57%)	3/33(9%)
Query 172		LDVTMD---ICGNNPEFKILKERCQIMKQSIEK	201		
		+ VT+D E ++LKE Q+ K+++EK			
Sbjct 411		IGVTIDKEKYTWTEEEKRLLKENVQMRKENMEK	443		

Range 2: 351 to 366 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
13.5 bits(23)	7.9	Compositional matrix adjust.	5/16(31%)	10/16(62%)	0/16(0%)
Query 70		LQQILGLSDYLLEEIY	85		
		+ +ILG ++ E+Y			
Sbjct 351		MARILGQAEAEANELY	366		

CPn0811 (LcrH 1) und CT 576 (LcrH 1):

Range 1: 1 to 219 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
324 bits(830) 2e-116 Compositional matrix adjust. 155/222(70%) 185/222(83%) 3/222(1%)					
Query	1	MSKPSPRNANQPQKPSASFNKKTRSRLAE	LAAQKKAKADDLEQVHPVPTEEEIKKALGNI	60	
Sbjct	1	MSTPSSNNS---KKPSASFNKKRSRLAE	IAAQKKAKAEDLEQKYPVPTEETKQVLM	57	
Query	61	FEGLSNGLDLQQILGLSDYLLEEIYTVAYTFYSQ	GKYNEAVGLFQLLAAQPNKYMLG	120	
Sbjct	58	LQGLSNGLTLLQQILGLSDVLLLEEIYTVAYTFYS	QGYQEAIGLFQILTASQPKYKYL	117	
Query	121	LSSCYHQLHLYNEAAFQFFLAFDAQPDNPIPPYYI	ADSLKLLQPEESNNFLDVTMDICG	180	
Sbjct	118	LSSCYHQLKMYDEAAFQFFLAFDAQPENPIPPYYI	ADSLMMLNQPESQDFLDITIDMCK	177	
Query	181	NNPEFKILKERCQIMKQSIKQ	MAGETKKKAPTKKPKGSKTT	222	
Sbjct	178	NKPEYKVLKDRCSIMKQSLDAVLKKEKSAK	SETQASSPKNT	219	

CPn0811 (LcrH 1) und CT 579:

Range 1: 354 to 363 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.0 bits(27) 2.4 Compositional matrix adjust. 4/10(40%) 7/10(70%) 0/10(0%)					
Query	60	IFEGLSNGLD	69		
Sbjct	354	MVHGLTAGID	363		

CPn0811 (LcrH 1) und CT 863:

Range 1: 424 to 439 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
20.4 bits(41) 0.061 Compositional matrix adjust. 8/16(50%) 13/16(81%) 0/16(0%)					
Query	186	KILKERCQIMKQSIK	201		
Sbjct	424	KLLKENIQMRKENMEK	439		

CPn0811 (LcrH 1) und CT 862 (LcrH 2):

Range 1: 43 to 195 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	50.8 bits(120)	1e-12	Compositional matrix adjust.	42/153(27%)	61/153(39%)	1/153(0%)
Query	45		HPVPTEEEIKKALGNIFEGLSNGLD-LQQILGLSDYLLEEIYTVAYTFYSQGKYNEAVGL	103		
			H P + ++ N LD Q+I LS LE++Y Y Y QG Y E+			
Sbjct	43		HMCPLPDNMEAYFENYIPNKDIPLDITYQKIFKLSSSEDLQVYKEGYNAYLQGDYEEESTA	102		
Query	104		FQLLAAAQPQNYKMYMLGLSSCYHQLHLYNEAAFQFFLAFDAQPDNP IPPYYIADSLKLO	163		
			F L P K+ L + H L Y +A + +A + +P P YY L			
Sbjct	103		FYWLIFFNPFVSKFWFSLGASLHMLQYQQALHAYGVAALLREKDPYPHYAYICYTLLN	162		
Query	164		QPEESNNFLDVTMDICGNNPEFKILKERCQIMK	196		
			PEE+ LD+ + + LKE +K			
Sbjct	163		NPEEAEKALDLAWQKVKTSSAYSSLKEEILAIK	195		

CPn0811 (LcrH_1) und CT_861:

Range 1: 172 to 201 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	21.9 bits(45)	0.020	Compositional matrix adjust.	12/30(40%)	16/30(53%)	0/30(0%)
Query	18		SFNKKTRSRLAELAAQKKAKADDLEQVHPV	47		
			SF+ +T S L QKK + EQ HP+			
Sbjct	172		SFSAETESLEERLVTQKKEETVAQEQQHPL	201		

Range 2: 161 to 216 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	16.2 bits(30)	1.2	Compositional matrix adjust.	16/63(25%)	31/63(49%)	7/63(11%)
Query	169		NNFLDVTMDICGNNPEFKILKERCQIMKQSIKQAGETKKAPTCKKPKAGKSKITTTNKKSG	228		
			+N + +I + E + L+ER ++ Q E+ +A E K P ++ T +K SG			
Sbjct	161		DNLSPIMEEIDSFSFAETESLEER--LVTQKKEETVAQEQQH-----PLLRTSTPPSKASG	213		
Query	229		KKR 231			
			+ +			
Sbjct	214		ESQ 216			

Range 3: 35 to 61 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	13.5 bits(23)	8.9	Compositional matrix adjust.	8/27(30%)	12/27(44%)	7/27(25%)
Query	192		CQIMKQS-----IEKQAGETKKAP	211		
			C I K+S I +A + + AP			
Sbjct	35		CSISKESAPSCIQKIFAHLASQKESAP	61		

Range 4: 125 to 170 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
13.5 bits(23)	9.4	Compositional matrix adjust.	13/46(28%)	18/46(39%)	0/46(0%)
Query	8	NANQPQKPSASFNKKTRSRLAELAAQKAKADDLEQVHPVPTEEEI	53		
		+A KPS+S K L K L++ + P EEI			
Sbjct	125	SARDSTKPSSEPIKPSENLLHTPEHHKELFSSLKKNLSPIMEEI	170		

CPn0811 (LcrH 1) und CT 860:

Range 1: 289 to 301 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.2 bits(25)	5.2	Compositional matrix adjust.	6/13(46%)	8/13(61%)	0/13(0%)
Query	78	DYLLEEIYTVAYT	90		
		+YL EEI A +			
Sbjct	289	EYLPEEIREFALS	301		

CPn1019 und CPn1020:

Range 1: 218 to 355 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
24.6 bits(52)	0.008	Compositional matrix adjust.	34/159(21%)	66/159(41%)	30/159(18%)
Query	257	YEQEQEQEKGKKKTPWCTVESLQQTSSSNQVYES--YTPIIPDPIVEFALSQLSVLAG	314		
		+ Q+Q+ + +KK+P+ Q TS N++ ++ P+IP P ++ LS L			
Sbjct	218	FSQDQDSNQKQKSPF-----QQDTSRKNRIAKAAQAVPVIPPP----SIGVFTLSYLLT	268		
Query	315	KRVTNLDVLRICTELMKMLKSRANDTMTRLEERELMEREAEHLAASYSRQAKYARWLGI	374		
		K+ I ++ + ++ R E L E+ + S ++ + W +			
Sbjct	269	KQ-----GILSDFSSYGCHKDSVESTQR-ELDALHEKRIETIKVSIEKEKRERLWGSL	320		
Query	375	ATATLILGAIAP-----MVGEISGDSILGFVQRISG	406		
		+ I+G +AP +V +SG I F +G			
Sbjct	321	S----DIIGWLAPFVSIIGIVAILSGGGIFAFAGFFAG	355		

CPn1019 und CPn1022:

Range 1: 21 to 58 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
21.9 bits(45)	0.052	Compositional matrix adjust.	14/41(34%)	20/41(48%)	3/41(7%)

Query	119	STSSNSTGKASTETTSSSFPFFSCKAPEGDSSVDKFTVSV	159
		ST S ++G T T SC A EG SS D ++++	
Sbjct	21	STVSTASGILKTATGEV---LVSCTALEGSSSTDALISLAL	58

Range 2: 206 to 254 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.1 bits(35)	0.66	Compositional matrix adjust.	15/54(28%)	32/54(59%)	11/54(20%)

Query	217	ATLSPMSLYSTLHKEVPQALSSTKSQQ-----KDEEHRDQRQQEGYEQEQEQE	264
		++ SP+S +S ++ +AL+++KS + +D R QR+Q + +QE++	
Sbjct	206	SSFSPLSQFSAEKQK--EALTTSKSHELYKERDQD---RQREQHDKHDQEQEED	254

Range 3: 292 to 341 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.1 bits(35)	0.77	Compositional matrix adjust.	15/53(28%)	24/53(45%)	4/53(7%)

Query	114	PLAQQSTSSNSTGKASTETTSSSFP--FFSCKAPEGDSSVDKFTVSVQTPKAQ	165
		P A++++ +T K + S F F K P SV + +QTPK +	
Sbjct	292	PPAEETSKKETTFKKKLPSPMSVFSRFIPSKNP---LSVGSSIHGPIQTPKVE	341

Range 4: 323 to 332 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.8 bits(29)	4.1	Compositional matrix adjust.	4/10(40%)	9/10(90%)	0/10(0%)

Query	220	SPMSLYSTLH	229
		+P+S+ S++H	
Sbjct	323	NPLSVGSSIH	332

CPn1019 und CT_576 (LcrH_1):

Range 1: 122 to 149 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.9 bits(32)	0.72	Compositional matrix adjust.	7/28(25%)	10/28(35%)	0/28(0%)

Query	45	YAMLRATSELFCFGILTQSECALTQALPP	72
		Y L+ E FG + +PP	

Sbjct 122 YHQLKMYDEAAFQFFLAFDAQPENPIPP 149

CPn1019 und CT 577:

Range 1: 47 to 113 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	20.0 bits(40)	0.027	Compositional matrix adjust.	17/67(25%)	24/67(35%)	15/67(22%)
Query	385		IAPMVGEISGDSILG-FVQRISGRFKDATAKTFFKG-----IGKVFTSLSQ			429
			+A M EI + L + +SG +T KG I +F L			
Sbjct	47		LAQMFSEIQDEKQLAKMMAALSGMLDLPVETLTGKGFVDFNPKEEAQLSQEISSIFLGLKH			106
Query	430		LTEAASK 436			
			LTE +K			
Sbjct	107		LTETVNK 113			

CPn1019 und CT578:

Range 1: 56 to 104 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	16.9 bits(32)	1.6	Compositional matrix adjust.	19/55(35%)	27/55(49%)	14/55(25%)
Query	16		EFDIFVDGNATEE-AVVAAEV-----QVALPAGEQYAMLRATSELFCFGILTQS			62
			E D+ V G A ++ A A+++ Q L AG++ A ATS LTQS			
Sbjct	56		ESDVAVAGTAGKDRAASASQIEGQELIEQQGLAAGKETASADATS-----LTQS			104

Cpn1019 und CT 579:

Range 1: 16 to 31 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	15.0 bits(27)	6.4	Compositional matrix adjust.	8/16(50%)	11/16(68%)	0/16(0%)
Query	115		LAQQSTSSNSTGKAST 130			
			LAQ + ++NS AST			
Sbjct	16		LAQLTQNANSASAAST 31			

Cpn1019 und CT 863:

Range 1: 315 to 338 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
20.4 bits(41)	0.16	Compositional matrix adjust.	10/24(42%)	12/24(50%)	0/24(0%)
Query	13	PEGEFDIFVDGNATEEAVVAAEVQ	36		
		P +F NATEEA A V+			
Sbjct	315	PPSPMSLFSSQNATEEAPKEARVE	338		

Range 2: 230 to 330 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.2 bits(30)	2.7	Compositional matrix adjust.	28/103(27%)	33/103(32%)	13/103(12%)
Query	156	TVSVQTPKAQEQQEASASQSQAQFHVRSY-----SSSTIKEHSAKEKVSQSTKS	204		
		T S K QQE + Q Q H SY SSS H E +			
Sbjct	230	TCSTGREKRDGQQRHSDQEQNSDH--SYQEEDLSDDMQVSSSKRSSHPEDENTEVEVFSV	287		
Query	205	AETQKHTQTKSDATLSPMSLYSTLHKEVPQALSSTKSQQKDEE	247		
		+ H + L S ST K P +S SQ EE			
Sbjct	288	SHFAYHAAPHPSSNLDQESNQSTFQKRPPSPMSLFSSQNATEE	330		

Range 3: 102 to 120 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.0 bits(27)	6.2	Compositional matrix adjust.	8/19(42%)	11/19(57%)	0/19(0%)
Query	268	KKTPWCTVESLQQTSSSNQ	286		
		++TP SLQQ +S Q			
Sbjct	102	EETPSSDSRSLQQKETAQ	120		

CPn1019 und CT 862 (LcrH 2):

Range 1: 65 to 98 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
13.5 bits(23)	7.8	Compositional matrix adjust.	11/39(28%)	17/39(43%)	5/39(12%)
Query	221	PMSLYSTLHKEVPQALSSTKSQQKDEEHRDQRQQEGYEQ	259		
		P+ Y + K LSS +Q +E + Q YE+			
Sbjct	65	PLDTYQKIFK-----LSSLEQVYKEGYNAYLQGDYEE	98		

CPn1019 und CT 861:

Range 1: 401 to 447 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
21.2 bits(43)	0.080	Compositional matrix adjust.	15/52(29%)	27/52(51%)	5/52(9%)
Query	363	SRQAKYARWLGIATATLGIAGAIAPMVGEISGDSILGFVQRISGRFKDATAK	414		
		S A Y LG++ G++ +IAP +SG +LG Q ++ + ++ K			
Sbjct	401	SLSALYVAKLGMSPLLLEGVVKSIAP---ALSG--MLGLTQGVVALYLQSSSQK	447		

Range 2: 201 to 231 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.9 bits(37)	0.45	Compositional matrix adjust.	11/31(35%)	21/31(67%)	1/31(3%)
Query	89	LMRSTSLPNLKPQSQTS-LASHRNPLAQQ	118		
		L+R+++ P+ G+SQ +S +S +P +QQ			
Sbjct	201	LLRTSTPPSKASGESQDSSEHSSKEDPHSQQ	231		

Range 3: 421 to 479 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.5 bits(36)	0.66	Compositional matrix adjust.	13/59(22%)	25/59(42%)	3/59(5%)
Query	418	KGIGKVFTSLSQLTEAASKVHELSESAVRVA---EYRKEVFRMRQDEVTRTIEEVKDN	473		
		K I + + LT+ + + S +RA + R E+ +DE E++ D+			
Sbjct	421	KSIAPALSGMLGLTQGVVALYLQSSSQKIRACCTQIDARIELINWERDEYFLRAEQLLDS	479		

Range 4: 120 to 207 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
17.3 bits(33)	1.2	Compositional matrix adjust.	23/94(24%)	40/94(42%)	12/94(12%)
Query	184	YSSSTIKEHSAKEKVSQSTKSAETQKHTQTKSDATLSPMSLYSTLHKE----VPQALSST	239		
		+SS S K S+ K +E HT L+S+L K+ + + + S			
Sbjct	120	FSSELSARDSTKPSSEPIKPSENLLHTPEHHK-----ELFSSLKKNLSPIMEEIDSF	173		
Query	240	KSQKDEEHR--DQRQQEGYEQEQEQEKGKKTTP	271		
		++ + E R Q+++E QEQ+ + TP			
Sbjct	174	SAETESLEERLVTQKKEETVAQEQQKHP LLRTSTP	207		

Range 5: 251 to 270 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #5

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
-------	--------	--------	------------	-----------	------

16.2 bits(30) 3.3 Compositional matrix adjust. 7/20(35%) 8/20(40%) 0/20(0%)

```
Query 70 LPPKEKPLQEEQFLVKNLIL 89
      +PP L K GIL
Sbjct 251 IPPTVGIFSLSYLLTKQGIL 270
```

CPn1019 und CT_860:

Range 1: 209 to 493 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
246 bits(627)	1e-78	Compositional matrix adjust.	124/291(43%)	192/291(65%)	7/291(2%)
Query 208		QKHTQTKSDATLSPMSLYSTLHKEVPQALSSTKSQKDEEHRDQRQQEGYEQEQQEEGK			267
Sbjct 209		QK+ + A LSPM+L+ T ++ A +++D R +Q+QE++E			267
Query 268		KKTPWCTVESLQQTSSSNQVYESYTP-IIPDPIVEFALSSESQSVLAGKRVTNLDVLRIC			326
Sbjct 268		-----LAISASFSLSHSKKRREHHFDPEYLPPEIREFALSEAQSLQLLHIRLNHLDILRIC			322
Query 327		TELMKMLKSRANDTMRLEERELMEREAEHLAASYSRQAKYARWLGIATATLGILGAIA			386
Sbjct 323		E+MKLML SR D + R R +EA ++A S+++QA+ +WLGATATLGI G I+			382
Query 387		PMVGEISGDSILGFVQRISGRFKDATAKTFKIGKVFVTSLSQLTEASKVHELSESAVR			446
Sbjct 383		PIIGELGGEGLLNVIRKATGGWQQASSKTFEFGMGKVCSSSELAKVSTVYDLRANAVR			442
Query 447		AVAEYRKEVFRMRQDEVTRTIEEVKDNWKSMDNLLNQLQTEHDAARSLYQ			497
Sbjct 443		+AE KE+FR+ DE+ R+IEE+KD+W++MD+FLL ILQT+HDA RSLYQ			493

Cpn1020 und Cpn1021 (LcrH_2):

Range 1: 72 to 87 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
22.7 bits(47)	0.006	Compositional matrix adjust.	6/16(38%)	11/16(68%)	0/16(0%)
Query 387		KIITIIQWVVYLPVI			402
Sbjct 72		K IT+ +W+V+ P +			87

Range 2: 153 to 168 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
-------	--------	--------	------------	-----------	------

16.2 bits(30) 0.96 Compositional matrix adjust. 7/17(41%) 12/17(70%) 1/17(5%)

Query 375 KHLPIKNEELRRKIITI 391
+H P+ NE L+ +I+ I
Sbjct 153 QHKPLYNE-LKEEILDI 168

Cpn1020 und CPn1022:

Range 1: 376 to 415 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
17.7 bits(34)	1.0	Compositional matrix adjust.	11/40(28%)	19/40(47%)	3/40(7%)

Query 301 IETIKVSI EK---EK RERLWGSLS DIIGWLAPFVSIGIGI 337
++T+ V I K EK++ W ++ L IG+ I
Sbjct 376 VDTLTVLISKINNEK KDIDWSENEEMKALLNRAKEIGVTI 415

Range 2: 138 to 157 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.2 bits(30)	3.2	Compositional matrix adjust.	8/20(40%)	14/20(70%)	0/20(0%)

Query 169 SLYSQSLDSEQQE LLSRRE 188
SL + DS+QQ+ LQ+ ++
Sbjct 138 SLKPEISDSKQQALQTPKD 157

CPn1020 und CT_576 (LcrH_1):

Range 1: 81 to 92 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.2 bits(30)	1.3	Compositional matrix adjust.	4/12(33%)	8/12(66%)	0/12(0%)

Query 260 VF TLSYLLTKQG 271
++T++Y QG
Sbjct 81 IYTVAYTFYSQG 92

Range 2: 179 to 205 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.6 bits(26)	4.0	Compositional matrix adjust.	12/29(41%)	17/29(58%)	2/29(6%)

Query 203 KIETKVQIKDLCKDLFSQDQDSNQKQKKS 231
 K E KV +KD C + Q D+ K++KS
 Sbjct 179 KP EYKV-LKDRCS-IMKQSLDAVLKKEKS 205

CPn1020 und CT 577:

Range 1: 50 to 59 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.6 bits(26)	2.0	Compositional matrix adjust.	5/10(50%)	7/10(70%)	0/10(0%)

Query 217 LFSQDQDSNQ 226
 +FS+ QD Q
 Sbjct 50 MFSEIQDEKQ 59

Range 2: 30 to 53 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
13.9 bits(24)	3.4	Compositional matrix adjust.	8/24(33%)	14/24(58%)	0/24(0%)

Query 422 AIKGIQPAIESTMAALRCAILFSQ 445
 A++ +Q A+ S L A +FS+
 Sbjct 30 ALQELQNAMISFSQDLPLAQMFSE 53

CPn1020 und CT 578:

Range 1: 163 to 267 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
21.9 bits(45)	0.054	Compositional matrix adjust.	23/106(22%)	47/106(44%)	15/106(14%)

Query 251 PVIPPPSIG----VFTLSYLLTKQGILSDFSSYGCHKDSVESTQRELDALHEKRIETIKV 306
 P +P PS V +S L K I + S ++ +STQ + +++ +E+ +
 Sbjct 163 PGLPKPSTTPRQEVMEISLALAK-AITALGESTQAALNFQSTQSQSANMNKMSLESQGL 221

Query 307 SIEKEKRE-----RLWGSLSDIIGWLAPFVSIIGIVAILS 342
 I+KE+ E S D + + V++ I +++++S
 Sbjct 222 KIDKEREFEFKMQEIQKSGTNSTMDTVNKVMIGVTVAITVISVVS 267

Range 2: 185 to 198 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
-------	--------	--------	------------	-----------	------

14.6 bits(26) 8.6 Compositional matrix adjust. 8/14(57%) 8/14(57%) 0/14(0%)

```
Query 424 KGIQPAIESTMAAL 437
          K I     EST AAL
Sbjct 185 KAITALGESTQAAL 198
```

CPn1020 und CT 579:

Range 1: 192 to 220 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
19.6 bits(39)	0.20	Compositional matrix adjust.	9/32(28%)	20/32(62%)	3/32(9%)

```
Query 307 SIEKEKRERLWGSLSDIIGWLAPFVVSIGIGIV 338
          + E + ++ L   +++I+G+   VS+G GI+
Sbjct 192 ATELQAQQLSISGITNIVGFA---VSVGGGIL 220
```

CPn1020 und CT 863:

Range 1: 309 to 329 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
21.6 bits(44)	0.055	Compositional matrix adjust.	10/21(48%)	15/21(71%)	0/21(0%)

```
Query 94 NTSQAQTSSPWNLFSSQKNSTE 114
          +T Q +  SP +LFS +N+TE
Sbjct 309 STFQKRPPSPMSLFSSQNATE 329
```

Range 2: 303 to 316 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.5 bits(31)	2.2	Compositional matrix adjust.	8/14(57%)	10/14(71%)	2/14(14%)

```
Query 221 DQDSNQK--QKKSP 232
          DQ+SNQ  QK+ P
Sbjct 303 DQESNQSTFQKRPP 316
```

Range 3: 253 to 268 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
-------	--------	--------	------------	-----------	------

16.2 bits(30) 2.7 Compositional matrix adjust. 6/16(38%) 11/16(68%) 0/16(0%)

Query 471 DHYERSQELLDNMESS 486
DH + ++L D+M+ S
Sbjct 253 DHSYQEEDLSDDMQVS 268

Range 4: 235 to 281 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.2 bits(30)	3.0	Compositional matrix adjust.	13/51(25%)	22/51(43%)	4/51(7%)

Query 187 REERSETYANQQSSEKKIETKVQIKDLCKDLFSQDQDSNQKQKKSPFQQDT 237
RE+R E+ + Q +DL D+ Q S+ K+ P ++T
Sbjct 235 REKRDGQQERHSDQEQNSDHSYQEEDLSDDM----QVSSSKRSSHPEDENT 281

Range 5: 4 to 38 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #5

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.2 bits(30)	3.1	Compositional matrix adjust.	14/35(40%)	16/35(45%)	2/35(5%)

Query 254 PPPSIGVFTLSYLLTKQGILSDFSSY--GCHKDSV 286
P P V T + L + G S FSS G K SV
Sbjct 4 PTPLESSVPTNASLKGEPGSSSQFSSAEKGVLKTSV 38

Range 6: 161 to 184 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #6

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.4 bits(28)	4.7	Compositional matrix adjust.	7/24(29%)	12/24(50%)	0/24(0%)

Query 419 IEGAIKGIQPAIESTMAALRCAIL 442
I+G PA T+ A+ +I+
Sbjct 161 IQGLNTPFSPAARCTIRAVPLSIV 184

CPn1020 und CT_862 (LcrH_2):

Range 1: 156 to 171 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
19.2 bits(38)	0.11	Compositional matrix adjust.	7/16(44%)	12/16(75%)	0/16(0%)

Query 33 ISYSITVAPQEAQKSL 48
I Y++ P+EA+K+L
Sbjct 156 ICYTLLNNPEEA EKAL 171

Range 2: 159 to 172 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.5 bits(31)	0.80	Compositional matrix adjust.	8/15(53%)	12/15(80%)	1/15(6%)
Query	124	TMPKSPEKTSEKALD	138		
		T+ +PE+ +EKALD			
Sbjct	159	TLLNNPEE-AEKALD	172		

Cpn1020 und CT 861:

Range 1: 1 to 506 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
271 bits(692)	5e-88	Compositional matrix adjust.	182/524(35%)	290/524(55%)	33/524(6%)
Query	1	MSSWLSQASEVLLNQDPYIPDAPRSQESSVPKISYSITVAPQEAQKSLPKFFTQKFQSQC	60		
		MSSW +QA++V L+Q +PDA + ++ K YS +++ + A + K F SQ			
Sbjct	1	MSSWFAQATDVALSQTLDLPDASLAIQTE--KFPYSCSISKESAPSCIQKIFAH-LASQK	57		
Query	61	KSEPPITHHKTFIIATPRERILRFGSSFESQLHNTSQAQTSSPWNLFQKNSTEASKALM	120		
		+S P TP+ERIL FGSS SQL +T + TSSPWNLF + +++ L			
Sbjct	58	ESAP--LSFSRLQPTTPKERILFFGSSPSSQLSSTVRTTSSPWNLFNSQTRNSTRKLS	115		
Query	121	QEL-----TMPKS--PEKTSEKALDKNLSSKQEGSCKNFDTLHLQQLHLKFLGTV	167		
		++L T P S P K SE NL E + F +L + +			
Sbjct	116	EKLHFSSELSARDSTKPSSEPIKPE-----NLLHTPEHHKELFSSLKKNLSPIMEEI	170		
Query	168	DSLYSQSLDSEQQELLQSRREERSETYANQQSSEKKIETKVQIKDLCKDLFSQDQDSNQK	227		
		DS +S +S ++ L+ ++EE T A +Q + T + SQD S			
Sbjct	171	DS-FSAETESLEERLVTQKKEE---TVAQEQQ-HPLLRTSTPPSKASGE--SQD-SSEHS	222		
Query	228	QKSPFQDTSRK--NRIAKAAQAVPVIPPPSIGVFTLSYLLTKQGILSDFSSYGCHKDS	285		
		K+ P Q S K R +A + VP+I PP++G+F+LSYLLTKQGIL+DFS+Y +KD+			
Sbjct	223	SKEDPHSQP SHKIQRRKERAKRVVPIIIPPTVGIFLSYLLTKQGILADFSAYSAYKDN	282		
Query	286	VESTQRELDALHEKRIETIKVSIEKEKRERLWGSLSDIIGWLAPFVSIIGIVAILSGGG	345		
		+E+TQ+EL LH++RIE ++ ++K K R W SL+ I+ + P++ +G+ + I GGG			
Sbjct	283	LETTQELTMLHQERIEQVQKIVDKSKTTRFWDASLIVATIIPWIEMGVAVTIIALGGG	342		
Query	346	IFAFAGFFAGLISLVIKCLEKLFWDWLEKHLPIKNEELRRKIITIIQVWVYLPVILSI	405		
		I ++ FA LI +V+ LE W + KHLP + E + + + ++ + + +LS+			
Sbjct	343	ILSWCSLFAALIMIVLSLLEAFDGWRAIAKHLPGNDLEKMRYLGYVKLALTVFSCLLSL	402		
Query	406	CTLKVENLGFSP IIEGAIKGIQPAIESTMAALRCAILFSQAEIYKLGKLTQIQLDIELK	465		
		L V LG SP++EG +K I PA+ + + L+ Q+ K++ T+I IEL			
Sbjct	403	SALYVAKLGMSPLELGVVKSIAPALSGMLGLTQGVLYLQSSSQKIRACCTQIDARIELI	462		
Query	466	SFDRDDHYERSQELLDNMESFEALSRIILNMYRELDQVYLHSLR	509		
		+++RD+++ R+++LLD+M++SFE L+ L RE+DQ + +LR			
Sbjct	463	NWERDEYFLRAEQLLDSMQTSFEQLTETLQLQREIDQTFDALR	506		

Cpn1020 und CT 560:

Range 1: 333 to 390 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.9 bits(37)	0.48	Compositional matrix adjust.	18/65(28%)	23/65(35%)	7/65(10%)
Query	291	RELDALHEKRIETIKVSIKEKRERLWGSLSDIIGWLAPFVSIIGIVAILSGGGIFAF	350		
		RE D L E+R E +K + + I WL GI + GGI			
Sbjct	333	REQDLL-ERRSTRTHFMQEAKKIADSFQAKQARITKWL-----GIATATLGIFGGISPII	385		
Query	351	GFFAG 355			
		G G			
Sbjct	386	GELGG 390			

Range 2: 309 to 341 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.5 bits(36)	0.56	Compositional matrix adjust.	10/33(30%)	18/33(54%)	1/33(3%)
Query	155	LHLQ-QHLKLFQTVDSLYSQSLDSEQQELLQSR 186			
		LH++ HL + + L+S +Q+LL+ R			
Sbjct	309	LHIRLNHLDILRICAIEIMKMLNSREQDLLERR 341			

Range 3: 208 to 266 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.2 bits(30)	2.7	Compositional matrix adjust.	20/70(29%)	33/70(47%)	14/70(20%)
Query	137	LDKNLSSKQEGSCKNFDTLHLQQHLKLFQTV---DSLYSQSLDSEQQELLQSRREERSET 193			
		L KNLSS + L + LF T ++L + L E+++L S+ +R			
Sbjct	208	LQKNLSSPRAA-----LLSPMALFETTAQKETLAREGLLHEREDL--SQEGDRDHH 256			
Query	194	YANQQSSEKK 203			
		++QQ EK+			
Sbjct	257	QSDQQQEEKE 266			

CPn1021 (LcrH_2) und CPn1022:

Range 1: 312 to 332 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
19.6 bits(39)	0.074	Compositional matrix adjust.	8/21(38%)	14/21(66%)	1/21(4%)
Query	80	LVFFNPV-SKFWFSLGASLH 99			
		+ F+ F+ SK S+G+S+H			
Sbjct	312	MSVFSRFIPSKNPLSVGSSIH 332			

Range 2: 305 to 323 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.0 bits(27)	2.0	Compositional matrix adjust.	7/22(32%)	10/22(45%)	3/22(13%)
Query	16	KEDFPFPDDLESYLEGYVPDKN	37		
		K+ P P S ++P KN			
Sbjct	305	KKKLPSP---MSVFSRFIPSKN	323		

Range 3: 199 to 207 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
13.5 bits(23)	6.6	Compositional matrix adjust.	6/9(67%)	7/9(77%)	0/9(0%)
Query	7	LLEKIAASS	15		
		LLE+ ASS			
Sbjct	199	LLEQQKASS	207		

CPn1021 (LcrH 2) und CT 576:

Range 1: 66 to 189 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
48.9 bits(115)	3e-12	Compositional matrix adjust.	32/124(26%)	57/124(45%)	0/124(0%)
Query	42	TYQKIFKISSEDLEKVYKEGYHAYLDKDYAKSITVFRWLVFNPVSKFWFSLGASLHMS	101		
		T Q+I +S LE++Y Y Y Y ++I +F+ L P K+ L + H			
Sbjct	66	TLQQILGLSDVLLLEEIYTVAYTFYSQGYQEAIQLFQILTASKPQCYKYILGLSSCYHQL	125		
Query	102	EQYSQALHAYGVTAVLRDKDPYPHYAYICYTLTNEHEEEAEKALEMAWVRAQHKPLYNEL	161		
		+ Y +A + + + ++P P YY N+ EE++ L++ ++KP Y L			
Sbjct	126	KMYDEAAFQFFLAFDAQPENP IPPYYIADSLMKLNQPEESQDFLDITIDMCKNKPEYKVL	185		
Query	162	KEEI	165		
		K+			
Sbjct	186	KDRC	189		

CPn1021 (LcrH 2) und CT 862 (LcrH 2):

Range 1: 27 to 197 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
243 bits(619)	4e-86	Compositional matrix adjust.	115/171(67%)	138/171(80%)	0/171(0%)
Query	1	MSHLNYLEKIAASSKEDFPFPDDLESYLEGYVPDKNIALDITYQKIFKISSEDLEKVYKE	60		
		M HL YLL+KIA S P PD++E+Y E Y+P+K+I LDTYQKIFK+SSEDLE+VYKE			
Sbjct	27	MRHLAYLLDKIARSYHHMCPDPNMEAYFENYIPNKDIPLDITYQKIFKLSSEDLEQVYKE	86		

```

Query 61  GYHAYLDKDYAKSITVFRWLVFFNPFVSKFWFSLGASLHMSEQYSQALHAYGVTAVLRDK 120
          GY+AYL DY +S T F WL+FFNPFVSKFWFSLGASLHM ++Y QALHAYGV A+LR+K
Sbjct 87  GYNAYLQGDYEESSSTAFYWLIFFNPFVSKFWFSLGASLHMLQKYQQALHAYGVAALLREK 146

Query 121 DPYPHYAYICYTLTNEHEEAEKALEMAWVRAQHKLPLYNELKEEILDIRKH 171
          DPYPHYAYICYTL N EEA EKAL++AW + + Y+ LKEEIL I+ +
Sbjct 147 DPYPHYAYICYTLLNNPEEA EKALDLAWQKVKTSAYSSLKEEILAIKSY 197

```

Cpn1021 (LcrH 2) und CT 860:

Range 1: 80 to 92 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.2 bits(30)	0.87	Compositional matrix adjust.	6/13(46%)	10/13(76%)	0/13(0%)

```

Query 4  LNYLLEKIAASSK 16
          L YL ++ +ASS+
Sbjct 80  LKYLSQQTSA SSR 92

```

Range 2: 358 to 368 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.8 bits(29)	1.3	Compositional matrix adjust.	4/11(36%)	7/11(63%)	0/11(0%)

```

Query 70  YAKSITVFRWL 80
          +AK + +WL
Sbjct 358  FAKQARITKWL 368

```

CPn1022 und CT 576 (LcrH 1):

Range 1: 67 to 82 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.6 bits(26)	3.9	Compositional matrix adjust.	5/16(31%)	10/16(62%)	0/16(0%)

```

Query 351  MARILGQAEAEANELY 366
          + +ILG ++ E+Y
Sbjct 67  LQQILGLSDVLEEEIY 82

```

CPn1022 und CT 577:

Range 1: 23 to 46 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
-------	--------	--------	------------	-----------	------

16.2 bits(30) 0.50 Compositional matrix adjust. 9/24(38%) 15/24(62%) 0/24(0%)

```
Query 297 TSKKETTFKKKLPSPMSVFSRFIP 320
          SKKE+ ++L + M FS+ +P
Sbjct 23 VSKKESPALQELQNAMISFSQDLP 46
```

Range 2: 87 to 112 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
13.9 bits(24)	2.9	Compositional matrix adjust.	7/26(27%)	14/26(53%)	1/26(3%)

```
Query 83 PPEVVELEIQVVDLLVQLEH-AETIT 107
          P E +L ++ + + L+H ET+
Sbjct 87 PKEEAQLSQEISSIFLGLKHLTETVN 112
```

Range 3: 2 to 10 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
12.3 bits(20)	9.1	Compositional matrix adjust.	5/9(56%)	6/9(66%)	0/9(0%)

```
Query 257 SKKKKKKRG 265
          SKK K K+
Sbjct 2 SKKKHKHQ 10
```

CPn1022 und CT 578:

Range 1: 137 to 141 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.8 bits(29)	3.5	Compositional matrix adjust.	5/5(100%)	5/5(100%)	0/5(0%)

```
Query 455 HLQEI 459
          HLQEI
Sbjct 137 HLQEI 141
```

CPn1022 und CT 579:

Range 1: 312 to 317 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
-------	--------	--------	------------	-----------	------

15.0 bits(27) 6.6 Compositional matrix adjust. 5/6(83%) 5/6(83%) 0/6(0%)

Query 150 QALQTP 155
QAL TP
Sbjct 312 QALNTP 317

CPn1022 und CT 863:

Range 1: 1 to 482 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
308 bits(788)	9e-103	Compositional matrix adjust.	217/511(42%)	299/511(58%)	54/511(10%)
Query 1		MNMPVP-SAVPSANITLKED---SSTVSTA-SGILKTATGEVLVSVCTALEGSSSTDALIS			55
Sbjct 1		M+ P P S+VP+ N +LK + SS S+A G+LKT+ G+V++S + +G + T IS			57
Query 56		LALGQIILATQQELLQSTNVHQLLFLPPEVVELEIQVVDLLVQLEHAETITSEPQETQT			115
Sbjct 58		L+G + + QE L + +FLPPE VELEIQ+ ++ LE ET +S+ + Q			114
Query 116		QSRSEQTLQP-----QSSSKQSAL--SPRSLKPEISDSKQQALQTPKDSAVR			161
Sbjct 115		+ S QT P Q SS+ +L S SL P+ ++ Q L TP A R			173
Query 162		KHSEAPS----PETQARASLSQASSSQ-RSLPPQESAPERTLLEQQKASSFSPLSQFSA			216
Sbjct 174		A P +A + SQ+ S R+ S L Q+ +FS+			225
Query 217		EKQKEALTTKSHELYKERDQDRQREQHDKHDQEEDAESKKKKKRLGLVEAVAEPEG			276
Sbjct 226		+ K T + + +ER D++Q H QEED + E			282
Query 277		ENLDIAALIFSDQMRPPAE-ETSKKETTFFKKLPSMVSFRFIPSKNPLSVGSSIHGPI			335
Sbjct 283		E ++ + P + + ++TF+K+ PSPMS+FS S ++ P			333
Query 336		QTPKVENVFLRFMKLMARILGQAEAEANELYMRVKQRTDDVDTLTVLISKINNEKIDW			395
Sbjct 334		+ +VENVFLRFM+LMARILGQAEAEA+ELY+RVK+RTD+VD LT+L+SKINNEK IDW			392
Query 396		SENEEMKALLNRAKEIGVTIDKEYTWTEEEKRLLENVQMRKENMEKITQMERTDMQRH			455
Sbjct 393		+++EEM+AL+++AK++GV I + Y W+EE K+LLKEN+QMRKENMEKITQ+ERTDMQRH			451
Query 456		LQEISQCHQARSNVLKLKELMDTFIYNLRP	486		
Sbjct 452		LQEVSQCHQARSNVLKLKELMDTFIYNMRP	482		

CPn1022 und CT 862 (LcrH 2):

Range 1: 106 to 125 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
-------	--------	--------	------------	-----------	------

19.2 bits(38) 0.098 Compositional matrix adjust. 8/21(38%) 14/21(66%) 1/21(4%)

Query 312 MSVFSRFIPSKNPLSVGSSIH 332
+ F+ F+ SK S+G+S+H
Sbjct 106 LIFFNPFV-SKFWFSLGASLH 125

CPn1022 und CT 861:

Range 1: 288 to 297 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.4 bits(28)	5.0	Compositional matrix adjust.	5/10(50%)	7/10(70%)	0/10(0%)

Query 457 QEISQCHQAR 466
QE++ HQ R
Sbjct 288 QELTMLHQER 297

CPn1022 und CT 860:

Range 1: 216 to 281 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
23.5 bits(49)	0.014	Compositional matrix adjust.	20/66(30%)	30/66(45%)	5/66(7%)

Query 204 KASSFSPLSQFSAEKQKEALT----TSKSHELYKERDQDRQRE-QHDRKHDQEEDAESK 258
+A+ SP++ F QKE L + +L +E D+D Q + Q + K D A
Sbjct 216 RAALLSPMALFETTAQKETLAREGLLHEREDLSQEGDRDHHQSDQQEEDLAIASASFL 275
Query 259 KKKKKR 264
KKR
Sbjct 276 SHSKKR 281

Range 2: 75 to 91 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.2 bits(30)	2.6	Compositional matrix adjust.	8/17(47%)	11/17(64%)	0/17(0%)

Query 191 QESAPERTLLEQQKASS 207
+ES P + L +Q ASS
Sbjct 75 RESCPLKYLSQOTSASS 91

Range 3: 125 to 138 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.2 bits(30)	2.9	Compositional matrix adjust.	6/14(43%)	9/14(64%)	0/14(0%)

Query	324	PLSVGSSIHGPIQT	337
		P+S S + G +QT	
Sbjct	125	PISHKSFVQGRVQT	138

CT_576 (LcrH_1) und CT_577:

Range 1: 10 to 79 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
11.5 bits(18)	9.2	Compositional matrix adjust.	16/70(23%)	32/70(45%)	5/70(7%)

Query	6	SNNSKKPS---ASFNKKRSRLAEIAAQKKAKAED--LEQKYPVPTEETKQVLM DILQG	60
		++ S KP A +KK L E+ + ++D L Q + +E+ +M L G	
Sbjct	10	AHTSSKPKVEPAYVSKKESPALQELQNAMISFSQDLPLAQMFSEIQDEKQLAKMMAALSG	69

Query	61	LSNGLTLQQI	70
		+ + L ++ +	
Sbjct	70	MLDSL PVETL	79

CT_576 (LcrH_1) und CT_579:

Range 1: 379 to 391 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.6 bits(26)	3.0	Compositional matrix adjust.	7/16(44%)	12/16(75%)	3/16(18%)

Query	23	RLAEIAAQKKAKAEDL	38
		R+A +A +A+AE+L	
Sbjct	379	RMAGMA---EARAEEL	391

CT_576 (LcrH_1) und CT_863:

Range 1: 348 to 363 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.4 bits(28)	2.4	Compositional matrix adjust.	5/16(31%)	10/16(62%)	0/16(0%)

Query	67	LQQILGLSDVLEEEIY	82
		+ +ILG ++ E+Y	
Sbjct	348	MARILGQAEAEAEHELY	363

CT 576 (LcrH 1) und CT 861:

Range 1: 172 to 201 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
20.0 bits(40)	0.072	Compositional matrix adjust.	10/30(33%)	17/30(56%)	0/30(0%)
Query 15	SFNKKSRSRLAEIAAQKKAKAEDLEQKYPV		44		
	SF+ ++ S + QKK + EQK+P+				
Sbjct 172	SFSAETESLEERLVTQKKEETVAQEQLHPL		201		

Range 2: 132 to 192 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.5 bits(31)	0.88	Compositional matrix adjust.	17/61(28%)	25/61(40%)	14/61(22%)
Query 4	PSSNNSKKPS-----ASFNKKRSRLAEIAAQKKAKAEDLEQKYPVPTEEE		49		
	PSS+ KPS +S K + S + E A+ E LE++ +EE				
Sbjct 132	PSSSEPIKPSENLLHTPEHHKELFSSLKKNLSPIMEEIDSFSAETESLEERLVTQKKEE		191		
Query 50	T 50				
	T				
Sbjct 192	T 192				

Range 3: 35 to 48 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.8 bits(29)	1.8	Compositional matrix adjust.	6/14(43%)	10/14(71%)	0/14(0%)
Query 189	CSIMKQSLDAVLKK 202				
	CSI K+S + ++K				
Sbjct 35	CSISKESAPSCIQK 48				

CT 576 (LcrH 1) und CT 860:

Range 1: 314 to 339 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.4 bits(28)	2.0	Compositional matrix adjust.	8/26(31%)	11/26(42%)	0/26(0%)
Query 145	NPIPPYYIADSLMKLNQPEESQDFLD 170				
	N + I +MKL QD L+				
Sbjct 314	NHLDILRICAIEIMKMLNSREQDLLE 339				

CT 577 und CT 863:

Range 1: 326 to 347 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.8 bits(29)	0.72	Compositional matrix adjust.	7/22(32%)	10/22(45%)	0/22(0%)
Query	86	NPKEEAQLSQEISSIFLGLKHL	107		
		N EEA + ++FL L			
Sbjct	326	NATEEAPKEARVENVFLRFMRL	347		

Range 2: 31 to 47 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
13.9 bits(24)	3.5	Compositional matrix adjust.	7/17(41%)	8/17(47%)	0/17(0%)
Query	81	KGVFDNPKEEAQLSQEI	97		
		KGV + LSQ I			
Sbjct	31	KGVLKTSVGDVLSQSI	47		

CT 577 und CT 861:

Range 1: 426 to 437 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.1 bits(35)	0.16	Compositional matrix adjust.	10/18(56%)	11/18(61%)	6/18(33%)
Query	66	ALSGMLDLPVETLTQGV	83		
		ALSGML LT+GV			
Sbjct	426	ALSGMLG-----LTQGV	437		

CT 577 und CT 860:

Range 1: 302 to 307 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.6 bits(26)	1.6	Compositional matrix adjust.	6/6(100%)	6/6(100%)	0/6(0%)
Query	90	EAQLSQ	95		
		EAQLSQ			
Sbjct	302	EAQLSQ	307		

CT_578 und CT_577:

Range 1: 59 to 71 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
19.2 bits(38)	0.061	Compositional matrix adjust.	7/13(54%)	11/13(84%)	0/13(0%)
Query 471	QIAKALSAISGAL	483			
	Q+AK ++A+SG L				
Sbjct 59	QLAKMMAALSGML	71			

Range 2: 84 to 113 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.6 bits(26)	1.7	Compositional matrix adjust.	11/30(37%)	14/30(46%)	1/30(3%)
Query 223	IDKEREFFKMQEIQQKS-GTNSTMDTVNK	251			
	D +EE + QEI G +TVNK				
Sbjct 84	FDNPKEEAQLSQEISSIFLGLKHLTEVVK	113			

Range 3: 87 to 104 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
12.7 bits(21)	8.1	Compositional matrix adjust.	7/18(39%)	8/18(44%)	0/18(0%)
Query 166	PKPSTTPRQEVMEISLAL	183			
	PK QE+ I L L				
Sbjct 87	PKEEAQLSQEISSIFLGL	104			

CT_578 und CT_863:

Range 1: 98 to 114 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
17.7 bits(34)	0.90	Compositional matrix adjust.	8/17(47%)	11/17(64%)	0/17(0%)
Query 87	LAAGKETASADATSLTQ	103			
	A +ET S+D+ SL Q				
Sbjct 98	FQALEETPSSDSRSLQQ	114			

Range 2: 239 to 262 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.6 bits(26)	7.9	Compositional matrix adjust.	7/24(29%)	11/24(45%)	0/24(0%)

```

Query 37  DNQVKVQVQTRQNRDDLMESEDVA 60
           D Q ++      QN D      E D++
Sbjct 239 DGQQERHSDQEQNSDHSYQEEDLS 262
    
```

CT 578 und CT 861:

Range 1: 389 to 412 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
20.0 bits(40)	0.20	Compositional matrix adjust.	10/24(42%)	15/24(62%)	3/24(12%)

```

Query 256  VTVAITVISV---SALFTCGLGL 276
           V +A+TV S +  SAL+  LG+
Sbjct 389  VKLALTVFSCLLSLSALYVAKLGM 412
    
```

Range 2: 257 to 339 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
20.0 bits(40)	0.22	Compositional matrix adjust.	21/97(22%)	44/97(45%)	21/97(21%)

```

Query 176  VMEISLALAK-AITALGESTQAALNFQSTQSQSANMNKMSLESQGLKIDKEREEFKKMQ 234
           + +S L K I A + A +N ++TQ + +++      E +++Q
Sbjct 257  IFSLSYLLTKQGILADFSAYSAYKDNLETTQQELTMLHQ-----ERIEQVQ 302

Query 235  EIQQKSGTNSTMDTVNKVM-----IGVTVAITVISV 265
           +I KS T  D++ ++      I + VA+T+I++
Sbjct 303  KIVDKSKTTRFWDSLASIVATIIPWIEMGVAVTIIAL 339
    
```

Range 3: 307 to 333 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.8 bits(29)	3.9	Compositional matrix adjust.	6/28(21%)	16/28(57%)	1/28(3%)

```

Query 369  KNAVSKSFPKLSKVINTLGSKWVTLGVG 396
           K+ ++ + L+ ++ T+  W+ +GV
Sbjct 307  KSKTTRFWDSLASIVATI-IPWIEMGVA 333
    
```

CT 578 und CT 860:

Range 1: 242 to 266 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.1 bits(35)	0.72	Compositional matrix adjust.	11/33(33%)	14/33(42%)	8/33(24%)

```
Query 48 QNRDDLSMESDVAVAGTAGKDRAASASQIEGQE 80
      R+DLS E D +D S Q E +E
Sbjct 242 HEREDLSQEGD-----RDHHQSDQQQEEKE 266
```

Range 2: 345 to 355 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.9 bits(32)	1.7	Compositional matrix adjust.	7/11(64%)	8/11(72%)	0/11(0%)

```
Query 441 TLFWQQASKIA 451
      T F Q+A KIA
Sbjct 345 THFMQEAKKIA 355
```

Range 3: 404 to 408 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.5 bits(31)	2.1	Compositional matrix adjust.	5/5(100%)	5/5(100%)	0/5(0%)

```
Query 444 WQQAS 448
      WQQAS
Sbjct 404 WQQAS 408
```

Range 4: 419 to 470 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.8 bits(29)	3.8	Compositional matrix adjust.	12/52(23%)	23/52(44%)	11/52(21%)

```
Query 350 VKAAVKTLAKNVGKIFSAGKNAV---SKSFPKLSKV-----INTLGSKW 390
      V +++ LAK ++ NAV ++S+ +L ++ I L W
Sbjct 419 VCSSLSELAKVSVSTVYDLRANAVRTIAESYKELFRLEHDEMLRSIEELKDHW 470
```

Range 5: 395 to 415 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #5

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.0 bits(27)	6.4	Compositional matrix adjust.	7/21(33%)	11/21(52%)	0/21(0%)

```
Query 58 DVAVAGTAGKDRAASASQIEG 78
      +V T G +A+S + EG
Sbjct 395 NVIRKATGGWQQASSKTFEFG 415
```

Range 6: 81 to 97 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #6

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.6 bits(26)	9.6	Compositional matrix adjust.	7/17(41%)	11/17(64%)	0/17(0%)
Query	449	KIAAKQTESPSETQQQA	465		
		K ++QT + S TQ+ A			
Sbjct	81	KYLSQQTSASSRTQESA	97		

CT 579 und CT 863:

Range 1: 37 to 51 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.5 bits(31)	1.7	Compositional matrix adjust.	8/15(53%)	9/15(60%)	0/15(0%)
Query	214	SVGGGILSASKSLGG	228		
		SVG +LS S GG			
Sbjct	37	SVGDVVLSQSIEDGG	51		

Range 2: 60 to 70 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.2 bits(30)	2.7	Compositional matrix adjust.	5/11(45%)	8/11(72%)	0/11(0%)
Query	368	GVIGAQVAQEQ	378		
		GV+ +AQE+			
Sbjct	60	GVVNINMAQEE	70		

CT 579 und CT 862 (LcrH 2):

Range 1: 161 to 169 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
13.5 bits(23)	7.4	Compositional matrix adjust.	5/9(56%)	6/9(66%)	0/9(0%)
Query	314	LNTPSWSEK	322		
		LN P +EK			
Sbjct	161	LNNPEEAEK	169		

CT 579 und CT 861:

Range 1: 456 to 492 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
23.5 bits(49)	0.015	Compositional matrix adjust.	14/40(35%)	22/40(55%)	3/40(7%)
Query 385	EARAEEELKSLNSVQAQYASQAQQLQEESQQSFNSALQTLQ				424
	+AR E +N + +Y +A+QL + Q SF +TLQ				
Sbjct 456	DARIE---LINWERDEYFLRAEQLLDSMQTSFEQLTETLQ				492

Range 2: 472 to 506 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
23.1 bits(48)	0.016	Compositional matrix adjust.	14/37(38%)	23/37(62%)	4/37(10%)
Query 387	RAEELKSLNSVQAQY--ASQAQQLQEESQQSFNSALQ				421
	RAE+L L+S+Q + ++ QLQ + Q+F AL+				
Sbjct 472	RAEQL--LDSMQTSFEQLTETLQLQREIDQTFDALR				506

Range 3: 337 to 353 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
19.6 bits(39)	0.22	Compositional matrix adjust.	7/17(41%)	10/17(58%)	0/17(0%)
Query 213	VSVGGGILSASKSLGGL				229
	+++GGGILS L				
Sbjct 337	IALGGGILSWCSLFAAL				353

Range 4: 132 to 198 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.9 bits(32)	1.6	Compositional matrix adjust.	14/67(21%)	28/67(41%)	4/67(5%)
Query 317	PSWSEKVS RGMNVVKTQGTRAAKFAGRALSSAMNISQMVHGLTAGIDGIVGGVIGAQ---				373
	PS SE + N++ T F+ + I + + +A + + ++ +				
Sbjct 132	PSSSEPIKPSENLLHTPEHHKELFSSLKKNLSPIMEEIDSFSAETESLEERLVTQKKEE				191
Query 374	-VAQEQR				379
	VAQEQR+				
Sbjct 192	TVAQEQRK				198

Range 5: 482 to 506 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #5

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.5 bits(31)	2.2	Compositional matrix adjust.	7/25(28%)	14/25(56%)	0/25(0%)

Query	159	SSFQQQNQAIQNQVAMAPEIGNAIR	183
		+SF+Q + +Q Q + +A+R	
Sbjct	482	TSFEQLTETLQLQREIDQFTFDALR	506

CT 579 und CT 860:

Range 1: 377 to 435 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
20.0 bits(40)	0.17	Compositional matrix adjust.	20/63(32%)	33/63(52%)	9/63(14%)
Query	201	LISGITNIVGFAVSVGG-GILSA-SKSLGGLKSAA---FTNETASATTSATSSLAKTATS	255		
		+ GI+ I+G +GG G+L+ K+ GG + A+ F E S+ S LAK +++			
Sbjct	377	IFGGISPIIG---ELGGEGLLNVIRKATGGWQQASSKTFE-EGMGKVCSSLSSELAKVSST	432		
Query	256	ALD 258			
		D			
Sbjct	433	VYD 435			

Range 2: 364 to 390 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.5 bits(31)	2.2	Compositional matrix adjust.	10/27(37%)	13/27(48%)	3/27(11%)
Query	205	ITNIVGFA---VSVGGGILSASKSLGG	228		
		IT +G A + + GGI LGG			
Sbjct	364	ITKWLGIATATLGIFGGISPIIGELGG	390		

CT 863 und CT 861:

Range 1: 444 to 483 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
19.2 bits(38)	0.36	Compositional matrix adjust.	13/45(29%)	19/45(42%)	5/45(11%)
Query	224	SSQTVKTCSTGREKRGGQQRHSDQEONSDHSYQEEDLSDDMQVS	268		
		SSQ ++ C T + R D ++ + E L D MQ S			
Sbjct	444	SSQKIRACCTQIDARIELINWERD-----EYFLRAEQLLDSMQTS	483		

Range 2: 42 to 76 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.5 bits(36)	0.64	Compositional matrix adjust.	15/38(39%)	16/38(42%)	3/38(7%)

Query	124	APSGKVSIFSLQAQGSSQTRSLPSSQESLSPQQPARAI	161
		APS IF A +SQ S P S L P P I	
Sbjct	42	APSCIQKIF---AHLASQKESAPLSFSRLQPTPKERI	76

Range 3: 453 to 468 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.5 bits(31)	2.3	Compositional matrix adjust.	5/16(31%)	10/16(62%)	0/16(0%)

Query	381	SKINNEKGAIWNQDE	396
		++I+ I+W +DE	
Sbjct	453	TQIDARIELINWERDE	468

Range 4: 288 to 297 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.4 bits(28)	4.6	Compositional matrix adjust.	5/10(50%)	7/10(70%)	0/10(0%)

Query	453	QEVSQCHQAR	462
		QE++ HQ R	
Sbjct	288	QELTMLHQER	297

CT 863 und CT 860:

Range 1: 144 to 155 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.1 bits(35)	0.81	Compositional matrix adjust.	7/12(58%)	8/12(66%)	0/12(0%)

Query	5	TPLSSVPTNASL	16
		TPL S+P SL	
Sbjct	144	TPLRSIPVIISL	155

Range 2: 221 to 239 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
-------	--------	--------	------------	-----------	------

17.3 bits(33) 1.3 Compositional matrix adjust. 7/19(37%) 10/19(52%) 0/19(0%)

Query 317 SPMSLFSSQNATEEAPKEA 335
SPM+LF + E +E
Sbjct 221 SPMALFETTAQKETLAREG 239

CT_862 (LcrH_2) und CT576 (LcrH1):

Range 1: 66 to 193 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
61.2 bits(147) 2e-16 Compositional matrix adjust. 40/128(31%) 59/128(46%) 0/128(0%)					
Query	68	TYQKIFKLSSEDLQVYKEGYNAYLQGDYEESSSTAFYWLIFFPVSKFWFSLGASLHML	127		
Sbjct	66	T Q+I LS LE++Y Y Y QG Y+E+ F L P K+ L + H L	125		
Query	128	QKYQQALHAYGVAALLREKDPYPHYAYICYLLNNPEEA EKALDLAWQKVTSSAYSSL	187		
Sbjct	126	+ Y +A + +A + ++P P YY LN PEE++ LD+ K Y L	185		
Query	188	KEEILAIK 195			
Sbjct	186	K+ +K KDRCSIMK 193			

CT_862 (LcrH_2) und CT_861:

Range 1: 476 to 486 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.6 bits(26) 3.0 Compositional matrix adjust. 5/11(45%) 7/11(63%) 0/11(0%)					
Query	47	LPDNMEAYFEN 57			
Sbjct	476	L D+M+ FE LLDSMQTSFEQ 486			

Range 2: 383 to 389 [Graphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #2

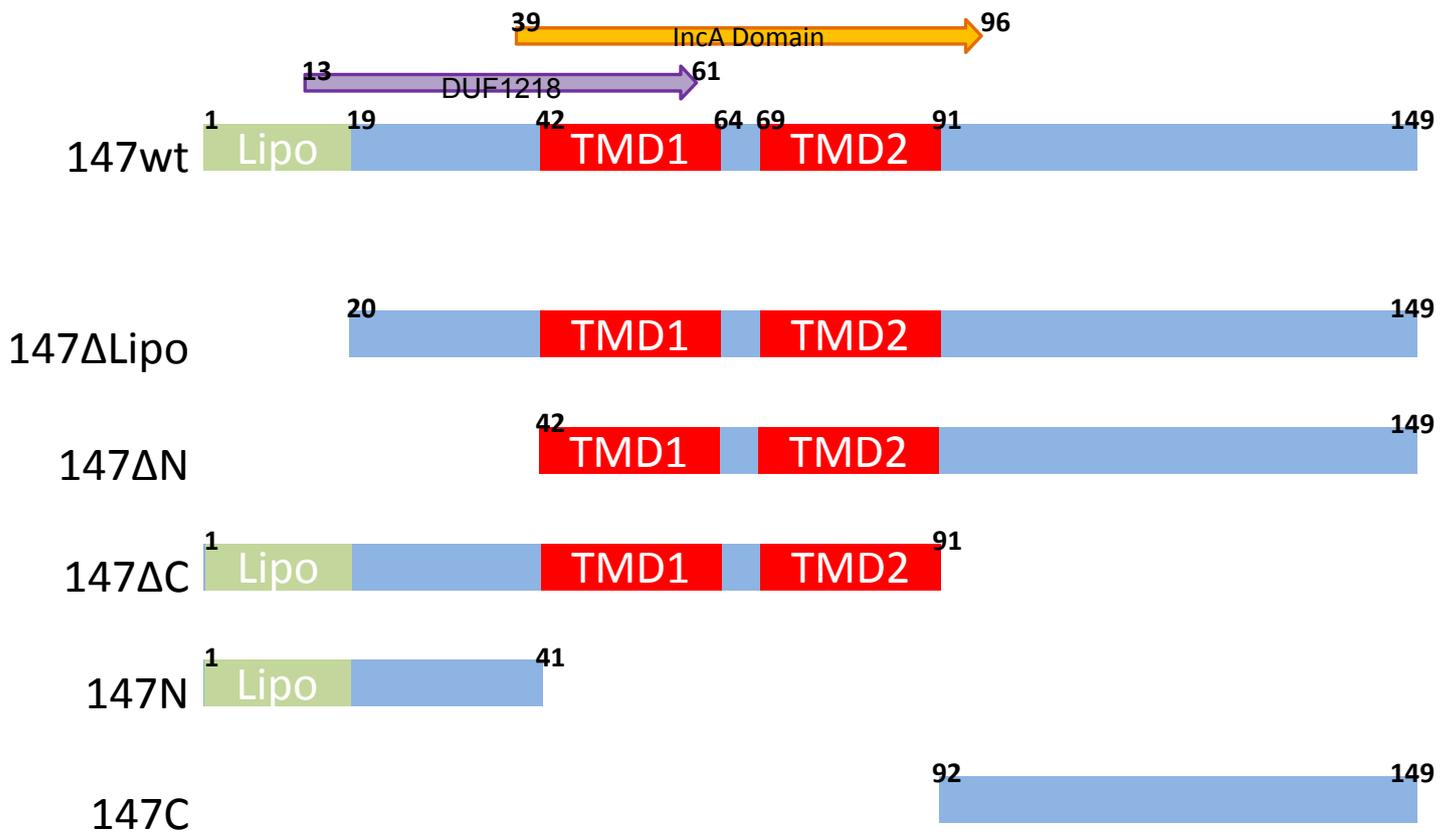
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
14.2 bits(25) 5.0 Compositional matrix adjust. 4/7(57%) 6/7(85%) 0/7(0%)					
Query	27	MRHLAYL 33			
Sbjct	383	MR+L Y+ MRYLGYV 389			

CT_862 (LcrH_2) und CT_860:

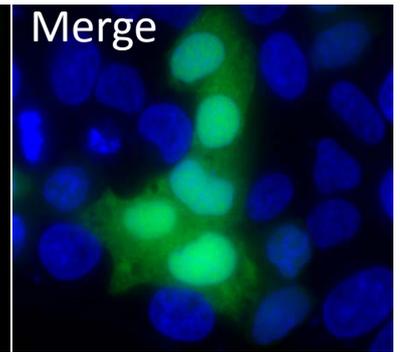
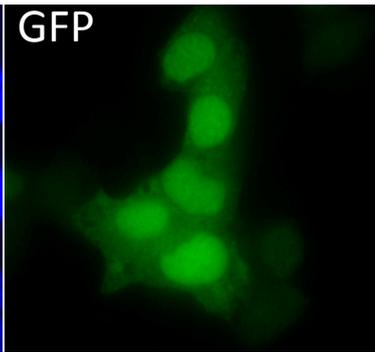
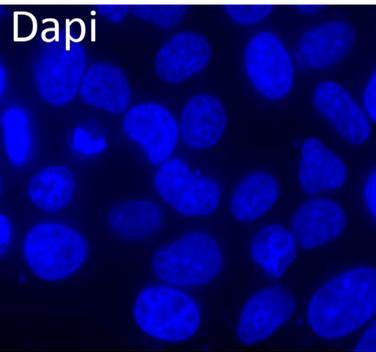
Range 1: 245 to 262 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
15.0 bits(27)	2.8	Compositional matrix adjust.	8/21(38%)	11/21(52%)	3/21(14%)
Query	78	EDLEQVYKEGYNAYLQGDYEE	98		
		EDL Q EG + Q D ++			
Sbjct	245	EDLSQ---EGDRDHHQSDQQQ	262		



147C_GFP



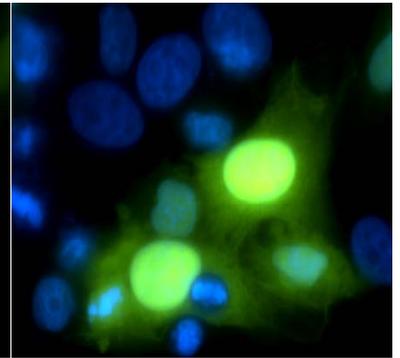
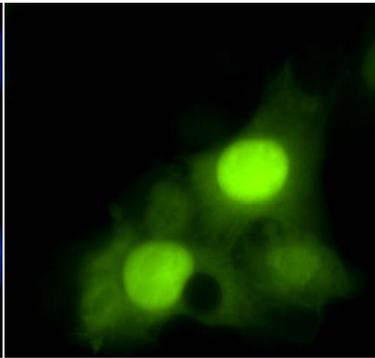
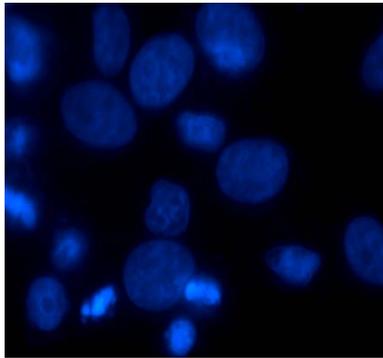
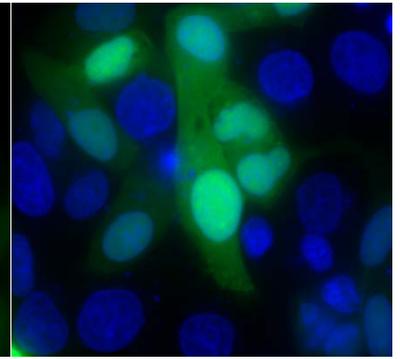
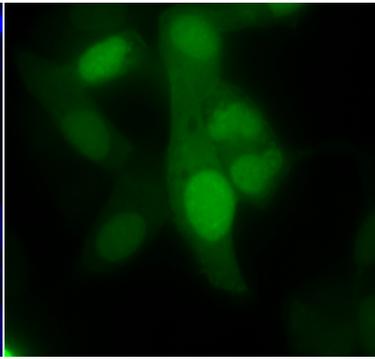
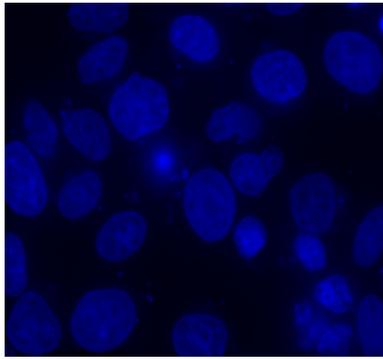
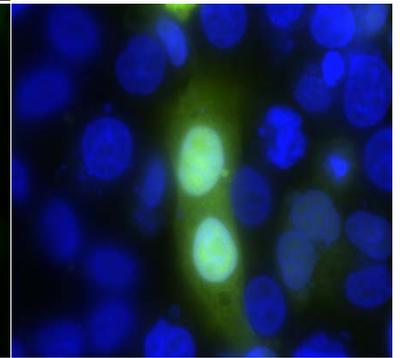
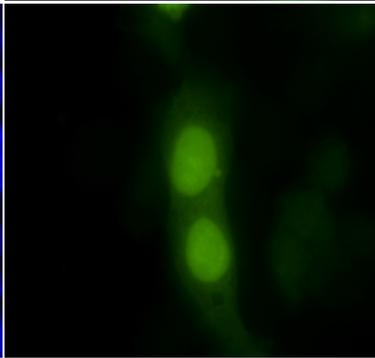
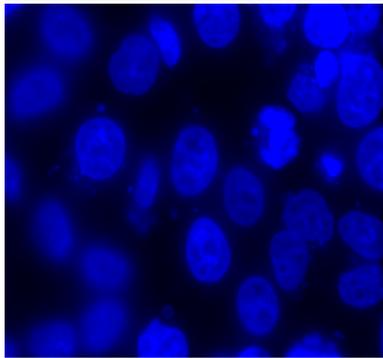
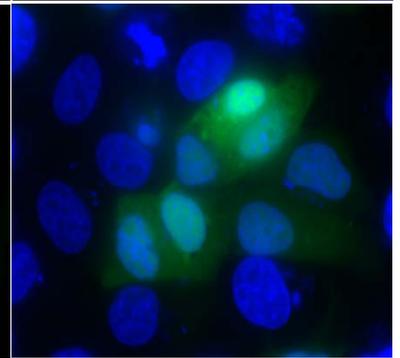
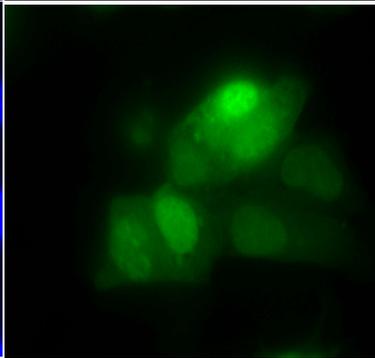
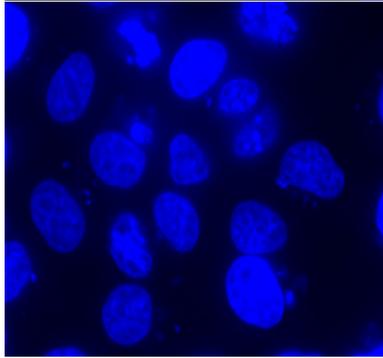
15h

18h

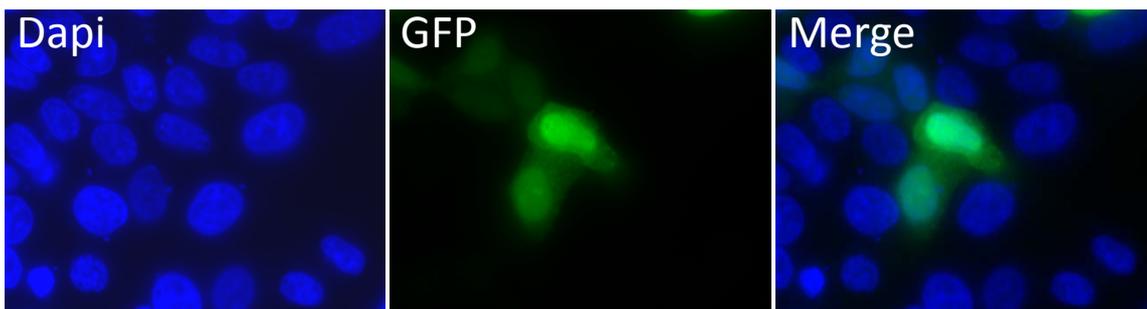
21h

24h

31h

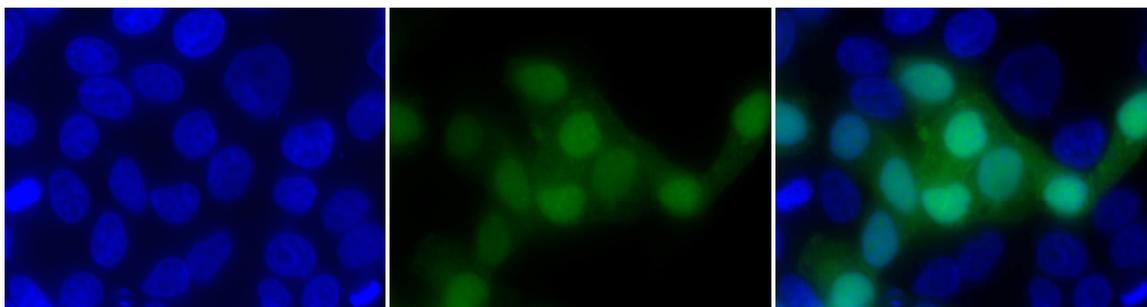


147N_GFP



15h

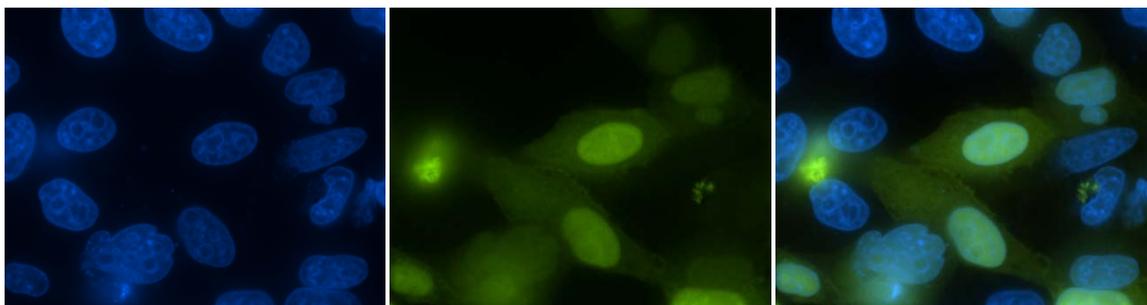
18h



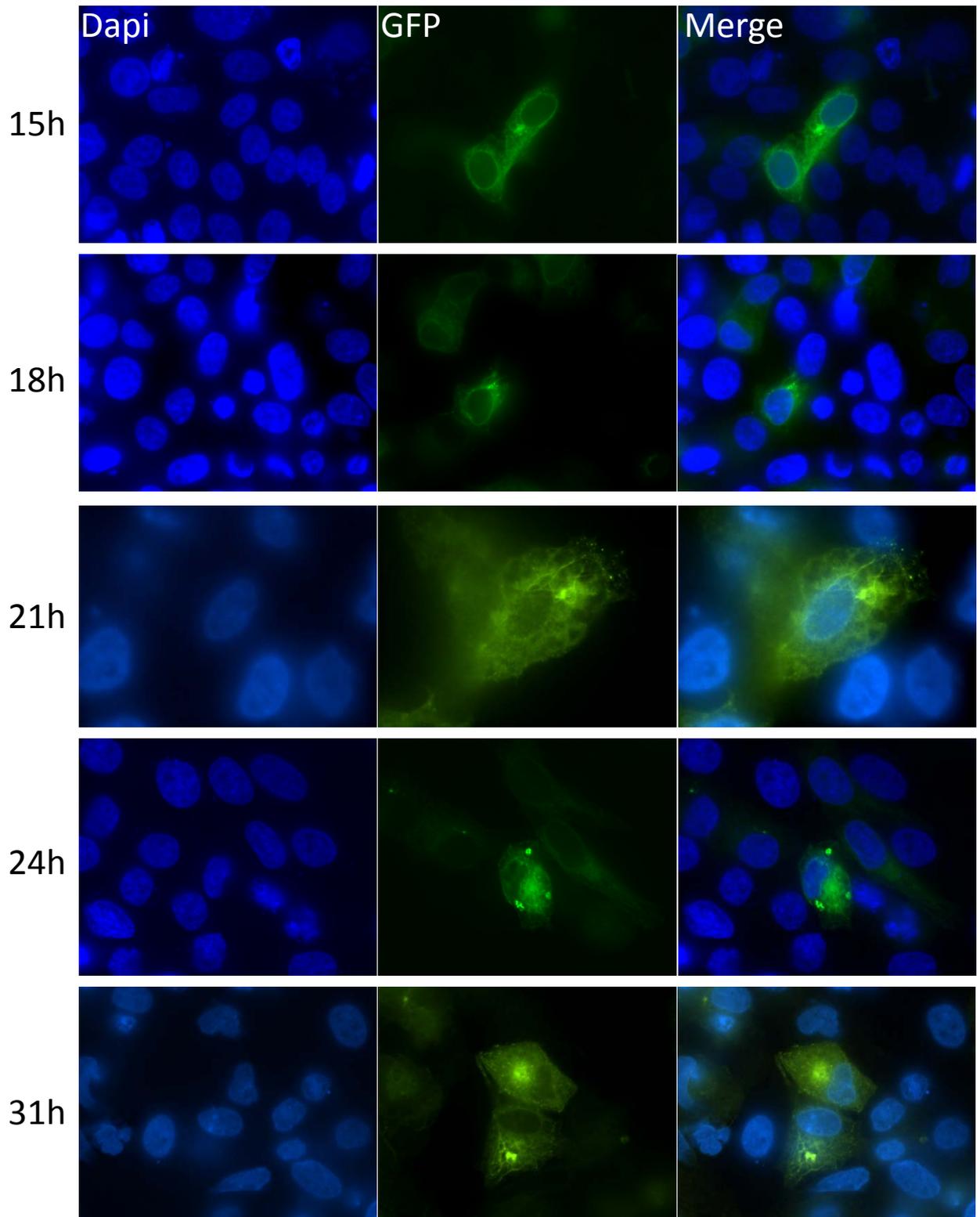
21h

24h

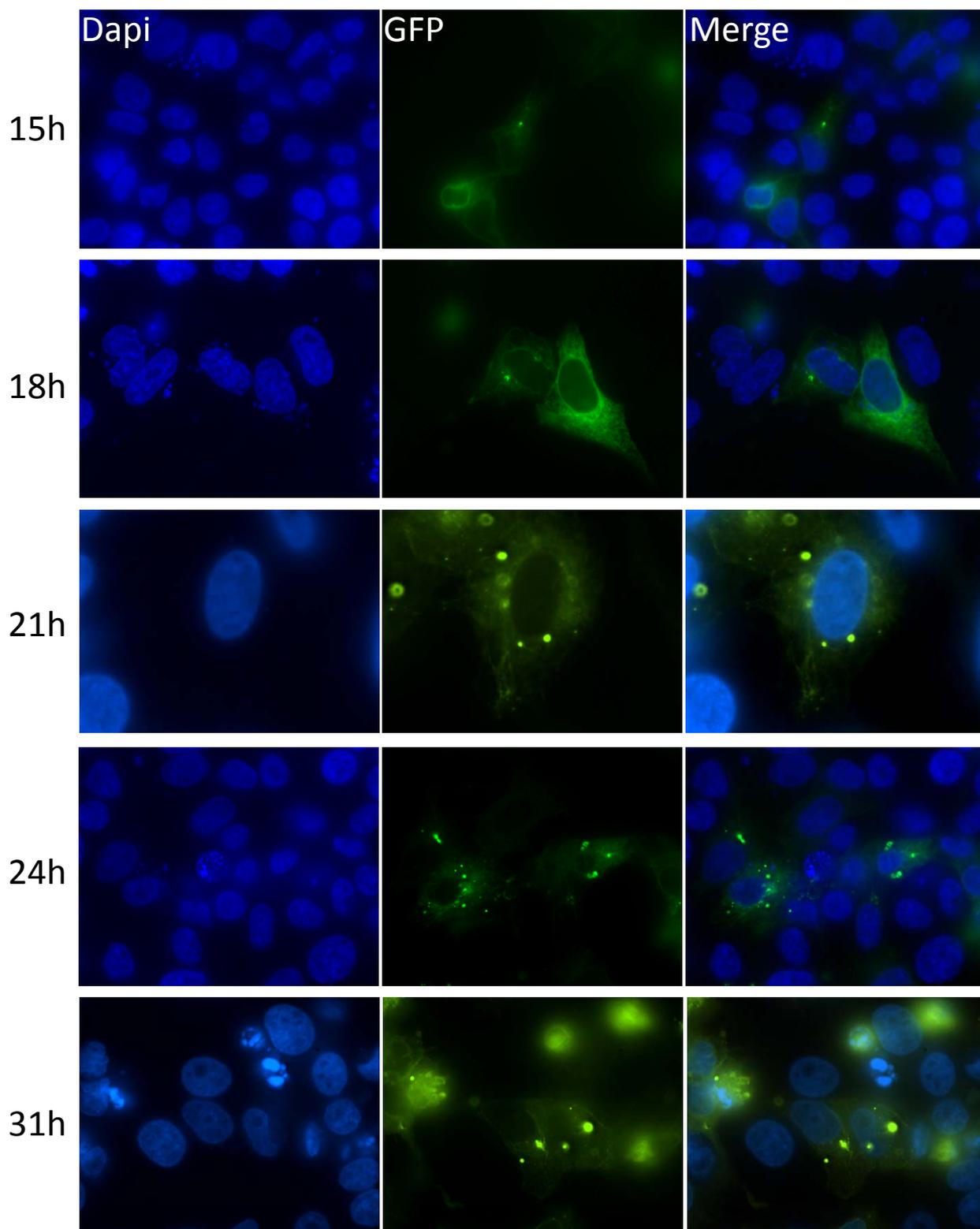
31h



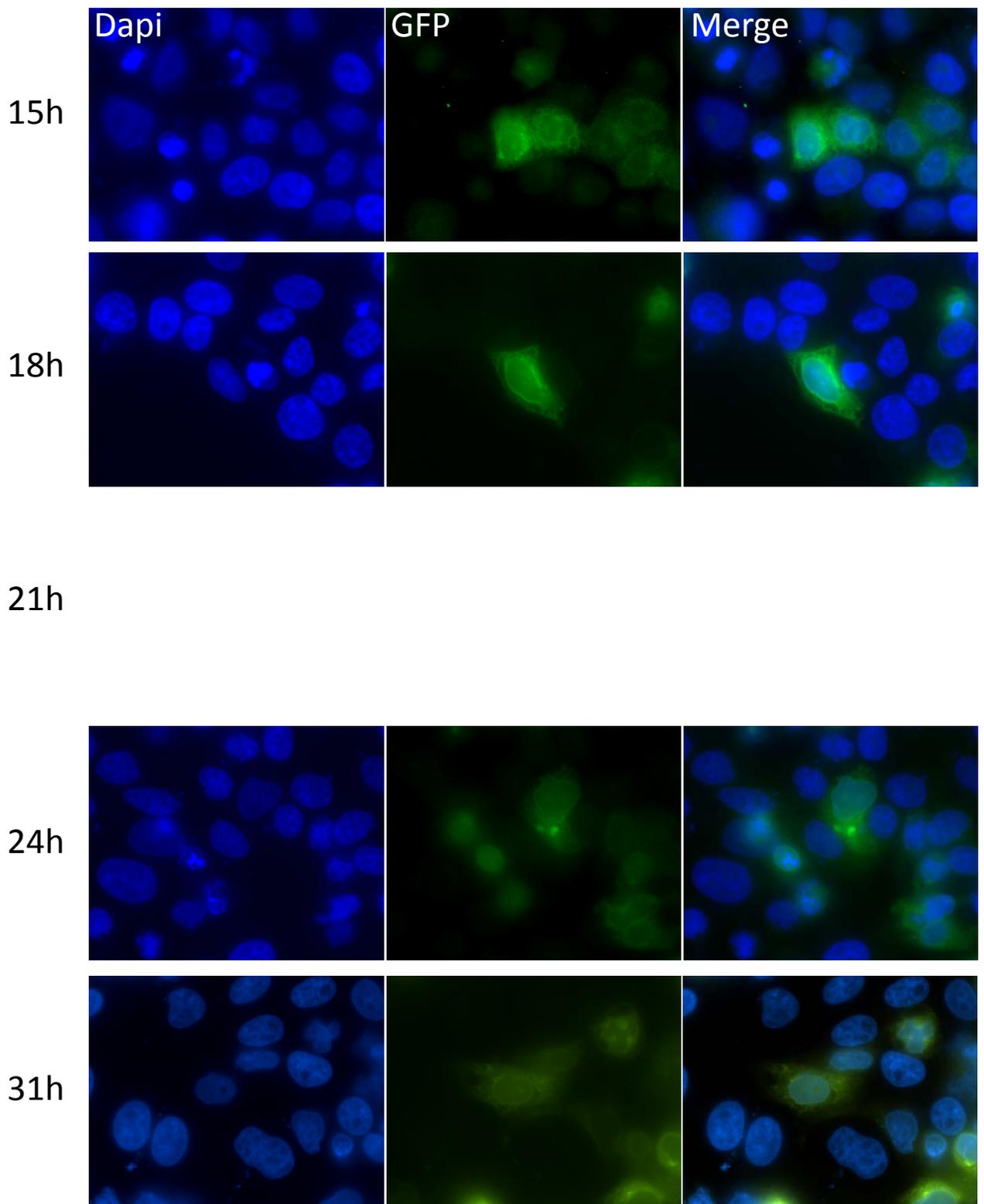
147 Δ Lipo_GFP



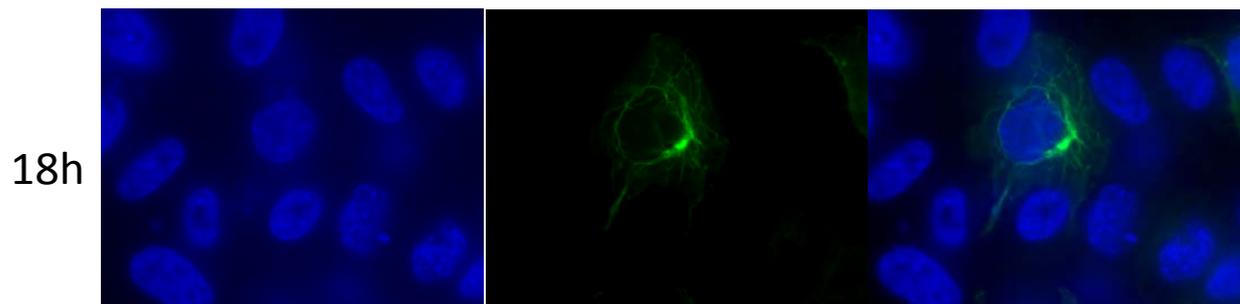
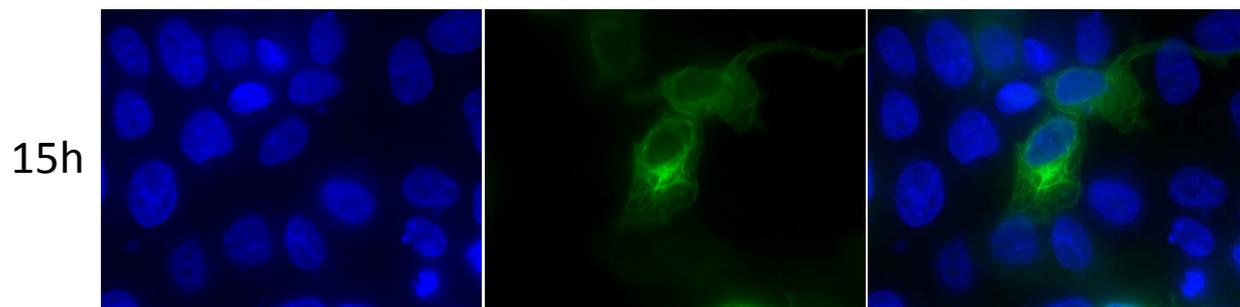
147 Δ N_GFP



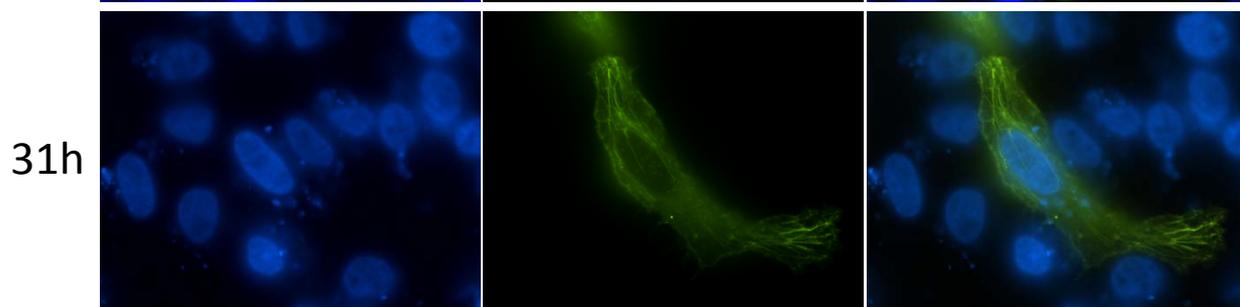
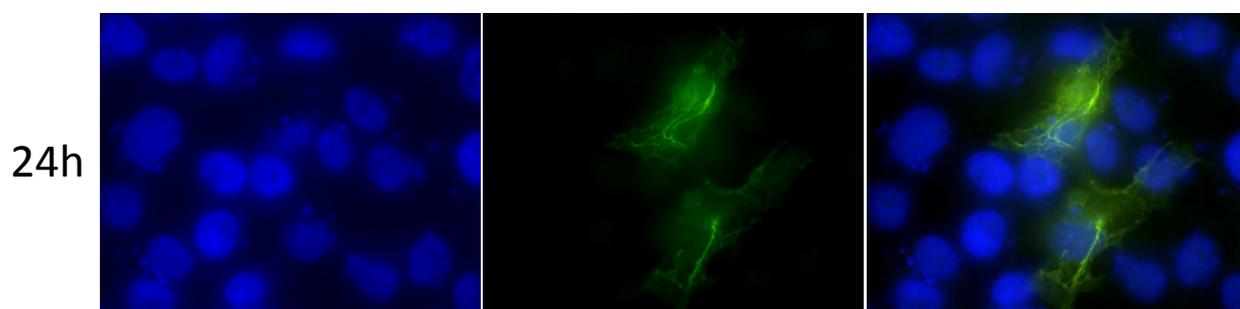
147 Δ C_GFP



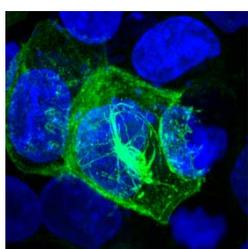
147wt_GFP



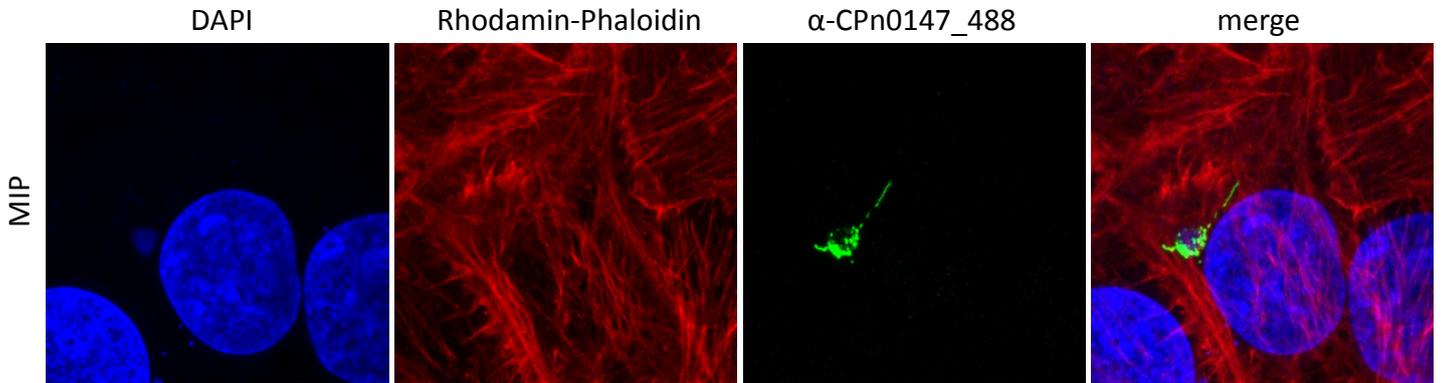
21h



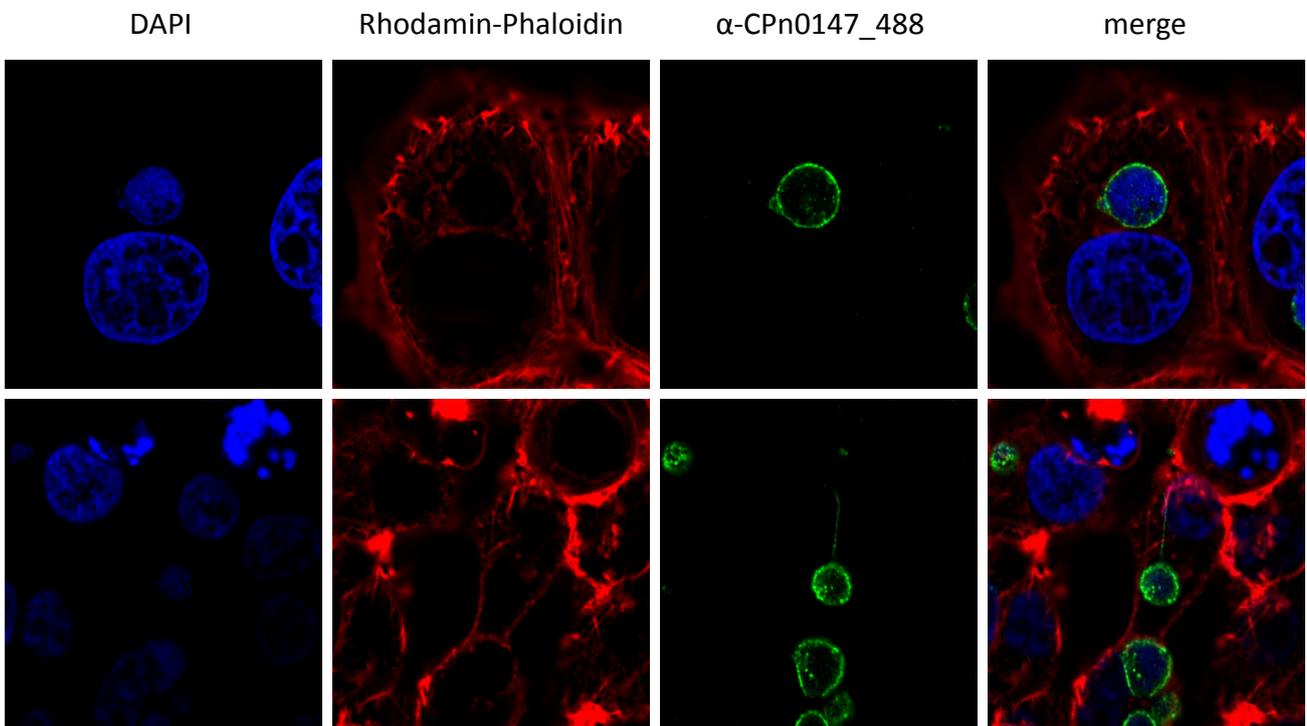
MIF 15h



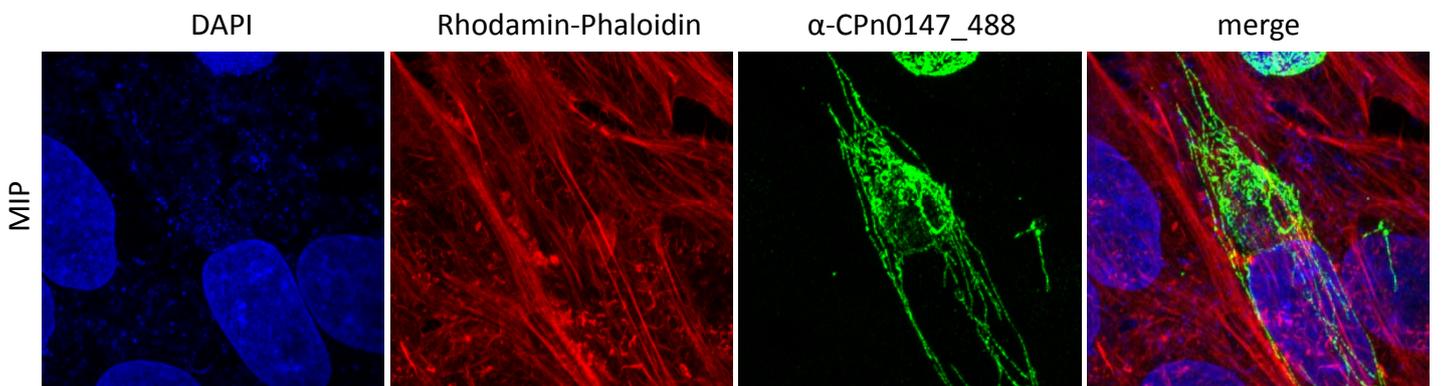
24 hpl Pfa 37°C fixed



48 hpl Pfa 37°C fixed



72 hpl Pfa 37°C fixed



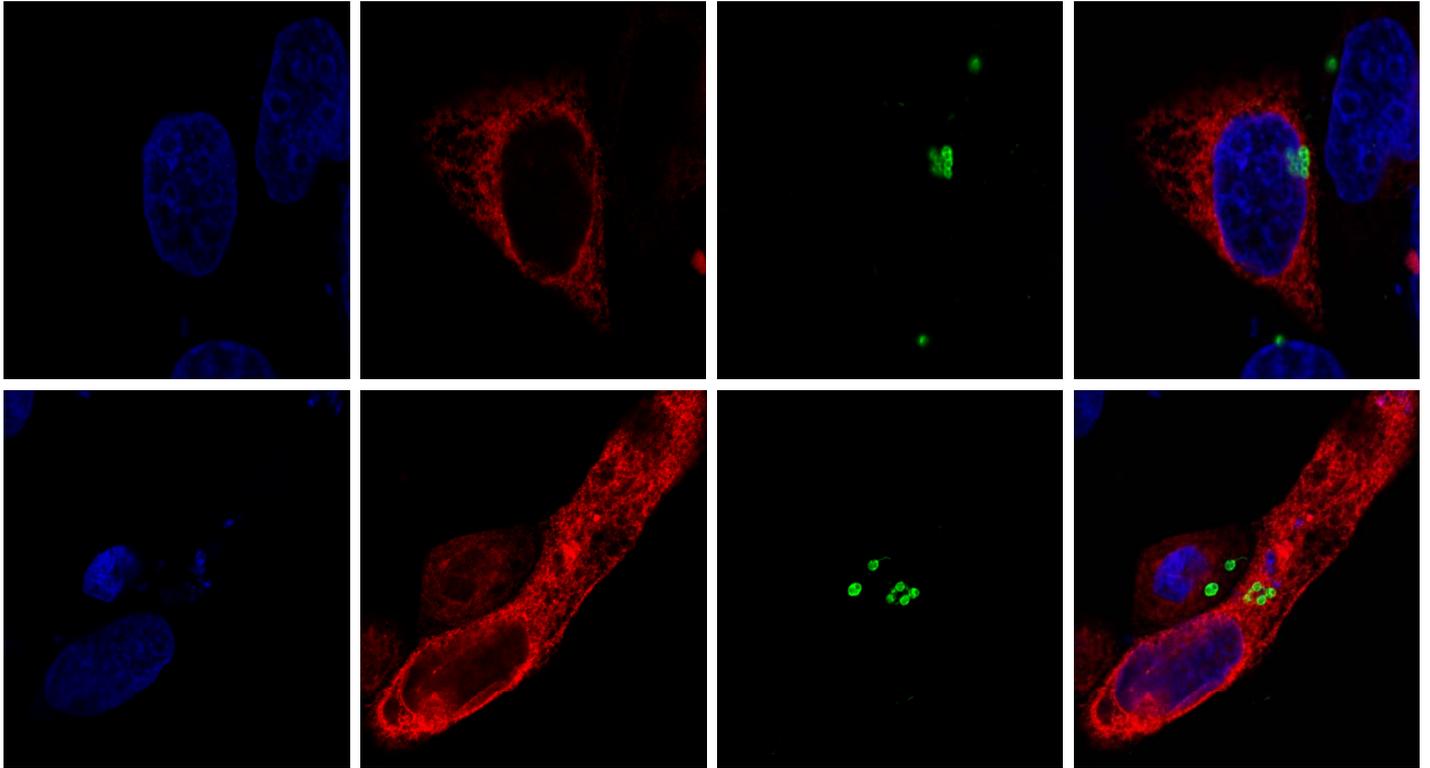
19 hpl Pfa 37°C fixed

DAPI

ER-dsRed

α -CPn0147_488

merge



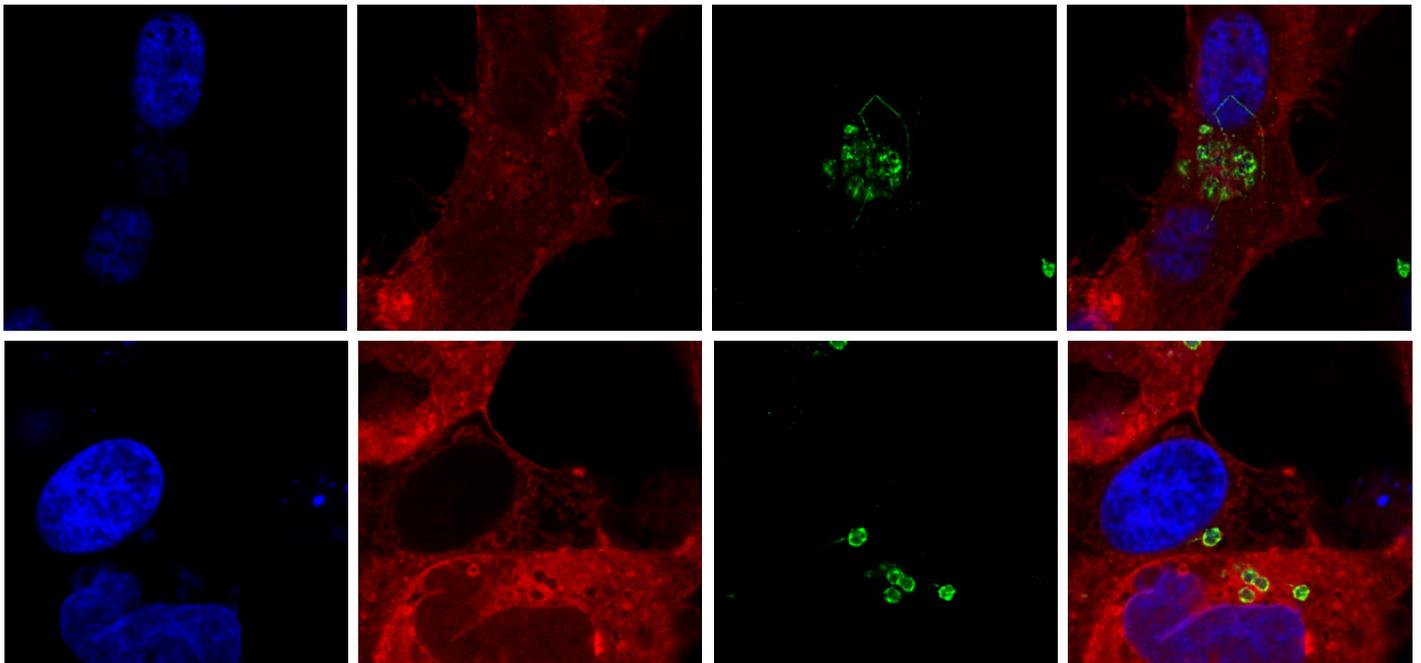
24 hpl Pfa 37°C fixed

DAPI

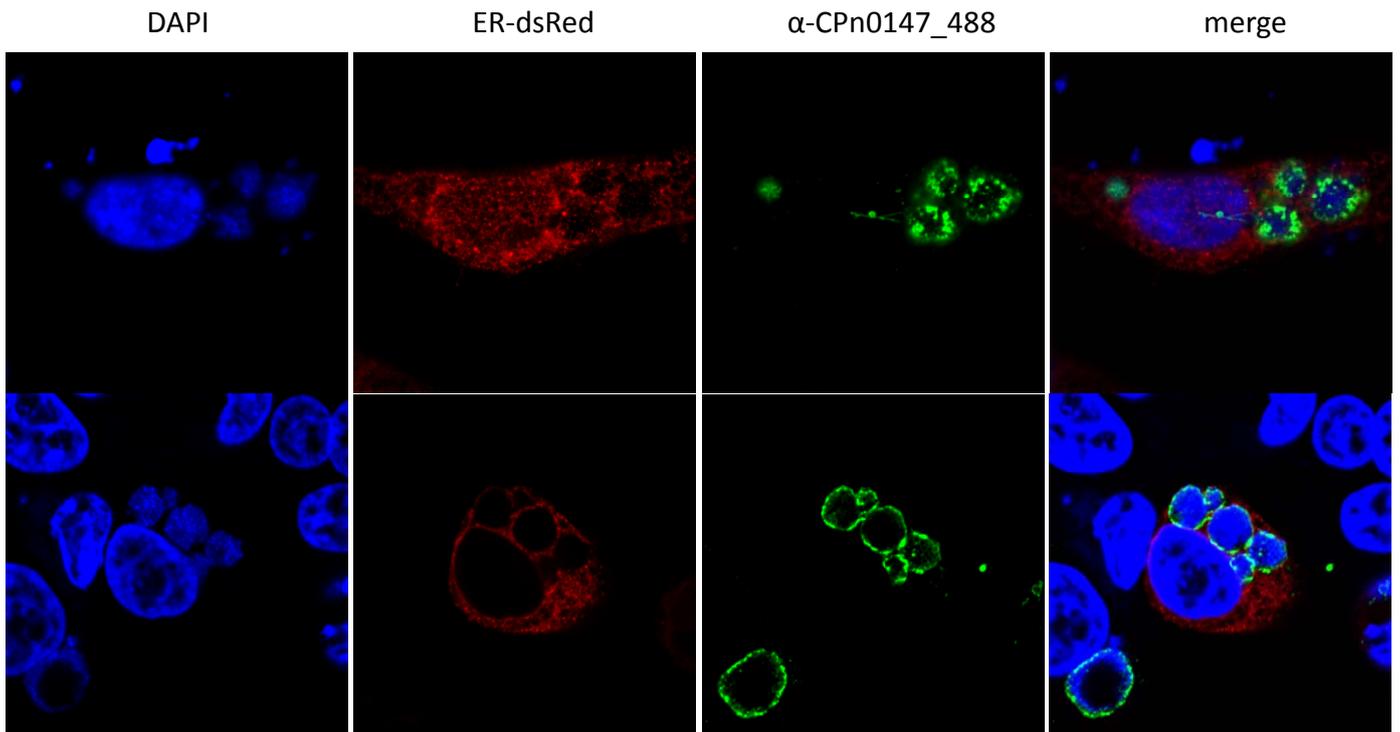
ER-dsRed

α -CPn0147_488

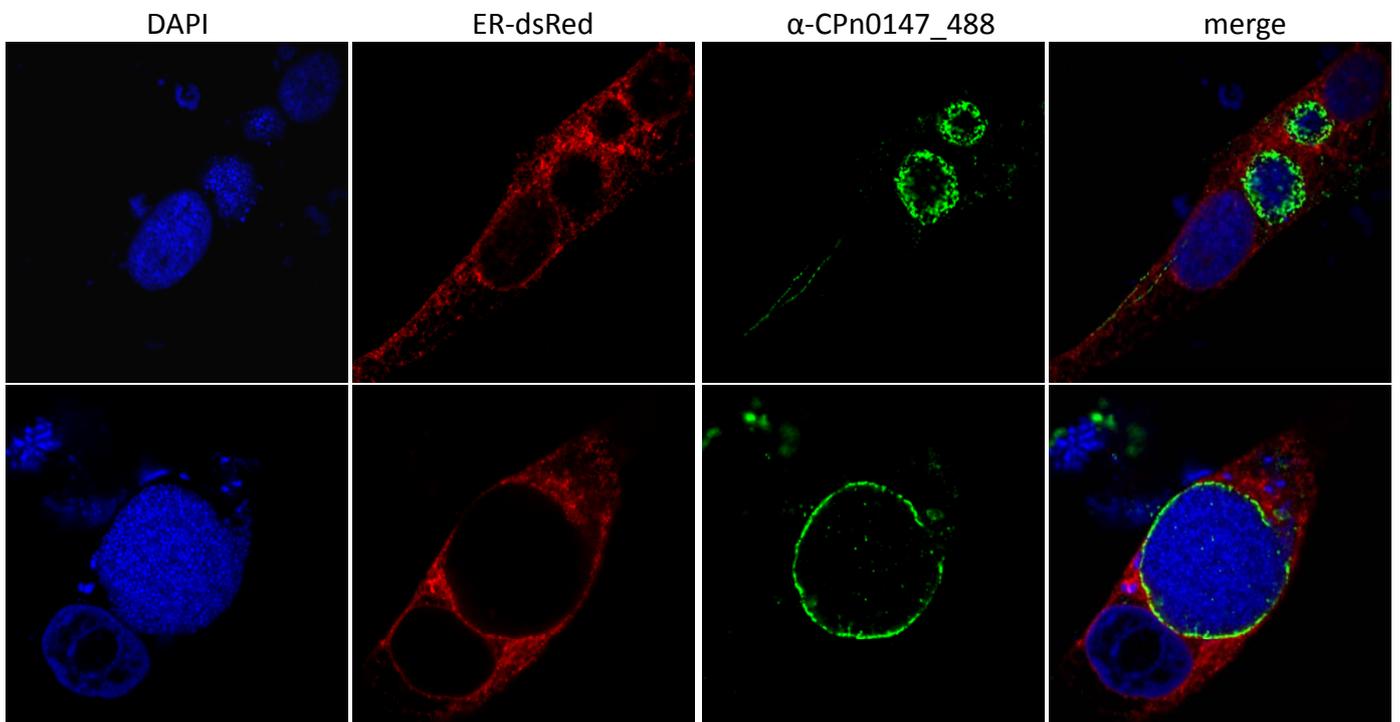
merge



48 hpl Pfa 37°C fixed



72 hpl Pfa 37°C fixed



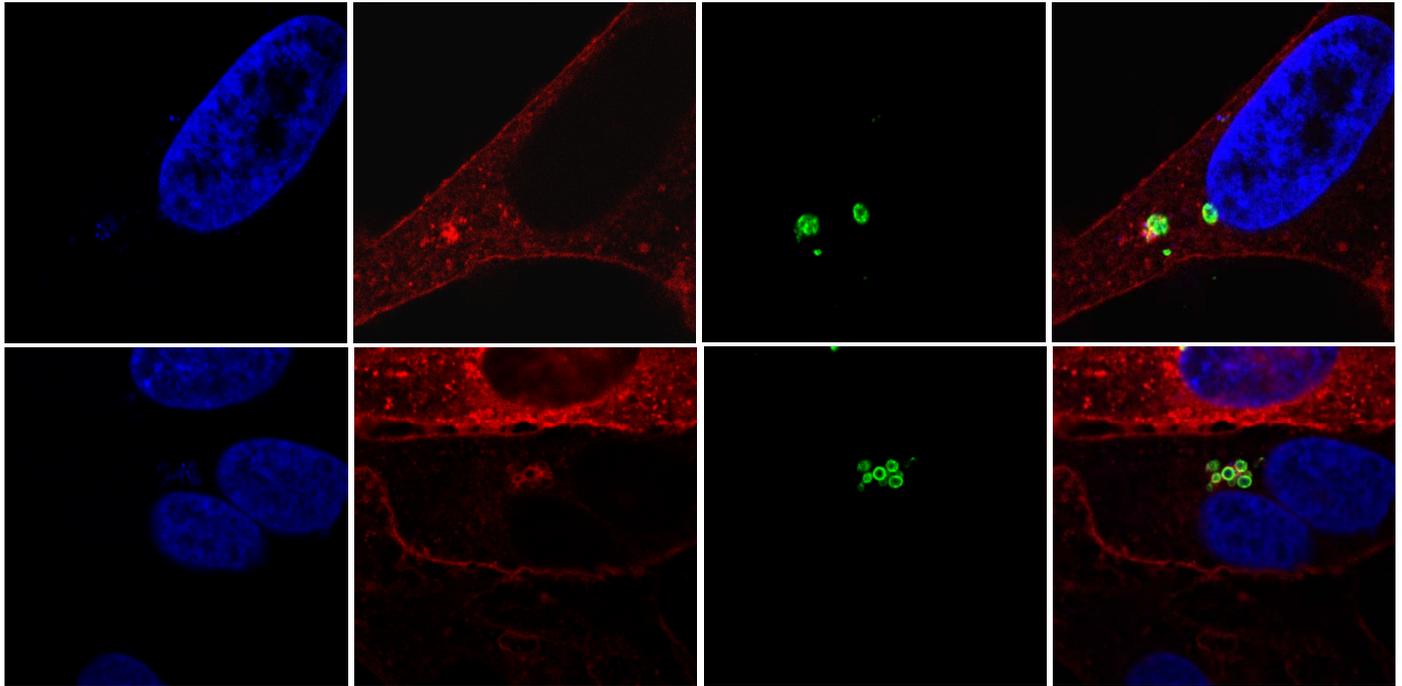
19 hpl Pfa 37°C fixed

DAPI

GPI_mCherry

α -CPn0147_488

merge



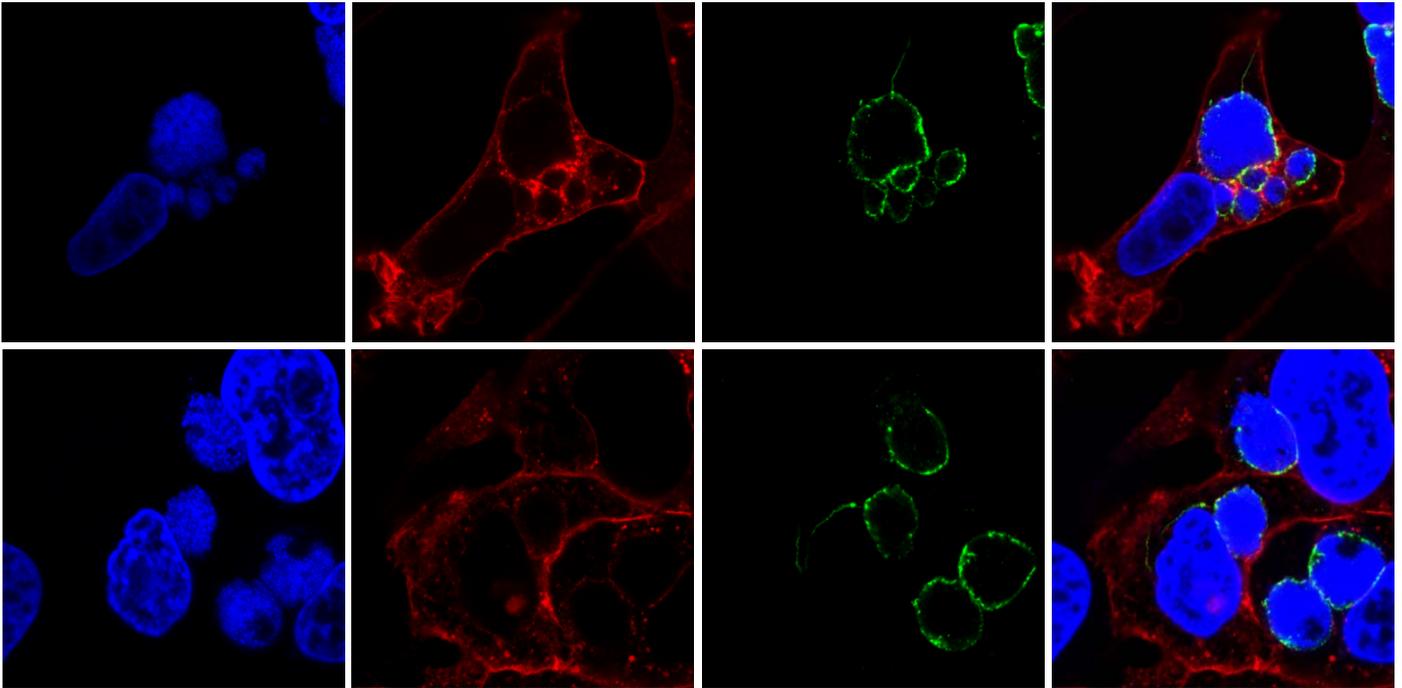
48 hpl Pfa 37°C fixed

DAPI

GPI_mCherry

α -CPn0147_488

merge



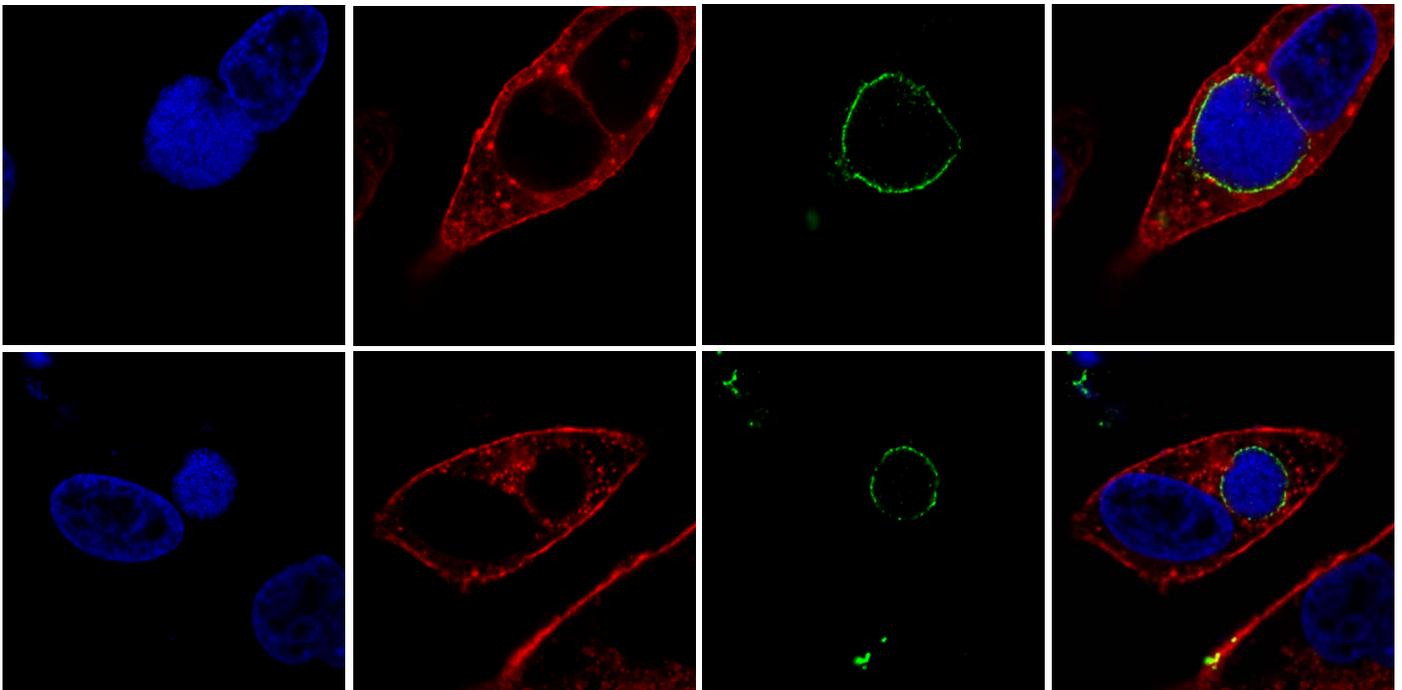
72 hpl Pfa 37°C fixed

DAPI

GPI_mCherry

α -CPn0147_488

merge



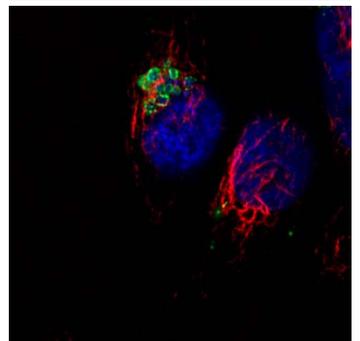
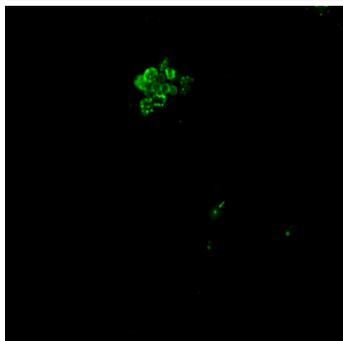
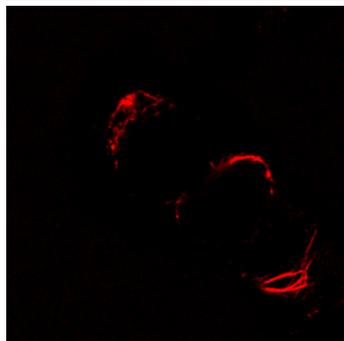
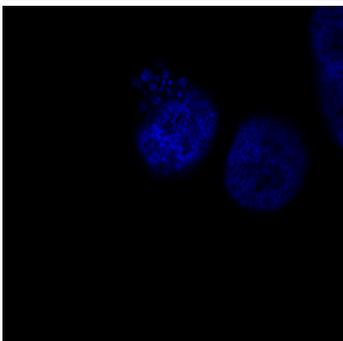
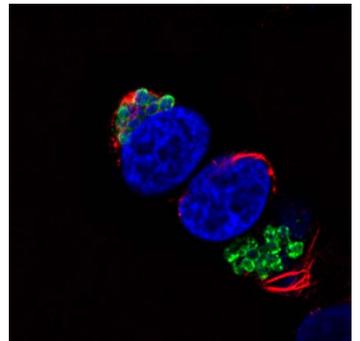
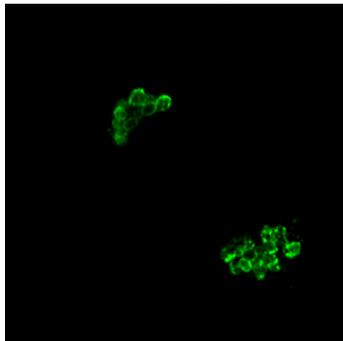
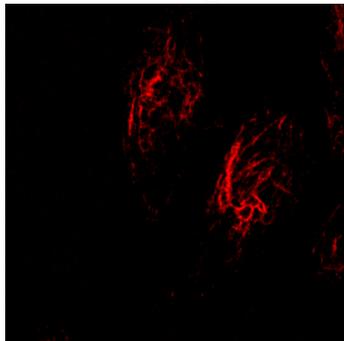
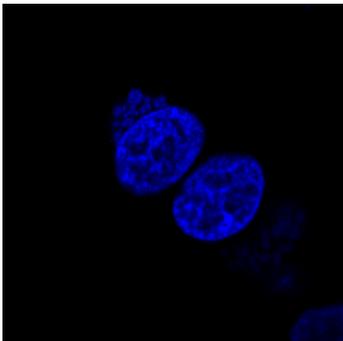
24 hpl Pfa 37°C fixed

DAPI

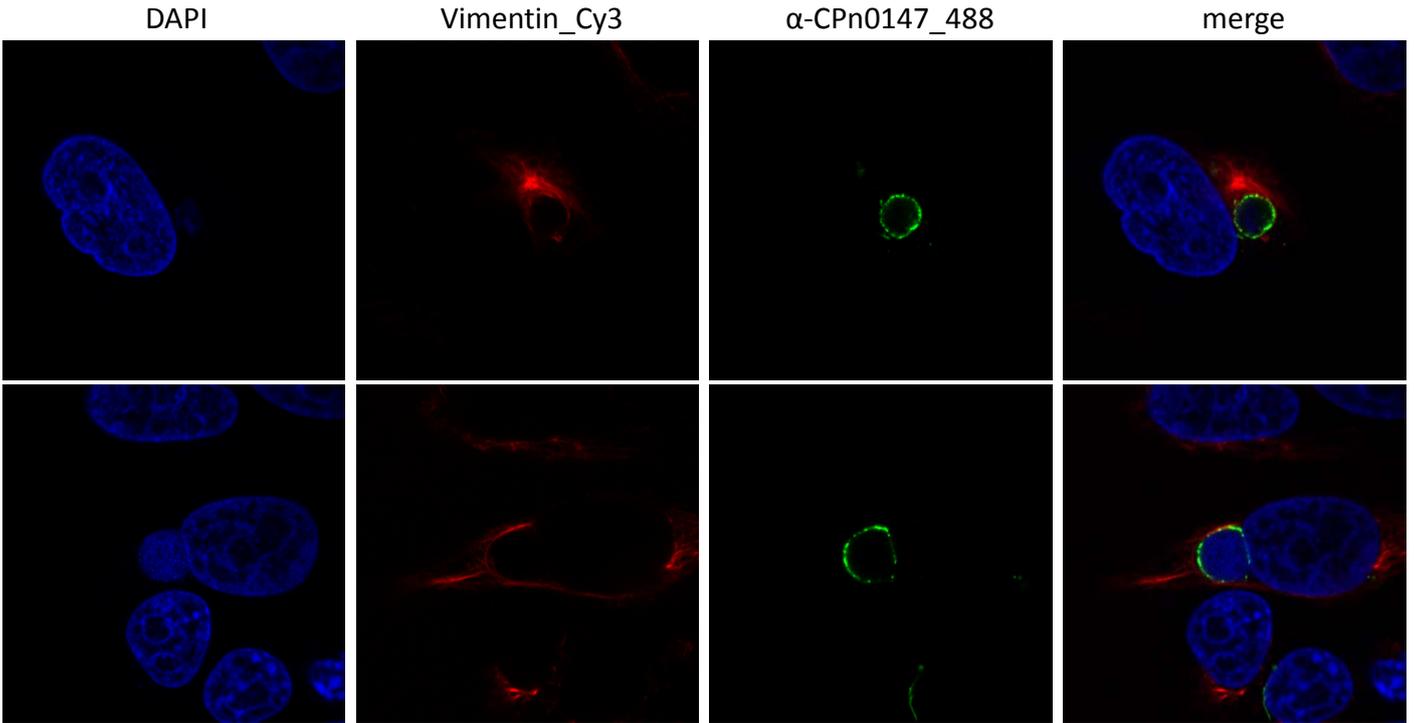
Vimentin_Cy3

α -CPn0147_488

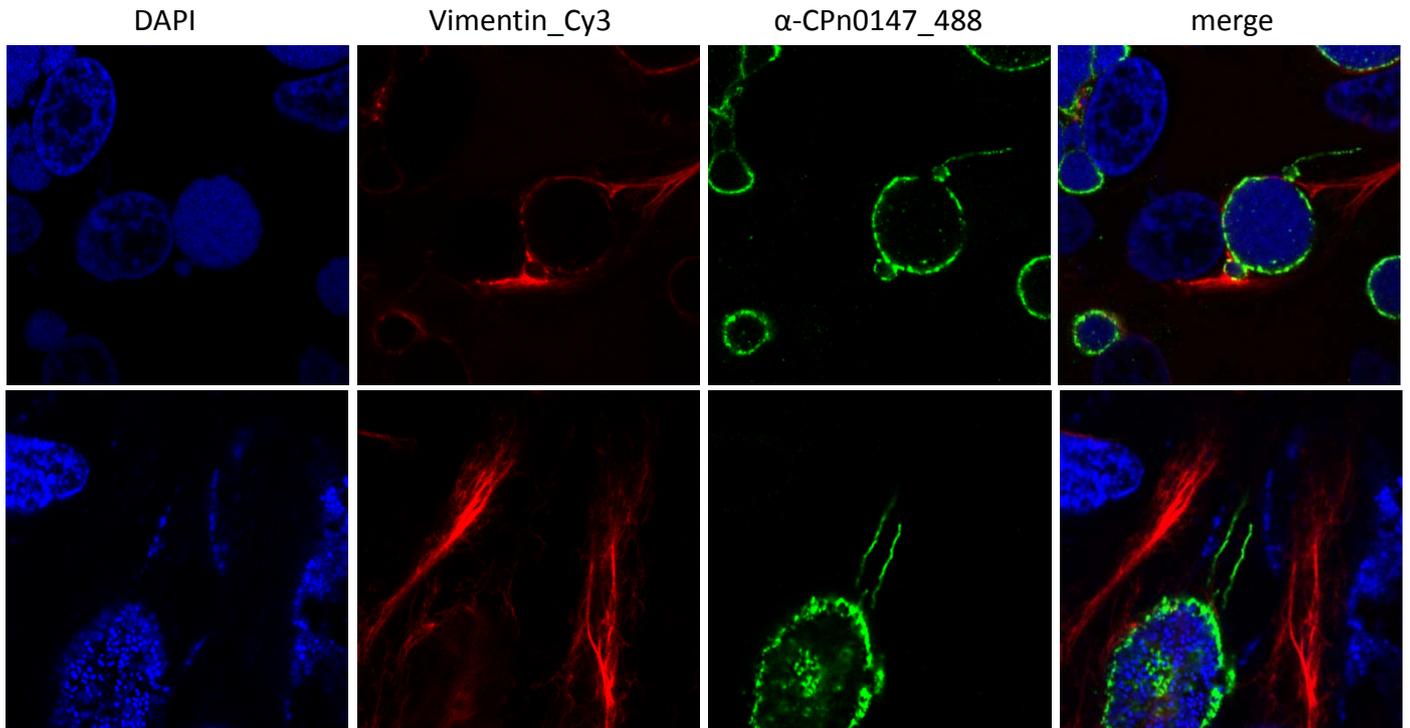
merge



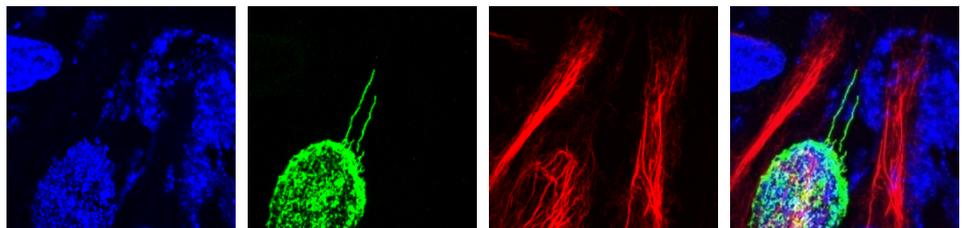
48 hpl Pfa 37°C fixed



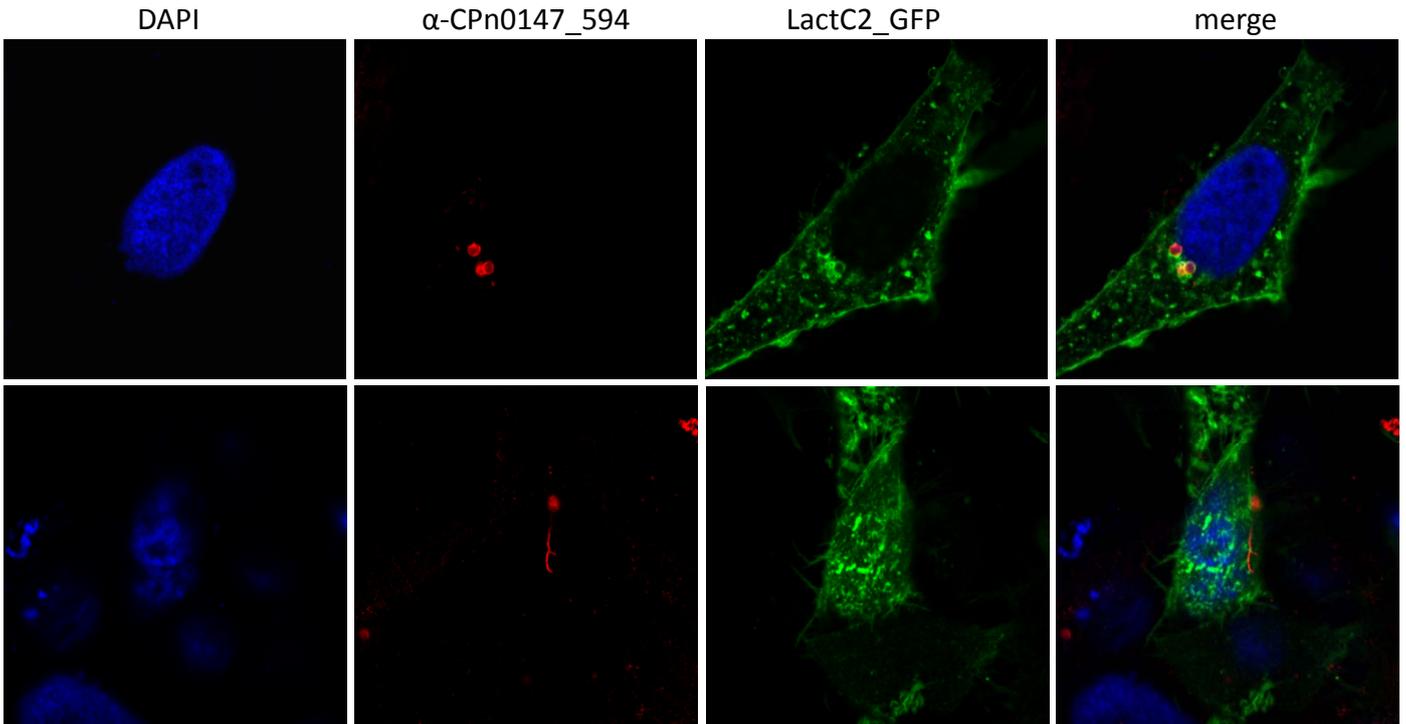
72 hpl Pfa 37°C fixed



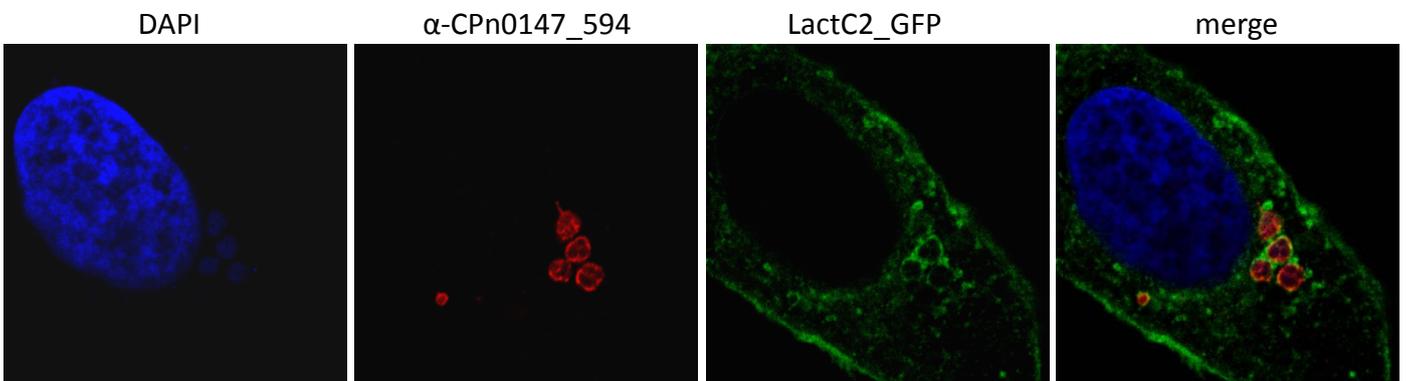
MIP



19 hpi Pfa 37°C fixed



24 hpi Pfa 37°C fixed



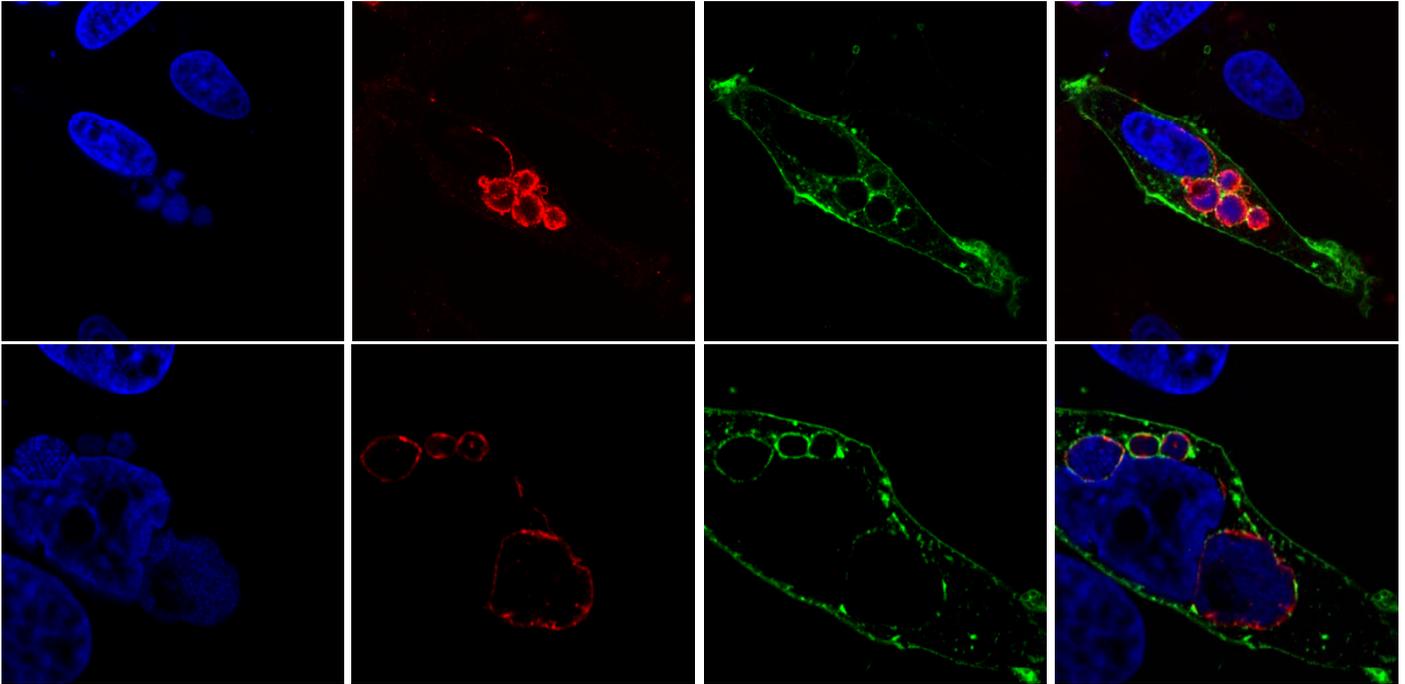
48 hpl Pfa 37°C fixed

DAPI

α -CPn0147_594

LactC2_GFP

merge



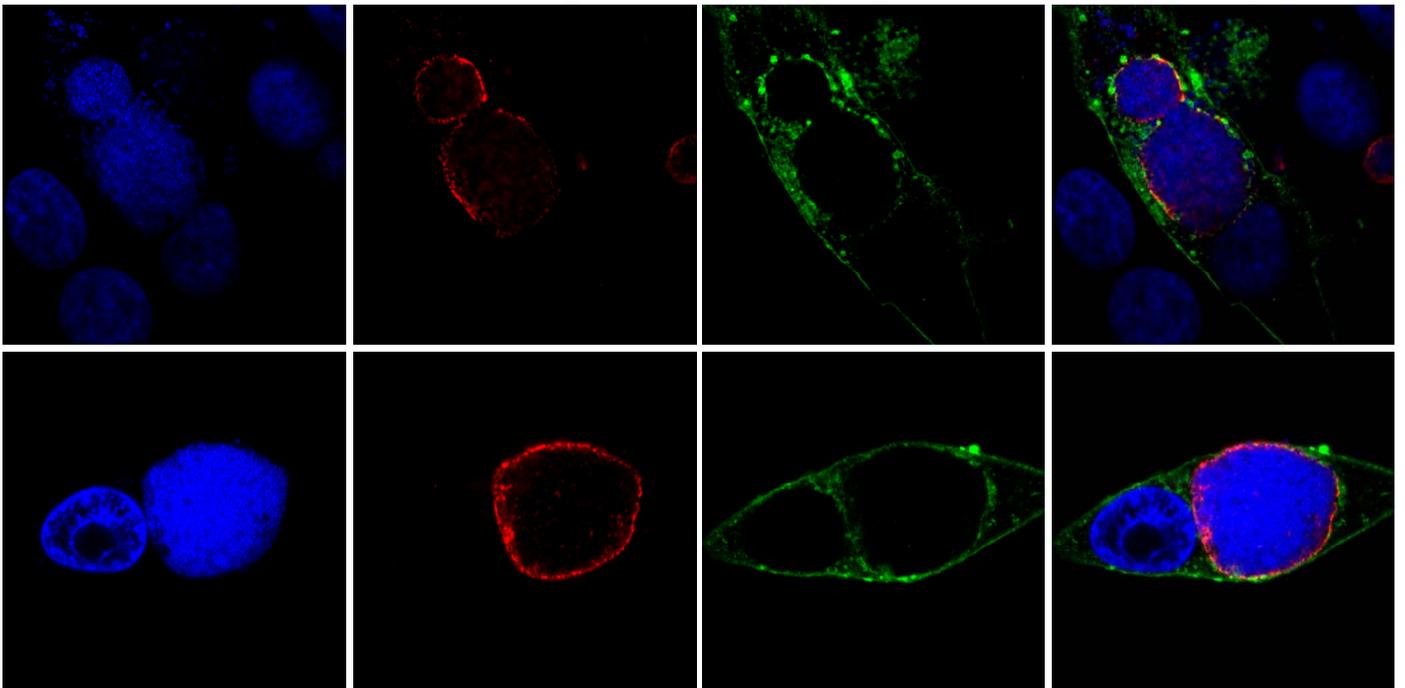
72 hpl Pfa 37°C fixed

DAPI

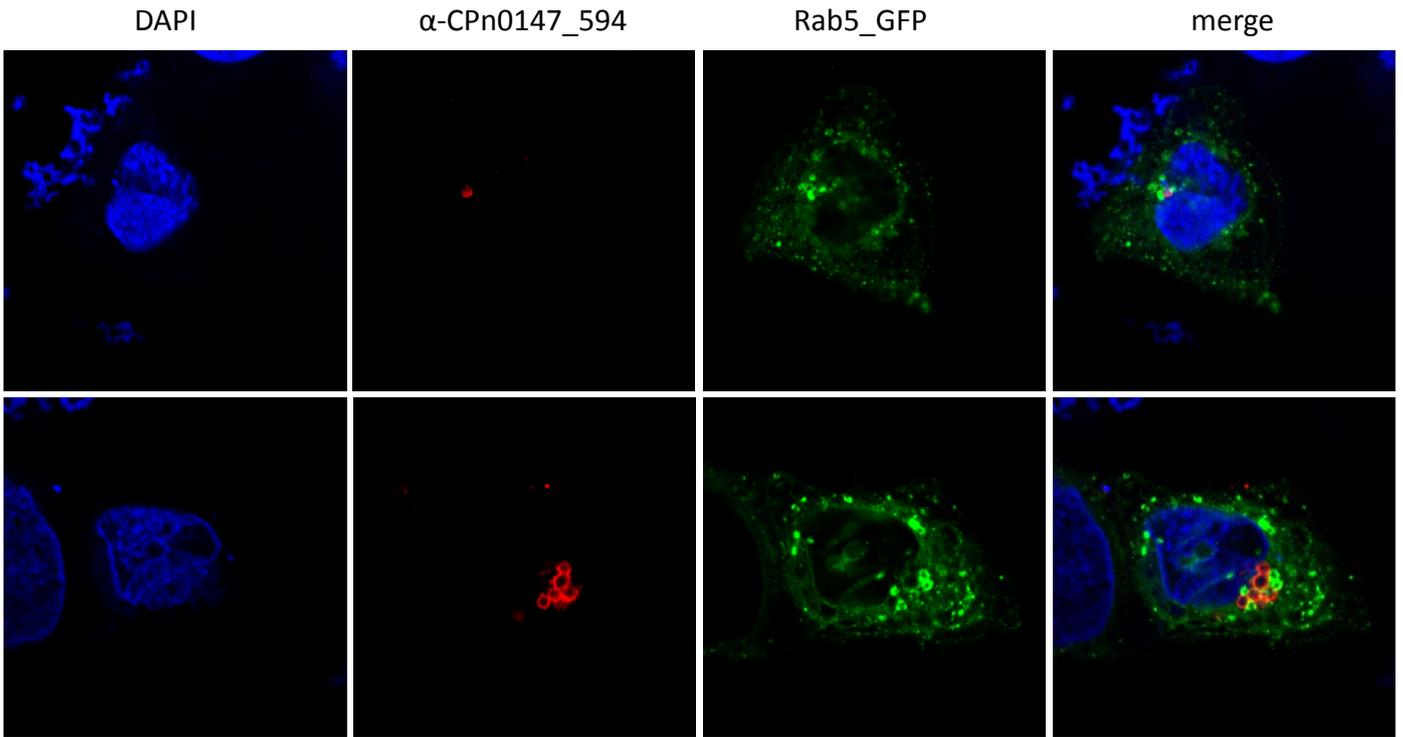
α -CPn0147_594

LactC2_GFP

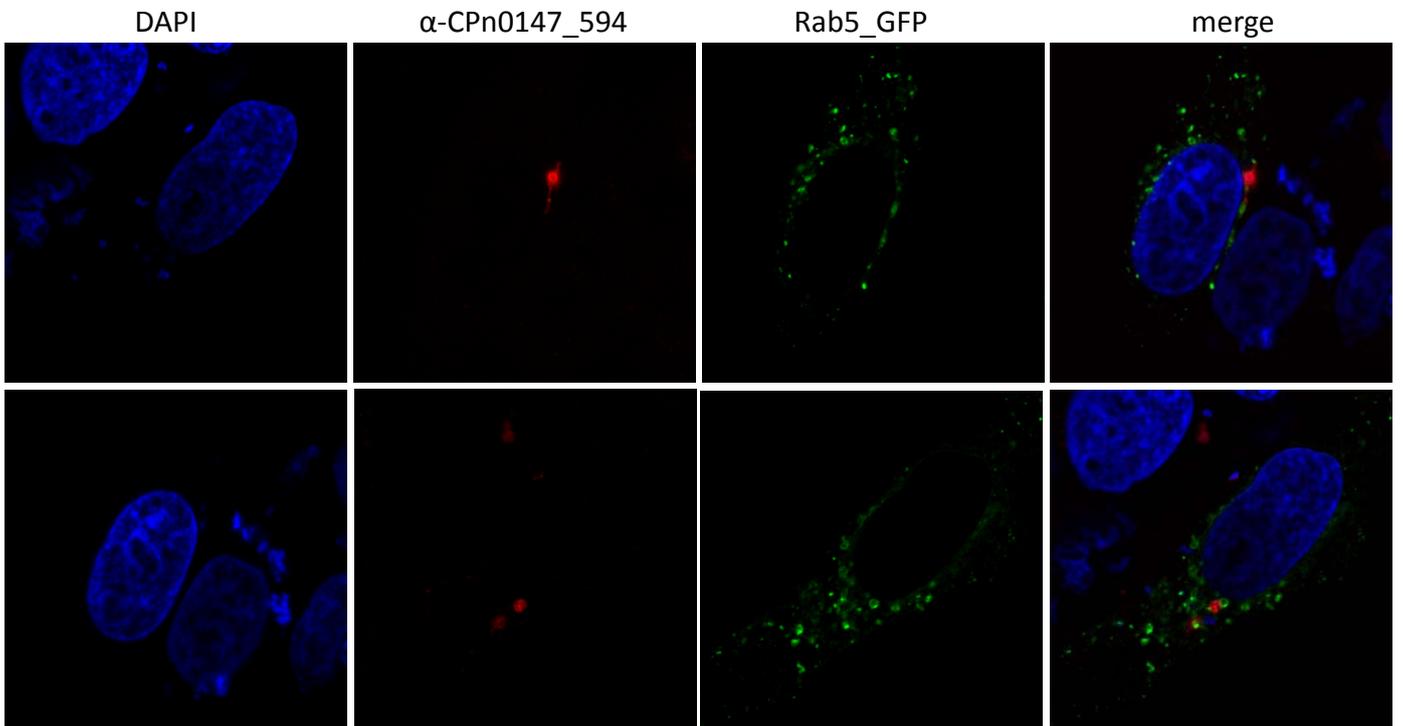
merge



19 hpl Pfa 37°C fixed



24 hpl Pfa 37°C fixed



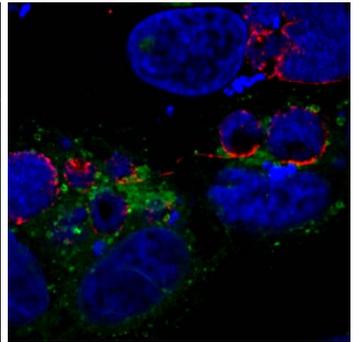
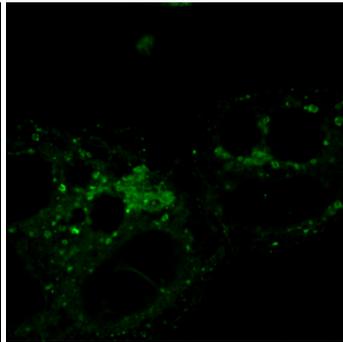
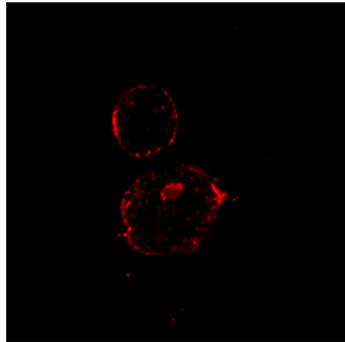
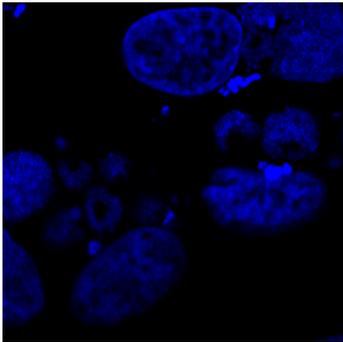
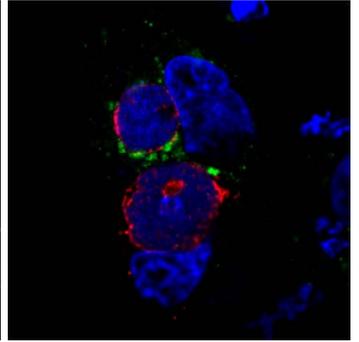
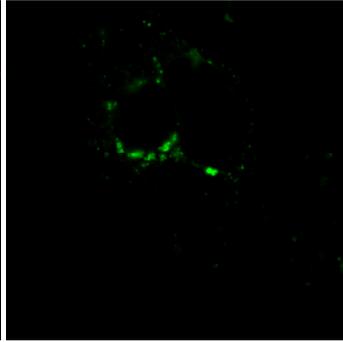
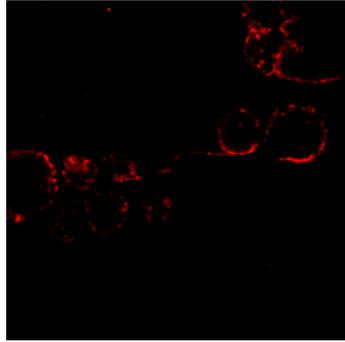
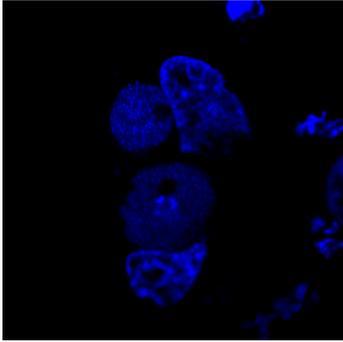
48 hpl Pfa 37°C fixed

DAPI

α -CPn0147_594

Rab5_GFP

merge



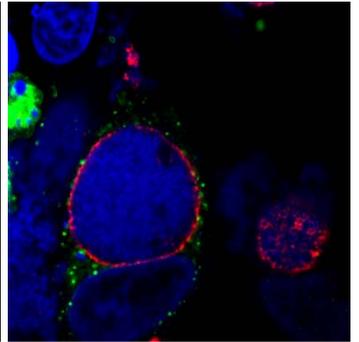
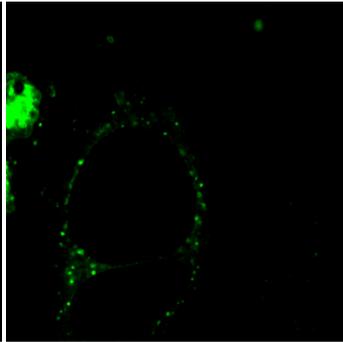
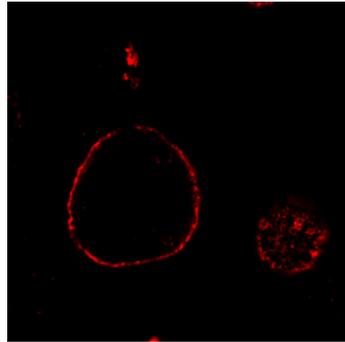
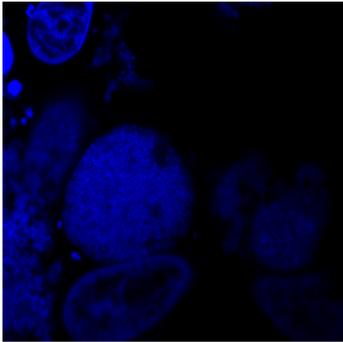
72 hpl Pfa 37°C fixed

DAPI

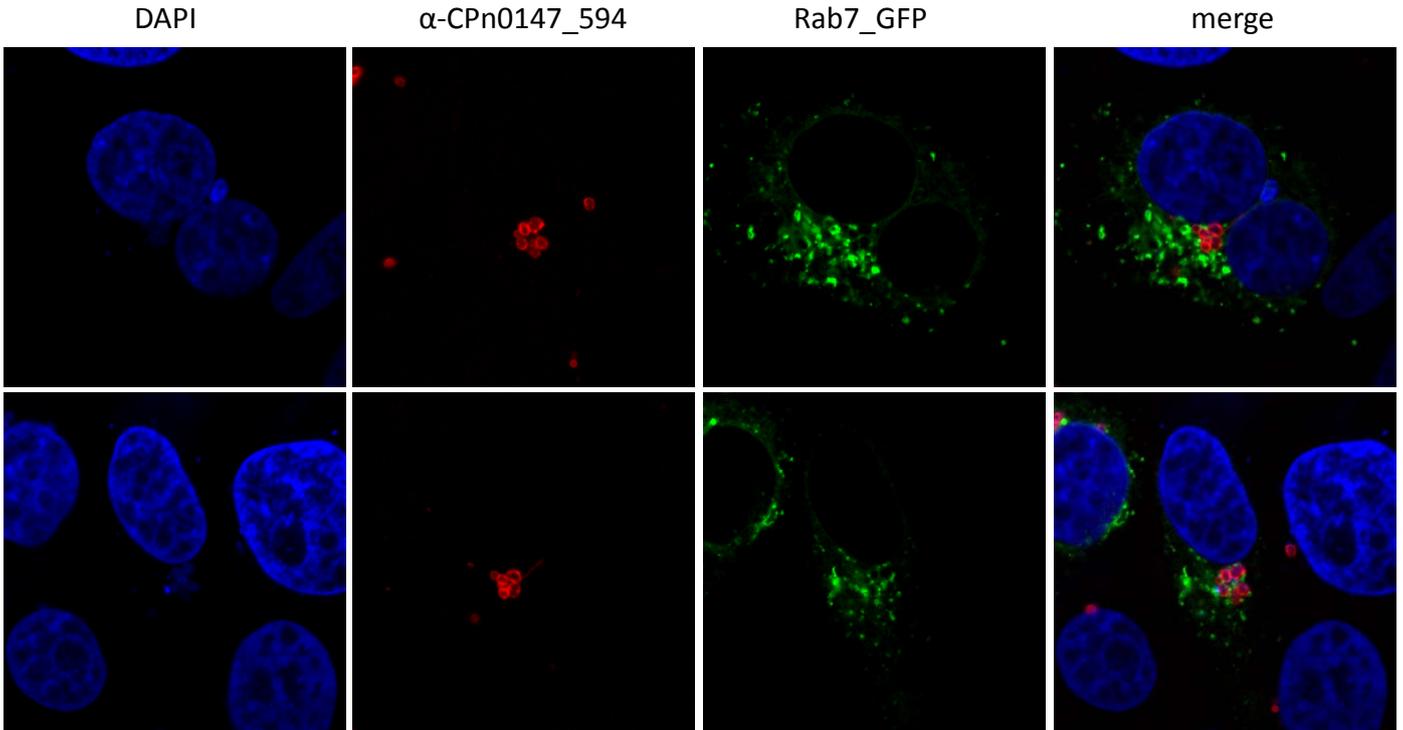
α -CPn0147_594

Rab5_GFP

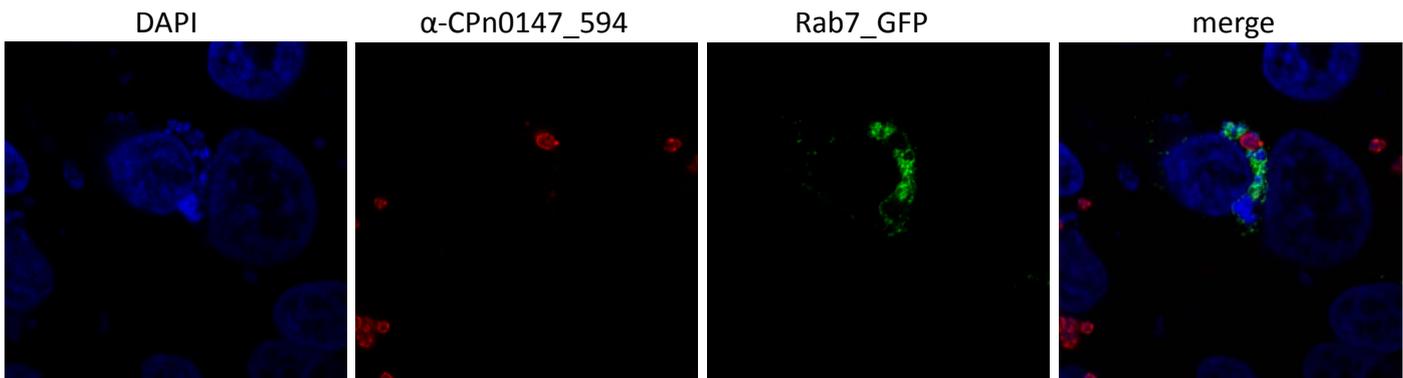
merge



19 hpi Pfa 37°C fixed



24 hpi Pfa 37°C fixed



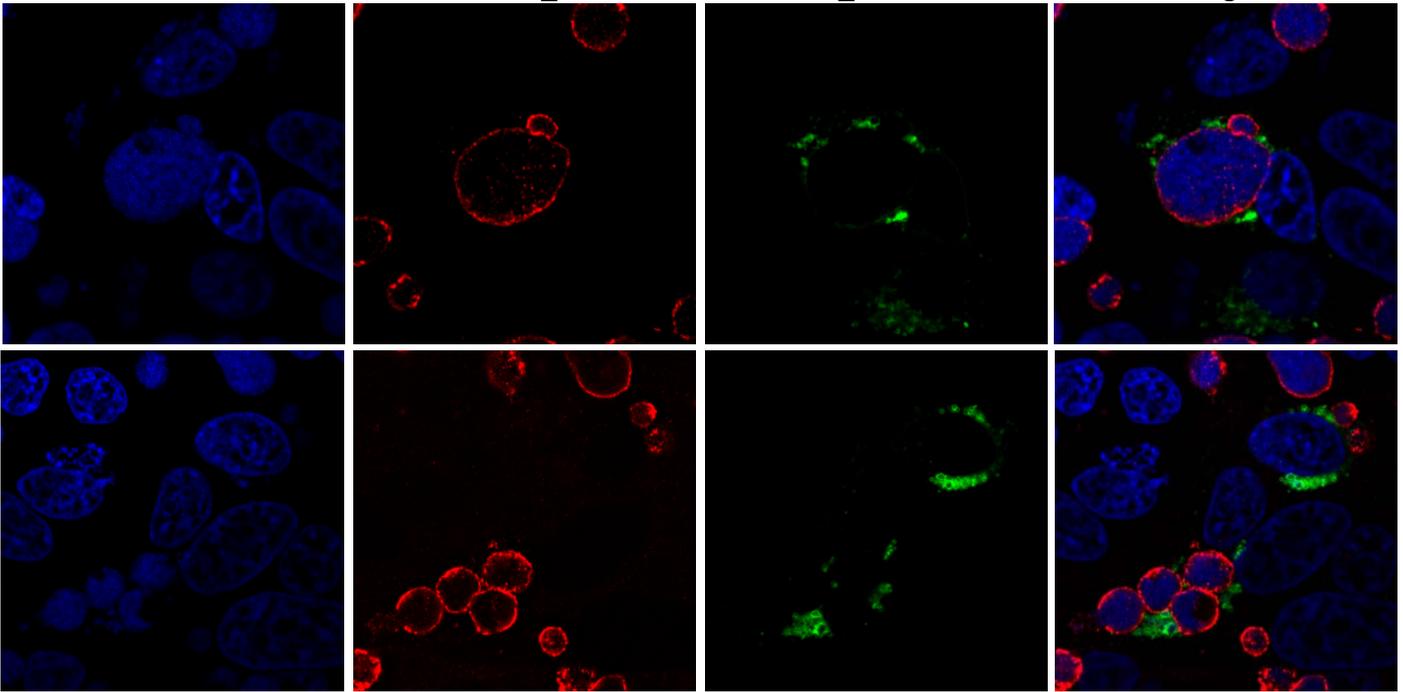
48 hpl Pfa 37°C fixed

DAPI

α -CPn0147_594

Rab7_GFP

merge



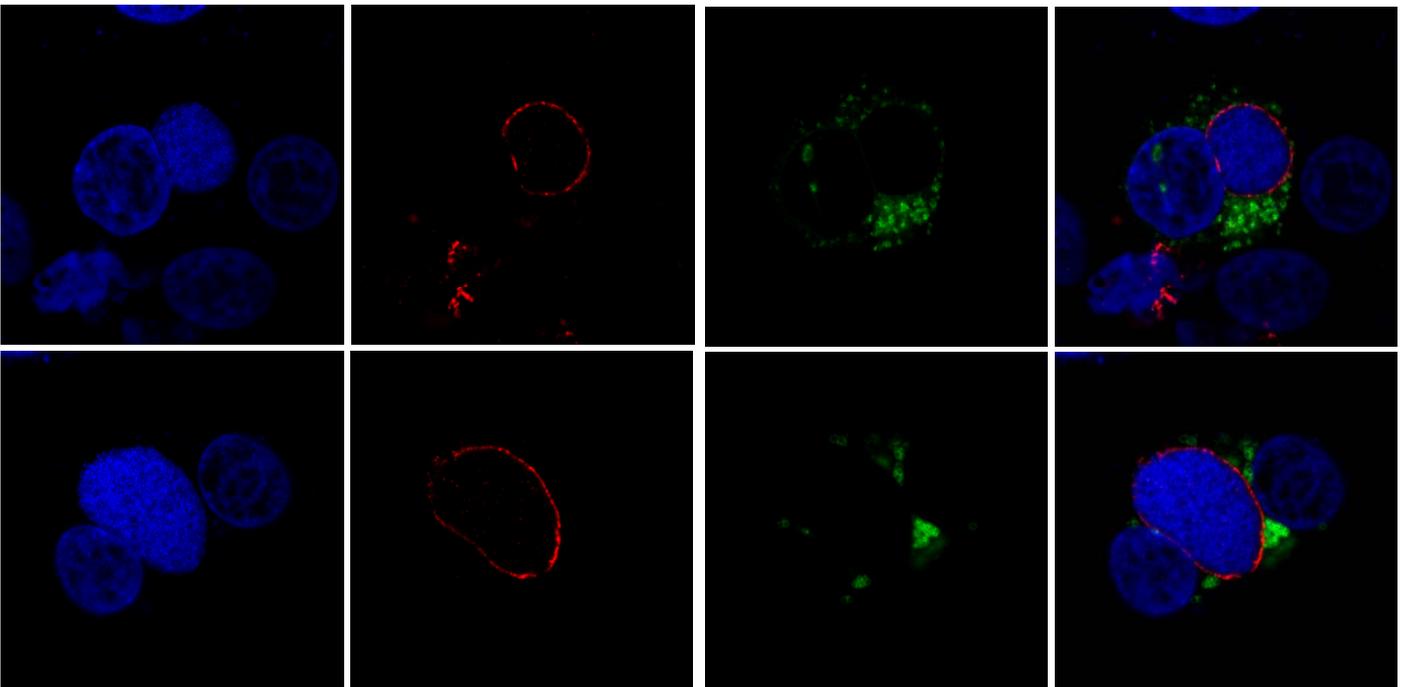
72 hpl Pfa 37°C fixed

DAPI

α -CPn0147_594

Rab7_GFP

merge



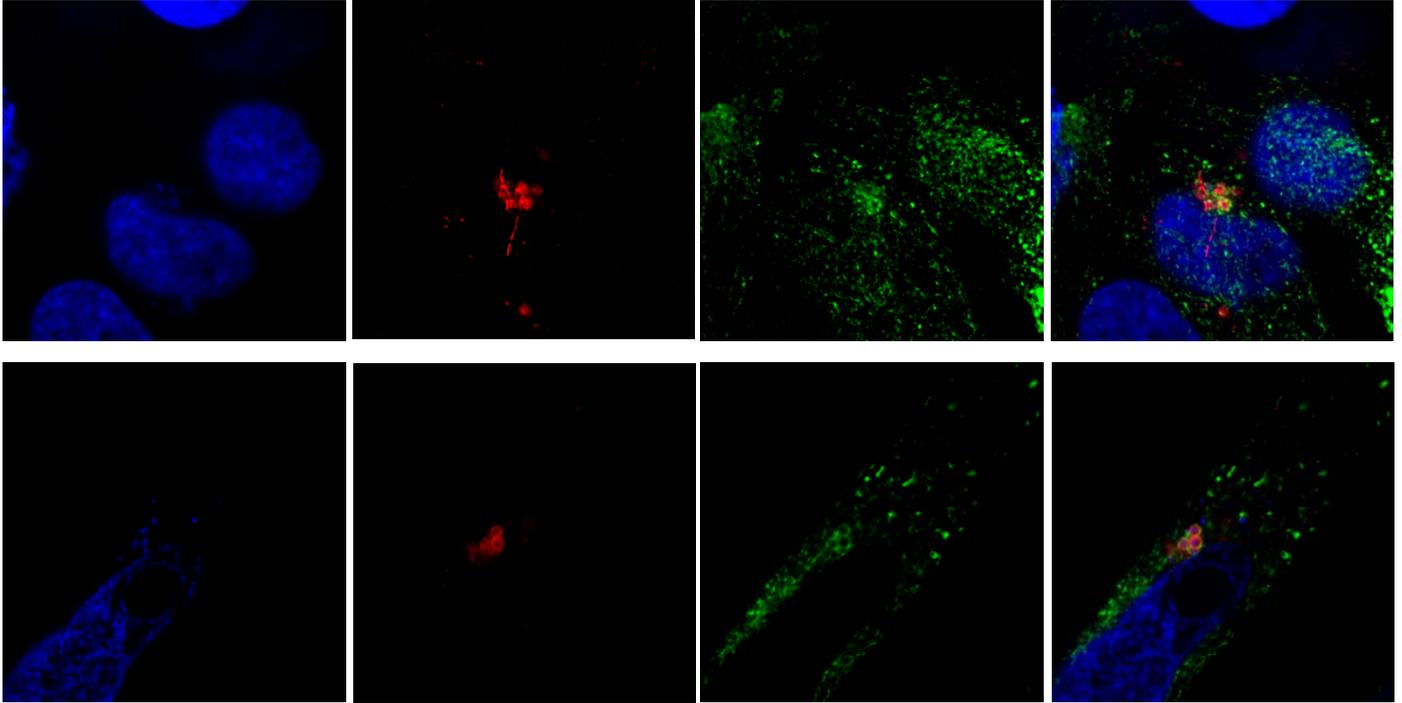
19 hpl Pfa 37°C fixed

DAPI

α -CPn0147_594

Rab11_GFP

merge



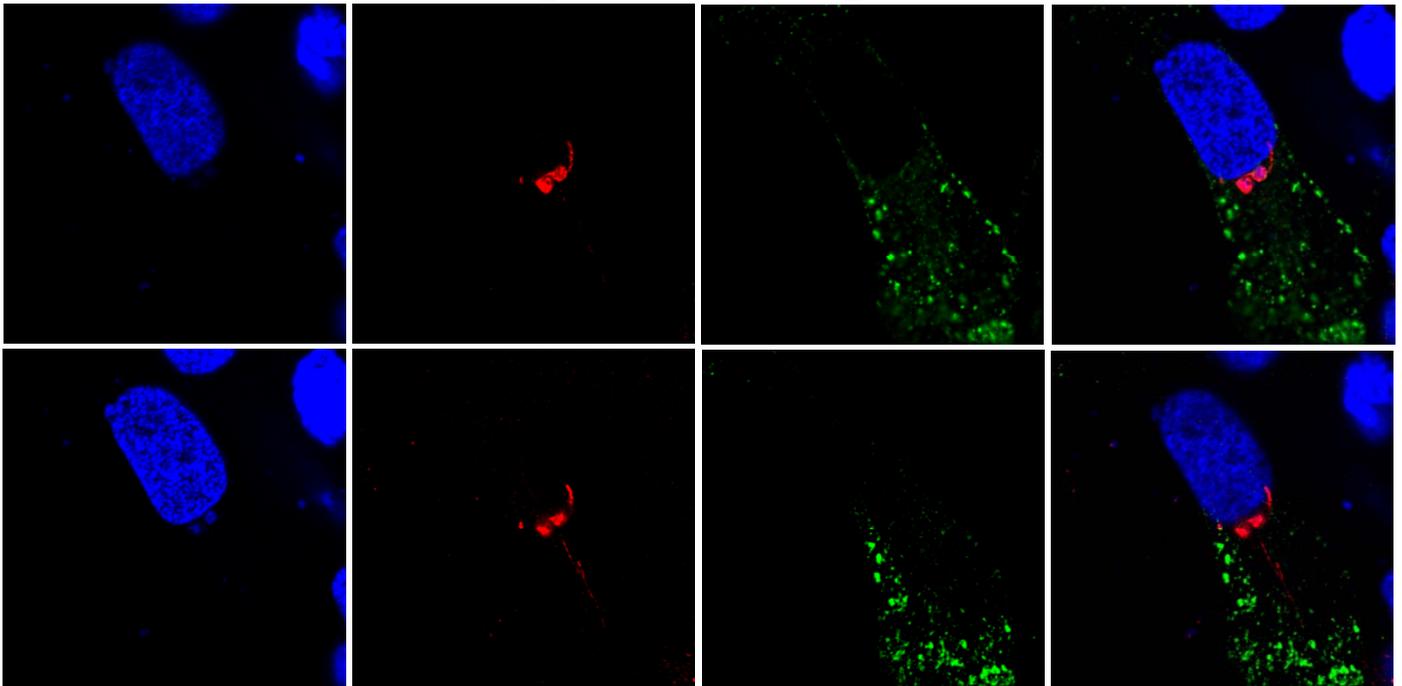
24 hpl Pfa 37°C fixed

DAPI

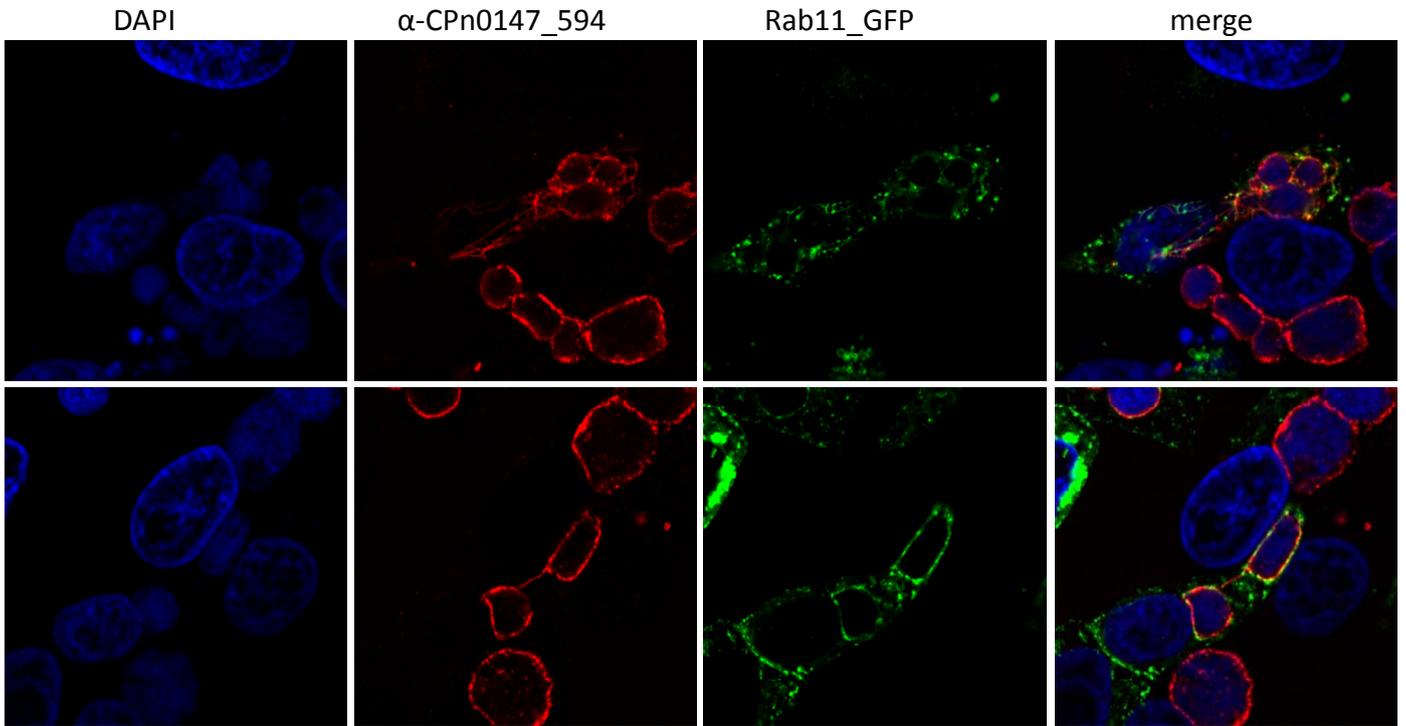
α -CPn0147_594

Rab11_GFP

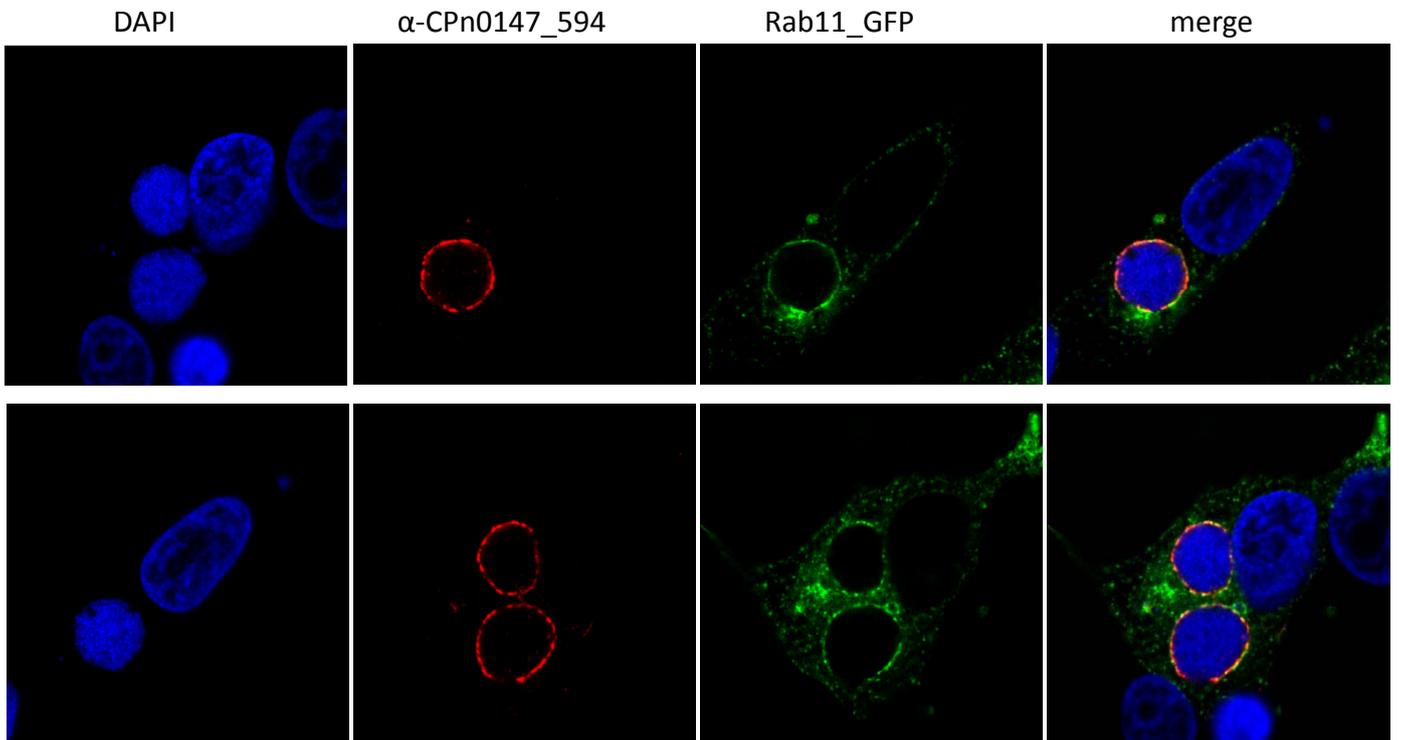
merge



48 hpl Pfa 37°C fixed



72 hpl Pfa 37°C fixed



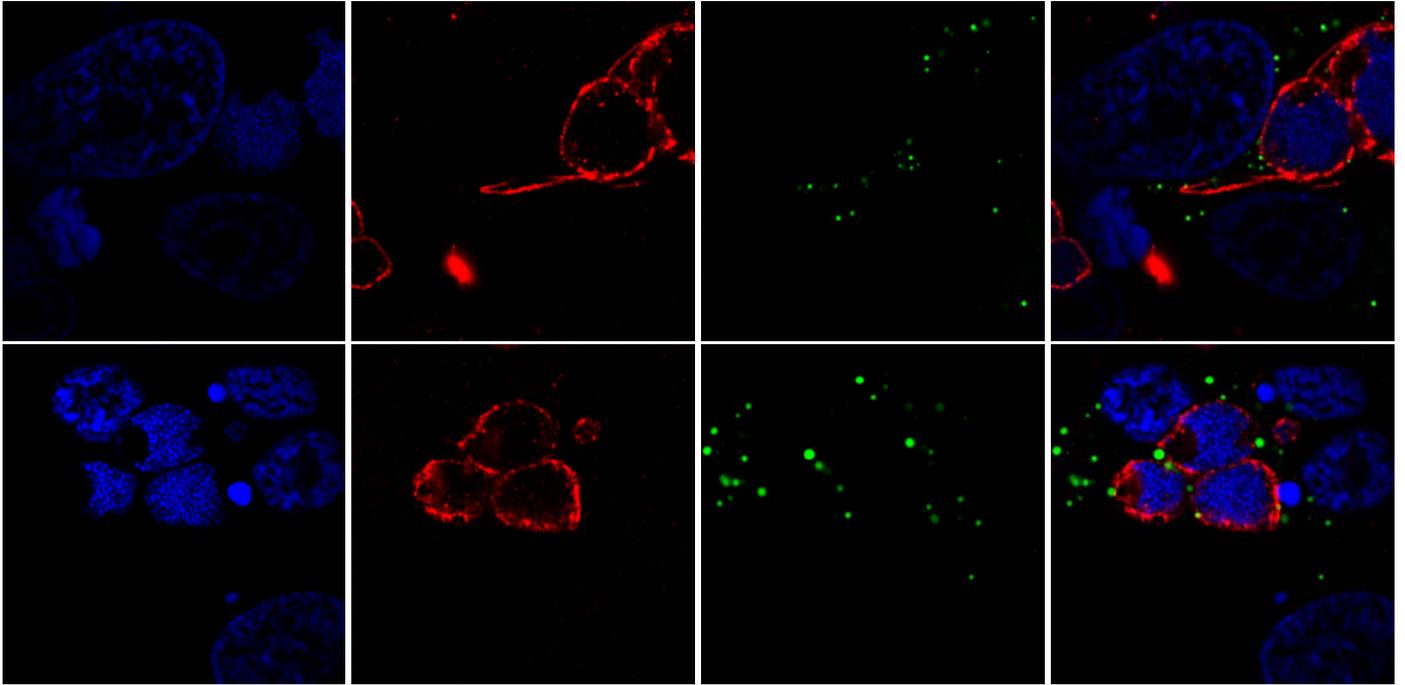
48 hpl Pfa 37°C fixed

DAPI

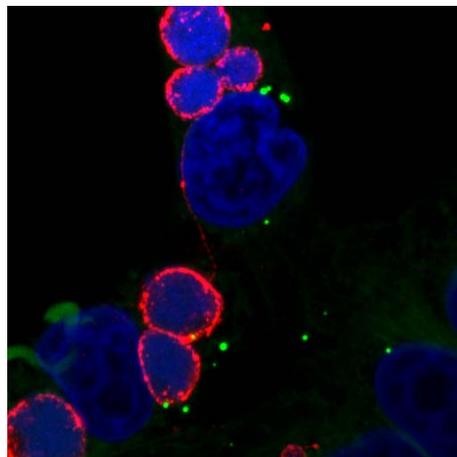
α -CPn0147_594

Bodipy

merge



MIP



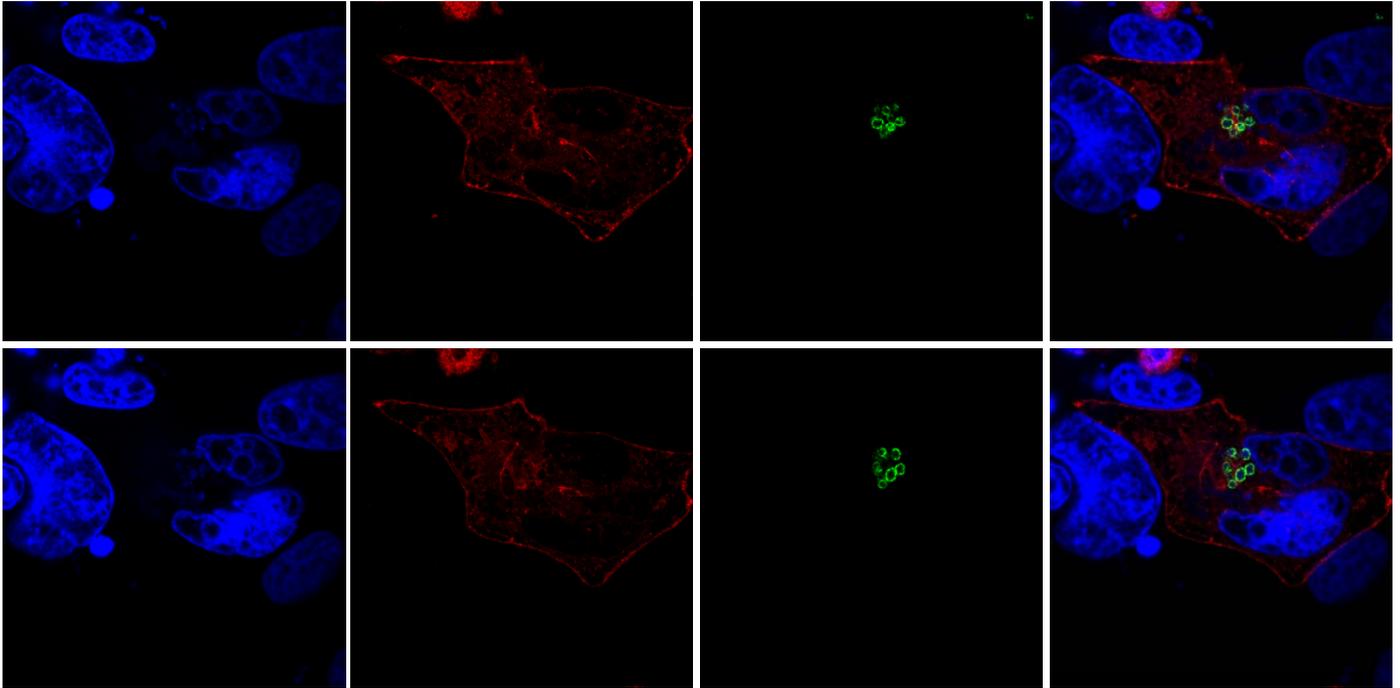
24 hpi Pfa 37°C fixed

DAPI

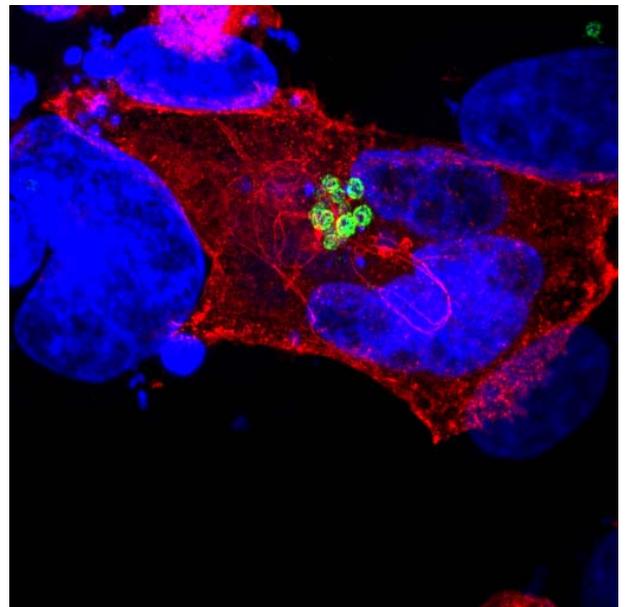
CPn0147_mCherry

α -IncA_488

merge



MIP



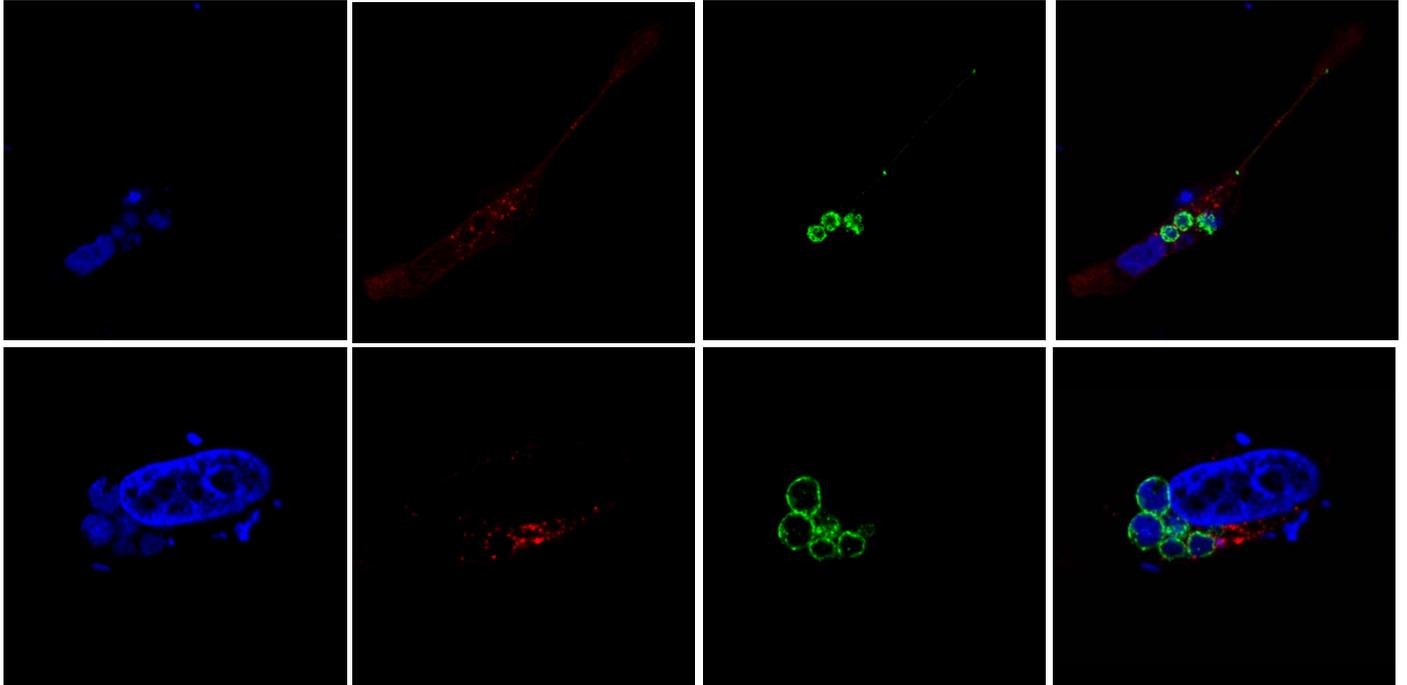
48 hpl Pfa 37°C fixed

DAPI

CPn0147_mCherry

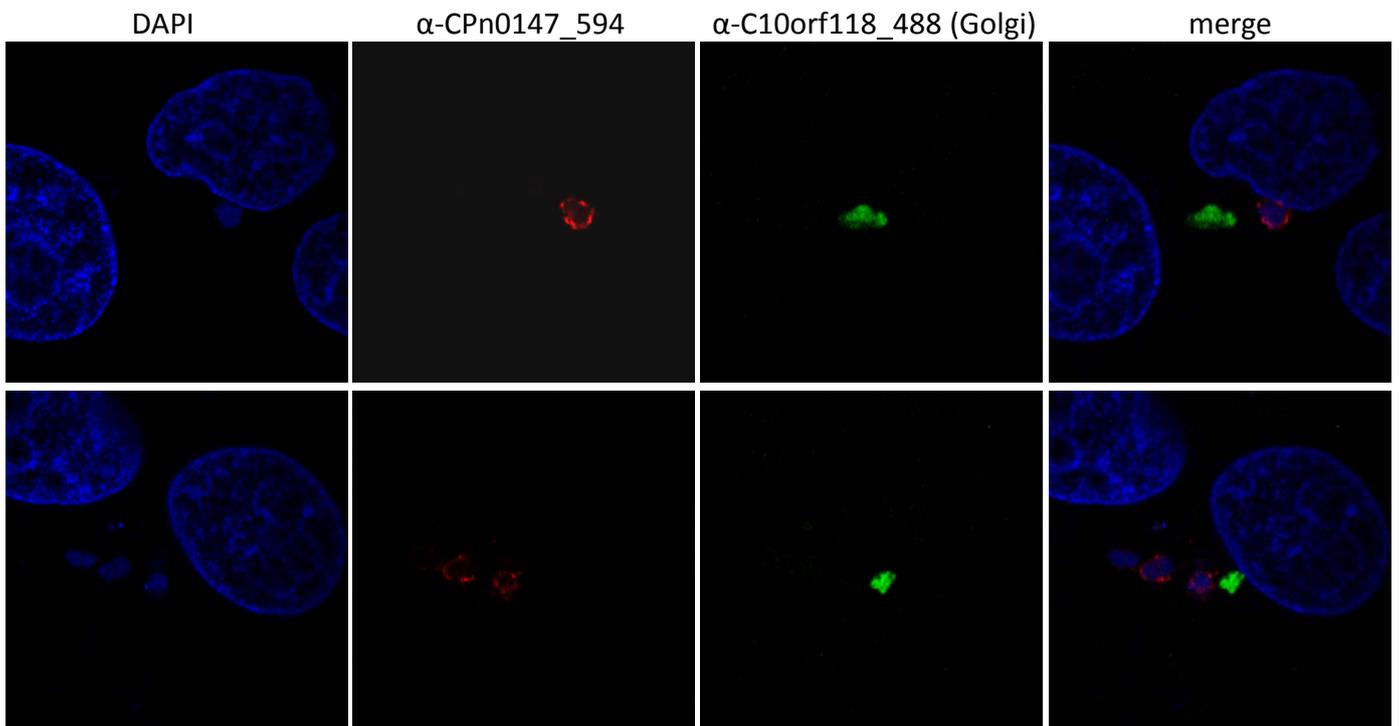
α -IncA_488

merge

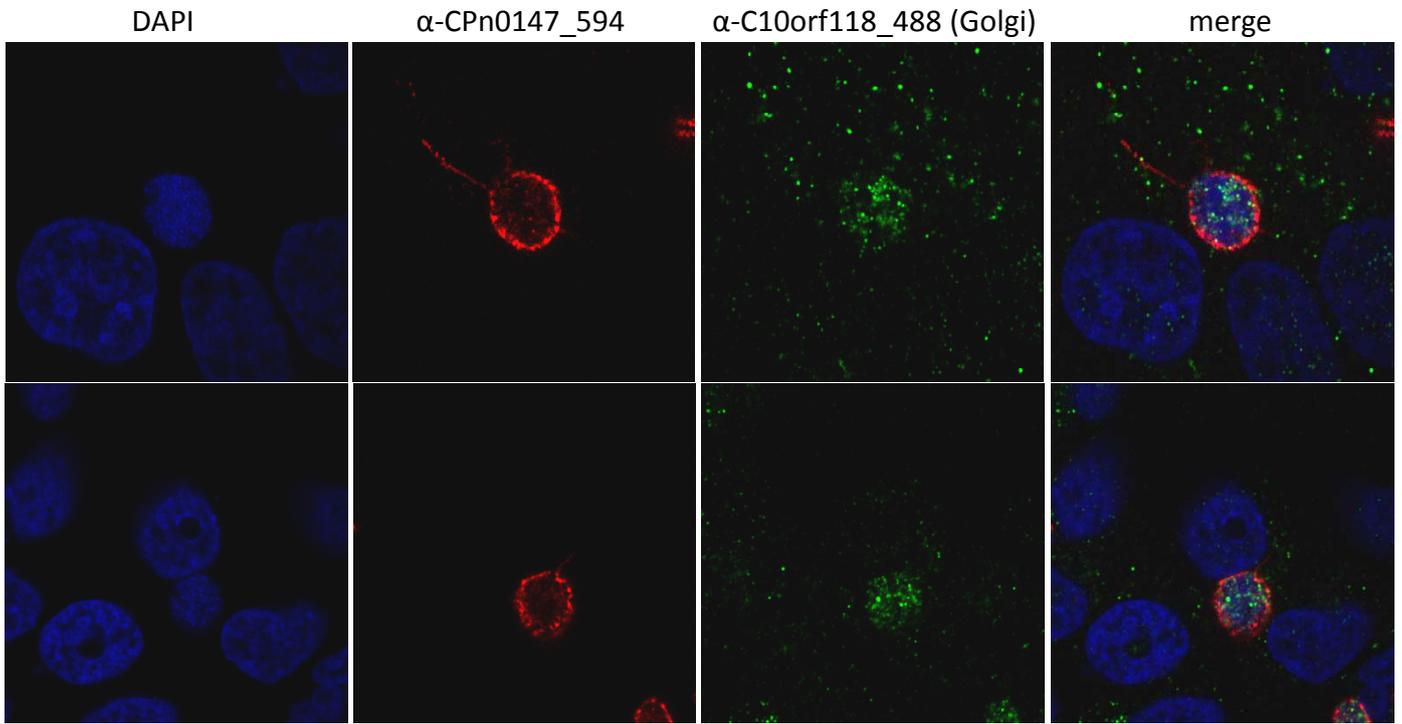


19 hpl Pfa 37°C fixed

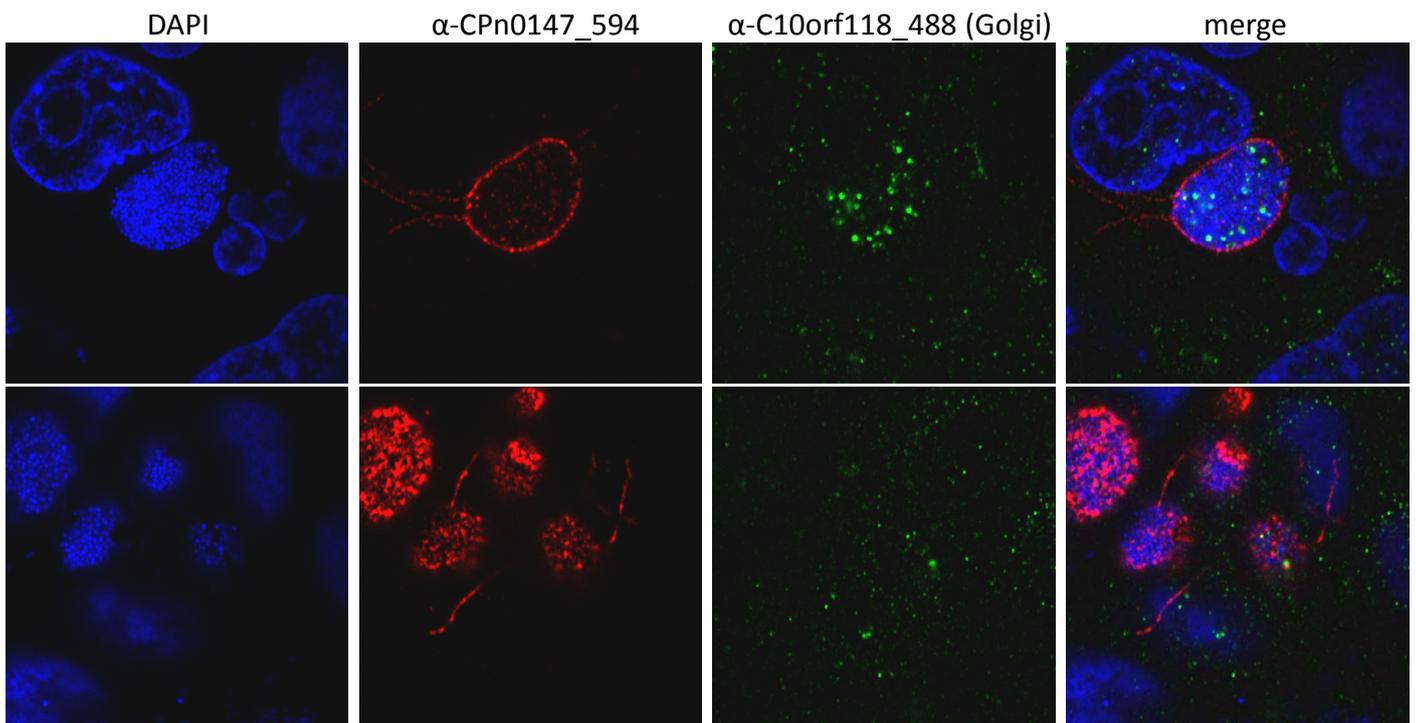
24 hpl Pfa 37°C fixed



48 hpl Pfa 37°C fixed

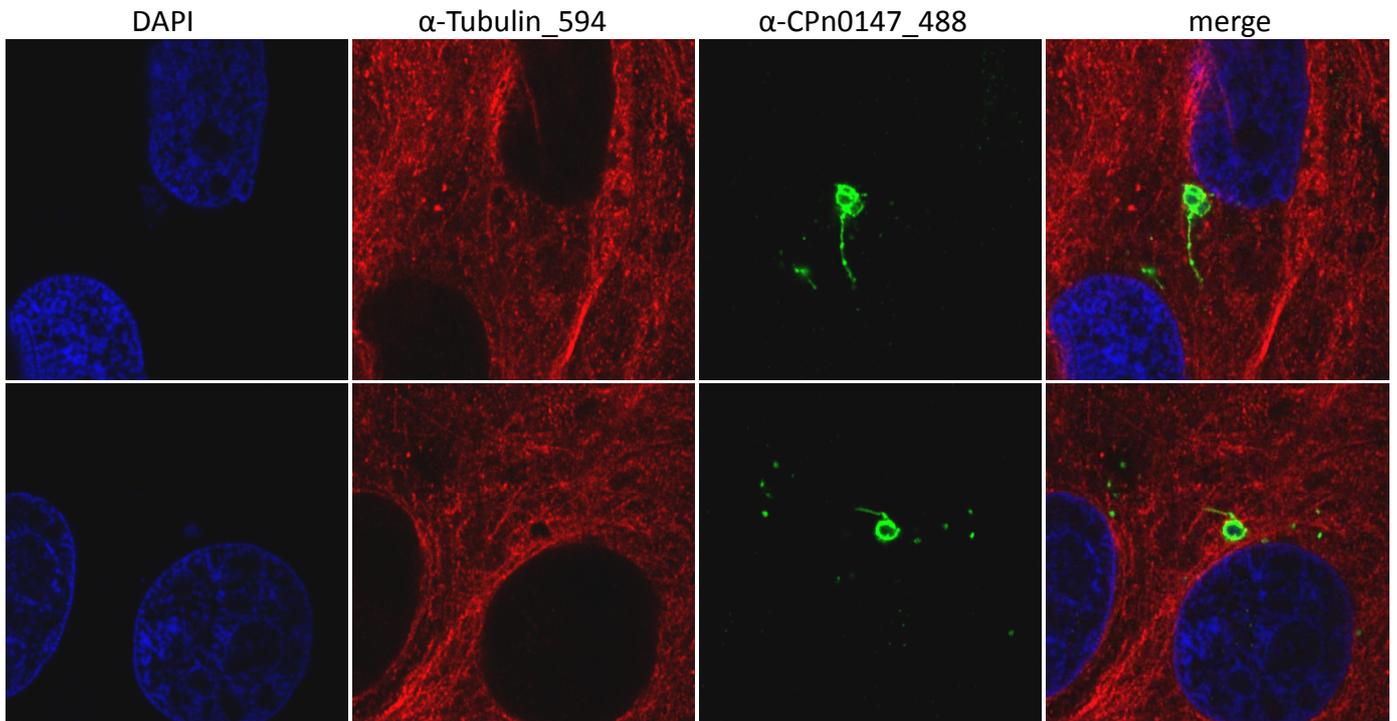


72 hpl Pfa 37°C fixed

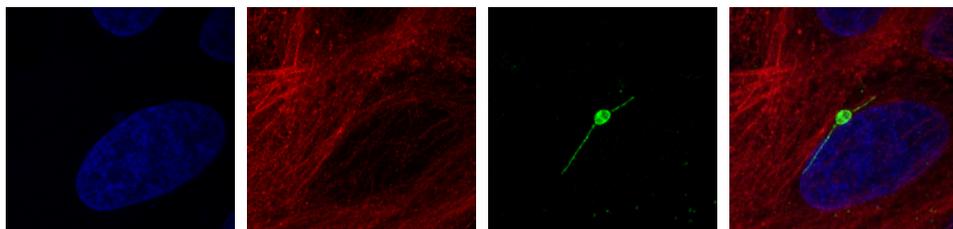


19 hpl Pfa 37°C fixed

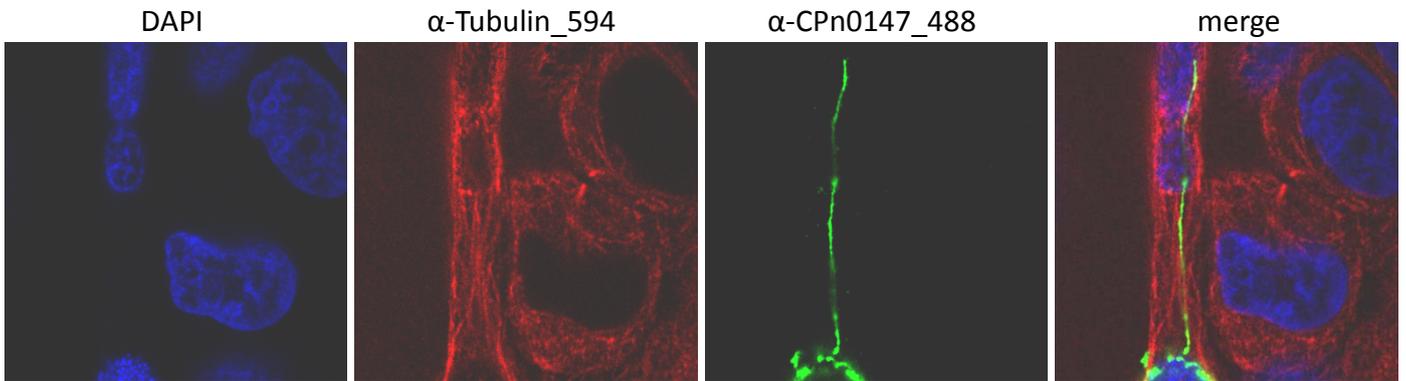
24 hpl Pfa 37°C fixed



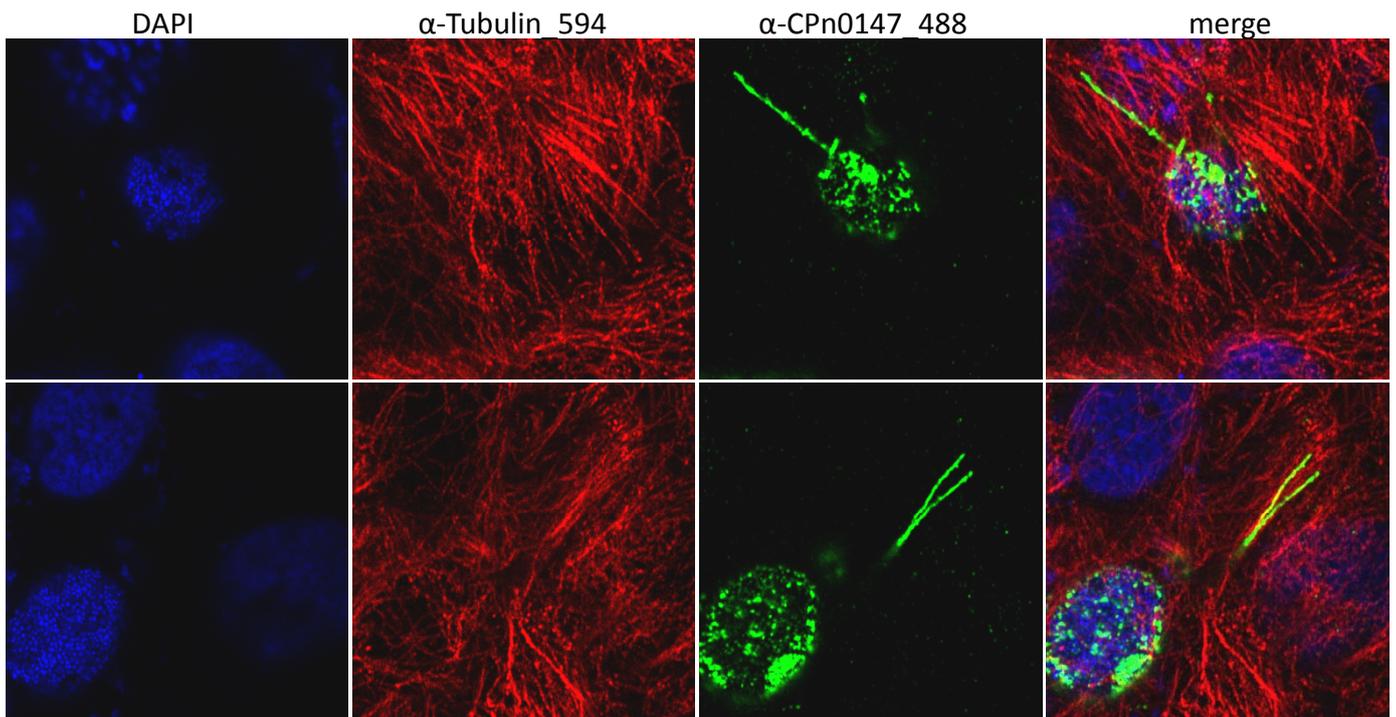
MIP



48 hpl Pfa 37°C fixed



72 hpl Pfa 37°C fixed



Zeit 24hpl	Fibers per Cell	InCA Pos	147 Pos	Zeit 48hpl	Fibers per Cel	InCA Pos	147 Pos	Zeit 72hpl	Fibers per Cell	InCA Pos	147 Pos
1	3	3	3	2	2	2	2	3	3	3	3
2	1	1	1	5	5	5	5	1	1	1	1
3	1	1	1	4	4	4	4	1	1	1	1
4	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1
5	1	1	1	3	3	3	3	1	1	1	1
6	1	1	1	2	2	2	2	4	4	4	4
7	1	1	1	3	3	3	3	2	2	2	2
8	1	1	1	4	4	4	4	4	4	4	4
9	1	1	1	4	4	4	4	4	4	4	4
10	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
11	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1
12	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1
13	3	3	3	5	5	5	5	3	3	3	3
14	1	1	1	3	3	3	3	5	5	5	5
15	1	1	1	5	5	5	5	1	1	1	1
16	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3
17	1	1	1	1	1	1	1	4	4	4	4
18	1	1	1	4	4	4	4	3	3	3	3
19	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
20	1	1	1	3	3	3	3	2	2	2	2
21	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3
22	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
23	1	1	1	4	4	4	4	2	2	2	2
24	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2
25	1	1	1	5	5	5	5	2	2	2	2
26	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1
27	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1
28	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3
29	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2
30	1	1	1	3	3	3	3	1	1	1	1
31	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3
32	1	1	1	6	6	6	6	1	1	1	1
33	1	1	1	6	6	6	6	3	3	3	3
34	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3
35	1	1	1	3	3	3	3	2	2	2	2
36	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1
37	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
38	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2
39	1	1	1	2	2	2	2	8	8	8	8
40	1	1	1	4	4	4	4	1	1	1	1
41	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
42	1	1	1	3	3	3	3	1	1	1	1
43	1	1	1	4	4	4	4	2	2	2	2
44	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2
45	1	1	1	3	3	3	3	2	2	2	2
46	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
47	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
48	1	1	1	4	4	4	4	2	2	2	2
49	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1
50	1	1	1	4	4	4	4	3	3	3	3
Summe	60	60	60	Summe	134	134	134	Summe	110	110	110
Mittelwert	1,2	1,2	1,2	Mittelwert	2,68	2,68	2,68	Mittelwert	2,2	2,2	2,2
Zeit 24hpl	Fibers per Cell	147 Pos	DNAK Pos	Zeit 48hpl	Fibers per Cel	147 Pos	DNAK pos	Zeit 72hpl	Fibers per Cell	147 Pos	DNAK Pos
1	1	1	0	1	4	4	0	1	4	4	0
2	1	1	0	2	2	2	0	2	1	1	0
3	1	1	0	3	1	1	0	3	4	4	0
4	1	1	0	4	3	3	0	4	5	5	0
5	1	1	0	5	1	1	0	5	1	1	0
6	1	1	0	6	1	1	0	6	4	4	0
7	1	1	0	7	1	1	0	7	2	2	0
8	1	1	0	8	1	1	1 mit DNA Signal	8	3	3	0
9	1	1	0	9	4	4	0	9	3	3	0
10	1	1	0	10	2	2	0	10	1	1	0
11	1	1	0	11	1	1	0	11	1	1	0
12	1	1	0	12	3	3	0	12	1	1	0
13	1	1	0	13	3	3	0	13	1	1	0
14	1	1	0	14	5	5	0	14	5	5	0
15	1	1	0	15	3	3	0	15	5	5	0
16	1	1	0	16	1	1	0	16	4	4	0
17	3	3	0	17	1	1	0	17	5	5	0
18	2	2	0	18	5	5	1 mit DNA Signal	18	1	1	0
19	1	1	1 mit DNA Signal	19	1	1	0	19	1	1	0
20	1	1	0	20	1	1	0	20	2	2	0
21	1	1	0	21	4	4	0	21	1	1	0
22	1	1	1 mit DNA Signal	22	1	1	0	22	3	3	0
23	2	2	0	23	3	3	0	23	5	5	0
24	2	2	0	24	1	1	0	24	2	2	0
25	1	1	0	25	3	3	0	25	5	5	0
26	1	1	0	26	2	2	0	26	1	1	0
27	3	3	0	27	1	1	0	27	3	3	0
28	1	1	0	28	1	1	0	28	5	5	0
29	2	2	0	29	1	1	0	29	1	1	0
30	2	2	0	30	1	1	0	30	4	4	0
31	1	1	0	31	1	1	0	31	1	1	0
32	1	1	0	32	1	1	0	32	1	1	0
33	2	2	0	33	1	1	0	33	1	1	0
34	1	1	0	34	5	5	0	34	4	4	0
35	1	1	0	35	2	2	0	35	5	5	0
36	1	1	0	36	3	3	0	36	1	1	0
37	1	1	0	37	1	1	0	37	2	2	0
38	1	1	0	38	2	2	0	38	1	1	0
39	1	1	0	39	1	1	0	39	2	2	0
40	1	1	0	40	2	2	0	40	2	2	0
41	1	1	0	41	5	5	0	41	2	2	0
42	1	1	0	42	1	1	0	42	2	2	0
43	3	3	0	43	2	2	0	43	1	1	0
44	1	1	0	44	1	1	0	44	1	1	0
45	2	2	0	45	5	5	0	45	5	5	0
46	1	1	0	46	2	2	1 mit DNA Signal	46	5	5	0
47	1	1	0	47	4	4	0	47	2	2	0
48	1	1	0	48	1	1	0	48	4	4	0
49	1	1	0	49	5	5	0	49	1	1	0
50	3	3	0	50				50	1	1	0
51	1	1	0	51				51	2	2	0
Summe	66	66	2		107	107	3		130	130	0
Mittelwert	1,29	1,29	0,04		2,18	2,18	0,06		2,55	2,55	0,00
Zeit 24hpl	Fibers per Cell	147 Pos	LPS Pos	Zeit 48hpl	Fibers per Cel	147 Pos	LPS pos	Zeit 72hpl	Fibers per Cell	147 Pos	LPS Pos
1	3	3	0	1	2	2	0	1	3	3	1 einzelner Partikel ohne DNA
2	1	1	0	2	1	1	0	2	1	1	0
3	1	1	0	3	1	1	0	3	5	5	0
4	1	1	0	4	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	4	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA
5	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	5	3	3	1 einzelner Partikel ohne DNA	5	3	3	0
6	3	3	1 einzelner Partikel ohne DNA	6	2	2	2 einzelner Partikel ohne DNA	6	1	1	0
7	2	2	0	7	1	1	0	7	3	3	1 einzelner Partikel ohne DNA
8	1	1	0	8	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	8	1	1	0
9	1	1	0	9	1	1	0	9	5	5	1 einzelner Partikel ohne DNA
10	1	1	0	10	1	1	0	10	1	1	0
11	1	1	0	11	5	5	2 einzelner Partikel ohne DNA	11	4	4	1 einzelner Partikel ohne DNA
12	1	1	0	12	1	1	0	12	1	1	0

13	1	1	0		13	1	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	13	2	2	0
14	1	1	0		14	2	2	2	2 einzelner Partikel ohne DNA	14	3	3	0
15	2	2	0		15	1	1	0	0	15	1	1	0
16	2	2	0		16	5	5	0	0	16	3	3	0
17	1	1	0		17	1	1	0	0	17	1	1	0
18	3	3	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	18	1	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	18	4	4	1 einzelner Partikel ohne DNA
19	3	3	2	2 ein partikel ohne und einer mit DNA	19	1	1	0	0	19	1	1	0
20	1	1	0		20	1	1	0	0	20	1	1	0
21	2	2	0		21	1	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	21	2	2	1 einzelner Partikel ohne DNA
22	2	2	1	1 einzelner Partikel mit DNA	22	1	1	0	0	22	1	1	0
23	1	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	23	1	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	23	3	3	0
24	1	1	0		24	1	1	0	0	24	4	4	1 einzelner Partikel ohne DNA
25	1	1	0		25	1	1	0	0	25	1	1	0
26	3	3	3		26	1	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	26	1	1	0
27	1	1	0		27	1	1	0	0	27	4	4	0
28	1	1	0		28	1	1	0	0	28	5	5	2
29	1	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	29	3	3	3	3 einzelner Partikel ohne DNA	29	1	1	0
30	1	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	30	5	5	5	5 einzelner Partikel ohne DNA	30	4	4	1 einzelner Partikel ohne DNA
31	1	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	31	5	5	2	2 einzelner Partikel ohne DNA	31	4	4	1 einzelner Partikel ohne DNA
32	1	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	32	1	1	0	0	32	3	3	0
33	1	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	33	2	2	0	0	33	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA
34	1	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	34	5	5	2	2 einzelner Partikel ohne DNA	34	1	1	0
35	1	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	35	3	3	0	0	35	4	4	0
36	4	4	3	3 einzelner Partikel ohne DNA	36	2	2	2	2 einzelner Partikel ohne DNA	36	2	2	0
37	1	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	37	1	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	37	2	2	0
38	1	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	38	1	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	38	5	5	3 einzelner Partikel ohne DNA
39	1	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	39	1	1	0	0	39	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA
40	1	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	40	1	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	40	2	2	0
41	2	2	0		41	2	2	2	2 einzelner Partikel ohne DNA	41	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA
42	3	3	0		42	1	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	42	4	4	1 einzelner Partikel ohne DNA
43	1	1	0		43	2	2	0	0	43	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA
44	1	1	0		44	2	2	0	0	44	1	1	0
45	1	1	0		45	1	1	0	0	45	2	2	0
46	1	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	46	2	2	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	46	3	3	2 einzelner Partikel ohne DNA
47	1	1	0		47	2	2	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	47	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA
48	1	1	0		48	1	1	0	0	48	1	1	0
49	2	2	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	49	1	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	49	2	2	0
50	1	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	50	2	2	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	50	2	2	0
51	1	1	1	1 einzelner Partikel ohne DNA	51	1	1	0	0	51	2	2	1 einzelner Partikel ohne DNA
Summe	73	73	28		88	88	38			116	116	24	
Mittelwert	1,43	1,43	0,55		1,73	1,73	0,75			2,27	2,27	0,47	
Zeit 24hpl	Fibers per Cell	InCA Pos	Pmp21N Pos		Zeit 48hpl	Fibers per Cell	InCA Pos	Pmp21N Pos		Zeit 72hpl	Fibers per Cell	InCA Pos	Pmp21N Pos
1	1	1	0		1	1	1	0		1	10	10	0
2	2	2	0		2	3	3	0		2	10	10	0
3	1	1	0		3	1	1	0		3	5	5	0
4	1	1	0		4	2	2	0		4	5	5	0
5	1	1	0		5	1	1	0		5	3	3	0
6	1	1	0		6	1	1	0		6	10	10	0
7	3	3	0		7	4	4	0		7	10	10	0
8	2	2	0		8	1	1	0		8	10	10	0
9	1	1	0		9	1	1	0		9	1	1	0
10	1	1	0	0 einzelner Partikel ohne DNA	10	1	1	0		10	3	3	0
11	1	1	0		11	2	2	0		11	3	3	0
12	1	1	0		12	1	1	0		12	3	3	0
13	1	1	0		13	2	2	0		13	1	1	0
14	1	1	0		14	2	2	0		14	3	3	0
15	1	1	0		15	1	1	0		15	4	4	0
16	1	1	0		16	2	2	0		16	5	5	0
17	1	1	0		17	1	1	0		17	5	5	0
18	2	2	0		18	1	1	0		18	5	5	0
19	1	1	0		19	3	3	0		19	2	2	0
20	1	1	0		20	1	1	0		20	2	2	0
21	1	1	0		21	1	1	0		21	5	5	0
22	1	1	0		22	1	1	0		22	5	5	0
23	1	1	0		23	4	4	0		23	5	5	0
24	1	1	0		24	1	1	1		24	3	3	0
25	1	1	0		25	1	1	0		25	2	2	0
26	3	3	0		26	1	1	0		26	5	5	0
27	1	1	0		27	1	1	0		27	5	5	0
28	1	1	0		28	2	2	0		28	5	5	0
29	1	1	0		29	2	2	0		29	5	5	0
30	1	1	0		30	1	1	0		30	5	5	0
31	1	1	1	1 einzelne Partikel ohne DNA	31	1	1	0		31	5	5	0
32	1	1	0		32	2	2	0		32	5	5	0
33	1	1	0		33	1	1	0		33	4	4	0
34	2	2	2	2 einzelne Partikel ohne DNA	34	2	2	0		34	5	5	0
35	3	3	1		35	1	1	0		35	5	5	0
36	1	1	0		36	1	1	0		36	5	5	0
37	1	1	0		37	4	4	0		37	5	5	0
38	1	1	0		38	1	1	0		38	3	3	0
39	1	1	0		39	1	1	0		39	1	1	0
40	1	1	0		40	1	1	0		40	5	5	0
41	2	2	0		41	1	1	0		41	5	5	0
42	1	1	0		42	3	3	0		42	1	1	0
43	1	1	0		43	1	1	1	1 einzelne Partikel ohne DNA	43	5	5	0
44	1	1	0		44	1	1	0		44	1	1	0
45	2	2	0		45	1	1	0		45	10	10	0
46	1	1	0		46	1	1	0		46	5	5	0
47	1	1	0		47	1	1	0		47	2	2	0
48	1	1	0		48	1	1	0		48	10	10	0
49	1	1	0		49	1	1	0		49	5	5	0
50	1	1	0		50	1	1	0		50	1	1	0
51	1	1	1		51	2	2	0		51	10	10	0
Summe	63	63	5		76	76	2			243	243	0	
Mittelwert	1,24	1,24	0,10		1,490	1,490	0,039			4,76	4,76	0,00	

Zeit	Average Fibres per Cell	IncA Positive	CPn0147 Positive	
24	1,2	1,2	1,2	100%
48	2,68	2,68	2,68	100%
72	2,2	2,2	2,2	100%

100% der Fäden sind IncA und 147 Positiv

Zeit	Average Fibres per Cell	CPn0147 Positive	LPS Positive	
24	1,43	1,43	0,55	38%
48	1,73	1,73	0,75	43%
72	2,27	2,27	0,47	21%

sind Positiv

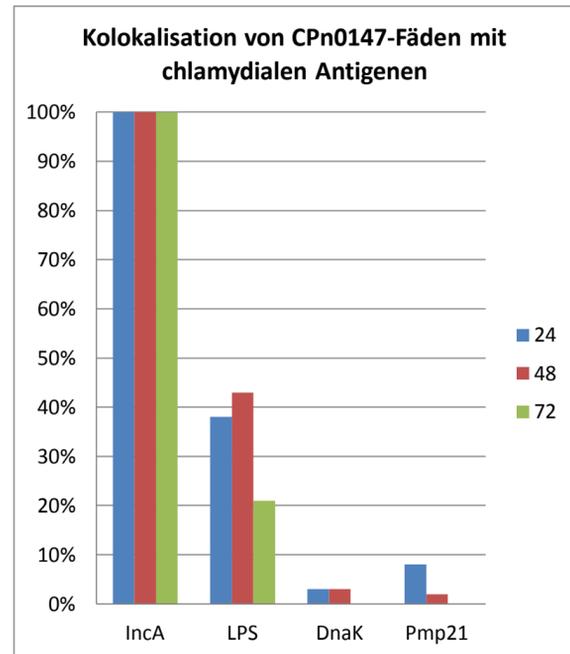
Zeit	Average Fibres per Cell	CPn0147 Positive	DnaK Positive	
24	1,29	1,29	0,04	3%
48	2,18	2,18	0,06	3%
72	2,55	2,55	0,00	0%

sind Positiv

Zeit	Average Fibres per Cell	IncA Positive	Pmp21 Positive	
24	1,24	1,24	0,10	8%
48	1,49	1,49	0,03	2%
72	4,76	4,76	0,00	0%

sind Positiv

	24	48	72
IncA	100%	100%	100%
LPS	38%	43%	21%
DnaK	3%	3%	0%
Pmp21	8%	2%	0%



Gesichtsblätter	Inklusionen	Zellen	DMSO Kontrolle - OS + Sjl Chlamyden 1:100 verdünnt - Cyclo 48hpl
1	74	129	
2	36	80	
3	13	13	
4	57	57	
5	80	113	
6	69	118	
7	63	83	
8	20	38	
9	20	55	
10	60	79	
11	13	18	
12	73	85	
13	49	40	
14	53	70	
15	55	75	
16	66	109	
17	52	80	
18	71	114	
19	61	68	
20	67	84	
21	55	88	
22	20	22	
23	41	70	
24	34	45	
25	32	88	
Σ	1259	1837	68,5% der Zellen sind infiziert

Gesichtsblätter	Inklusionen	Zellen	DMSO Kontrolle + OS 100mM + Sjl Chlamyden 1:100 verdünnt - Cyclo 48hpl
1	54	81	
2	56	66	
3	47	90	
4	52	83	
5	1	21	
6	21	44	
7	14	37	
8	54	73	
9	39	83	
10	47	95	
11	4	9	
12	45	77	
13	33	83	
14	11	30	
15	44	97	
16	30	91	
17	51	103	
18	22	40	
19	39	60	
20	67	103	
21	37	77	
22	15	55	
23	67	77	
24	22	45	
25	27	66	
Σ	909	1743	52,2% der Zellen sind infiziert

Gesichtsblätter	Inklusionen	Zellen	DMSO Kontrolle - OS + 10µl Chlamyden Chlamyden 1:100 verdünnt - Cyclo 48hpl
1	38	55	
2	72	75	
3	41	49	
4	64	83	
5	29	63	
6	66	60	
7	91	102	
8	56	71	
9	60	69	
10	14	25	
11	45	55	
12	64	79	
13	82	89	
14	14	13	
15	92	73	
16	95	111	
17	54	49	
18	73	42	
19	117	125	
20	72	99	
21	113	114	
22	48	38	
23	50	87	
24	97	127	
25	69	69	
Σ	1655	1822	90,8% der Zellen sind infiziert

Gesichtsblätter	Inklusionen	Zellen	DMSO Kontrolle + OS 100mM + 10µl Chlamyden Chlamyden 1:100 verdünnt - Cyclo 48hpl
1	83	79	
2	89	82	
3	71	41	
4	104	110	
5	111	60	
6	19	11	
7	84	79	
8	55	52	
9	94	123	
10	136	103	
11	61	74	
12	58	107	
13	62	83	
14	36	46	
15	79	91	
16	51	99	
17	67	171	
18	48	75	
19	64	61	
20	86	95	
21	61	73	
22	89	108	
23	67	57	
24	51	67	
25	23	27	
Σ	1745	1974	88,4% der Zellen sind infiziert

Gesichtsblätter	Inklusionen	Zellen	DMSO Kontrolle - OS + Sjl Chlamyden 1:100 verdünnt - Cyclo 48hpl
1	20	27	10µM Nocodazol - OS + Sjl Chlamyden 1:100 verdünnt - Cyclo 48hpl
2	15	30	
3	25	70	
4	16	67	
5	50	91	
6	8	23	
7	21	62	
8	24	55	
9	22	45	
10	10	10	
11	17	24	
12	23	28	
13	38	57	
14	13	37	
15	5	29	
16	4	14	
17	7	28	
18	25	29	
19	18	39	
20	27	44	
21	22	42	
22	15	40	
23	15	36	
24	49	64	
25	33	54	
Σ	551	1120	49,1% der Zellen sind infiziert

Gesichtsblätter	Inklusionen	Zellen	DMSO Kontrolle + OS 100mM + Sjl Chlamyden 1:100 verdünnt - Cyclo 48hpl
1	38	72	10µM Nocodazol + OS 100mM + Sjl Chlamyden 1:100 verdünnt - Cyclo 48hpl
2	6	30	
3	3	28	
4	17	28	
5	43	43	
6	22	23	
7	19	25	
8	18	17	
9	11	23	
10	11	14	
11	7	25	
12	63	72	
13	14	29	
14	16	39	
15	2	29	
16	6	13	
17	7	28	
18	22	27	
19	4	21	
20	6	27	
21	28	48	
22	13	38	
23	10	29	
24	23	32	
25	28	26	
Σ	384	762	50,4% der Zellen sind infiziert

Gesichtsblätter	Inklusionen	Zellen	DMSO Kontrolle - OS + 10µl Chlamyden 1:100 verdünnt - Cyclo 48hpl
1	13	34	10µM Nocodazol - OS + 10µl Chlamyden 1:100 verdünnt - Cyclo 48hpl
2	23	23	
3	41	41	
4	21	39	
5	17	30	
6	26	25	
7	19	30	
8	15	18	
9	16	22	
10	14	14	
11	29	31	
12	25	22	
13	27	37	
14	39	43	
15	9	27	
16	47	37	
17	26	26	
18	22	38	
19	11	28	
20	13	6	
21	25	34	
22	28	51	
23	20	45	
24	32	40	
25	55	36	
Σ	587	820	71,6% der Zellen sind infiziert

Gesichtsblätter	Inklusionen	Zellen	DMSO Kontrolle + OS 100mM + 10µl Chlamyden 1:100 verdünnt - Cyclo 48hpl
1	16	20	10µM Nocodazol + OS 100mM + 10µl Chlamyden 1:100 verdünnt - Cyclo 48hpl
2	19	24	
3	12	18	
4	32	30	
5	30	31	
6	11	15	
7	39	46	
8	18	16	
9	21	17	
10	42	34	
11	32	18	
12	11	13	
13	31	45	
14	29	36	
15	11	14	
16	28	44	
17	17	16	
18	15	21	
19	27	37	
20	19	29	
21	22	59	
22	26	29	
23	31	62	
24	25	30	
25	36	36	
Σ	587	741	79,2% der Zellen sind infiziert

Gesichtsblätter	Inklusionen	Zellen	DMSO Kontrolle - OS + Sjl Chlamyden 1:100 verdünnt - Cyclo 48hpl
1	41	79	1µM Nocodazol - OS + Sjl Chlamyden 1:100 verdünnt - Cyclo 48hpl
2	13	21	
3	57	54	
4	24	22	
5	32	69	
6	28	56	
7	32	81	
8	54	93	
9	50	62	
10	40	49	
11	41	46	
12	23	38	
13	27	29	
14	22	68	
15	55	60	
16	28	61	
17	36	69	
18	27	30	
19	82	73	
20	24	44	
21	22	19	
22	19	35	
23	37	59	
24	30	43	
25	33	59	
Σ	876	1319	66,4% der Zellen sind infiziert

Gesichtsblätter	Inklusionen	Zellen	DMSO Kontrolle + OS 100mM + Sjl Chlamyden 1:100 verdünnt - Cyclo 48hpl
1	19	23	1µM Nocodazol + OS 100mM + Sjl Chlamyden 1:100 verdünnt - Cyclo 48hpl
2	40	39	
3	13	33	
4	15	17	
5	29	27	
6	27	43	
7	29	57	
8	35	35	
9	23	33	
10	43	43	
11	39	42	
12	32	32	
13	13	13	
14	23	14	
15	18	47	
16	13	22	
17	39	28	
18	39	28	
19	47	49	
20	16	20	
21	39	32	
22	37	25	
23	73	73	
24	36	44	
25	59	25	
Σ	821	925	88,8% der Zellen sind infiziert

Gesichtsblätter	Inklusionen	Zellen	DMSO Kontrolle - OS + 10µl Chlamyden 1:100 verdünnt - Cyclo 48hpl
1	19	16	1µM Nocodazol - OS + 10µl Chlamyden 1:100 verdünnt - Cyclo 48hpl
2	40	46	
3	13	33	
4	83	74	
5	56	71	
6	45	59	
7	36	53	
8	32	28	
9	47	36	
10	17	17	
11	39	53	
12	30	30	
13	9	27	
14	49	70	
15	13	51	
16	48	49	
17	38	37	
18	34	32	
19	39	55	
20	15	20	
21	39	30	
22	39	64	
23	59	87	
24	55	85	
25	130	130	
Σ	1032	1309	78,8% der Zellen sind infiziert

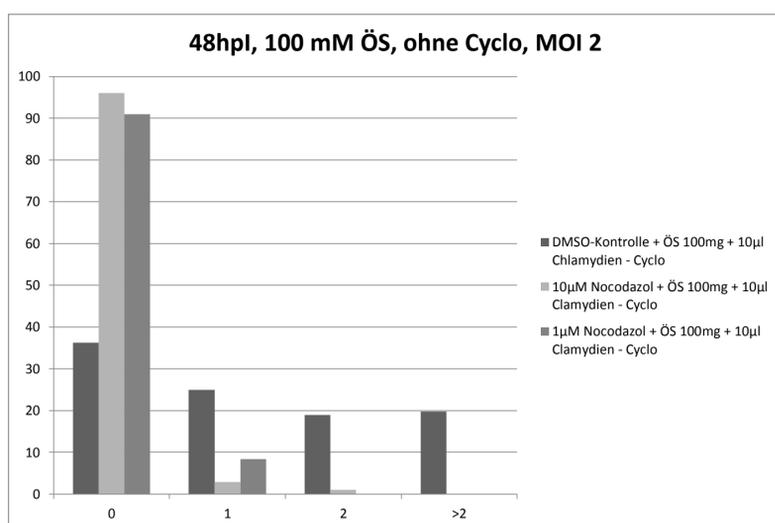
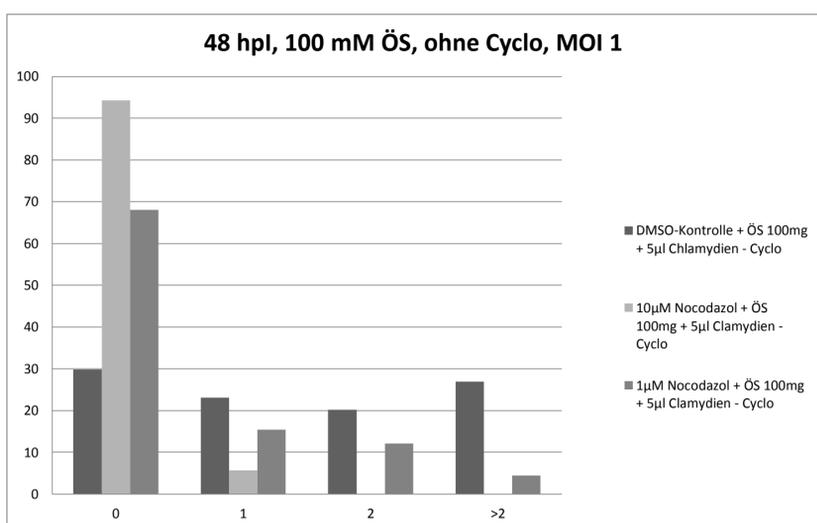
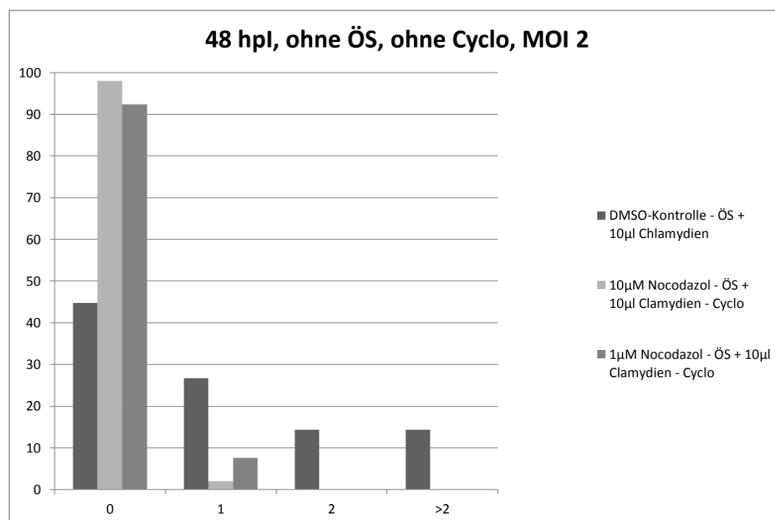
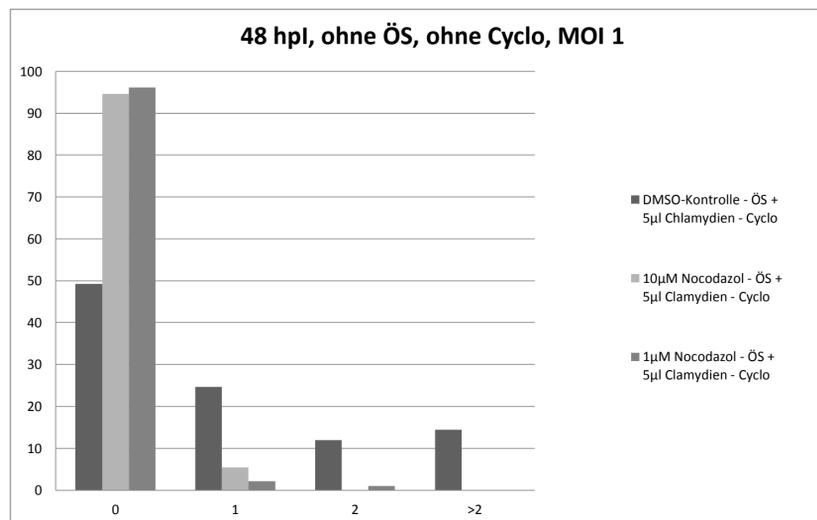
Gesichtsblätter	Inklusionen	Zellen	DMSO Kontrolle + OS 100mM + 10µl Chlamyden 1:100 verdünnt - Cyclo 48hpl
1	39	46	Brefeldin A - OS + 10µl Chlamyden 1:100 verdünnt - Cyclo 48hpl
2	20	67	
3	37	38	
4	94	105	
5	65	107	
6	132	112	
7	67	73	
8	16	18	
9	111	163	
10	114	175	
11	116	123	
12	67	71	
13	101	93	
14	66	64	
15	65	51	
16	37	31	
17	42	43	
18	105	143	
19	57	76	
20	58	60	
21	64	63	
22	71	43	
23	60	43	
24	84	35	
25	41	60	
Σ	1156	884	130% der Zellen sind infiziert?

Gesichtsblätter	Inklusionen	Zellen	DMSO Kontrolle - OS + Sjl Chlamyden 1:100 verdünnt - Cyclo 48hpl
1	66	87	Brefeldin A - OS + Sjl Chlamyden 1:100 verdünnt - Cyclo 48hpl
2	86	132	
3	46	45	
4	61	84	
5	76	86	
6	53	25	
7	14	23	
8	52	48	
9	69	100	
10	62	83	
11	87	79	
12	102	91	
13	2	10	
14	24	23	
15	40	28	
16	79	89	
17	37	88	
18	37	93	
19	118	186	
20	90	108	
21	125	142	
22	103	81	
23	71	100	
24	35	46	
25	32	31	
Σ	1575	1910	82,5% der Zellen sind infiziert

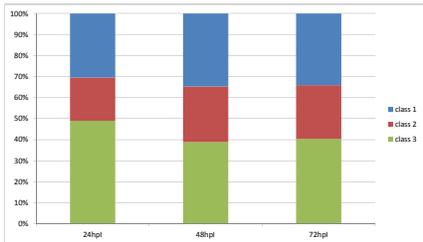
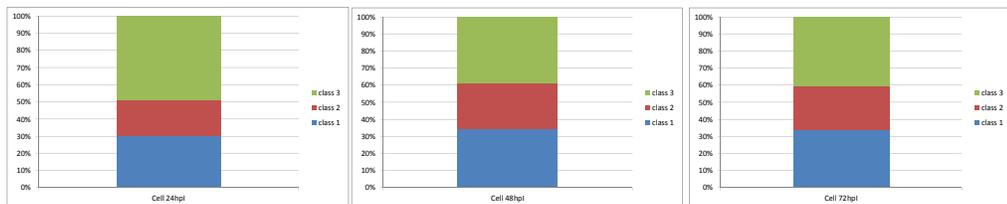
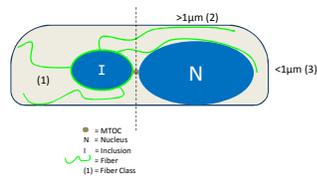
Gesichtsblätter	Inklusionen	Zellen	DMSO Kontrolle + OS 100mM + Sjl Chlamyden 1:100 verdünnt - Cyclo 48hpl
1	47	83	Brefeldin A - OS + 100mM + Sjl Chlamyden 1:100 verdünnt - Cyclo 48hpl

DMSO-Kontrolle - ÖS + 5µl Chlamydien - Cyclo					DMSO-Kontrolle - ÖS + 10µl Chlamydien				
Fäden je Einzelinklusion	0	1	2	>2	Fäden je Einzelinklusion	0	1	2	>2
Zahl Gezählter Inklusionen	58	29	14	17	Zahl Gezählter Inklusionen	47	28	15	15
%	49,2	24,6	11,9	14,4	%	44,8	26,7	14,3	14,3
10µM Nocodazol - ÖS + 5µl Clamydien - Cyclo					10µM Nocodazol - ÖS + 10µl Clamydien - Cyclo				
Fäden je Einzelinklusion	0	1	2	>2	Fäden je Einzelinklusion	0	1	2	>2
Zahl Gezählter Inklusionen	106	6	0	0	Zahl Gezählter Inklusionen	100	2	0	0
%	94,6	5,4	0	0	%	98	2	0	0
1µM Nocodazol - ÖS + 5µl Clamydien - Cyclo					1µM Nocodazol - ÖS + 10µl Clamydien - Cyclo				
Fäden je Einzelinklusion	0	1	2	>2	Fäden je Einzelinklusion	0	1	2	>2
Zahl Gezählter Inklusionen	100	3	1	0	Zahl Gezählter Inklusionen	97	8	0	0
%	96,2	2,1	1	0	%	92,4	7,6	0	0
BrefeldinA 1mg/ml - ÖS + 5µl Clamydien - Cyclo					BrefeldinA 1mg/ml - ÖS + 10µl Clamydien - Cyclo				
Fäden je Einzelinklusion	0	1	2	>2	Fäden je Einzelinklusion	0	1	2	>2
Zahl Gezählter Inklusionen	97	16	2	0	Zahl Gezählter Inklusionen	87	9	5	0
%				0	%				0
BrefeldinA 1mg/ml - ÖS + 5µl Clamydien - Cyclo 6h vor Fixierung gewegewaschen					BrefeldinA 1mg/ml - ÖS + 10µl Clamydien - Cyclo 6h vor Fixierung gewegewaschen				
Fäden je Einzelinklusion	0	1	2	>2	Fäden je Einzelinklusion	0	1	2	>2
Zahl Gezählter Inklusionen	103	6	1	1	Zahl Gezählter Inklusionen	108	6	0	1
%					%				

DMSO-Kontrolle + ÖS 100mg + 5µl Chlamydien - Cyclo					DMSO-Kontrolle + ÖS 100mg + 10µl Chlamydien - Cyclo				
Fäden je Einzelinklusion	0	1	2	>2	Fäden je Einzelinklusion	0	1	2	>2
Zahl Gezählter Inklusionen	31	24	21	28	Zahl Gezählter Inklusionen	42	29	22	23
%	29,8	23,1	20,2	26,9	%	36,2	25	19	19,8
10µM Nocodazol + ÖS 100mg + 5µl Clamydien - Cyclo					10µM Nocodazol + ÖS 100mg + 10µl Clamydien - Cyclo				
Fäden je Einzelinklusion	0	1	2	>2	Fäden je Einzelinklusion	0	1	2	>2
Zahl Gezählter Inklusionen	100	6	0	0	Zahl Gezählter Inklusionen	98	3	1	0
%	94,3	5,7	0	0	%	96	2,9	1	0
1µM Nocodazol + ÖS 100mg + 5µl Clamydien - Cyclo					1µM Nocodazol + ÖS 100mg + 10µl Clamydien - Cyclo				
Fäden je Einzelinklusion	0	1	2	>2	Fäden je Einzelinklusion	0	1	2	>2
Zahl Gezählter Inklusionen	62	14	11	4	Zahl Gezählter Inklusionen	109	10	0	0
%	68,1	15,4	12,1	4,4	%	91	8,4	0	0
BrefeldinA 1mg/ml + ÖS 100mg + 5µl Clamydien - Cyclo					BrefeldinA 1mg/ml + ÖS 100mg + 10µl Clamydien - Cyclo				
Fäden je Einzelinklusion	0	1	2	>2	Fäden je Einzelinklusion	0	1	2	>2
Zahl Gezählter Inklusionen	53	33	23	18	Zahl Gezählter Inklusionen	63	22	18	7
%					%				
BrefeldinA 1mg/ml + ÖS 100mg + 5µl Clamydien - Cyclo 6h vor Fixierung gewegewaschen					BrefeldinA 1mg/ml + ÖS 100mg + 10µl Clamydien - Cyclo 6h vor Fixierung gewegewaschen				
Fäden je Einzelinklusion	0	1	2	>2	Fäden je Einzelinklusion	0	1	2	>2
Zahl Gezählter Inklusionen	90	20	9	15	Zahl Gezählter Inklusionen	82	17	15	4
%					%				



Cell 24hpi	Fiber-class	Σ Fibers per Cell	Cell 48hpi	Fiber-class	Σ Fibers per Cell	Cell 72hpi	Fiber-class	Σ Fibers per Cell			
1	1 und 2	2	1	1 u 1 u 1 u 2	4	1	1	1			
2	3	1	2	3 u 3	2	2	3	1			
3	3	1	3	2	1	3	3	1			
4	3	1	4	3	1	4	3	1			
5	3	1	5	1 u 1 u 3 u 3	4	5	3	1			
6	3	1	6	1 u 1 u 1 u 2	4	6	2	1			
7	3	1	7	1 u 2	2	7	3	1			
8	1	1	8	2	1	8	1	1			
9	3	1	9	2 u 3 u 3	3	9	3	1			
10	3	1	10	1	1	10	1	1			
11	1	1	11	1 u 3 u 3 u 3	4	11	1	1			
12	3	1	12	2 u 3	2	12	3	1			
13	1	1	13	1 u 3 u 3	3	13	1 u 3	2			
14	3	1	14	1	1	14	1 u 3	2			
15	3	1	15	2	1	15	3	1			
16	1 und 2	2	16	1 u 2 u 3 u 3 u 3	5	16	3	1			
17	3	1	17	2	1	17	2 u 2 u 2 u 3	4			
18	2	1	18	1	1	18	1	1			
19	2	1	19	1 u 3 u 3	3	19	1 u 2	2			
20	1	1	20	1 u 1 u 1 u 2 u 2 u 3	6	20	3	1			
21	3	1	21	3	1	21	2 u 2 u 3 u 3	4			
22	1	1	22	3 u 3 u 3	3	22	2	1			
23	3	1	23	1 u 3	2	23	1	1			
24	3	1	24	1 u 2	2	24	3 u 3	2			
25	3	1	25	2 u 3	2	25	3 u 3	2			
26	2	1	26	1 u 2 u 3 u 3	4	26	1	1			
27	1	1	27	1 u 2	2	27	2	1			
28	2	1	28	1 u 2 u 3	3	28	1	1			
29	3	1	29	3	1	29	3	1			
30	1	1	30	3 u 3	2	30	1 u 2	2			
31	2	1	31	1 u 2 u 3 u 3	4	31	2	1			
32	3	1	32	1	1	32	2 u 2 u 3 u 3	4			
33	3	1	33	1 u 2 u 3 u 3	4	33	2	1			
34	3	1	34	1 u 1	2	34	1	1			
35	3	1	35	1 u 1	2	35	2	1			
36	2	1	36	1 u 1 u 1 u 3	4	36	2	1			
37	1	1	37	1 u 2	2	37	1 u 3 u 3	3			
38	3	1	38	2	1	38	1 u 2 u 2 u 3 u 3	5			
39	3	1	39	3	1	39	3 u 3	2			
40	1	1	40	1	1	40	1 u 3	2			
41	3	1	41	3	1	41	1 u 3 u 3	3			
42	1	1	42	1 u 1	2	42	1	1			
43	1	1	43	3	1	43	3	1			
44	3	1	44	2	1	44	2 u 1	2			
45	3	1	45	2	1	45	3 u 3 u 3 u 3	4			
46	2	1	46	1 u 3	2	46	3	1			
47	1	1	47	1 u 2 u 3	3	47	3 u 3 u 1	3			
48	1	1	48	3	1	48	1 u 3	2			
49	3	1	49	2 u 3	2	49	2	1			
50	3	1	50	2 u 3 u 3	3	50	1	1			
51	1	1	51	1 u 3 u 3	3	51	1 u 1 u 1 u 2	4			
52	2	1	52	2 u 2 u 3	3	52	2	1			
53	1	1	53	1 u 3	2	53	1 u 2 u 2	3			
54	2	1	54	1 u 1	2	54	3 u 3 u 3	3			
55	3	1	55	1 u 2	2	55	1	1			
56	1	1	56	1 u 1 u 1 u 3 u 3	5	56	1	1			
57	3	1	57	3	1	57	1 u 1 u 2 u 3 u 3	5			
58	1	1	58	1 u 2 u 3 u 3	4	58	2 u 3	2			
59	3	1	59	2 u 3	2	59	2 u 3	2			
60	3	1	60	1 u 3 u 3	3	60	1 u 2 u 2	3			
61	3	1	61	2 u 3	2	61	3 u 3 u 3	2			
62	3	1	62	1 u 2	2	62	1 u 3 u 3 u 3	4			
63	3	1	63	1 u 1 u 1 u 2	4	63	2	1			
64	1	1	64	2 u 2	2	64	2 u 2	2			
65	2	1	65	2 u 3 u 3 u 3	4	65	1	1			
66	3	1	66	1 u 1	2	66	1 u 1 u 1 u 3 u 3 u 3	6			
67	3	1	67	1	1	67	2 u 3	2			
68	2	1	68	1 u 2 u 2	3	68	1 u 3	2			
69	1	1	69	1 u 3	2	69	1 u 2	2			
70	3	1	70	1	1	70	1	1			
71	2	1	71	2	1	71	1 u 3	2			
72	2	1	72	2 u 3	2	72	2	1			
73	2	1	73	2	1	73	2 u 2 u 2	3			
74	1	1	74	1 u 2 u 2	3	74	1 u 2 u 2	3			
75	1	1	75	1 u 1 u 1 u 3 u 3 u 3	6	75	1 u 2	2			
76	2	1	76	1 u 2	2	76	3	1			
77	1	1	77	3	1	77	3	1			
78	3	1	78	2	1	78	3 u 3	2			
79	1	1	79	1 u 2	2	79	3	1			
80	1	1	80	2	1	80	1 u 3 u 3 u 3	4			
81	1	1	81	3 u 3	2	81	1 u 3 u 3 u 3	4			
82	1	1	82	1	1	82	1 u 2 u 3	3			
83	3	1	83	2	1	83	3	1			
84	3	1	84	2 u 3 u 3	3	84	1	1			
85	3	1	85	2 u 3	2	85	1	1			
86	1	1	86	3 u 3	2	86	3	1			
87	1	1	87	2 u 2 u 3	3	87	1 u 1 u 2	3			
88	3	1	88	1	1	88	1	1			
89	3	1	89	2	1	89	1 u 3 u 3 u 3	4			
90	3	1	90	3	1	90	1 u 3	2			
91	2	1	91	1 u 2	2	91	2	1			
92	2	1	92	3	1	92	2	1			
93	3	1	93	3 u 3	2	93	2 u 2	2			
94	3	1	94	1 u 2	2	94	1 u 1	2			
95	3	1	95	1 u 1 u 2	3	95	1 u 1 u 2	3			
96	1	1	96	2 u 3	2	96	1 u 3	2			
97	1	1	97	3	1	97	1 u 1 u 1 u 3	4			
98	1	1	98	2 u 3	2	98	3	1			
99	3	1	99	2 u 3 u 3 u 3	4	99	1	1			
100	3	1	100	3 u 3	2	100	2 u 3 u 3	3			
102			219			191					
Σ Fibers	class 1	class 2	class 3	class 1	class 2	class 3	class 1	class 2	class 3		
102	31	21	50	219	76	58	85	191	65	49	77



	class 1	class 2	class 3
24hpi	31	21	50
48hpi	76	58	85
72hpi	65	49	77