



**Analyse der neuen potentiellen
Effektorproteine CPn0712, CPn0677 und
CPn0678 von *Chlamydia pneumoniae***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Sebastian Hänsch

aus Werl

Düsseldorf, April 2016

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

Korreferent: Prof. Dr. Hermann Aberle

Tag der mündlichen Prüfung: 09.06.2016

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	2
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	7
ZUSAMMENFASSUNG	9
SUMMARY	11
1 EINLEITUNG	13
1.1 Die Ordnung <i>Chlamydiales</i>	13
1.1.1 Geschichte und Taxonomie.....	13
1.1.2 Pathogenität.....	15
1.1.3 Der Lebenszyklus von <i>C. pneumoniae</i>	16
1.2 Die humane Endozytose.....	19
1.2.1 Membranen während der Endozytose	22
1.2.2 Das Aktin- und Mikrotubuliskelett während der Endozytose.....	24
1.2.3 SNX9 als Mediator zwischen Membran- und Zytoskelettdynamik	26
1.2.4 Frühe Prozesse der chlamydialen Infektion	29
1.3 Das Typ-III Sekretionssystem	31
1.3.1 CdsD bzw. CPn0712.....	34
1.4 Identifikation neuartiger chlamydialer Effektorproteine	37
1.5 CPn0677 und CPn0678	38
1.5.1 EspF und EspF _U als wichtige Modulatoren einer bakteriellen Infektion	42
1.5.2 CPn0677 & CPn0678 Adhäsine oder Effektorproteine?	44
ZIELSETZUNG	45
2 MATERIAL	46
2.1 Gebrauchsartikel	46
2.2 Geräte und Maschinen	46
2.3 Chemikalien und Reagenzien.....	47
2.4 Lösungen und Puffer	49
2.1 Enzyme.....	51
2.1.1 Restriktionsenzyme	51

2.1.2	Weitere Enzyme	52
2.2	Antikörper für Westernblot und Immunfluoreszenz	52
2.2.1	Primäre Antikörper	52
2.2.2	Sekundäre Antikörper.....	53
2.3	Kits.....	53
2.4	Größenstandards	53
2.5	Oligonukleotide	54
2.5.1	Oligonukleotide zur Klonierung	54
2.5.2	Sonstige Oligonukleotide	54
2.6	Verwendete und neu erstellte Plasmide.....	55
2.7	Zellen und Zelllinien.....	56
2.7.1	Eukaryotische Zellen und Zelllinien.....	56
2.7.2	Prokaryotische Zellen und Zelllinien	57
2.8	Medien und Medienzusätze.....	57
3	METHODEN.....	60
3.1	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>.....	60
3.1.1	Induktion der Proteinexpression in <i>S. cerevisiae</i>	60
3.1.2	Serieller Verdünnungstropftest von <i>S. cerevisiae</i>	60
3.1.3	Aufbereitung von <i>S. cerevisiae</i> Zellen für Fluoreszenzmikroskopie.....	61
3.2	Kultivierung von <i>E. coli</i>.....	61
3.2.1	Herstellung elektrokompenter XL ₁ -blue Zellen	61
3.2.2	Induktion der Proteinexpression in <i>E. coli</i>	62
3.3	Kultivierung humaner Zelllinien.....	62
3.3.1	Mykoplasmen-Detektion und Behandlung von humanen Zelllinien	63
3.3.2	Auftauen humaner Zelllinien.....	65
3.3.3	Passagieren und Lagerung humaner Zelllinien	66
3.3.4	Ektopische Expression durch Transfektion in HEp-2 Zellen.....	66
3.3.4.1	Transfektion mit Infektion.....	67
3.3.4.2	Transfektion mit Endozytose-Induktion	67
3.3.4.3	Transfektion mit Zytoskelett-Beeinflussung.....	68

3.3.5	Antikörpertransfektion	68
3.4	Kultivierung von <i>C. pneumoniae</i>	69
3.4.1	Mykoplasmenbehandlung chlamydialer Bakterienstämme.....	69
3.4.2	Chlamydieninfektion und Kultivierung in Humanzellen.....	71
3.4.3	Bestimmung der Infektiosität einer Chlamydien suspension.....	71
3.4.4	Chlamydienreinigung über diskontinuierlichen Gastrografin-Gradient.....	72
3.4.5	Kurzzeitinfektion in Humanzellen.....	74
3.5	Molekularbiologische Methoden	74
3.5.1	DNA-Amplifikation über Polymerase-Kettenreaktion	74
3.5.2	Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen	76
3.5.3	Transformation <i>S. cerevisiae</i> und homologe Rekombination <i>in vivo</i>	76
3.5.4	DNA-Isolation aus <i>S. cerevisiae</i>	77
3.5.5	Transformation von <i>E. coli</i> über Elektroporation	77
3.5.6	Transformation von <i>E. coli</i> über 1-Minuten-Protokoll	77
3.5.7	Plasmid isolation im mini-Maßstab.....	77
3.5.8	Plasmid isolation im MIDI-Maßstab	77
3.5.9	Auftrennung von DNA-Proben mittels Agarosegel-Elektrophorese.....	78
3.5.10	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	78
3.6	Biochemische Methoden	78
3.6.1	Proteinaufreinigung mittels denaturierender Lyse und Dialyse.....	78
3.6.2	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford-Reagenz	80
3.6.3	Aufbereitung von Proben für SDS-PAGE.....	80
3.6.4	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Gelelektrophorese.....	80
3.6.5	Westernblot-Analyse und Immundetektion	81
3.6.6	Crosslinken von Proteinkomplexen in Lösung.....	82
3.6.7	Antikörperaufreinigung	83
3.6.8	Präabsorptionstest.....	84
3.6.9	Immunfluoreszenz-Färbung.....	85
3.6.10	Differenzielles Permeabilisieren	88
3.6.11	Koimmunpräzipitationen	90
3.6.11.1	Ko-IP aus transfizierten Zellen mittels μ MACS™	90
3.6.11.2	Ko-IP aus Kurzzeit-infizierten Zellen mittels Protein-G-Agarose	91
3.7	Bioinformatische Programme.....	93

3.8	Mikroskopie	94
4	ERGEBNISSE	95
4.1	CPn0712 – Strukturprotein des Typ-3 Sekretionssystems oder Effektorprotein? .	95
4.1.1	Überprüfung der Spezifität der verwendeten α -CPn0712 Antikörper.....	95
4.1.2	CPn0712 assoziiert mit Bakterien und teilweise mit der Inklusionsmembran	97
4.1.3	Einige CPn0712-Signale kolokalisieren mit der Inklusionsmembran.....	100
4.1.4	CPn0712 ist während der Infektion nicht vom Wirtszellzytosol zugänglich	102
4.1.5	Während der Infektion ist CPn0712 intrachlamydial lokalisiert.....	103
4.1.6	CPn0712 lokalisiert in Partikeln dicht unter der Inklusionsmembran.....	105
4.1.7	Der CPn0712-induzierte wachstumsdefekte Phänotyp geht von einer Transmembrandomäne aus	108
4.2	CPn0678 – Adhäsion oder Effektorprotein?.....	113
4.2.1.1	Überprüfung der Spezifität der α -CPn0677 und α -CPn0678 Antikörper.....	113
4.2.1.2	CPn0677 und CPn0678 kolokalisieren mit redifferenzierten EBs innerhalb der späten Inklusion.....	115
4.2.1.3	CPn0678 ist kein chlamydiales Oberflächenprotein und wird zu frühen Infektionszeitpunkten sekretiert.....	118
4.2.1.4	CPn0678 kolokalisiert mit endozytotischen Strukturen in den Frühphasen der Infektion.....	120
4.2.2	Eigenschaften von CPn0678	122
4.2.2.1	Eine N-terminale Region von CPn0678 vermittelt spezifische Lokalisation zur Plasmamembran der Wirtszelle	122
4.2.2.2	Die membranbindende amphipathische Helix vermittelt Spezifität über flankierende, positiv geladene Aminosäuren	126
4.2.2.3	CPn0678 kann Tetramere in Lösung bilden.....	129
4.2.2.4	CPn0678 ^{GFP} -Membrantubuli werden vom Wirtszellzytoskelett beeinflusst und kolokalisieren teilweise mit diesem.....	131
4.2.3	Die Funktion von CPn0678.....	137
4.2.3.1	Die erste prolinreiche Region von CPn0678 ist essentiell für die Interaktion mit Sorting nexin 9	137
4.2.3.2	Die Interaktion von SNX9 und CPn0678 ist spezifisch.....	141
4.2.3.3	CPn0678 kolokalisiert mit IRSp53 und Cortactin in der Transfektion	143

4.2.3.4	CPn0678 und SNX9 interagieren im Wirtszellzytosol in den Frühphasen der chlamydialen Infektion.....	145
4.2.3.5	CPn0678 ^{GFP} induziert einen dominant-negativen Effekt in der chlamydialen Infektion.....	148
4.2.3.6	Transfiziertes CPn0678 ^{GFP} und SNX9 ^{mCherry} kolokalisieren an frühen <i>C. pneumoniae</i> -Infektionsereignissen.....	151
4.2.3.7	Transfiziertes CPn0678 ^{GFP} hat einen negativen Einfluss auf die Endozytoseprozesse der Humanzelle.....	153
5	DISKUSSION	156
5.1	CPn0712 – Sekretionsapparat und / oder Effektor?	156
5.1.1	CPn0712 lokalisiert intrachlamydial.....	157
5.1.2	Die TMD von CPn0712 erzeugt den wachstumsdefekten Phänotyp	158
5.1.3	CPn0712-Signale erscheinen kolokalisiert mit der Inklusionsmembran	159
5.1.4	CPn0712 bietet weitere Perspektiven, aber nicht als Effektor	162
5.2	CPn0678 als frühes Effektorprotein	165
5.2.1	Aktualisierung der bioinformatischen Einschätzung von CPn0677 und CPn0678.....	166
5.2.2	CPn0677 und CPn0678 sind keine Adhäsionsproteine.....	169
5.2.3	CPn0678 wird während der Frühphasen der Infektion sekretiert	170
5.2.4	Die amphipathische Helix von CPn0678 – Kein Einzelphänomen der Membranbindung	172
5.2.4.1	Die APH von CPn0678 in Effektorproteinen anderer Pathogene	172
5.2.4.2	CPn0678 vermittelt sehr wahrscheinlich Membrankrümmung.....	177
5.2.5	Der Einfluss des Zytoskeletts auf den CPn0678-Phänotyp.....	180
5.2.6	Die Interaktion von CPn0678 und SNX9.....	183
5.2.7	CPn0678 beeinflusst direkt humane endozytotische Prozesse.....	186
5.2.8	Weiterer Ausblick für CPn0678 und CPn0677.....	188
5.2.9	CPn0678 ein Schlüsselprotein der frühen chlamydialen Infektion?	191
6	ANHANG	195
	LITERATURVERZEICHNIS.....	206
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	220
	TABELLENVERZEICHNIS	222
	DANKSAGUNG	223
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	224

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	Cortactin	c ortical a ctin binding protein
(c/m/μ/n-)m	(zenti/mili/mikro/nano-) Meter	C-ring	c ytoplasmic r ing
(g-)STED	(gated) S timulated E mission D epletion	Ctd1	<i>C</i> hlamydia <i>t</i> rachomatis a dhesin 1
(k-)Da	(kilo-)Dalton	Ctx	c holera- t oxin
(k-)LSM	(k o nfokale) L aserscan M ikroskopie	CUE	C lathrin- u nabhängige E ndozytose
(Ko-)IP	(Ko -)Imm u n p rä z ipitation	d.h.	das heißt
(m-)A	(mili-)Ampere	DNA	d eoxyribon n ucleic a cid
(m-)V	(mili-)Volt	dNTP	Deoxynukleotide
(m-)W	(mili-)Watt	EB	e lementary b ody
(m/μ/n-)g	(mili/mikro/nano-)Gramm	EGF	E pidermal g rowth f actor
(m/μ/n-)l	(mili/mikro/nano-)Liter	EGFR	E pidermal g rowth f actor r eceptor
(m/μ/n-)M	(mili/mikro/nano-)Mol	Elu	E lu t ionsfraktion
<μH>	hydrophobisches Moment	ER	e ndoplasmatisches R etikulum
<H>	Gesamthydrophobizität	EspF	<i>E. coli</i> s ecreted p rotein F
°C	Grad Celsius	EspFU	EspF -like protein encoded on prophage U
∞	unendlich	et al.	und andere
Abb.	A bbildung	ExoS	E xo e nzyme S
ADP	A denosin d iphosphat	F-/G-Aktin	f ilamentöses / g lobuläres A ktin
AP	a lkalische P hosphatase	FHA	f ork h ead a ssociated domain
APH	a mphipathische H elix	Fix.	Fixierung
Arf1/6	A DP- r ibolysation f actor 1/6	FKS	f etales K älberserum
Arp2/3	a ctin- r elated p roteins 2 and 3	FT	Durchflussfraktion (flow through)
AS	A minosäure	GAG	G lykosaminoglykan
ATG16	a utophagy protein 16	GAP	G T P ase- a ctivating p rotein
ATP	A denosin t riphosphat	GEEC	G PI-AP-enriched e arly e ndosomal c ompartment
BAR	B in- A mphiphysin- R vs167	GFP	g reen f luorescent p rotein
BLAST	B asic L ocal A lignment S earch T ool	GMAP-210	G olgi M icrotubule A ssociated P rotein of 210 kDa
BON	b acterial O smY and n odulation domain	GRAF1	G T P ase r egulator a ssociated with focal adhesion kinase- 1
bp	B asen p aar	GRB2	g rowth factor r eceptor b ound protein 2
BSA	b ovines S erum a lbumin	GTP	G uanosin t riphosphat
BTK	B ruton T yrosin k inase	h	Stunde (h our)
CAE	C lathrin- a bhängige E ndozytose	HBSS	H anks b uffered s alt s olution
CBL	C asitas B -lineage L ymphoma	Hc 1/2	H iston-like protein of <i>chlamydia</i> 1/2
Cdc42	C ell d ivision p rotein 42	hpi	Stunden nach der Infektion (h ours p ost i nfection)
Cds	C ontact d ependent s ecretion	Hsp70	h eat s hock p rotein at 70 kDa
CesT	c haperone for <i>E. coli</i> secretion of T ir	i.d.R.	i n d er R egel
ChlaOTU	<i>C</i> hlamydia O TU-domain containing protein	IF	I mmun f luoreszenz
CHP	C entre of H ealth P rotection Hongkong	IFU	i nclusion f orming u nits
CIN85	C bl i n t eracting protein of 85 kDa	IgG	I mmunglobulin G
CLIC	C lathrin- i ndependent c arriers		
cm ²	Quadratcentimeter		
CopN	c hlamydial o uter p rotein N		

IncA/E	I nclusion membrane protein A/E	Pmp21	p olymorphic m embrane protein 21
IRSp53	I nsulin r eceptor s ubstrate p53	Post-Fix.	Nachbehandlung nach Fixierung
ISTC	I nternational S ubcommittee of the T axonomy of the <i>Chlamydiae</i>	PRR	p rolin r eiche R egion
Kap.	K apitel	PtdSer	P hosphatidyl s erin
Lact	L actadhäerin	PX	p ho x homology
LDs	lipid d roplets	px	P ixel
LPS	L ipopolysaccharid	RB	r eticulate b ody
M6P/IGF2	m annose- 6 -phosphate/ i nsuline g rowth f actor 2	RhoA	R as h omologue A
MEK1	M APK/ E RK K inase 1	r _{max}	maximaler Radius
min	M inute	RNA	r ibonucleic a cid
min pi	Minuten nach Infektion (min utes p ost i nfection)	RT	R aum t emperatur
MOI	m ultiplicity of i nfection	RTX	r epeat in t oxin
MOMP	m ajor o uter m embrane protein	Sec	general s ecretion
mRFP	m onomeric r ed f luorescent protein	sek	S ekunde
MT	M ikrotubuli	SepD/L	S ecretion switching protein D / L
MTOC	m icrotubule o rganizing center	SH2/3	S RC H omology 2/3
MVB	m ultivesicular b ody	SINC	s ecreted i nner n uclear membrane-associated <i>Chlamydia</i> protein
NCBI	n ational center for biotechnology information	Slc1	S ycE-like c haperone 1
nt	N ukleotid	SNX	S orting n exin
nvCT	Swedish n ew v ariant of <i>Chlamydia trachomatis</i>	SptP	S ecreted effector protein P
N-WASP	n euronal W iskott- A ldrich S yndrome protein	T3SS	T yp- III S ekretionssystem
Ø	Durchschnitt bzw. Durchmesser	TARP	T ranslocated a ctin- r ecruiting phosphoprotein
OD	optische D ichte	Tat	t win a rginin t ranslocator
OmcB	O uter m embrane c omplex protein B	TE	T otal e lutionsfraktion
OmpC	O uter m embrane p rotein C	Temp.	T emperatur
PAGE	p olyacrylamide g el e lectrophoresis	TepP	T ranslocated e arly phosphoprotein
PBS	p hosphate b uffered s alt solution	TMD	T rans m embran d omäne
PDM	p roduct of d ifference from the m ean	ü/N	ü ber N acht
Pdr5	p leiotropic d rug r esistance protein 5	Upm	U mdrehungen p ro M inute
PFA	p ara- F ormaldehyd	UV	u ltraviolett
pH	p ondus H ydrogenii	vgl.	vergleiche
PH	p leckstrin h omology	WAVE-2	W iskott- A ldrich syndrome protein v erprolin homologous protein 2
PIP	P hosphatidyl i nositol-phosphate	WB	W estern b lot
PLCγ	P hosphoinositid- P hospholipase C T yp γ	WHO	w orld h ealth o rganization
PM	P lasma m embran	xg	x-fache Normalbeschleunigung
		YopE	Y ersinia o uter membrane virulence protein E
		Ysc	Y ersinia s ecretion c omponent
		z.B.	zum Beispiel

Häufiger verwendete Abkürzungen sind bei der entsprechenden Erstnennung im Fließtext erneut ausgeschrieben.

Zusammenfassung

Chlamydia pneumoniae ist ein weit verbreitetes Gram-negatives Bakterium mit einem biphasischen, obligat intrazellulären Lebenszyklus. Es infiziert die oberen Atemwege des Menschen und kann bei einem schweren Verlauf zu Lungenentzündungen führen. Beginnend mit der initialen Internalisierung der infektiösen Elementarkörperchen (EB), über die intrazelluläre Replikation der differenzierten Retikularkörperchen (RB) bis zur Freisetzung, findet eine konstante Manipulation der humanen Wirtszelle statt, welche unter anderem über so genannte Effektorproteine bewirkt wird. Diese Proteine werden über das **Typ-III Sekretionssystem** (T3SS) in die Wirtszelle transferiert und beeinflussen dort direkt oder indirekt Wirtszellprozesse. Bisher sind nur wenige Effektorproteine von *C. pneumoniae* bekannt, obwohl ein ausführliches Wissen über diese Proteinklasse unerlässlich für das Verständnis der Infektion dieses Humanpathogens ist.

Das Protein CPn0712 wurde bereits zuvor als Strukturkomponente des T3SS von Chlamydien beschrieben. Interessanterweise besitzt CPn0712 eine Chlamydien-spezifische N-terminale Verlängerung, der bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte. Für diesen Bereich von CPn0712 wurde eine mögliche Funktion als Effektorprotein postuliert. CPn0677 und CPn0678 sind hypothetische Proteine, die anhand vorläufiger Daten als Adhäsionsproteine eingeordnet wurden, obgleich sie in *Shigella* heterolog funktionierende N-terminale T3SS-Signalpeptide tragen. Darüber hinaus wurde die Interaktion beider Proteine mit dem humanen Protein **Sorting nexin 9** (SNX9) beschrieben, welches eine wichtige Funktion während der humanen Endozytose einnimmt. CPn0677 und CPn0678 weisen Parallelen zu einem sekretierten Effektorprotein aus dem enteropathogenen *Escherichia coli* auf, was die mögliche Funktion von CPn0677 und CPn0678 als Effektorproteine nahe legte.

Daher war das Ziel dieser Arbeit die detaillierte Analyse der chlamydialen Proteine CPn0712, CPn0677 und CPn0678 unter dem Aspekt einer potentiellen Effektorprotein-Funktion.

CPn0712 wird während der mittleren bis späten Infektion exprimiert und lokalisiert subzellulär bakterienassoziiert, sowie zum Teil Inklusionsmembran-assoziiert. Spezifische Zugänglichkeitsanalysen identifizierten CPn0712 allerdings eindeutig als intrainklusional und später als intrachlamydial. Hochauflösende Mikroskopie bestätigte die Lokalisierung von CPn0712 dicht an der Inklusionsmembran, jedoch intrainklusional. Weiterhin konnte der zuvor beobachtete CPn0712-induzierte wachstumsdefekte Phänotyp bei Expression in *Saccharomyces cerevisiae* auf eine C-terminale Transmembrandomäne zurückgeführt werden, was ebenfalls gegen eine spezifische Funktion als Effektorprotein spricht. Eine Effektorfunktion von CPn0712 konnte daher ausgeschlossen werden. Weitere potentielle Funktionen des N-

Terminus von CPn0712, neben der einer Strukturkomponente des T3SS, sind somit wahrscheinlich nur intrachlamydial möglich.

Die subzelluläre Lokalisation von CPn0677 und CPn0678 konnte zu späten Zeitpunkten als EB-assoziiert beschrieben werden. Zugänglichkeitsanalysen dieser Proteine zu den gleichen Zeitpunkten zeigten allerdings deutlich eine intrachlamydiale Lokalisation beider Proteine. Mit dem Fokus auf CPn0678 konnte darüber hinaus in mikroskopischen Experimenten die Sekretion dieses Proteins zu frühen Zeitpunkten nachgewiesen werden. In weiteren Analysen konnte die Fähigkeit von CPn0678 zur Tetramerisierung und zur Membranassoziation in Transfektions-Experimenten identifiziert werden. Die Membranassoziation konnte mittels Deletionsvarianten auf eine **amphipathische Helix** (APH) im N-terminalen Bereich des Proteins eingegrenzt werden, die höchst wahrscheinlich über benachbarte **Aminosäuren** (AS) Spezifität zur **Plasmamembran** (PM) vermittelt. Ähnliche Helices konnten dann aufgrund einiger bioinformatischer Analysen in einer Vielzahl von Effektoren anderer Gram-negativer Bakterien identifiziert werden. Weiterhin wurde erstmalig die Interaktion von intrazellulärem humanen SNX9 mit chlamydialem CPn0678 in der endogenen *in vivo* Situation zu frühen Zeitpunkten der Infektion nachgewiesen. Diese Interaktion ist essentiell abhängig von einer C-terminalen **prolinreichen Region** (PRR) in CPn0678, welche ein RxxPxxP-Motiv aufweist, das als spezifisches Bindungsmotiv von SNX9 bekannt ist. Die Rekrutierung von SNX9 zu adhären Chlamydien konnte in der frühen Infektion bzw. zu ektopisch exprimiertem CPn0678 in der Transfektion beobachtet werden. Homologien zwischen CPn0677 und CPn0678 lassen für CPn0677 ebenfalls Sekretion, Membranassoziation und SNX9-Bindung vermuten. Regionen mit unbekannter Funktion oder Homologie in CPn0677 legen mögliche weitere Funktionen nahe. Schlussendlich konnte gezeigt werden, dass CPn0678 für die Infektion wichtig ist, denn transfiziertes CPn0678 löste einen dominant-negativen Effekt auf die Infektion aus. Außerdem nahm transfiziertes CPn0678 direkten Einfluss auf die humane Endozytose. Die Daten lassen eine Modulation der humanen Endozytose durch den Effektor CPn0678 in der *C. pneumoniae* Infektion vermuten, wodurch es ein Schlüsselprotein der frühen Infektion sein könnte.

Zusammenfassend wurden die Effektorfunktion von CPn0712 und die Adhäsinfunktionen von CPn0677 und CPn0678 weitestgehend ausgeschlossen. CPn0678 konnte erstmalig als sekretiertes Effektorprotein identifiziert werden, welches vermutlich mit humanem SNX9 und der humanen PM interagiert und so eine wichtige Rolle in der frühen Infektion von *C. pneumoniae* einnimmt.

Summary

Chlamydia pneumoniae is a common Gram-negative bacterium with an obligate intracellular biphasic life cycle. It infects the upper respiratory tract and can cause pneumonia in severe cases. Starting at the initial internalization of the infectious elementary body (EB), during the intracellular replication of differentiated reticular bodies (RB), until the final release, a constant manipulation of the human host cell is observed, which can be caused via effector proteins. These proteins are transferred into the host cell by the **type-III secretion system** (T3SS) and influence the host cell processes directly or indirectly. Until now, only a few effector proteins of *C. pneumoniae* are known, although a detailed knowledge of this class of proteins is essential in order to understand the infectivity of this human pathogen.

The protein CPn0712 has been previously described as a structural component of the T3SS of *C. pneumoniae*. Interestingly CPn0712 bears a chlamydia-specific N-terminus, with unknown function. A possible function as an effector protein has been postulated for this region.

CPn0677 and CPn0678 are hypothetical proteins that were classified as adhesion proteins based on preliminary data, although they harbour an N-terminal T3SS-Signalpeptide, which is functional in *Shigella* heterologous secretion experiments. Furthermore, the interaction with human protein **Sorting nexin 9** (SNX9) was shown for both proteins. SNX9 is an important factor in human endocytosis. CPn0677 and CPn0678 exhibit parallels to a secreted effector protein from enteropathogenic *Escherichia coli*, which suggested potential functions of CPn0677 and CPn0678 as effector proteins as well.

Therefore the aim of this study was a detailed analysis of CPn0712, CPn0677 and CPn0678 in terms of a potential effector function.

CPn0712 is expressed in the infection in intermediate to late phases and localized associated with bacteria at a subcellular level. It was partly associated with the inclusion membrane as well. However specific analysis of the accessibility by CPn0712 antibodies identified the protein clearly as intrainclusional and later as intrachlamydial. High resolution microscopy confirmed the localization of CPn0712 to the inclusion membrane, but intrainclusional. Furthermore a growth phenotype induced by CPn0712 expression in *Saccharomyces cerevisiae* could be attributed to a C-terminal transmembrane domain, which also argues against a specific function as an effector protein. Therefore an effector function of CPn0712 could mostly be excluded. Other potential functions of CPn0712 via its N-terminus, in addition to a structural component of the T3SS, are probably only intrachlamydial possible.

The subcellular localization of CPn0677 and CPn0678 could be described as EB-associated at late stages of infection. Accessibility analysis of these proteins revealed a clearly

intrachlamydial localization for both proteins at the same time points. Focusing on CPn0678, secretion of this protein could be detected by microscopy at early time points. In further analysis, the ability of CPn0678 to tetramerize and to associate with membranes in transfection experiments could be identified. The membrane association of CPn0678 could be limited by deletion variants to an N-terminal region of the CPn0678 bearing an **amphipathic helix** (APH), which gives specificity to the plasma membrane by adjacent amino acids most likely. Bioinformatic analysis revealed that similar helices are present in a variety of effectors of other Gram-negative bacteria. Further, the interaction between the endogenous human SNX9 and CPn0678 was detected *in vivo* at early time points of infection for the first time. This interaction is essential depending on a C-terminal **proline-rich region** (PRR) of CPn0678 harbouring an RxxPxxP-motif, which is known as a specific binding motif of SNX9. Homologies between CPn0677 and CPn0678 allow hypothesizing an active secretion, membrane association and SNX9 interaction for CPn0677 as well. However, regions in CPn0677 with unknown function or homology suggest other possible functions. The recruitment of SNX9 to adhering *C. pneumoniae* in the early infection and to ectopically expressed CPn0678 in transfection respectively was observed. Finally, it could be shown that CPn0678 is important for infection, because transfected CPn0678 induced a dominant-negative effect on the infection. CPn0678 showed direct influence on the human endocytosis in transfection. The data suggest the modulation of the human cell endocytosis by CPn0678 during infection with *C. pneumoniae* and could render it a potential key protein in early infection.

In summary the effector function of CPn0712 and the adhesin protein functions of CPn0677 and CPn0678 were excluded. CPn0678 was identified as a secreted effector protein, which presumably interacts with human SNX9 and the human plasma membrane, and is representing an important player in the early infection of *C. pneumoniae*.

1 Einleitung

1.1 Die Ordnung *Chlamydiales*

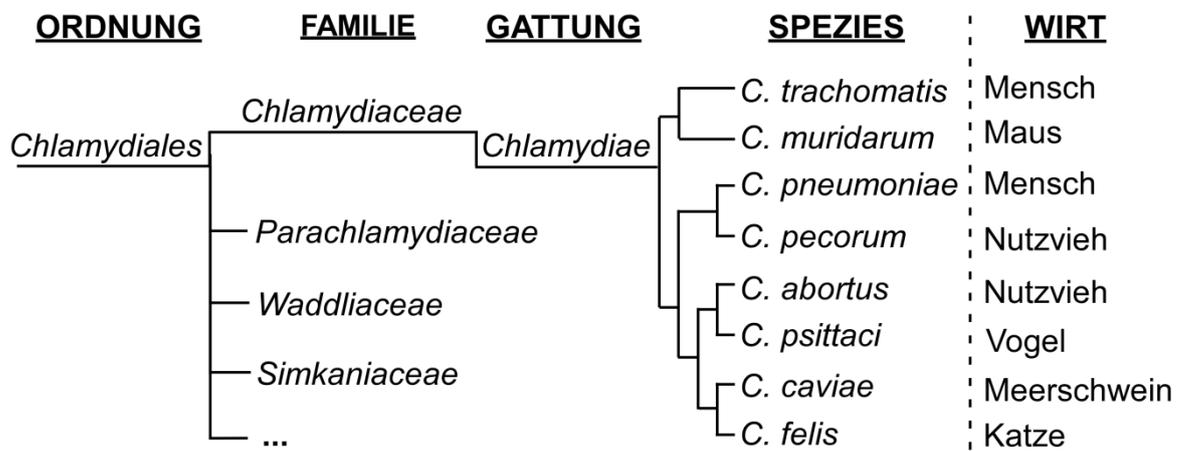
Unter *Chlamydiales* werden Gram-negative Bakterien mit einem einzigartigen biphasischen Lebenszyklus beschrieben. Allen gemein ist der obligat intrazelluläre Charakter, der sich besonders vielschichtig und komplex darstellt. Eben diese Diversität und ihre Einzigartigkeit unter den Bakterien stellen *Chlamydiae* selbst nach fast 100 Jahren in den Fokus der mikrobiologischen und medizinischen Forschung. *Chlamydiae* haben im Laufe der Evolution ein besonders breites Maß an möglichen Wirtsorganismen entwickelt. Es sind einige Spezies bekannt, die vor allem Nutzvieh infizieren und somit besonders ökonomische Schäden hervorrufen. Andere sog. Umweltchlamydien sind sogar in der Lage einzellige Organismen wie etwa Amöben zu befallen. Im Vordergrund stehen allerdings die humanpathogenen Spezies, die eine Vielzahl an schweren Erkrankungen auslösen können. Darunter sind allen voran *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydia psittaci* als relevanteste Spezies zu nennen. Im Folgenden wird die Einzigartigkeit und Komplexität dieser Bakterien dargestellt.

1.1.1 Geschichte und Taxonomie

Beginnend mit den ersten ernsthaften, wissenschaftlichen Näherungen wurden Chlamydien erstmalig um 1907 beschrieben, wobei sie zuerst fälschlicherweise für Viren gehalten wurden (Halberstaedter 1907). Weitere Experimente folgten dann in der Zeit des zweiten Weltkrieges, bei denen der taxonomisch bakterielle Charakter deutlicher und für Chlamydien eine Trennung von den echten Viren vorgeschlagen wurde (Jones et al. 1945). Diese Hinweise wurden zwanzig Jahre später bestätigt und die Ordnung der *Chlamydiales*, die anfangs nur eine einzige Familie und Gattung enthielt, die *Chlamydiae*, eingeführt (Moulder 1966, Page 1966). Die bis dahin identifizierten Spezies *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci* und *C. pecorum* wurden hiermit einheitlich zusammengefasst. Im Jahr 1999 wurden die Familien der sog. Umweltchlamydien aufgrund vergleichender Analysen der 16S- und 23S-rRNA (ribosomal RNA) in die Ordnung der *Chlamydiales* eingeordnet (Everett & Andersen 1997, Everett et al. 1999). Ebenfalls wurde zu dieser Zeit eine Trennung der bis dahin identifizierten chlamydialen Spezies in die Gattung der *Chlamydiae* (*C. trachomatis*, *C. muridarum*, *C. suis*) und die der *Chlamydophila* (*C. pneumoniae*, *C. abortus*, *C. felis*, *C. caviae*, *C. pecorum*, *C. psittaci*) vorgeschlagen. Diese Gattungen wurde 2009 durch eine detailliertere Einschätzung anhand einer Vielzahl konservierter Gene weiter in Frage gestellt (Stephens et al. 2009). Aufgrund der neuen Datenlage beschloß das 2008 gegründete ISTC offiziell eine neuerliche Vereinigung der

Gattungen *Chlamydophila* und *Chlamydiae* (Bavoil et al. 2013, Greub 2010). Zuletzt wurde kürzlich eine Empfehlung des aktuell Vorsitzenden des ISTC Gilbert Greub veröffentlicht, die eine möglichst genaue Einteilung der *Chlamydiales* ermöglichen soll (Abb. 1.1) (Pillonel et al. 2015). Dabei verbindet die empfohlene Vorgehensweise Analysen der 16S- und 23S-rRNA zur groben Einteilung in Ordnung bzw. Familie mit Vergleichen von 9 aus 20 verlässlichen Diskriminanzproteinen zur detaillierten Einteilung in Gattung und Spezies. Die daraus resultierende aktuellste Taxonomie (Stand 2015) der Ordnung *Chlamydiales* ist in Abb. 1.1 dargestellt. Metagenomische Analysen zeigen, dass sog. Chlamydien-verwandte Bakterien die Ordnung der *Chlamydiales* um ein Vielfaches erweitern (Lagkouvardos et al. 2014).

A



B

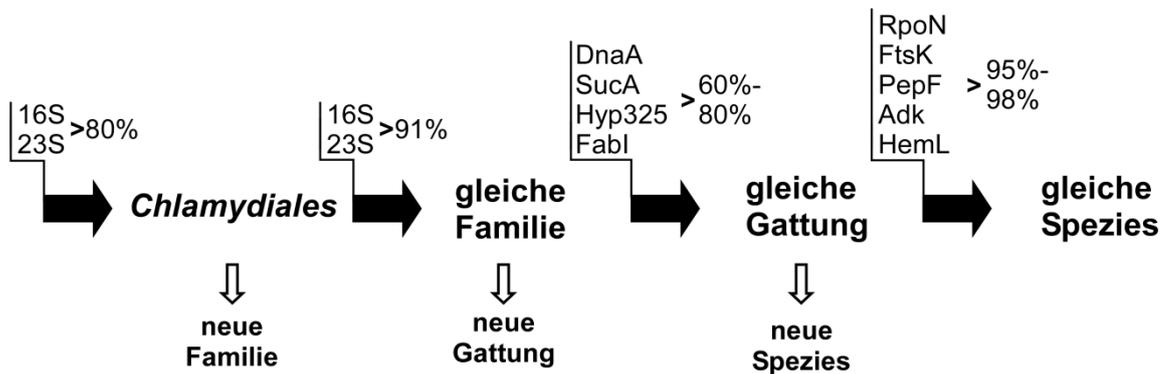


Abb. 1.1: Taxonomie und empfohlene Klassifizierung der Ordnung *Chlamydiales* (Stand 2015)

(A) Zur Übersicht wurden nur einige der jeweiligen Familien, Gattungen, Spezies und potentiellen Wirtsorganismen dargestellt. Länge der Linien bei Verwandtschaftsbeziehungen repräsentiert keine phylogenetischen Abstände. Nutzvieh: Rind, Schwein, Schaf und Ziege. (Modifiziert nach Pillonel et al. 2015).

(B) Empfohlene Klassifizierungsmethode der Ordnung *Chlamydiales*. Grenzwerte der Ähnlichkeiten in Prozent stellen nur zusammengefasste Näherungswerte der empfohlenen Einzelgrenzwerte dar. DnaA, SucA, Hyp325, FabI, RopN, FtsK, PepF, Adk, HemL agieren als Diskriminanzproteine zur Klassifizierung (Modifiziert nach Pillonel et al. 2015).

1.1.2 Pathogenität

Chlamydiales können eine Vielzahl von verschiedenen Wirten infizieren und somit ebenso viele verschiedene Krankheitsbilder hervorrufen. Die beiden Spezies, die den Menschen direkt befallen können, sind *C. trachomatis* und *C. pneumoniae*, aber auch einige der anderen Spezies sind in der Lage über zoonotische Prozesse den Menschen zu infizieren. Dazu gehören seltener Fälle von Chlamydiosen über *C. pecorum*, *C. abortus* und *C. felis*; weit häufiger konnte aber *C. psittaci* als Erreger identifiziert werden.

Vor allem im chinesischen Raum werden oft aviäre Chlamydiosen beobachtet, die neben dem hohen ökonomischen Verlust schwere sog. Psittakosen der Mitarbeiter nach sich ziehen (Yin et al. 2015). Zum Krankheitsbild zählen unter anderem grippeähnliche Symptome, aber auch schwere Lungenentzündungen (MMWR 1998). Deshalb wurde die humane Psittakose im Juli 2008 vorbeugend in China als meldepflichtige Krankheit klassifiziert, um gravierende Ausbrüche aufgrund der lokal hohen Bevölkerungsdichte zu vermeiden (nach CHP; <http://www.chp.gov.hk/en/>).

Neben Spezies mit Potential zur Zoonose bilden *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* die beiden bekanntesten humanpathogenen Vertreter. Die WHO schätzte für 2008 die Zahl der Neuinfektionen mit *C. trachomatis* weltweit auf 104 Millionen, was einem Zuwachs von ~4 % gegenüber der letzten Schätzung (Stand 2005) entspricht (WHO 2012). Dabei ist der Krankheitsverlauf stark von den jeweiligen *C. trachomatis* Serovaren abhängig. Beispielsweise rufen die invasiven Serovare L1 bis L3 systemische Infektionen wie Lymphogranuloma durch Infektion von Makrophagen hervor (Stoner & Cohen 2015). Die nicht invasiven Serovare A bis C können unbehandelt zu Trachomen führen, chronische Infektionen des Auges, welche Erblindung nach sich ziehen (Taylor et al. 2014). Dagegen lösen die Serovare D bis K akute und chronische Infektionen des Urogenitaltrakts aus, die Unfruchtbarkeit und Eileiterschwangerschaften hervorrufen (Peipert 2003). Hierbei stellen sich die von den Serovaren D bis K hervorgerufenen Komplikationen als besonders schwerwiegend heraus. Bei Frauen verlaufen 70 % der Infektionen asymptomatisch, während dieser Anteil bei Männern etwa 50 % beträgt (BASHH 2013). Der Großteil der *C. trachomatis* Infektionen verbleibt also unentdeckt und fließt nicht in die gängigen Statistiken ein. Seit einiger Zeit werden präventive Screening-Verfahren zur Einschätzung der *C. trachomatis* Infektionen in Deutschland durchgeführt. Dennoch können Routine-Testverfahren durch Variationen des Bakteriums nutzlos werden, wie zuletzt in Schweden am Fall der sog. nvCT zu sehen war (Unemo & Clarke 2011).

Die Infektion mit *C. pneumoniae* zeigt bei gesunden Menschen einen milden Krankheitsverlauf, kann aber in schweren Fällen oder bei immundefizienten Patienten ernsthafte Folgen haben.

Die Infektion der Epithelien der oberen und unteren Atemwege kann zu Bronchitis, Sinusitis und Lungenentzündungen führen (Kuo et al. 1995). So sind etwa 6 - 20 % aller ambulant erworbenen Lungenentzündungen auf *C. pneumoniae* zurückzuführen und bei 30 % dieser Lungenentzündungen ist *C. pneumoniae* zumindest ein koinfizierender Erreger (Blasi et al. 2009). In seltensten Fällen sind auch schwere systemische Infektionen beobachtet worden. Hervorzuheben ist dabei die hohe Prävalenz von 50 % bis zu einem Alter von etwa 20 Jahren, ab 70 Jahren sogar etwa 80 % (Blasi et al. 2009). Einhergehend damit wird *C. pneumoniae* mit einer Vielzahl von chronischen Erkrankungen in Verbindung gebracht wie etwa der Alzheimer Krankheit (Dreses-Werringloer et al. 2009), Arthritis (Carter & Hudson 2010), Lungenkrebs (Zhan et al. 2011) und Diabetes (Wang et al. 2009). Der Einfluss von *C. pneumoniae* ist bei diesen Krankheiten allerdings umstritten und noch nicht hinreichend durch Studien belegt. Stärker scheint dagegen die Verbindung zu Arteriosklerosen über Daten, die im Verlauf von 20 Jahren gesammelt wurden (Watson & Alp 2008). Eben durch die extrem weite Verbreitung und mögliche Verbindungen zu anderen ernstzunehmenden Krankheiten ist *C. pneumoniae* ein wichtiges Forschungsobjekt.

Wie diese drei Beispiele verdeutlichen besitzen *Chlamydiae* durch gravierende Krankheitsbilder, deren Folgeerscheinungen und / oder durch hohe Durchseuchungsraten der Bevölkerung erhebliche epidemiologische Relevanz. Trotz der vielen Gemeinsamkeiten, wie dem bereits erwähnten besonderen Lebenszyklus, zeigen verschiedene Spezies der *Chlamydiae* Wirts- und Gewebespezifitäten, die durch Unterschiede in grundlegenden Eigenschaften begründet sind.

1.1.3 Der Lebenszyklus von *C. pneumoniae*

Alle chlamydialen Vertreter weisen einen einzigartigen biphasischen Lebenszyklus auf, der grob in fünf asynchrone Unterphasen aufgeteilt werden kann: Adhäsion bzw. Internalisierung, Differenzierung, Replikation, Redifferenzierung und Freisetzung (Abb. 1.2). Der Infektionszyklus von *C. pneumoniae* dauert insgesamt ca. 72 bis 96 h. Aufgrund der hohen Verwandtschaft von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* ähneln sich viele Prozesse zwischen den beiden Spezies stark (Read et al. 2000). Den Infektionszyklus beginnen Chlamydien als Elementarkörperchen (EB; **e**lementary **b**ody). Diese Form ist in der vorangegangenen Infektionsrunde gebildet worden und stellt das infektiöse Stadium der Chlamydien dar und besitzt eine ungefähre Größe von 0,3 – 0,4 µm (Chi et al. 1987, Wolf et al. 2000). Ihr Außenkomplex ist besonders stabil und schützt gegen die meisten widrigen äußeren Einflüsse. EBs sind weitestgehend metabolisch inaktiv und beinhalten alle nötigen Proteine für die ersten Phasen der Infektion. Diese Phasen werden im folgenden Abschnitt nur erwähnt und später detaillierter dargestellt werden.

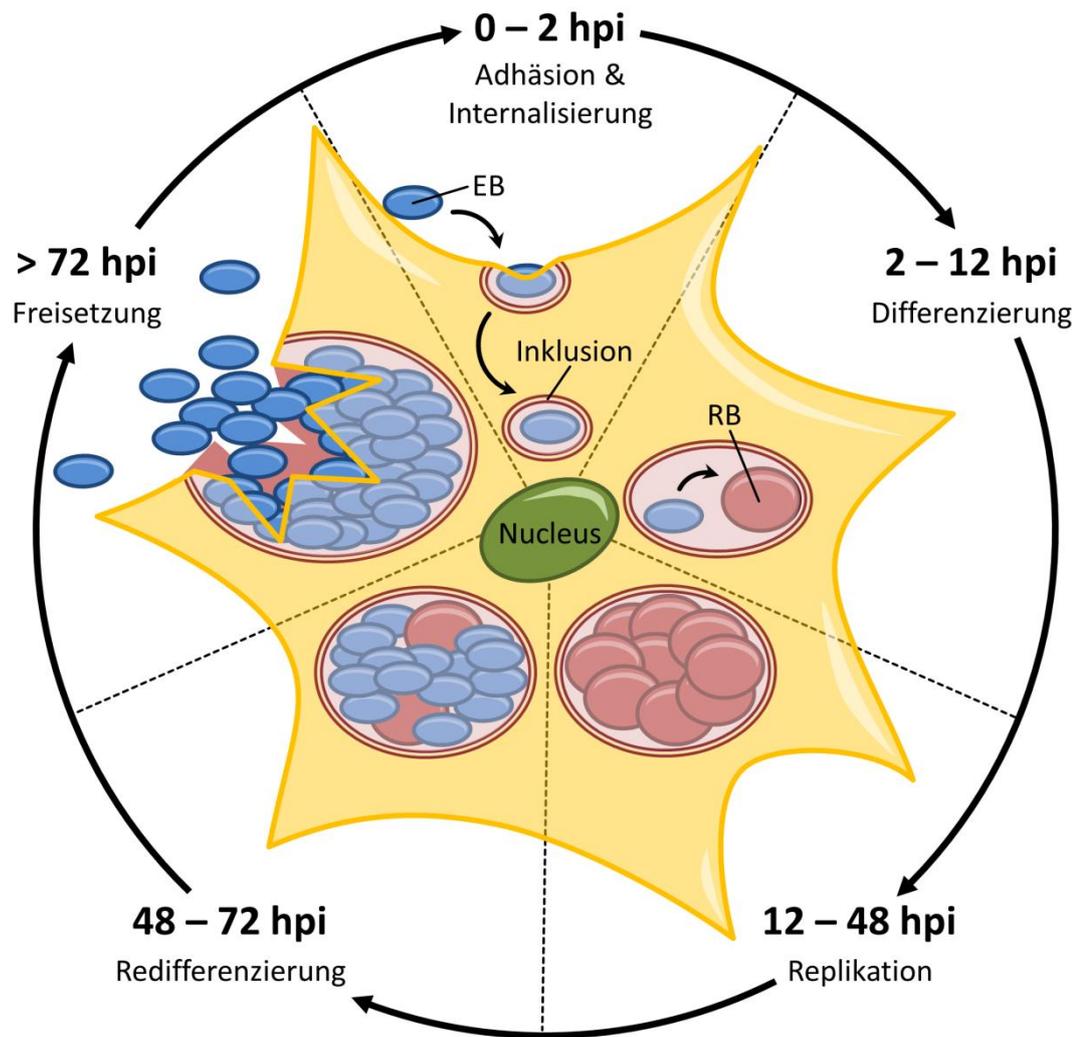


Abb. 1.2: Der biphasische Infektionszyklus von *Chlamydia pneumoniae*

Dargestellt ist der Infektionszyklus mit den fünf Stadien und den jeweiligen Zeitfenstern. Zu sehen sind die Wirtszelle in gelb und ihr Zellkern in grün. Chlamydiale EBs sind in blau eingezeichnet, RBs in rot und Inklusionen in rosa mit Doppelumrandung. hpi, Stunden nach Infektion; EB, Elementarkörperchen; RB, Retikularkörperchen. (Angefertigt nach Wolf, et al. 2000).

Während der ersten Schritte der chlamydialen Infektion etablieren Adhäsine den ersten Kontakt mit Oberflächenstrukturen der Wirtszelle (Becker & Hegemann 2014, Fechtner et al. 2013). Kurz nach diesem ersten Kontakt werden Effektorproteine über das **Typ-III Sekretionssystem (T3SS)** in die Wirtszelle sekretiert, die zusammen mit der durch Adhäsins-Bindung an Rezeptoren ausgelösten Signaltransduktion die Internalisierung des Bakteriums in das Wirtszellzytosol bewirken (Mehlitz & Rudel 2013, Molleken et al. 2013, Valdivia 2008). Die dabei entstehende parasitäre Vakuole wird als Inklusion bezeichnet und in der Folgezeit aktiv von den Chlamydien modifiziert. Die Inklusion bei *C. pneumoniae* wird dann über bislang nicht vollständig verstandene Prozesse in die perinukleäre Region transportiert und verbleibt dort. *C. trachomatis* bedient sich vermutlich endozytotischer Prozesse, die einen **Mikrotubuli (MTs)** und Dynein-abhängigen Transport in diese Region auslösen (Grieshaber et al. 2003).

Diese ersten Infektionsphasen dauern in der Regel ungefähr 2 bis zu 8 Stunden nach Infektion (hpi; **h**ours **p**ost **i**nfection).

Im nächsten Schritt differenzieren sich die EBs 12 hpi in die Retikularkörperchen-Form (R**B** **r**eticulate **b**ody) (Wolf et al. 2000). Die RBs sind mit etwa 0,5 bis 1 μm weitaus größer als die EBs, sind metabolisch aktiv und in der Lage sich etwa 7- bis 10-mal binär zu teilen. So werden während eines Zyklus bis zu 1000 neue chlamydiale Partikel gebildet (Peters et al. 2007, Van Ooij et al. 1998). Ebenfalls werden von den RBs weitere Effektorproteine in die Wirtszelle sekretiert, um beispielsweise eine mögliche Immunsystemantwort der Wirtszelle zu schwächen oder Nährstoffakquisition zu gewährleisten (Valdivia 2008). Bei widrigen Umständen wie Nährstoffmangel oder zu starker Immunantwort sind Chlamydien in der Lage aus der RB-Form in einen intrazellulären Dauerzustand, Persistenz genannt, überzugehen (Beatty et al. 1993, Coles et al. 1993). Nach einer Verbesserung der Umstände können sie erneut in die RB-Form übergehen und den Infektionszyklus fortsetzen. Zwar ist die *in vivo* Relevanz nicht vollständig geklärt, jedoch könnte diese Sonderform der Chlamydien ein weiteres Hindernis bei der Behandlung von Infektionen darstellen.

Nach der Teilung beginnt die Redifferenzierung (oder sekundäre Differenzierung) in die EB-Form, was ab ca. 48 hpi eintritt (Wolf et al. 2000). Insbesondere dieser Prozess verläuft höchst asynchron und die auslösenden Signale sind bisher nicht identifiziert. Als Auslöser wird beispielsweise der Kontaktverlust der Bakterien zur Inklusionsmembran vermutet, was grundlegende Genexpressionsänderungen nach sich zieht (Mukhopadhyay et al. 2006, Wilson et al. 2006). Während der Redifferenzierung werden die Histon-ähnlichen Proteine Hc1 und Hc2 exprimiert, die eine Kondensierung der chlamydialen DNA bewirken. Die rekombinante Expression von Hc2 in *E. coli* induziert eine starke Kondensierung der *E. coli* DNA und die Bildung von sog. Nukloiden, wie sie auch in Chlamydien beobachtet werden (Barry et al. 1992, Brickman et al. 1993, Grieshaber et al. 2006). Vermutlich ist der Grad der DNA-Kondensierung essentiell an der morphologischen Größe und der Transkriptionsregulation in der EB-Form beteiligt (Grieshaber et al. 2006, Niehus et al. 2008). Die DNA-Kondensation wurde für *C. trachomatis* gezeigt, dennoch sind Hc1 und Hc2 in *C. pneumoniae* vorhanden und übernehmen vermutlich eine ähnliche Rolle (Grieshaber et al. 2006). Interessanterweise kann kurz vor der Redifferenzierung auch eine verstärkte Expression von Proteinen beobachtet werden, die in den Frühphasen der Infektion benötigt werden (Abdelrahman & Belland 2005). Dies sind beispielsweise die Adhäsine oder Effektorproteine, aber auch Proteine, die für die ersten metabolischen Prozesse benötigt werden.

Zuletzt erfolgt die Freisetzung der infektiösen EBs über Lyse der Wirtszelle oder Extrusion etwa 72 hpi oder später. Während die Lyse eine vollständige Zerstörung der Wirtszelle

bewirkt, stellt die Extrusion einen neu entdeckten kontrollierten Prozess dar, bei dem konstant kleine Vesikel mit infektiösen EBs von der Hauptinklusion abgeschnürt und freigesetzt werden (Hybiske & Stephens 2007). Aufgrund der Asynchronität des Infektionsprozesses lassen sich bei der Freisetzung noch replizierende RBs ausmachen, während der Großteil der chlamydialen Partikel bereits redifferenziert ist.

Die freigesetzten EBs sind dann bereit, eine neue Wirtszelle zu infizieren und der Zyklus beginnt mit der Adhäsion und Internalisierung von vorn. Ein wichtiger Prozess bei diesen ersten Phasen der Infektion ist die humane Endozytose, die von *C. pneumoniae* manipuliert wird, um eine Internalisierung des Bakteriums zu erreichen. Bevor auf die Manipulation durch die Chlamydien an sich eingegangen wird, erfolgt eine grobe Darstellung der komplexen Prozesse der humanen Endozytose.

1.2 Die humane Endozytose

Die Endozytose der humanen Zelle dient vielen Zwecken und bietet ebenso viele Ausprägungsformen, an denen zahllose Faktoren beteiligt sind. Die wichtigsten sollen hier zusammengefasst dargestellt werden.

Die Endozytose wird durch spezifische Signale an der **Plas**ma**mem**bran (PM) ausgelöst. Der vermutlich am häufigsten anzutreffende Mechanismus ist die rezeptorvermittelte Endozytose. Die Bindung eines spezifischen Liganden an den Rezeptor löst dabei eine Signaltransduktion in der Zelle aus, die eine Invagination der PM um den Rezeptor nach sich zieht und später seine Aufnahme bewirkt. So sind zum Beispiel der Transferrin-Rezeptor oder der EGFR (**E**pidermal **g**rowth **f**actor **r**eceptor), aber auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren hierfür bekannt (Banerjee et al. 2010, Lavezzari & Roche 2007, Sigismund et al. 2008).

Regulierend greifen dann auf intrazellulärer Ebene GTPasen wie RhoA, Arf6 oder Cdc42 ein (Brown et al. 2001, Harris & Tepass 2010, Lamaze et al. 2001). Außerdem werden bestimmte Membranlipide chemisch verändert. Die sog. **P**hosphatidyl**i**nositol**p**hosphate (PIPs) tragen an ihren Kopfgruppen zusätzliche Phosphatgruppen und treten als Mono- (PIP), Bis- (PIP₂) und Triphosphatvarianten (PIP₃) auf. Über diese PIPs werden invaginierende Membransegmente an der Innenseite markiert und auf diesem Weg für selektiv membranbindende Proteine gekennzeichnet. So definiert sich die PM generell über das vorwiegende Vorhandensein von PI(4,5)P₂ (Gericke et al. 2013). Aktivierte Rezeptoren können nun Proteine rekrutieren, die eine lokale Modifikation von PI(4,5)P₂ zu PI(3,4,5)P₃ bewirken (Fields et al. 2010, Laketa et al. 2014). Sowohl PI(4,5)P₂ als auch PI(3,4,5)P₃ sind dann wiederum spezifische Membranbindungsziele von Proteinen, die die Endozytose des aktivierten Rezeptors lokal weiter vorantreiben. Hierbei wird die umgebende Membran unbeeinflusst belassen.

Generell wird zunächst unterschieden zwischen **C**lathrin-**a**bhängiger (CAE) und **C**lathrin-**u**nabhängiger **E**ndozytose (CUE) (Abb. 1.3) (Maldonado-Baez et al. 2013). Bei der CAE wird das namensgebende Protein Clathrin als Hüllprotein rekrutiert und bildet mit der beginnenden Invagination einen zytoplasmatischen Käfig um die endozytotische Invagination. Clathrin dient der Stabilisation und als Erkennungsprotein von Vesikel-sortierenden Transportprozessen. Doch nicht alle endozytotischen Signale lösen ausschließlich den einen oder den anderen Endozytoseweg aus. Der EGFR kann beispielsweise abhängig von der Konzentration seines gebundenen EGF-Liganden über CAE oder CUE aufgenommen werden (Sigismund et al. 2008). Analog zur CAE können ersatzweise Caveoline als Hüllproteine rekrutiert werden und teilweise ähnliche Funktionen wie Clathrin übernehmen (Abb. 1.3).

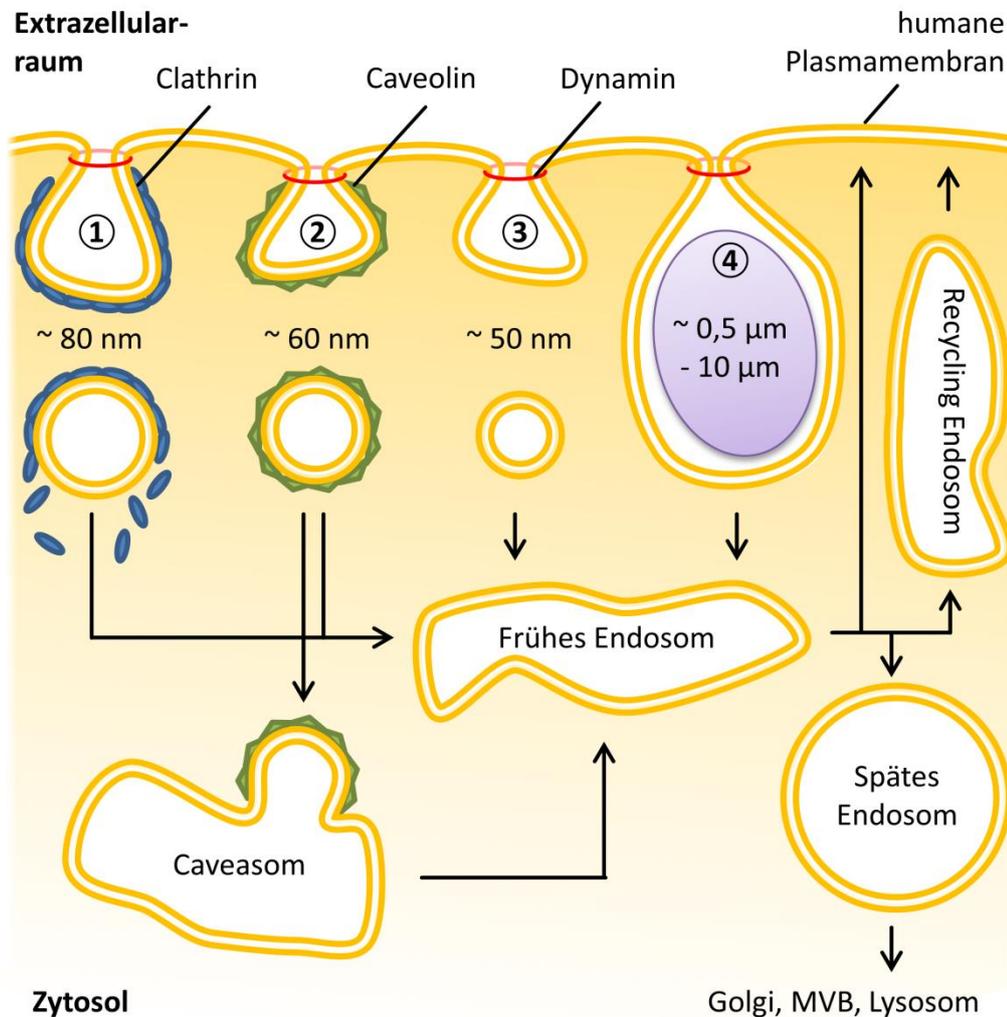


Abb. 1.3: Verschiedene Endozytosewege der humanen Zelle

Schematische Darstellung der verschiedenen Endozytosewege der Humanzelle, welche abhängig oder unabhängig von Clathrin, Caveolin und Dynamin verlaufen. 1 Clathrin-abhängige Endozytose, 2 Caveolin-abhängige Endozytose, 3 Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose, 4 Phagozytose. MVB, Multivesicular body. (Modifiziert nach Mayor & Pagano 2007)

Des Weiteren sind endozytotische Prozesse bekannt, bei denen weder Clathrin noch Caveolin beteiligt sind und deren Struktur vesikulär und tubulär ausgeprägt sein können (Mayor & Pagano 2007). Dann kann eine weitere Einteilung dieser Prozesse vorgenommen werden, denn nicht alle benötigen die kleine GTPase Dynamin (Abb. 1.3). Die Dynamin-Isoformen werden gewebespezifisch exprimiert (Dyn 1 Gehirn, Dyn 2 ubiquitär, Dyn 3 Hoden, Gehirn und Lunge) (Praefcke & McMahon 2004). Dynamin 1 und 2 können spiralartige Komplexe um die verbleibende Membranbrücke zwischen Invagination und der PM bilden (Ford et al. 2011). Die Rolle von Dynamin 3 ist dagegen wenig verstanden. Durch Energieumsatz aus GTP-Hydrolyse kontrahiert dieser Spiralkomplex soweit bis die Energie ausreicht, um eine Abschnürung des Vesikels von der PM zu bewirken (Abb. 1.3) (Chappie et al. 2011, Kozlovsky & Kozlov 2003). Diese Art der Abschnürung findet sich sowohl bei der CAE als auch bei der CUE, kann aber auch vollständig Dynamin-unabhängig erfolgen. Neben dieser Funktion konnte interessanterweise kürzlich aber gezeigt werden, dass Dynamin weitere Prozesse beeinflusst. So werden intakte MT in Verbindung mit aktivem Dynamin benötigt, um tubuläre Strukturen der CUE zu bilden und zu stabilisieren (Day et al. 2015).

Eine Sonderform der Endozytose stellt die Phagozytose dar. Dieser Prozess ähnelt weitestgehend der oben beschriebenen Endozytose, ist jedoch in der Regel unabhängig von Clathrin, aber abhängig von Dynamin 2 (Gold et al. 1999, Tse et al. 2003). Die Rolle von Caveolin während der Phagozytose wird bisher stark diskutiert (Park et al. 2006). Die potentielle Größe des phagozytierten Partikels unterscheidet sich dabei deutlich. Vesikel aus den oben beschriebenen endozytotischen Prozessen sind durchschnittlich 50 – 80 nm groß (Abb. 1.3) (Hansen & Nichols 2009). Partikel, die über Phagozytose aufgenommen werden, können eine Größe von 0,5 – 10 μm aufweisen (Sahay et al. 2010).

Nach der Abschnürung werden die gebildeten Vesikel zum sog. frühen Endosom transportiert und verschmelzen mit diesem. Vesikel aus der CUE können dazwischen ein Sonderorganell bilden, das Caveosom genannt wird (Abb. 1.3) (Parton & Simons 2007). Vesikel aus der CAE verschmelzen dagegen direkt mit dem frühen Endosom und werden vorher von ihrer Clathrin-Hülle befreit (Lemmon 2001). Im frühen Endosom werden die endozytierten Bestandteile sortiert und wiederum über Vesikel zu den Zielorganellen transportiert (Kornilova 2014). Im frühen Endosom eingeschlossene Bestandteile können auch zur PM zurückgeführt werden. Bei diesem Recycling genannten Prozess werden die Vesikel entweder direkt zur PM transportiert oder bilden als Zwischenstation das Recycling-Endosom (Abb. 1.3) (Grant & Donaldson 2009). Beim weiteren Transport der Endosomen in das Zellinnere können Zielstrukturen der Golgi-Apparat, MVBs oder das Lysosom sein.

Essentiell für die frühe Endozytose an sich sind unter anderem zwei grundlegende Strukturen, die Membran und das Zytoskelett. Die Membran bildet die Ausgangsstruktur, die während der Endozytose aktiv moduliert werden muss, um einen Vesikel zu bilden. Das Zytoskelett gibt Stabilität und kann die Kraft aufbringen, um Membranformungen zu unterstützen und zu fokussieren.

1.2.1 Membranen während der Endozytose

Membrankrümmungen können naturgemäß in zwei Richtungen erfolgen. Die definierte Unterscheidung als positive und negative Krümmung erfolgt dabei in der Literatur meist willkürlich (McMahon & Gallop 2005, Zimmerberg & Kozlov 2006). In dieser Arbeit wird deshalb, ausgehend vom Zytoplasma der Humanzelle, eine positive Membrankrümmung als einstülpende Krümmung dem Zytoplasma entgegen definiert. Eine negative Krümmung wird dagegen als eine auswölbende Krümmung dem extrazellulärem Medium entgegen definiert. Häufig werden in zellulären Prozessen beide Krümmungsrichtungen benötigt. Um beispielsweise eine endozytotische Invagination vor der Abschnürung zu stabilisieren, benötigt es eine positive Membrankrümmung entlang des Vesikels und der Membranbrücke, aber auch eine negative Membrankrümmung am Übergang von der Membranbrücke zur PM bzw. dem Vesikel (Abb. 1.4) (McMahon & Gallop 2005).

Die Krümmung von biologischen Membranen kann durch mehrere Prozesse ausgelöst werden, die sich in drei Großkategorien einteilen lassen: Veränderung der Membranzusammensetzung, Verformung durch Bindung und indirekte Verformung durch Krafteinwirkung. Meist wirken mehrere membrankrümmende Effekte synergetisch, um spezifische Membrankrümmungsgrade zu erreichen (McMahon & Boucrot 2015). Bei der Veränderung der Membranzusammensetzung können beispielsweise die Kopfgruppen der Lipide einer der Lipidschichten so modifiziert werden, dass diese sterisch mehr Platz einnehmen. So wird eine Krümmung in Richtung der nicht-modifizierten Lipidschicht erreicht (Hammond et al. 1984). An der Innenseite der PM akkumulierte PIPs lösen beispielsweise eine positive Membrankrümmung aus, während akkumuliertes Diacylglycerol aufgrund der kleinen Kopfgruppe eine negative Krümmung auslöst (McMahon & Boucrot 2015). Ähnlich verhält es sich, wenn Proteine in die Membran inseriert werden, die durch ihre Form eine ungleichmäßige Spreizung einer der beiden Schichten auslösen. Dies kann durch Transmembransegmente bewirkt werden, aber auch durch **amphipathische Helices (APHs)**, welche nur in eine der beiden Schichten integriert werden (Ford et al. 2002, Unwin 2005).

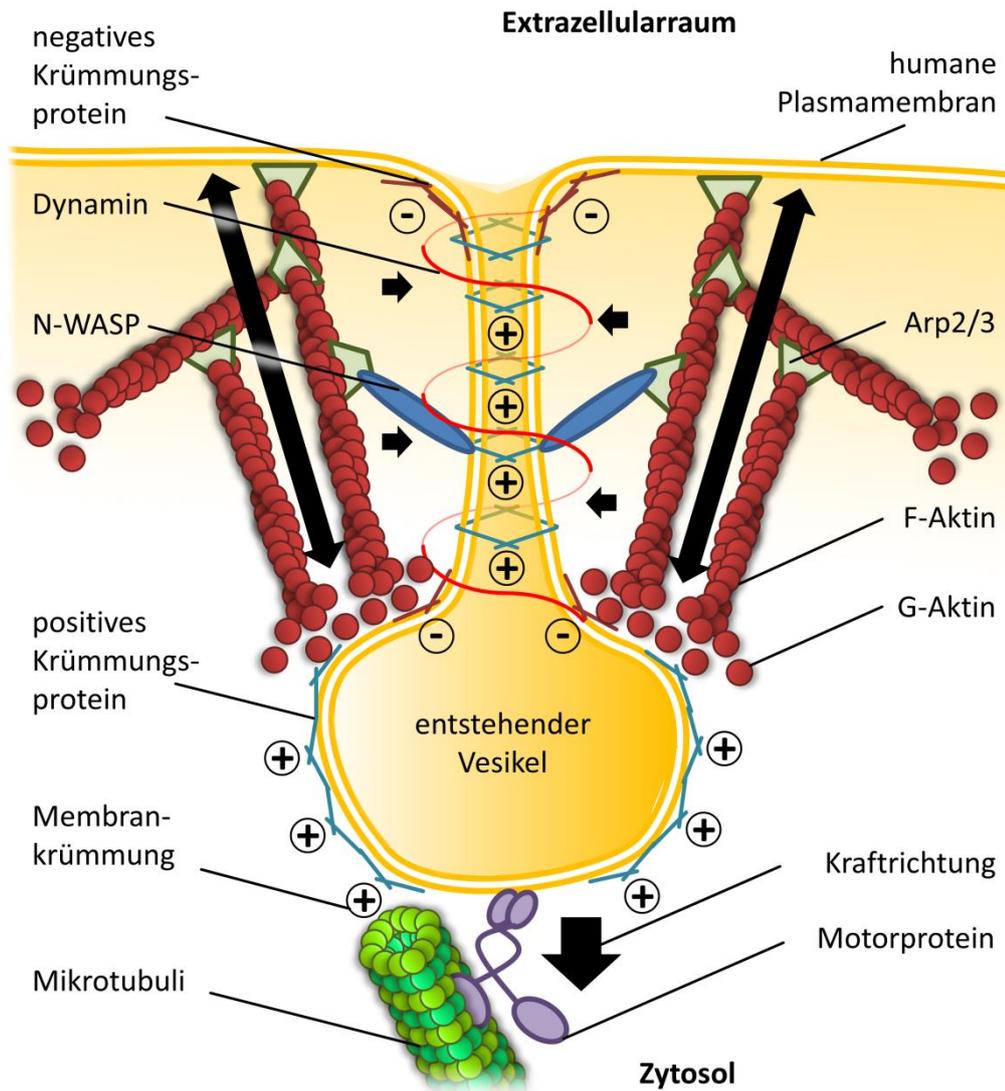


Abb. 1.4: Membran- und Zytoskeletteinflüsse während der humanen Endozytose

Schematisch dargestellt sind die einzelnen Komponenten und auftretenden Effekte der frühen Endozytose. In diesem Fall wurde eine Dynamin-abhängige Endozytose gewählt. Ausgeübte Kräfte durch das Zytoskelett sind durch schwarze Pfeile dargestellt. Positive und negative Membran-krümmungen sind durch + bzw. – angedeutet. (Modifiziert nach Kessels & Qualmann 2004)

Das Protein Epsin inseriert beispielsweise während der Endozytose eine APH spezifisch in die innere Schicht der PM. Hydrophobe Aminosäuren begünstigen dabei die Insertion in die Lipidschicht und positiv geladene Aminosäuren der APH vermitteln die Spezifität zu PI(4,5)P₂ der PM (Ford et al. 2002). Eine Krümmung durch Membranbindung wird auch generiert, wenn ein strukturell gekrümmtes Protein oder ein Proteinkomplex die Membran an mehreren Stellen eng an sich bindet und so eine positive oder negative Krümmung auf die Membran überträgt. Ein bekanntes Beispiel hierfür wäre Dynamin oder BAR-Domänen tragende Proteine (**B**in-**A**mphiphysin-**R**vs167-domain) (Ford et al. 2011, Safari & Suetsugu 2012). BAR-Domänen werden erst durch Dimerisierung vollständig funktional und können je nach Ausprägungsform bananenartige Strukturen besitzen, die Membranen positiv oder negativ

krümmen (Suetsugu et al. 2010). Beispielsweise sind SNX9 und SNX18 (**S**orting **n**exin **9/18**) positiv krümmende BAR-Proteine (Lundmark & Carlsson 2009). IRSp53 (**I**nulin **r**eceptor **s**ubstrate **p**53) ist als negativ krümmendes invers-BAR-Protein zu nennen, welches unter anderem mit Dynamin 1 interagiert und Cdc42 aktiviert (Chou et al. 2014, Kast et al. 2014). Die letzte Form der Krümmung wird durch Kraftausübung ausgelöst. Die Membran wird beispielsweise bei der Filopoden-Bildung durch Aktinpolymerisation nach außen gedrückt oder wie bei der CUE durch Motorproteine an Mikrotubuli nach innen gezogen.

1.2.2 Das Aktin- und Mikrotubuliskelett während der Endozytose

Das Zytoskelett als Zusammenspiel zwischen Aktin und Tubulinen ist der zweite wichtige Faktor in der Endozytose. Aktin- und MT-Filamente unterliegen beide ähnlichen Dynamiken. Beginnend von einer Nukleationsstruktur setzt sich an einem Ende die Polymerisation der monomeren Proteine (α - / β -Tubulin bzw. globuläres Aktin) fort, während die entgegengesetzte Seite depolymerisiert. Ein Wachsen oder Schrumpfen der jeweiligen Filamente wird erreicht, indem die Prozesse einer Seite beschleunigt oder verlangsamt werden und so die Nettopolymerisation oder Nettodepolymerisation überwiegt (Coles & Bradke 2015). Bei MT kommt hinzu, dass bestimmte Umstände eine sog. Katastrophe herbeiführen können, die den Hauptgrund zum Schrumpfen der MT darstellt. Dabei handelt es sich um ein oft sprunghaftes Depolymerisieren des polymerisierenden Endes (Alushin et al. 2014). Beide Filamente sind in Humanzellen darüber hinaus maßgeblich an der Stabilisierung der Zelle beteiligt (Ahmad et al. 2000).

Das Aktinzytoskelett wird haupttragend mit dynamischen Bewegungen in Verbindung gebracht; seltener sind aber auch Transportprozesse mit ihm verbunden. So kann es beispielsweise die Membran nach außen drücken, wenn viele Aktinfilamente (F-Aktin, **f**ilamentöses **A**ktin) der Membran entgegen polymerisieren. Dies geschieht beispielsweise bei der Filopoden-Bildung oder Phagozytose (Smythe & Ayscough 2006). Andererseits können selbst große Strukturen durch Aktinpolymerisation von der Membran weggedrückt werden. Der dabei entstehende sog. Aktin-Schweif ist bereits bei vollständig geschlossenen Vesikeln der CAE beobachtet worden, aber auch Pathogene wie *Listeria* verwenden dieses Prinzip der gerichteten Aktin-Polymerisation für Bewegungsprozesse innerhalb der Wirtszelle (Collins et al. 2011, Kocks et al. 1995). Frühe Vesikel der Endozytose werden über Motorproteine wie Myosin 6 aus dem Zellkortex entlang des F-Aktin zum polymerisierenden Ende des Filaments transportiert (Granger et al. 2014). Als Nukleationsstruktur für F-Aktin sind zahlreiche Proteine identifiziert worden: die bekanntesten sind allerdings ARP2/3 (**a**ctin-**r**elated **p**roteins **2** and **3**) und N-WASP (**n**euronale **W**iskott-**A**ldrich **S**yndrome **p**rotein) (Abb. 1.4). Wird N-WASP

beispielsweise durch Bindung an oligomerisiertes SNX9 aktiviert, werden mehrere monomere G-Aktin-Untereinheiten (**g**lobuläres **Aktin**) gebunden, dadurch in räumliche Nähe gebracht und so ein neuer Nukleationspunkt gebildet (Campellone & Welch 2010). N-WASP- bzw. Arp2/3-induzierte Aktinpolymerisation kann eine Kraftausübung am entstehenden endozytotischen Vesikel bewirken. Mit der Polymerisation wird vom Aktinfilament eine Kraft auf dieselbe Membran ausgeübt, in der auch der Nukleationspunkt verankert ist, die Kraft wirkt also in beide Richtungen (Kessels & Qualmann 2004). Als Folge dessen kommt es zu einer Verlängerung der Membranbrücke zwischen dem entstehenden Vesikel und der PM (Abb. 1.4). Gleichzeitig wird eine Verbindung von Dynamin und Aktin über N-WASP und ARP2/3 gewährleistet, was die Kraftausübung auf die sich verjüngende Membranbrücke regional zusätzlich verstärkt. Diese Verbindung kann durch BAR-Proteine gewährleistet werden wie das bekannte Syndaptin, aber auch durch SNX9, da es sowohl mit Dynaminen als auch ARP2/3 und N-WASP interagieren kann (Kessels & Qualmann 2004, Lundmark & Carlsson 2009). Eine Sonderrolle nimmt dabei das Protein Cortactin (**c**ortical **a**ctin binding protein) ein, das in der Lage ist sowohl mit N-WASP als auch mit ARP2/3 zu interagieren und F-Aktin zu binden (Kowalski et al. 2005, Martinez-Quiles et al. 2004). Daher ist dieses Protein oft mit dynamischen Aktinprozessen des Zellkortex und der Endozytose verbunden.

MTs sind in der Regel weniger dynamisch und daher stabiler. Ihren Polymerisationsursprung haben sie vorwiegend in sog. MTOCs. Viele Motorproteine bewegen sich entlang dieser Filamente in Richtung des polymerisierenden Endes wie Kinesine oder entgegengesetzt wie die Dyneine (Soldati & Schliwa 2006). In der Endozytose erfolgt also der initiale Kurzstreckentransport aus dem Zellkortex heraus über Myosine VI und Aktin. Der spätere Langstreckentransport findet dann entlang der Mikrotubuli statt. Bestimmte regulierende Proteine wie Huntingtin bewirken dann den Wechsel von Aktin-abhängigem Transport zu Mikrotubuli-abhängigem Transport in Bereichen, in denen sich beide Filamente überlappen (Granger et al. 2014). Als weitere Funktion von MT können Motorproteine bei endozytotischen Membrantubuli oder Invaginationen der CUE an die PM in das Innere der Zelle ziehen (Abb. 1.4) (Day et al. 2015, Soldati & Schliwa 2006). Die so entstehenden Membrantubuli werden dann entlang von MT transportiert und von MT stabilisiert.

Bestimmte Proteine können als Mediator zwischen Membran- und Zytoskelettdynamik agieren und nehmen so eine besonders wichtige Funktion während der Endozytose ein. Eines dieser Proteine ist SNX9, dessen wichtigste Funktionen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

1.2.3 SNX9 als Mediator zwischen Membran- und Zytoskelettdynamik

SNX9 ist Mitglied der Familie der **S**orting **n**exine (SNX), die im Allgemeinen bei endosomalen Vesikeltransporten bedeutende Rollen spielen, wie z.B. beim Recycling, der Sortierung oder Etablierung der Vesikelmorphologie (Cullen 2008). Die Familie der SNX-Proteine besteht aus etwa 33 Mitgliedern, von denen viele gemeinsame Domänenstrukturen teilen. Fast alle SNX-Proteine besitzen eine PX-Domäne (**p**hox-**h**omology domain), die zur spezifischen Erkennung von PIPs in Membranen dient (Abb. 1.5) (Carlton et al. 2005). Bereits darüber wird eine spezifische Membranlokalisation erreicht. Hinzu kommt die BAR-Domäne als eine zweite Membran-Interaktionsdomäne, die in 12 der SNX Proteine zu finden ist (vgl. Kap. 1.2.1). BAR-tragende Proteine sind in der Lage Homo- und in einigen Fällen Heterodimere oder höhere Oligomere zu bilden (Abb. 1.5) (Carlton et al. 2005). Nach erfolgreicher Oligomerisierung können sie durch Bindung spezifische Krümmungsgrade bei Membranen erzeugen, erkennen und stabilisieren (Peter et al. 2004). Durch Oligomerisierung verschiedener SNX-Proteine können über die kombinierten PX-Domänen neue Membranspezifitäten entstehen. Die synergetische Funktion von spezifischer Membranbindung und Krümmung über Homo- und Heterodimerisierung kann dann zu komplexen Membranstabilisierungen bis hin zur Membrantubulation führen (Yin et al. 2009). Darüber hinaus vermitteln SNX-Proteine über zusätzliche Domänen entsprechende weitere Effekte.

SNX9 besitzt eine N-terminale SH3-Domäne (**S**RC **h**omology **3**-domain), die für eine Vielzahl von Interaktionen verantwortlich ist, wie beispielsweise mit N-WASP und Dynamin 1/2 (Lundmark & Carlsson 2009, Soulet et al. 2005). Die SH3-Domäne vermittelt allerdings auch Bindung an bakterielle Proteine, wie EspF (**E.** coli **s**ecreted **p**rotein **F**) des enteropathogenen *Escherichia coli* (EPEC) und CPn0677 bzw. CPn0678 aus *C. pneumoniae*, die an späterer Stelle erläutert werden (Abb. 1.5) (vgl. Kap. 1.5 & Kap. 1.5.1). SH3-Domänen binden generell spezifische Erkennungssequenzen, die aus **p**rolin**r**eiche **R**egionen (PRR) mit positiv geladenen Aminosäuren bestehen. SH3-Domänen werden dabei in mehrere Klassen aufgeteilt (Li 2005). Vereinfacht dargestellt binden Klasse I SH3-Domänen hauptsächlich an Motive mit der Sequenz (R/K)_{x(1-3)}PxxP, also mit positiv geladenen Aminosäuren vor einem zentralen PxxP-Motiv (Li 2005). Klasse II SH3-Domänen binden dagegen an umgekehrte PxxP_{x(1-3)}(R/K)-Motive, und sog. nicht-kanonische SH3-Domänen an völlig unklassifizierbare Motive. SNX9 zählt zu den Proteinen mit einer Klasse I SH3-Domäne, da spezifische Affinität zu RxxPxxP-Motiven belegt werden konnte (Abb. 1.5) (Alto et al. 2007). Weiterhin wurde eine

amphipathische Helix (α_0) identifiziert, die in der sog. yoke-Domäne von SNX9 lokalisiert ist (Pylypenko et al. 2007). Die α_0 -Helix ist wiederum maßgeblich an der Membraninsertion beteiligt, während die gesamte yoke-Domäne der strukturellen Fixierung der PX-Domäne in einer bestimmten Orientierung zur BAR-Domäne dient (Abb. 1.5) (Teasdale & Collins 2012). Ferner vermittelt der N-terminale Teil von SNX9 die Rekrutierung von Clathrin (Lundmark & Carlsson 2009).

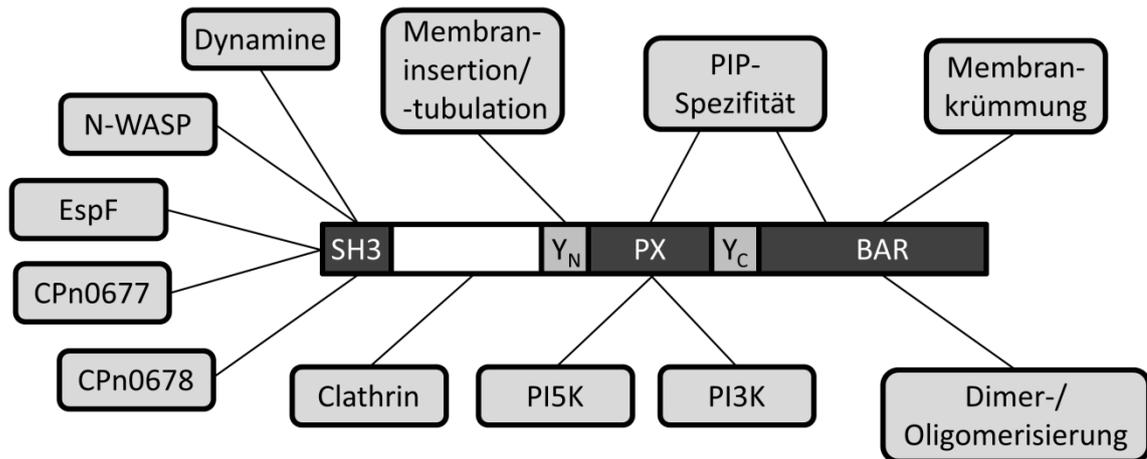


Abb. 1.5: Domänenübersicht von SNX9 mit entsprechender Funktionszuordnung

Dargestellt sind schematisch die in SNX9 enthaltenen Domänen und bereits bekannte Protein-Interaktionspartner oder Funktionen. Alle weiteren Abkürzungen sind im Fließtext erklärt. PX, phox-homology domain; BAR, Bin-Amphiphysin-Rvs167-domain; Y_{N/C}, C-terminale oder N-terminale yoke-Domäne; SH3, Src-homology 3 domain. (Angefertigt nach Lundmark & Carlsson 2009, Murra 2009, Morita-Ishihara et al. 2009 und Pylypenko et al. 2007).

Die Funktion von SNX9 ist in der Regel mit dem Endozytostyp CAE verbunden, wo es in späteren Phasen der Vesikelausbildung und der Abschnürung zu finden ist (vgl. Kap. 1.2) (Lundmark & Carlsson 2009). Einige Daten legen allerdings darüber hinaus die Beteiligung an der CUE nahe (Yarar et al. 2007). SNX9 wird durch seine PX-Domäne über Bindung an spezifischen PIP-Kompositionen zur Membran rekrutiert, die durch endozytotische Prozesse initial verändert werden (Abb. 1.6 (1)) (Yarar et al. 2008). So zeigt SNX9 die höchste Bindungsaffinität zum PM-definierenden PI(4,5)P₂, aber auch hohe Affinität zu PI(3,5)P₂, PI(3,4)P₂ und PI(3,4,5)P₃, die unter anderem durch Signale der rezeptorvermittelten Endozytose gebildet werden (vgl. Kap. 1.2). Die PX-Domäne dient bei SNX9 auch dazu die PI5K (**P**hosphatidy**I**nositol 4-phosphate **5**-**k**inase) zu aktivieren und PI(4)P zu PI(4,5)P₂ umzusetzen, was vermutlich die Bindung von weiterem SNX9 begünstigt (Shin et al. 2008). Andererseits interagiert SNX9 über die PX-Domäne mit der PI3K (**p**hospho**i**nositide **3**-**k**inase), die PI(4,5)P₂ zu PI(3,4,5)P₃ umsetzt, welches als Signal für weitere endozytotische

Prozesse dient, und könnte so die Endozytose voran treiben (Badour et al. 2007). Außerdem ist die PI3K an der weiteren Reifung des endozytotischen Vesikels beteiligt und rekrutiert Dynamin (Gold et al. 1999). Neben der Lokalisation bewirkt die PIP-Bindung bei SNX9 dessen Aktivierung (Badour et al. 2007). Durch die Bindung wird eine SNX9 Oligomerisierung ausgelöst, die mit einer stark erhöhten Aktivierung von N-WASP und GTP-Hydrolyse durch Dynamin 1/2 einhergeht (2) (Yarar et al. 2008). Zusammen mit der Kontraktion der Dynamine und der Aktin-Kraftausübung durch rekrutiertes N-WASP wird dann der Vesikel geschlossen (3). SNX9 verbleibt anschließend zum Teil am abgeschnürten Vesikel und ist vermutlich am weiteren ersten Aktin-abhängigen Transport des Vesikels durch Polymerisation beteiligt (Lundmark & Carlsson 2009).

Somit werden sowohl Membranmodulationen als auch eine kontrollierte Dynamik des Zytoskeletts in allen Bereichen der Endozytose benötigt, wobei SNX9 ein wichtiges Adapterprotein darstellt. Der Vorgang der Endozytose bildet für Pathogene einen wichtigen Angriffspunkt während ihrer Internalisierung. Welche Manipulationsmöglichkeiten von *C. pneumoniae* während dieser Phase bereits bekannt sind, wird im nächsten Kapitel betrachtet.

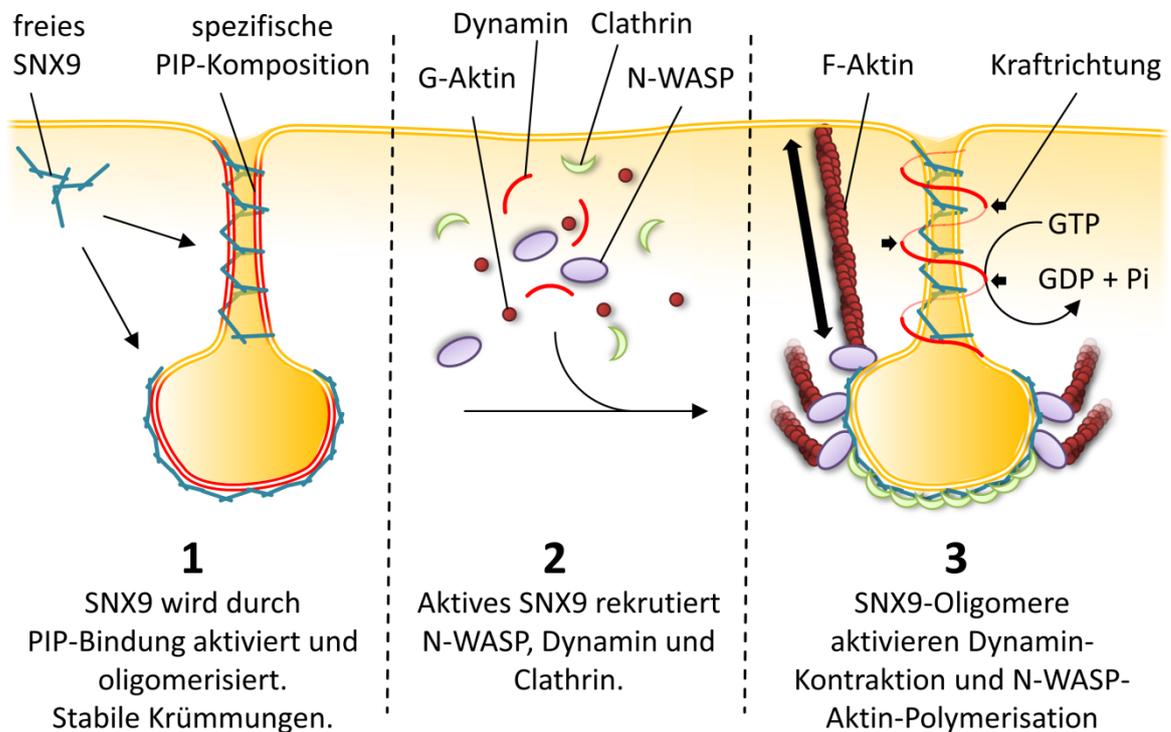


Abb. 1.6: Funktionen von SNX9 während der humanen Endozytose

Dargestellt sind drei Hauptphasen der SNX9-Funktionen während der humanen Endozytose. Einzelschritte sind im Fließtext erklärt. Ausgeübte Kräfte sind durch starke schwarze Pfeile dargestellt. (Angefertigt nach Lundmark & Carlsson 2009 und Pylypenko et al. 2007)

1.2.4 Frühe Prozesse der chlamydialen Infektion

Die ersten und vermutlich essentiellsten Schritte der chlamydialen Infektion sind die Adhäsion und die Internalisierung. Die funktionelle Charakterisierung dieser Schritte und ihre mögliche Inhibierung stehen besonders im medizinischen Forschungsfokus. Das Unterdrücken einer dieser Prozesse könnte eine Infektion von vorn herein verhindern, statt eine schon bestehende intrazelluläre Infektion zu behandeln.

Der vermutlich erste Kontakt wird durch Interaktionen zwischen dem oberflächenlokalisierten chlamydialem OmcB und humanen GAGs hergestellt (Abb. 1.7) (Fechtner et al. 2013, Moelleken & Hegemann 2008). Während der Adhäsion wird das chlamydiale MOMP mit dem M6P/IGF2 in Verbindung gebracht (Puolakkainen et al. 2005). Weiterhin bewirkt das Adhäsion LIPP vermutlich die Externalisierung des humanen negativen Membranlipids PtdSer (**Phosphatidylserin**) (Fechtner 2012). Für *C. trachomatis* konnte kürzlich Ctad1 als ein weiteres Adhäsion identifiziert werden, dessen Interaktion mit dem humanen Integrin- β 1 nachgewiesen wurde (Stallmann & Hegemann 2015). Die Relevanz des homologen *C. pneumoniae* Proteins für die Adhäsion ist noch ungeklärt. Im nachfolgenden Schritt wird vermutet, dass Pmp21 mit dem EGFR interagiert (Abb. 1.7) (Molleken et al. 2013). Bei dem aktiviertem EGFR wurde eine Aktivierung des ERK-Signalweges beobachtet, wobei nachweislich ein positiver Effekt auf die Internalisierung ausgelöst wird. Zusätzlich konnte eine Rekrutierung der Adapterproteine GRB2 (**g**rowth factor **r**eceptor **b**ound protein **2**) und CBL zu adhären Chlamydien beobachtet werden, welche die Aktivierung des EGFR und des ERK-Signalweges belegen (Abb. 1.7) (Molleken et al. 2013).

Interessanterweise scheint der Haupt-Endozytoseweg bzw. Phagozytoseweg zur Internalisierung von *C. pneumoniae* die CUE zu sein, da eine Abhängigkeit von cholesterolreichen Membrandomänen bei gleichzeitiger Unabhängigkeit von Clathrin entdeckt wurde (Korhonen et al. 2012). Im Gegensatz dazu ist Clathrin ein bekanntes Schlüsselprotein für die Phagozytose von *C. trachomatis* (Hybiske & Stephens 2007). Dies deutet darauf hin, dass die Aufnahme der chlamydialen Partikel weder vollständig der Endozytose noch der Phagozytose zugeordnet werden kann. Die Größe des Partikels betrachtend wäre Phagozytose nahe liegend. Die bislang identifizierten beteiligten Faktoren wie cholesterinreiche Membranen sprechen bei *C. pneumoniae* eher für CAE oder durch Clathrin-Abhängigkeit bei *C. trachomatis* für CUE.

Weiterhin transloziert das chlamydiale **Typ-III Sekretionssystem** (T3SS) Effektorproteine in die Wirtszelle (Abb. 1.7) (Betts-Hampikian & Fields 2010). Die sekretierten Effektorproteine

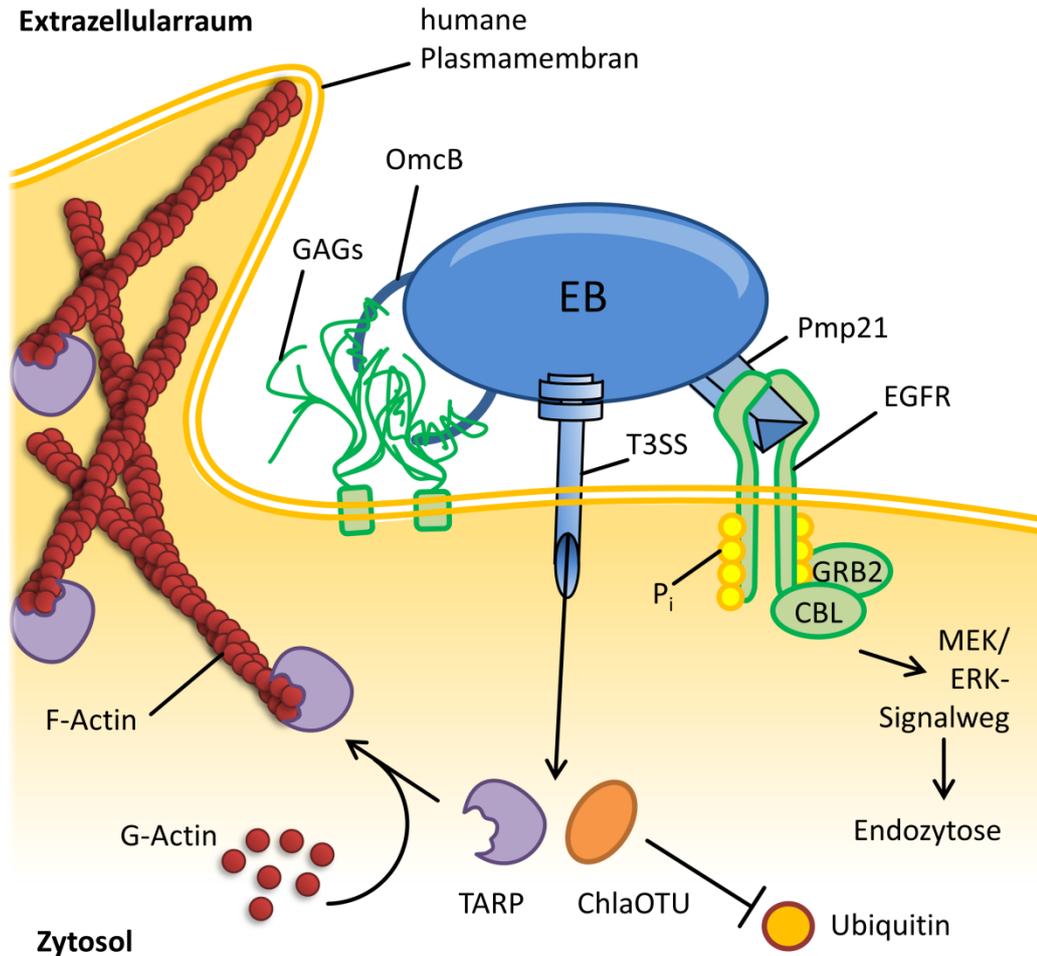


Abb. 1.7: Prozesse während der Frühphasen der Infektion von *C. pneumoniae*

Dargestellt sind die in der Literatur beschriebenen Proteine und die Prozesse, die von *C. pneumoniae* während der Frühphasen der Infektion manipuliert werden. Die Darstellung umfasst dabei Teilprozesse der Adhäsion und Internalisierung. Phosphorylierungen am EGFR sind durch gelbe Kreise angedeutet. Alle Abkürzungen sind im Fließtext erklärt. (Angefertigt nach Zriec 2009, Fechtner et al. 2013, Furtado et al. 2013 und Molleken et al. 2013).

dienen wiederum dazu, Prozesse der Wirtszelle zum Vorteil des Bakteriums zu modifizieren. Die meisten Effektorproteine weisen eine N-terminale Signalsequenz auf, die es als T3SS-Substrat kennzeichnen (Karavolos et al. 2005, Subtil et al. 2005). Diese ist zwar nicht eindeutig identifizierbar, muss sich aber innerhalb der ersten ca. 50 AS befinden. Beispielhaft kann das früh sekretierte *C. trachomatis* Protein TARP (**T**ranslocated **a**ctin-**r**ecruiting **p**hosphoprotein) genannt werden. Dieses Protein bewirkt eine Reorganisation des Aktinskeletts an der potentiellen Internalisierungsstelle und besitzt in CPn0572 ein entsprechendes Homolog in *C. pneumoniae* (Jewett et al. 2006). Für CPn0572 konnte bisher gezeigt werden, dass es als Nukleator von Aktin an der Internalisierungsstelle von *C. pneumoniae* agiert, was auf eine wichtige Funktion dieses Proteins ähnlich zu TARP schließen lässt (Abb. 1.7) (Jewett et al. 2010, Zriec 2009). Weiterhin konnten in *C. caviae* das Protein ChlaOTU und in *C. trachomatis* das Protein CT694 als frühe Effektorproteine identifiziert werden. Beide Proteine werden

vom T3SS sekretiert und besitzen ebenfalls entsprechende Homologe oder Gene in *C. pneumoniae* an gleicher Position mit unterschiedlicher oder bisher unbekannter Funktion. ChlaOTU löst die Deubiquitinierung bestimmter Proteine an der Eintrittsstelle aus, um möglicherweise Autophagie der infizierten Zelle zu vermeiden (Abb. 1.7) (Furtado et al. 2013). CT694 scheint dagegen mit dem Aktin-modulierenden Protein AHNAK zu interagieren, welches vermutlich die Aufnahme des Bakteriums unterstützt (Kap. 1.5) (Hower et al. 2009). Insgesamt sind im Vergleich zu anderen chlamydialen Prozessen nur sehr wenige früh agierende Effektorproteine bekannt. Da diese Proteine von dem T3SS in die humane Wirtszelle transferiert werden, wird diese komplexe Sekretionsmaschinerie im Folgenden erläutert.

1.3 Das Typ-III Sekretionssystem

Bei den Gram-negativen Bakterien sind insgesamt sechs Sekretionssysteme bekannt. Sie unterscheiden sich zum Teil deutlich in ihrem Aufbau, ihrer Form und dem Zweck. Allen gleich ist dabei die Funktion, Proteine aus der Zelle zu transportieren, damit diese Einfluss auf die Umgebung nehmen können.

Prinzipiell unterscheidet man zwischen ein- und mehrschrittigen Sekretionssystemen: Bei den mehrschrittigen Sekretionssystemen wird das Protein zuerst über Sec- oder Tat-Transporter in das Periplasma der Bakterienzelle gebracht (Desvaux et al. 2009). Anschließend können die Proteine über Typ-II oder Typ-V nach außen transportiert werden (Tseng et al. 2009). Bei Proteinen der Typ-V Sekretion handelt es sich allerdings um Autotransporter-Proteine, die für den zweiten Schritt der Sekretion keinen weiteren Proteinkomplex benötigen (Costa et al. 2015). Die Sekretionssysteme vom Typ-I, Typ-III und Typ-VI sind dagegen in der Lage ihre Proteine in einem Schritt auf die Außenseite zu befördern (Tseng et al. 2009). Das Typ-IV-Sekretionssystem nimmt eine Sonderrolle ein, weil es in der Lage ist sowohl eine ein- als auch mehrschrittige Sekretion durchzuführen. Weiterhin sind einige Sekretionssysteme in der Lage nicht nur die innere und äußere Membran der Gram-negativen Bakterien zu durchspannen, sondern über einen Nadelkomplex auch durch die Wirtszellmembran in eine Wirtszelle zu sekretieren (T3SS, Typ-IV und Typ-VI).

Von all diesen Sekretionssystemen ist das T3SS vermutlich das am besten erforschte. Einige der wichtigsten Effektorproteine Gram-negativer Bakterien werden durch dieses Sekretionssystem transportiert (Hueck 1998). Interessanterweise besteht relativ hohe Konservierung zwischen den einzelnen T3SS-Komponenten unter einigen bakteriellen Vertretern, wie *Chlamydiae*, *Yersinia*, *Shigella*, *E. coli* und *Salmonella* (Betts-Hampikian & Fields

2010). So können identifizierte Funktionen einzelner Strukturkomponenten häufig sinngemäß auf Funktionen der Homologe anderer Bakterien übertragen werden.

Das chlamydiale T3SS ist im Detail, verglichen mit anderen Gram-negativen Bakterien, nur schlecht verstanden. Bekannt ist zumindest, dass Chlamydien ein funktionales T3SS besitzen und über dieses Effektorproteine sekretieren (Fields et al. 2003). Die Sekretionsaktivität ist vom ersten Kontakt an durch den ganzen Infektionszyklus, bis zur Wirtszellyse zu beobachten. Die Sekretion der Effektorproteine erfolgt allerdings keineswegs willkürlich, sondern ist vielmehr ein höchst regulierter Prozess, der in allen Infektionsstadien benötigt wird (Betts-Hampikian & Fields 2010). Eine Regulationsmöglichkeit ist die Begrenzung der T3SS-Verfügbarkeit. Für *C. psittaci* konnten in elektronenmikroskopischen Aufnahmen unbekanntes Projektionen auf der Oberfläche der chlamydialen Partikel beobachtet werden, die, vervollständigt durch neue Daten, wahrscheinlich T3SS repräsentieren (Matsumoto 1982, Nans et al. 2014). Frühe *C. psittaci* RBs weisen durchschnittlich 44 Projektionen, RBs kurz vor der Redifferenzierung dagegen 20 und die redifferenzierten EBs nur noch 17 auf (Matsumoto 1982). Der Wert von etwa unbekanntes 17 Projektionen ist weitestgehend vergleichbar mit 20 beobachteten und identifizierten T3SS auf *C. trachomatis* EBs (Matsumoto 1982, Nans et al. 2014). Die Lokalisierung der T3SS am chlamydialen Partikel ist dabei sehr polar auf eine Seite konzentriert (Nans et al. 2014).

Des Weiteren existieren sog. Chaperone, die Substrat- bzw. Effektorproteine im Bakterienzytosol binden und so ebenfalls zur Regulation der Sekretion beitragen können. Von anderen Bakterien ist bekannt, dass von Chaperonen gebundene Proteine stabilisiert werden und darüber verhindert wird, dass besonders zerstörerische Effektorproteine ihre Wirkung bereits im Bakterieninneren entfalten (Page & Parsot 2002). Die Trennung von Effektor und Chaperon erfolgt dann energieabhängig und das Effektorprotein wird mit dem N-Terminus voran im entfalteten Zustand durch das gesamte T3SS in die angrenzende Wirtszelle sekretiert (Abb. 1.8) (Radics et al. 2014, Stone et al. 2011). Dort faltet es sich anschließend automatisch neu. Durch die hohe Konservierung der funktionellen Sekretionssignale können chlamydiale Effektoren in heterologen Sekretionsassays in *Shigella* oder *Yersinia* über das jeweilige T3SS sekretiert werden (da Cunha et al. 2014, Muschiol et al. 2011, Subtil et al. 2001). Diese heterologen Sekretionsassays sind zwingend notwendig, da eine zuverlässige bioinformatische Vorhersage der T3SS-Signalsequenz bisher nicht möglich ist.

Aufgrund zahlreicher Daten anderer Gram-negativer Bakterien weiß man, dass der nadelartige Gesamtaufbau aus zwei Ringkomplexen in der inneren und äußeren Membran gebildet wird, der mit einem hohlen Proteinkomplex verbunden ist (Abb. 1.8) (Radics et al. 2014).

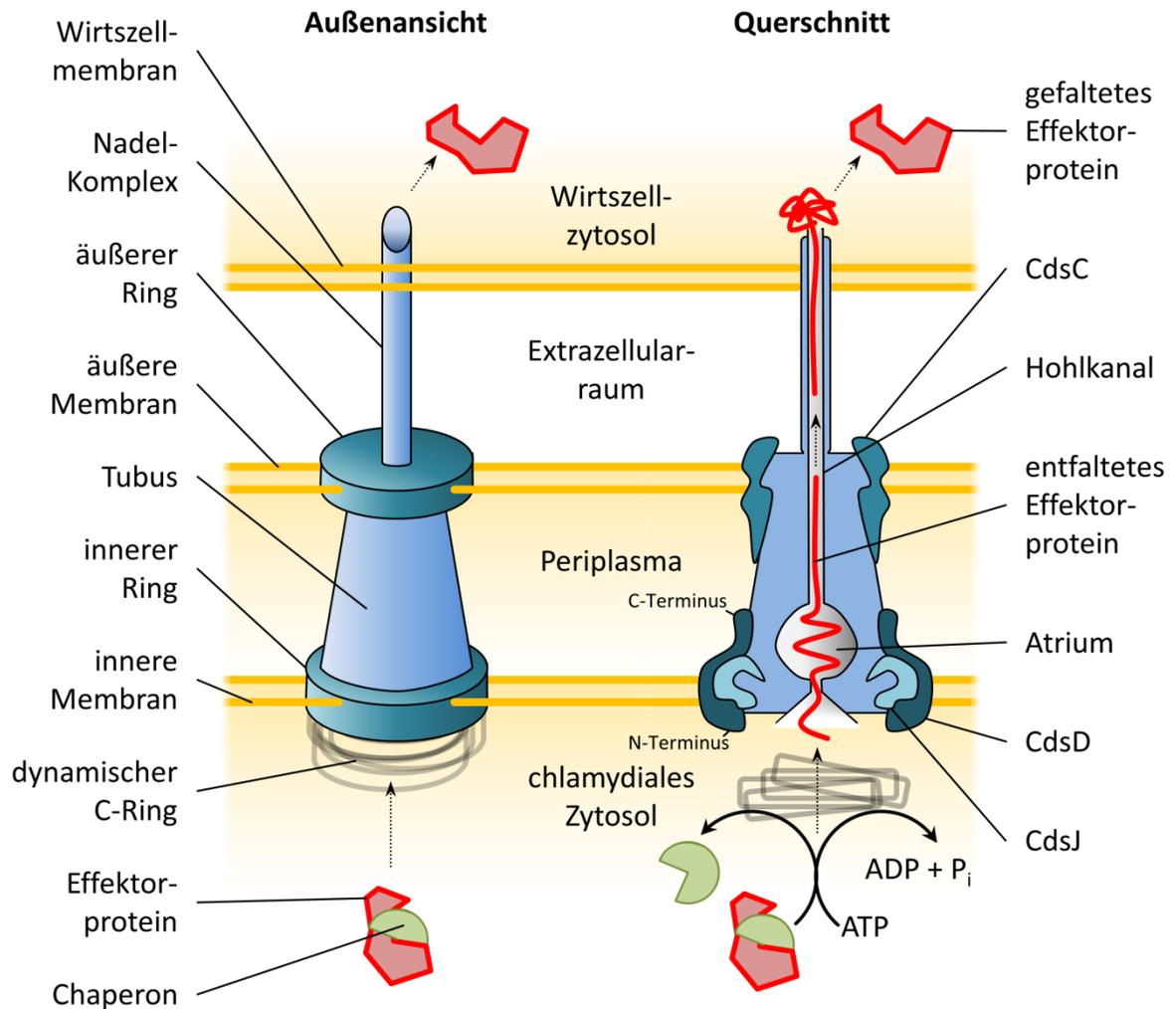


Abb. 1.8: Postulierter Aufbau und Funktionsweise des chlamydialen Typ-III Sekretionssystems

Dargestellt sind die Außenansicht und ein Querschnitt eines sekretierenden T3SS unter Berücksichtigung der Erkenntnisse aus verschiedenen Organismen. Die Lokalisation der Einzelkomponenten CdsC, CdsD und CdsJ wurde aufgrund der hohen Konservierung aus den funktionalen Strukturproteinklassen YscC, YscD und YscJ abgeleitet. Energieverbrauch ist als Hydrolyse von ATP zu ADP + P_i eingezeichnet. Aufbau des Hohlkanals und des Atriums wurden abgeleitet aus Radics, et al. 2014 und Kudryashev, et al. 2013. Alle weiteren Abkürzungen sind im Fließtext erklärt.

Nach außen hin wird das T3SS durch einen hohlen Nadelkomplex verlängert, dessen Ende durch Porenproteine verschlossen ist (Betts et al. 2008). Insgesamt besteht das chlamydiale T3SS etwa aus 15 unterschiedlichen Strukturproteinen (Peters et al. 2007). Der Substrat-Chaperon-Komplex wird durch Komponenten getrennt, die sich auf der zytoplasmatischen Seite des inneren statischen Membranringes des T3SS befinden (Abb. 1.8). Dieser sog. C-Ring kann aufgrund seiner hohen Dynamik eigentlich kaum als Struktur bezeichnet werden, wird aber vermutlich auch in Chlamydien von Proteinen homolog zu YscQ-, YscL- und YscN-Klassen (Ysc, *Yersinia* secretion component) gebildet (Kudryashev et al. 2013). Die statischen Membranringe werden dagegen aus Proteinen der YscC-Klasse (äußerer Ring) und der YscJ- und YscD-Klasse (innerer Ring) aufgebaut (Kudryashev et al. 2013). Dieser Ringkomplex

bildet mit jeweils 24 Untereinheiten die größte Struktur des gesamten T3SS. Proteine der YscD-Klasse interagieren dabei vermutlich im Ring mit sich selbst und über ihren C-Terminus mit den YscC-Proteinen des äußeren Ringes (Abb. 1.8) (McDowell et al. 2011, Ross & Plano 2011). Die essentielle Rolle dieser Proteinklasse wird dadurch belegt, dass mutierte Varianten dieses Proteins den vollständigen Zusammenbruch der Sekretionsaktivität in einer dominant-negativen Weise nach sich ziehen (Ross & Plano 2011). Das Homolog in *Chlamydiae* - CdsD (**C**ontact **d**eependent **s**ecretion protein **D**) - ist allerdings beachtenswert und nimmt aufgrund seiner Unterschiede zu Homologen anderer Bakterien im Gesamtgefüge dieses konservierten Proteinkomplexes eine außergewöhnliche Rolle ein.

1.3.1 CdsD bzw. CPn0712

Das chlamydiale CdsD ist das korrespondierende Protein des YscD aus *Yersinia*. Während die anderen chlamydialen Cds-Proteine sehr hohe Homologien zu den entsprechenden Strukturkomponenten in anderen Bakterien und *Yersinia* besitzen, ist CdsD diesbezüglich uneinheitlich. Das Protein ist je nach chlamydialer Spezies 809 bis 845 AS lang, was etwa der doppelten Länge des homologen YscD (413 AS) entspricht. Dabei weist nur die C-terminale Hälfte von CdsD Homologie zu YscD auf (z.B. *C. pneumoniae* CdsD: AS 395 – 845, Identität 23 %, Homologie 41 %, CDD E-Wert = $3.61 \cdot e^{-39}$). Chlamydien im Allgemeinen besitzen ein überaus reduziertes Genom, weshalb eine Erweiterung von CPn0712 um fast das Doppelte auffällig ist (Sakharkar et al. 2004). Die N-terminalen 450 Aminosäuren von CdsD besitzen keinerlei eindeutige Homologien zu anderen Proteinen. Die Nomenklatur „CdsD“ ist für die entsprechenden Proteine der einzelnen *Chlamydiae* Spezies unglücklich gewählt. Die CdsD Homologe aller *Chlamydiae* weisen die Verlängerung des Proteins im N-Terminus auf, dennoch sind nicht alle Proteine absolut gleich. Deshalb wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit auf die Terminologie „CdsD“ verzichtet und die einzelnen Proteine mit den speziesspezifischen Namen betitelt.

CPn0712 (**C**hlamydia **p**neumoniae protein **0712**) ist das entsprechende Protein aus *C. pneumoniae* und CT664 (**C**hlamydia **t**rachomatis protein **664**) aus *C. trachomatis*. CPn0712 und CT664 haben eine Sequenzidentität von über 50 % zueinander, was vermuten lässt, dass beide Proteine ähnliche Funktionen erfüllen. Innerhalb des YscD-homologen Bereiches befinden sich neben einer **T**rans**m**embran**d**omäne (TMD), eine sog. FHA- (**f**ork**h**ead **a**ssociated domain) und eine BON-Domäne (**b**acterial **O**smY and **n**odulation domain) (Abb. 1.9). FHA-Domänen sind dafür bekannt, Bindung zu phosphorylierten Proteinen zu vermitteln (Durocher & Jackson 2002). Unter eukaryotischen Proteinen sind diese Domänen sehr weit verbreitet, während sie bei Bakterien seltener vorkommen (Pallen et al. 2002). Zusätzlich kann

im Chlamydien-spezifischen N-terminalen Bereich eine weitere FHA-Domäne identifiziert werden, die die einzige identifizierte Homologie zu anderen Proteinen im N-terminalen Bereich darstellt (Abb. 1.9). BON-Domänen sind häufig in osmoregulatorischen Proteinen zu finden und dienen vermutlich zur Membranbindung (Yeats & Bateman 2003). Weiterhin werden von der Datenbank „Pfam“ Ähnlichkeiten beider FHA-Domänen zum zytoplasmatischen Bereich von YscD vorhergesagt, während die BON-Domäne Ähnlichkeit zur periplasmatischen Region von YscD aufweist. Eine Ähnlichkeit der letzten 40 AS zu Bestandteilen des Typ-II-Sekretionssystems wurde ebenfalls identifiziert, dessen Bedeutung allerdings fragwürdig erscheint (Abb. 1.9).

CT664 wird als Teil eines Operons von CT663 bis CT672 exprimiert (Hefty & Stephens 2007). Dieses und fünf weitere Operons umfassen Bestandteile des T3SS und bilden den funktionalen Sekretionsapparat. Für CPn0712 wurde eine Transkription ab 8 hpi und erstmalige Detektion des Proteins ab spätestens 24 hpi festgestellt (Hänsch 2011, Herrmann et al. 2006, Muller et al. 2008). Die Phosphorylierung von CPn0712 über die chlamydiale Kinase PknD konnte *in vitro* an beiden FHA-Domänen nachgewiesen werden (Abb. 1.9) (Johnson & Mahony 2007). Die exakte Bedeutung dieser Phosphorylierungen verbleibt allerdings unklar. Lediglich ein unbestimmter negativer Effekt auf die Entwicklung von *C. pneumoniae* konnte bei Inhibierung von PknD beobachtet werden (Johnson et al. 2009). Der Phosphorylierungsstatus von CPn0712 *in vivo* bleibt unbekannt. Die Kristallstruktur der FHA-Domäne aus CT664 konnte vor einiger Zeit aufgeklärt werden, ergab aber keine grundlegend neuen Erkenntnisse außer einer hohen strukturellen Ähnlichkeit zur entsprechenden Domäne von YscD (Gamez et al. 2012, Majorek 2009). Ebenso konnte erst kürzlich die Kristallstruktur des periplasmatischen C-terminus von CT664 bestimmt werden. Die Struktur unterstützt die Bildung eines Ringkomplexes aus 24 Untereinheiten und zeigt die Elastizität des periplasmatischen Bereichs von CT664, lässt aber keine Aussagen über den Chlamydien-spezifischen N-Terminus zu (Merilainen et al. 2016).

Darüber hinaus konnte die *in vitro* Interaktion von CPn0712 mit CdsQ gezeigt werden, die analog in Yersinien beobachtet wurde, aber auch mit CdsN und CdsL, welche bisher auch bei Yersinien unbekannt waren (Johnson et al. 2008, Stone et al. 2008). Interessanterweise gingen die Interaktionen mit CdsQ und CdsN nur vom C-terminalen YscD-homologen Bereich aus (Abb. 1.9). Als weiterer Interaktionspartner konnte für CT664 das T3SS-Chaperon Slc1 (**S**ycE-**l**ike **c**haperone **1**) identifiziert werden, was die funktionale Rolle des Proteins im T3SS unterstreicht (Chen et al. 2014). Die verantwortliche Domäne konnte hier allerdings nicht bestimmt werden (Abb. 1.9). Zuletzt konnte für CT664 eine cysteinabhängige Änderung der Oligomerisierungszustände im Verlauf des Infektionszyklus gezeigt werden (Betts-Hampikian

& Fields 2011). Diese Ergebnisse spiegeln den über Disulfidbrücken generell stark vernetzten Zustand chlamydialer Proteine in der EB-Form wider.

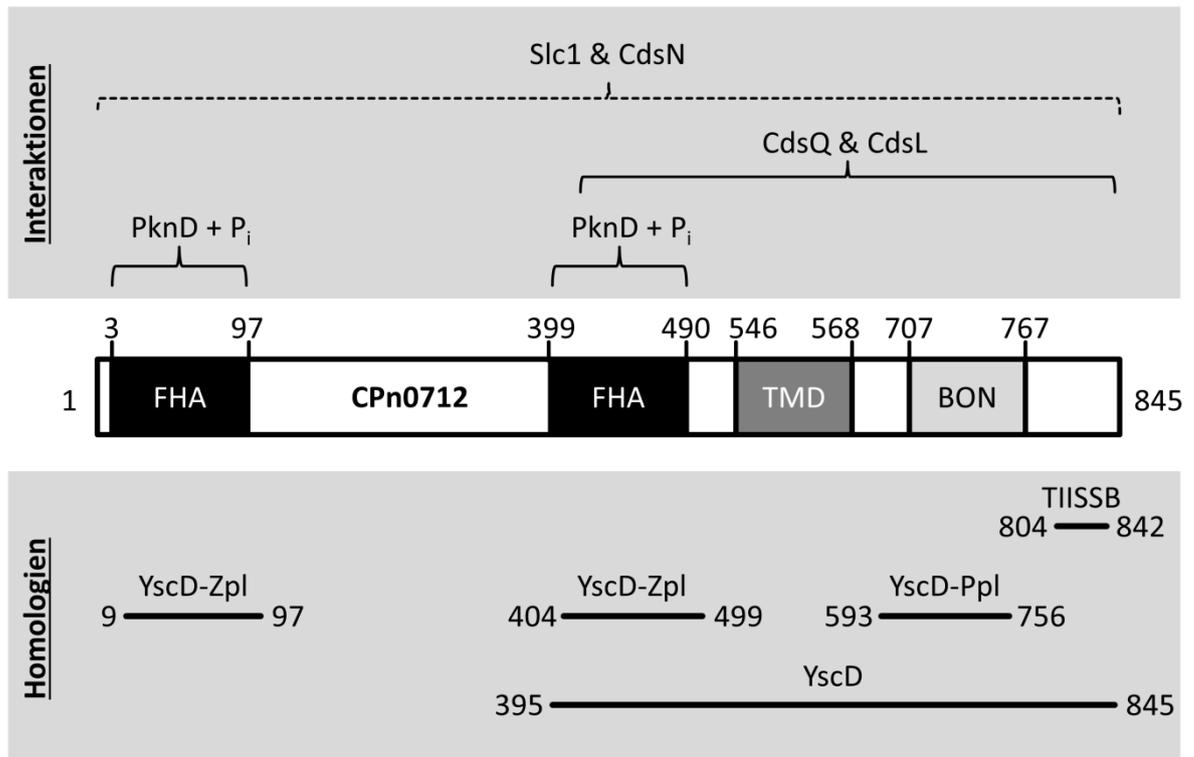


Abb. 1.9: Domänen von CPn0712 mit Interaktions- und Homologie-Übersicht

Schematische Darstellung der Domänen von CPn0712. Aminosäurepositionen sind mit Nummern bezeichnet. Das Schema ist nur bedingt maßstabsgetreu. Oberhalb sind Regionen mit belegter Interaktion zu betitelten Proteinen eingezeichnet. Interaktionen, deren dafür notwendige essentielle Region nicht näher bestimmt wurde, sind mit gestrichelter Klammer versehen. Unterhalb von CPn0712 sind Homologe Bereiche zu bekannten Proteindomänen eingezeichnet. Homologie zu YscD wurde über „NCBI-CDD“ bestimmt, alle anderen über „Pfam“-Datenbank. E-Werte: YscD-Zpl (AS 9-97) $6,5 \cdot 10^{-4}$; YscD-Zpl (AS 404-499) $4,6 \cdot 10^{-11}$; YscD-Ppl 0,017; TISSB $6,9 \cdot 10^{-5}$; YscD $4,7 \cdot 10^{-17}$. TISSB, Type-II secretion system protein B; Zpl, zytoplasmatische Domäne; Ppl, periplasmatische Domäne. Alle weiteren Abkürzungen sind im Fließtext erklärt. (Angefertigt nach Johnson & Mahony 2007, Johnson et al. 2008, Stone et al. 2008 und Chen et al. 2014)

Die subzelluläre Lokalisation der Proteine CT664 und CPn0712 ist bis heute umstritten. Initial wurde CT664 über Massenspektrometrie als 120 kDa-Protein detektiert und in Solubilisierungsstudien als extrachlamydial an der Bakterienoberfläche postuliert (Tanzer & Hatch 2001). Zwei weitere Studien unterstützen diese extrachlamydiale Lokalisation, indem CPn0712 als in die Inklusionsmembran sekretiert oder gänzlich im Wirtszellzytosol lokalisiert beschreiben wurde (Herrmann et al. 2006, Muller et al. 2008). Einige Zeit später wurden diese Daten deutlich kritisiert und CPn0712 durch erneute Solubilisierungsstudien und Mikroskopiedaten als intrachlamydial beschrieben (Johnson et al. 2008). Allerdings beziehen sich diese Daten stets nur auf Bereiche des C-terminalen Teils, während der N-terminale Teil in diesen Studien unbeachtet bleibt. Bei Verwendung von Antikörpern gegen den N-terminalen Teil von CPn0712 wurde dann ein Großteil des Proteins mit Bakterien assoziiert

beschrieben, während einige wenige Signale eine extrachlamydiale Lokalisation in der Inklusionsmembran andeuteten (Hänsch 2011). Darüber hinaus konnte in Zellfraktionierungsexperimenten infizierter Zellen ein lösliches Fragment von CPn0712 detektiert werden (Hänsch 2011). Eine mögliche Funktion als Effektorprotein wurde deshalb vermutet, da auch bei ektopischer Expression in *Saccharomyces cerevisiae* ein wachstumsdefekter Phänotyp identifiziert wurde (Hänsch 2011). Ein solcher Phänotyp spricht aufgrund der Konservierung eukaryotischer Prozesse üblicherweise für eine mögliche Effektorfunktion (Salomon & Sessa 2010, Sisko et al. 2006).

Zusammen genommen verbleibt die Funktion und Lokalisation von CPn0712 und vor allem des einzigartigen N-terminalen Teiles weitestgehend ungeklärt. Zwar deuten Studien stark auf eine Funktion als T3SS-Strukturprotein hin, dennoch zeigen andere Daten diesbezüglich untypische Ergebnisse. Kontroverse Ansichten über grundlegende Fragestellungen wie die Lokalisation von CPn0712 erschweren die Aufklärung möglicher weiterer Funktionen zusätzlich. Weitere Analysen an diesem Protein mit Fokus auf den N-terminalen Bereich sind daher nötig.

1.4 Identifikation neuartiger chlamydialer Effektorproteine

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben benötigen Chlamydien für eine erfolgreiche Manipulation der Wirtszelle neben einer Sekretionsmaschinerie auch entsprechende Effektorproteine. Bislang sind nur wenige dieser chlamydialen Effektorproteine in den einzelnen Entwicklungsstadien identifiziert worden. Ein Verständnis dieser Proteinklasse ist dennoch unerlässlich, um die Interaktion von Chlamydien mit der Wirtszelle im Detail verstehen zu können. Die Suche nach potentiellen neuen Effektorproteinen gestaltet sich aber als schwierig, da Chlamydien bis jetzt als nicht genetisch manipulierbar galten (Hooppaw & Fisher 2015). Zwar sind in den letzten Jahren Techniken zur genetischen Manipulation von Chlamydien entwickelt worden, aber diese beschränken sich auf *C. trachomatis* und *C. muridarum* (Hooppaw & Fisher 2015). Für *C. pneumoniae* wurde ein Transformationsprotokoll beschrieben, dass auf sog. Dendrimeren oder Vektoren basiert, die aus dem kryptischen Plasmid von *C. trachomatis* hergestellt wurden (Gerard et al. 2013). Diese Techniken sind allerdings nicht routinemäßig einsetzbar. Bis heute wird versucht, entweder über Hochdurchsatz-Analysen neue Effektorproteine zu identifizieren oder vorhergesagte putative Effektorproteine in neuerlichen und detaillierten Analysen zu charakterisieren. So brachten beispielsweise Interaktomanalysen mit *C. trachomatis* T3SS-Chaperonen neuartige Effektor-Kandidaten hervor. Darunter wurde für *C. trachomatis* TepP als früher Effektor identifiziert (Chen et al. 2014). Nahezu zeitgleich wurden kürzlich für *C. trachomatis* Ergebnisse

veröffentlicht, bei denen zahlreiche Inklusions-assoziierte humane Proteine über Hochdurchsatz-Massenspektrometrie identifiziert wurden (Aeberhard et al. 2015, Mirrashidi et al. 2015). Unter anderem wurden in beiden Studien Proteine der SNX-Klasse beschrieben, wobei das Inklusionsmembranprotein IncE vermutlich diese Interaktion vermittelt (Mirrashidi et al. 2015). Diese Daten weisen auf das Potential von Chlamydien hin, SNX-Proteine als Ziel von Effektorproteinen anzusteuern.

Besonders wichtige Zeitpunkte wie die Frühphasen der Infektion und ihre entsprechenden Effektorproteine sind in der chlamydialen Infektion bisher weitestgehend unerforscht. CPn0712 repräsentiert möglicherweise eines der Proteine, denen eine weitere Funktion als Effektorprotein zugeschrieben werden könnte. Darüber hinaus gibt es zusätzliche Proteine, die Effektorcharakteristika aufweisen und daher näher charakterisiert werden sollten. Die Proteine CPn0677 und CPn0678 stellen zwei dieser Proteine dar.

1.5 CPn0677 und CPn0678

Erstmalig fielen die Gene *cpn0677* und *cpn0678* im Zuge von Microarray-Analysen auf, bei denen die Expressionsänderungen chlamydialer Gene im Infektionsverlauf studiert wurden. Beide Gene konnten dabei als spät hochreguliert (> 48 hpi) identifiziert werden (Murra 2005). Der genomische Kontext dieser Gene und die Homologie der daraus resultierenden Proteine zu Proteinen anderer Spezies stellen sich als besonders interessant dar. In näher verwandten (*C. psittaci*) und weniger nahe verwandten Spezies (*C. trachomatis*) findet sich eine ähnliche genomische Organisation der flankierenden Gene, welche eine hohe Homologie aufweisen (Abb. 1.10). An der exakten genomischen Position von *cpn0677* und *cpn0678* befinden sich in anderen Spezies allerdings nur einzelne Gene bzw. resultierende Proteine (CT694 & Cpsi0741; **Chlamydia psittaci** protein **0741**), welche keine oder geringe Homologie aufweisen (Hower et al. 2009, Mojica et al. 2015, Murra 2009).

Cpsi0741 wurde kürzlich als spät sekretiertes Effektorprotein in der *C. psittaci*-Infektion identifiziert (Mojica et al. 2015). Nach der Sekretion lokalisiert dieses Protein an der Innenseite der Kernmembran infizierter Zellen und wird deshalb SINC genannt (**s**ecreted **i**nner **n**uclear membrane-associated *Chlamydia* protein). Einzigartigerweise ist SINC nach der Sekretion ebenfalls in uninfizierten benachbarten Humanzellen detektierbar, wobei der genaue Transportmechanismus unbekannt bleibt.

Im Gegensatz dazu ist CT694 ein früh im Infektionszyklus sekretiertes Effektorprotein, welches in heterologen Sekretionssystemen in *Yersinia* über das T3SS sekretiert werden kann (Hower et al. 2009). Nach der chlamydialen Sekretion erfolgt eine Interaktion von CT694 mit dem humanen Aktin-modulierenden Protein AHNAK (Hower et al. 2009). Bei ektopischer

Expression von CT694 in Humanzellen lokalisiert dieses unabhängig von der AHNAK-Bindung an der humanen PM. Bei Deletion von N-terminalen 40 Aminosäuren (AS 40 – 80) geht die Membranbindung verloren (Bullock et al. 2012). Bei Effektorproteinen anderer Gram-negativer Bakterien, wie ExoS (**Exo**enzyme **S**) aus *Pseudomonas aeruginosa* und YopE (**Yersinia** **o**uter membrane virulence **p**rotein **E**) aus *Yersinia pseudotuberculosis* sind ebenfalls N-terminale Regionen bekannt, die Membranassoziation vermitteln (Krall et al. 2004). CT694 weist in dieser Region helikalen Charakter auf, wie auch ExoS und YopE. Aber aufgrund fehlender Übereinstimmungen bei konservierten Leucin-Aminosäuren wurde diese Helix nicht weiter verfolgt (Bullock et al. 2012).

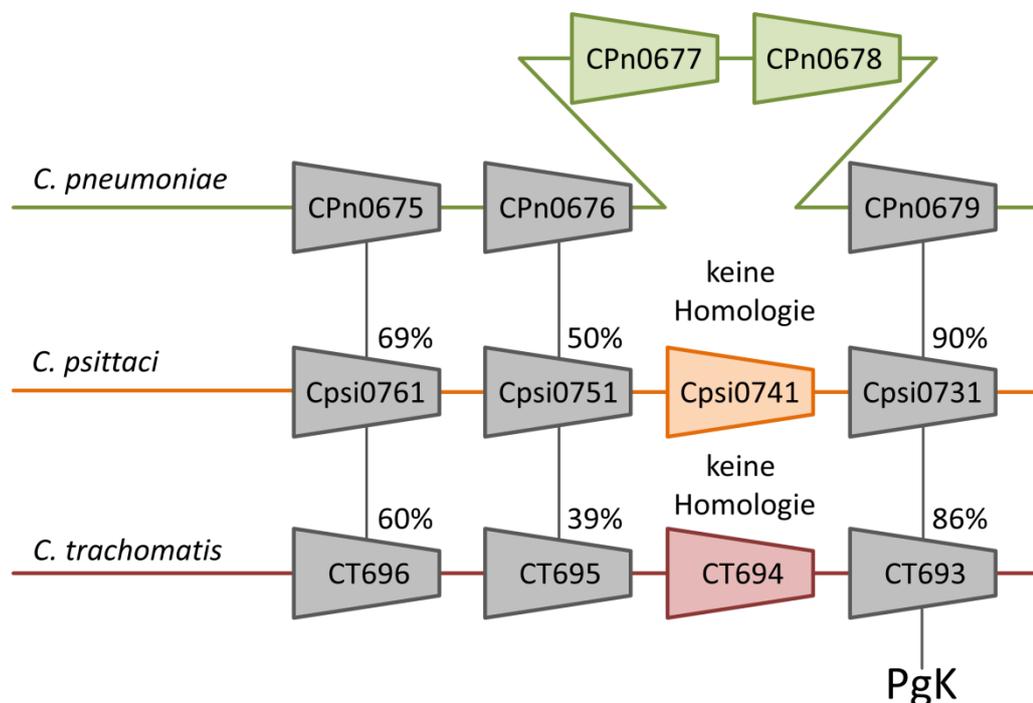


Abb. 1.10: Genetischer Kontext von *cpn0677* und *cpn0678* in chlamydialen Spezies

Dargestellt ist die bisher bekannte genomische Organisation der Gene *cpn0677* und *cpn0678* mit flankierenden Genen. Angegeben sind die dadurch kodierten Proteine. Homologien sind in Prozent an den einzelnen Proteinen dargestellt. Diese Werte beziehen sich immer auf das entsprechende Protein aus *C. pneumoniae* und repräsentieren Werte über die gesamte Länge des Proteins. Proteine mit höherer Homologie sind in grau dargestellt und durch Linien verbunden. PgK bezeichnet Gene, dessen kodierte Proteine mit höchstwahrscheinlicher Phosphoglycerat-Kinase-Funktion. Proteine ohne Homologie unterscheiden sich in der Farbe. Zugehörigkeit der einzelnen Gene und ihrer Homologe der Spezies untereinander wurden über die Datenbanken „NCBI“ und „KEGG“ ermittelt, Homologiewerte über „BLAST“. NCBI-GIs sind im elektronischen Anhang hinterlegt.

Auch für CT695 aus *C. trachomatis* (dem CPn0676 Homolog) wurde eine T3SS-Signalsequenz identifiziert, aufgrund dessen die Sekretion dieses Proteins lange Zeit postuliert wurde (Hower et al. 2009). Tatsächlich konnte dann die Sekretion mikroskopisch während der späten Phasen der Infektion, aber auch in Frühphasen der Folgeinfektion, belegt werden (Mueller & Fields 2015). CT695 lokalisiert dabei spät in der Infektion in der Inklusionsmembran und früh in der

Infektion in direkter Assoziation zu chlamydialen Partikeln. Die Funktion dieses Proteins zu beiden Zeitpunkten der *C. trachomatis*-Infektion verbleibt vollständig unklar. Es wird für dieses Protein aber eine N-terminale Membranlokalisationsdomäne vermutet, welche die beobachtete Inklusionsmembranbindung vermitteln könnte (Mueller & Fields 2015).

In *C. pneumoniae* wurden mittels Transkriptionsanalysen die Gene *cpn0677* und *cpn0678* erstmals als Teile eines Operons identifiziert, die gemeinsam spät im Entwicklungszyklus exprimiert werden (Murra 2009). In Adhäsionsassays zeigten beide adhäsive Eigenschaften für Humanzellen. In Deletionsanalysen wurde bei CPn0678 eine kleine N-terminale Region von etwa 20 AS als essentiell für die Adhäsion identifiziert (Abb. 1.11) (Stallmann 2010). Die Adhäsionsdomäne von CPn0677 konnte auf die ersten 140 AS eingeschränkt werden (Stallmann 2010).

Es wurde vermutet, dass beide Proteine auf der Oberfläche von Chlamydien lokalisiert sind, da eine Vorbehandlung von *C. pneumoniae* EBs mit Antikörpern gegen CPn0677 und CPn0678 in einer Reduktion der Infektion von 70 – 80 % resultierten. Antikörper gegen das im selben Operon exprimierte CPn0676 zeigten dagegen keine Reduktion und damit vermutlich auch keine Oberflächenlokalisierung (Murra 2009).

Weiterhin konnten für CPn0677 und CPn0678 in heterologen Sekretionsassays mit *Shigella flexneri* funktionale T3SS-Signalsequenzen identifiziert werden (Abb. 1.11) (Murra 2009, Subtil et al. 2001). Infektionsstudien von *C. pneumoniae* in Anwesenheit von rekombinantem CPn0677 oder CPn0678 stellten sich als uneindeutig dar. Tendenziell verstärkte die Zugabe von rekombinantem CPn0677 und CPn0678 die Infektion (Murra 2009). Allerdings zeigten sich auch Effekte bei Vorbehandlung mit dem vermutlich intrachlamydialen CPn0676, weswegen diese Ergebnisse kritisch betrachtet werden müssen.

Mikroskopisch wurden die Proteine CPn0677 und CPn0678 zu späten Phasen des Infektionszyklus bakterienassoziiert, innerhalb der Inklusion detektiert (> 48 hpi), was mit den frühen Transkriptionsdaten übereinstimmt (Murra 2005, Murra 2009). Interessanterweise zeigten CPn0677 und CPn0678 bei ektopischer Expression in Humanzellen eine Lokalisation zur Innenseite der humanen PM (Abb. 1.11) (Murra 2009). Rekombinantes CPn0678 zeigte darüber hinaus in Experimenten mit reversiblen Crosslink-Chemikalien Tendenzen zur Selbstinteraktion, wodurch die Bildung von Dimeren postuliert wurde (Murra 2009).

Außerdem konnte eine Interaktion von CPn0677 und CPn0678 mit dem zuvor beschriebenen humanen Protein SNX9 identifiziert werden (vgl. Kap. 1.2.3). Ausschlaggebender Hinweis auf eine solche Interaktion war die Identifikation von PRR, die in ihrer Anordnung den Motiven im Protein EspF des von *EPEC* ähneln (Abb. 1.11) (Murra 2009).

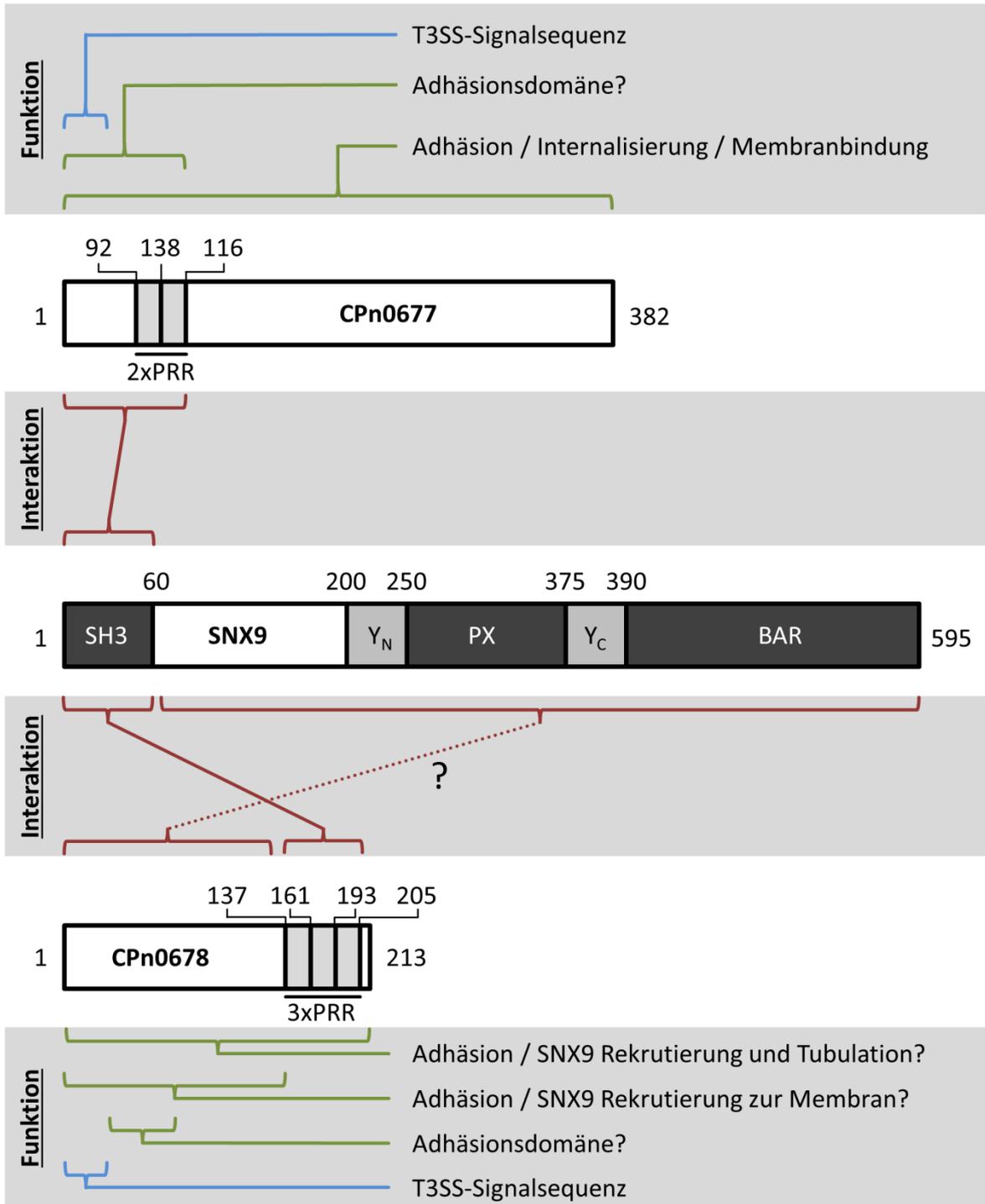


Abb. 1.11: Übersicht über Domänen, Funktionen und Interaktionen von CPn0677 und CPn0678

Schematische Darstellung der Proteine CPn0677 und CPn0678 und ihrer Teilbereiche mit jeweilig möglichen Funktionen. Außerdem wurden Interaktionen mit Abschnitten des in der Mitte dargestellten SNX9 eingezeichnet. Interaktionen aus Pulldown- und Farwestern-Analysen sind in grün, Ergebnisse aus Adhäsions- und Transfektions-Experimenten in rot und Daten aus heterologen Sekretionsassays in blau eingefärbt. Aminosäurepositionen sind mit Nummern gekennzeichnet. Darstellung bedingt maßstabsgetreu. Domänenbeschriftung von SNX9 wie in Abb. 1.5. Die prolinreichen Regionen (PRR) sind in hell-grau dargestellt. (Zusammengefasst aus Murra 2009 & Stallmann 2010).

Interessanterweise sind die PRR für CPn0678 C-terminal und für CPn0677 N-terminal lokalisiert. Die Motive ähneln sich untereinander teilweise, weisen aber keine Ähnlichkeiten zu den in EspF enthaltenen N-WASP- und Aktin-Bindedomänen auf (Alto et al. 2007, Murra 2009). Bei bioinformatischer Betrachtung der PRR wurde offensichtlich, dass nur die erste PRR von CPn0677 und CPn0678 die Aminosäure-Abfolge RxxPxxP aufweist (Murra 2009). Die zweiten und dritten PRR sind im Motiv Homolog, weisen aber kein Arginin an vorderer Position auf.

Die postulierte Interaktion von CPn0677 und CPn0678 mit SNX9 wurde in Pulldown- und Farwestern-Experimenten mit rekombinanten Proteinvarianten experimentell bestätigt, wobei die Bindung hauptsächlich auf die SH3-Domäne von SNX9 zurückzuführen ist (Murra 2009). In Transfektions-Experimenten wird für CPn0678 eine Kolokalisation mit SNX9 an Expressions-induzierten Filamenten in Humanzellen beobachtet (Abb. 1.11) (Murra 2009). Der N-terminale Teil von CPn0678 ohne PRR scheint dagegen überraschenderweise eine Rekrutierung von SNX9 zur humanen PM ohne Tubulation zu erzeugen. Letztendlich konnte SNX9 als wichtiger Faktor in der chlamydialen Infektion bestimmt werden, da die Infektionsrate von *C. pneumoniae* in SNX9-defizienten Zelllinien stark reduziert war (Murra 2009). In einem hypothetischen Modell wurde postuliert, dass CPn0677 und CPn0678 auf der Oberfläche von *C. pneumoniae* EBs präsentiert werden und bei Humanzellkontakt mit oberflächlich zugänglichem SNX9 interagieren.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass die Domänenorganisation und die möglichen Funktionen von CPn0677 und CPn0678 überaus komplex sind und weiterer Analysen bedürfen. So ist die Funktion der Adhäsion und SNX9-Interaktion nicht eindeutig Bereichen der chlamydialen Proteine zuzuordnen und Überschneidungen, aber auch regionsspezifische Unstimmigkeiten bestehen. Bekannte Daten zu EspF als *EPEC*-Effektorprotein, welches die Funktionshinweise für CPn0677 und CPn0678 gab, werden im Folgenden dargestellt.

1.5.1 EspF und EspF_U als wichtige Modulatoren einer bakteriellen Infektion

EspF stellt ein sekretiertes Effektorprotein aus *EPEC* dar, welches bei Zell-Zell Kontakt über das T3SS in die humane Wirtszelle sekretiert wird und dort eine Vielzahl von Aufgaben übernimmt. Bisher sind 16 unterschiedliche Wirtszellprozesse oder Strukturen bekannt, in die EspF aktiv eingreift und diese verändert (Holmes et al. 2010). Beispielsweise umfassen diese Veränderung Microvili, Intermediärfilamente, sog. tight junctions, Mitochondrien oder Nucleoli. EspF weist dabei mehrere PRR auf, die nachweislich über RxxPxxP-Motive mit der

SH3-Domäne von SNX9 interagieren (Alto et al. 2007) (vgl. Kap. 1.2.3). Diese Interaktion löst Membran- und Aktinremodulation aus. Die Aktinremodulation wird stark durch eine zusätzliche N-WASP-Bindedomäne in jeder PRR unterstützt (Alto et al. 2007).

Wird EspF in Kotransfektions-Experimenten mit SNX9 in Humanzellen exprimiert, so ist die Bildung von Membrantubuli und eine Aktivierung von N-WASP zu beobachten (Alto et al. 2007). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass alle PRR von EspF in der Lage sind, SNX9 zu binden und so eine Oligomerisierung von SNX9 und damit auch seine Aktivierung zu begünstigen. Jedoch sind mindestens zwei funktionale SNX9-bindende Motive nötig, um Membranremodulation zu verursachen, was das Vorhandensein mehrerer PRR plausibel macht (Weflen et al. 2010). Durch die Bindung von mindestens drei SNX9-Proteinen pro EspF erfolgt wahrscheinlich eine Verdrängung anderer Proteine, wie Dynamin 1/2 und N-WASP, aus der Bindung mit der SH3-Domäne. Dies könnte das Auftreten einer zusätzlichen Bindestelle für N-WASP im EspF-Protein erklären (Weflen et al. 2010). Obwohl *EPEC* als nicht invasives Bakterium gilt, kann eine Internalisierung dieses Erregers *in vitro* und *in vivo* beobachtet werden. Die erfolgreiche Internalisierung ist abhängig von der aktivierenden Bindung von SNX9 durch EspF, denn die EspF-unabhängige Rekrutierung durch *EPEC* zur Adhäsionsstelle war nicht ausreichend für die effiziente Internalisierung des Bakteriums (Weflen et al. 2010). Der genaue Mechanismus durch den die EspF-SNX9 Interaktion die Internalisierung von *EPEC* begünstigt ist unbekannt. Vermutet wird, dass allein die aktivierende Bindung multipler SNX9-Proteine ausreicht, um die Invasion einzuleiten (Weflen et al. 2010). Die Relevanz dieser Beobachtung für den Krankheitsverlauf ist allerdings unklar.

Zuletzt soll EspF_U (**E**sp**F**-like protein encoded on prophage **U**) erwähnt werden, welches eine Sonderrolle im Proteom des enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (*EHEC*) einnimmt und im kryptischen Prophagen U kodiert ist. Die PRR von EspF_U gleichen denen von EspF, das RxxPxxP-Motiv ist allerdings modifiziert, indem das vordere Arginin (R) substituiert wurde (Morita-Ishihara et al. 2009). Für EspF_U konnte unter anderem gezeigt werden, dass es interessanterweise nicht mehr in der Lage mit SNX9 zu interagieren, wohl aber mit den SH3-Domänen der Proteine IRSp53 und Cortactin (Cantarelli et al. 2007, Morita-Ishihara et al. 2009, Weiss et al. 2009). IRSp53 ist ein Adapterprotein für viele Prozesse, bei denen negative Membrankrümmung, Aktin-Remodulation und Interaktion mit Cdc42 zentrale Rollen einnehmen (Lim et al. 2008, Scita et al. 2008). Cortactin reguliert entscheidende Prozesse der Aktin-Dynamik und wird häufig mit humaner Endozytose in Verbindung gebracht. Außerdem ist seine Beteiligung bereits in vielen Prozessen humanpathogener Manipulation über Effektorproteine bekannt (Selbach & Backert 2005). Es besitzt mehrere F-Aktin-Bindestellen und zeigt ARP2/3 und N-WASP Bindung und Aktivierung (Selbach & Backert 2005).

Abhängig von Phosphorylierungen des Cortactin über Rezeptoren oder Src-Kinasen konnte gezeigt werden, dass ein Bindungswechsel von N-WASP zu EspF_U stattfindet (Cantarelli et al. 2007). Die Bindung von EspF_U an Cortactin ist dennoch umstritten, wobei der hochdynamische Phosphorylierungszustand von Cortactin im Verdacht steht, unterschiedliche Daten hervorzurufen (Cantarelli et al. 2007, Morita-Ishihara et al. 2009, Weiss et al. 2009). Übertragen auf CPn0677 und CPn0678 zeigt EspF interessante Anhaltspunkte potentieller Funktionen über die markanten PRR auf.

1.5.2 CPn0677 & CPn0678 Adhäsine oder Effektorproteine?

CPn0677 und CPn0678 werden nach aktueller Theorie als Adhäsionsproteine betrachtet, die im Extrazellulärraum mit SNX9 interagieren. Nach aktuellem Stand ist ein einzelnes Experiment bekannt, welches den extrazellulären Charakter von SNX9 darstellt (Murra 2009). Die übrige Literatur geht ausschließlich von intrazellulär lokalisierten SNX-Proteinen aus. Extrazellulär präsentiertes SNX9 würde somit eine absolute Neuheit darstellen und bedarf deswegen weiterer Charakterisierung. Weiterhin erscheint der Zusammenhang der Adhäsionsfunktion von CPn0677 und CPn0678 mit der Bindung von SNX9 unklar. So scheint beispielsweise die N-terminale Region von CPn0678 hauptsächlich die Adhäsion zu hervorzurufen, wohingegen die prolinreichen Regionen im C-terminalen Teil Bindung zu SNX9 vermitteln. Die Abhängigkeit der Adhäsion von der postulierten SNX9-Interaktion im Interzellularraum ist deshalb unklar. Darüber hinaus agiert EspF als sekretiertes Effektorprotein und interagiert mit SNX9 intrazellulär. Interessanterweise wird das Operon um CPn0677 und CPn0678 in anderen chlamydialen Spezies mit sekretierten Effektorproteinen in Verbindung gebracht (CT694 & CT695 und SINC). Dies kann, muss aber aufgrund der fehlenden Homologie kein notwendiges Kriterium einer Effektorfunktion der exprimierten Proteine CPn0677 und CPn0678 sein. Zusätzlich unterstützen die funktionalen T3SS-Signalsequenzen eine T3SS-Sekretion von CPn0677 und CPn0678, die eher Effektoren als Adhäsinen zugeschrieben werden. Zwar existieren Beispiele von T3SS-sekretierten Adhäsinen wie das Yersinien-Protein YopE, dieses agiert allerdings ebenfalls hauptartig als sekretiertes Effektorprotein im Zytosol der Wirtszelle (Krall et al. 2004). Die Proteine dieses Operons nehmen aufgrund ihrer heterologen Sequenz eine außergewöhnliche Rolle in den einzelnen chlamydialen Spezies ein. Eine Effektorfunktion der Proteine CPn0677 und CPn0678 erscheint aufgrund der früheren Daten und der Parallelen zu Effektorproteinen anderer Pathogene durchaus möglich. Weiteres Verständnis in diesem Bereich ist daher dringend notwendig, um die Pathogenität der *Chlamydiae* weiter aufzuklären.

Zielsetzung

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die detaillierte Betrachtung zuvor identifizierter chlamydialer Proteine (CPn0712, CPn0677 und CPn0678) unter dem Aspekt einer potentiellen Effektorprotein-Funktion.

Allen Effektorproteinen grundlegend gemein ist dabei die Sekretion zu einem oder mehreren Zeitpunkten der Infektion. Deshalb sollten zuerst die Expression und die subzelluläre Lokalisation der Proteine mit unterschiedlichen biochemischen und mikroskopischen Techniken eindeutig aufgeklärt werden. Dann sollten die Proteine eingehender auf innewohnende Eigenschaften und auf potentielle Zielstrukturen in der Wirtszelle untersucht werden. Dabei wurde die Technik der ektopischen Expression durch Transfektion in Humanzellen gewählt, da eine genetische Manipulation von *C. pneumoniae* zu diesem Zeitpunkt nicht etabliert war. Letztendlich sollte aufgrund der erhaltenen Daten aus den vorangegangenen Experimenten eine funktionale Zuordnung zu Prozessen in der Infektion erfolgen. Dafür sollten nach Möglichkeit quantifizierbare Techniken und Experimente verwendet werden, um eine zuverlässige Zuordnung zu ermöglichen.

Speziell für CPn0678 sollte darüber hinaus die Interaktion zu humanem SNX9 näher charakterisiert werden. Dabei sollte diese Interaktion bezüglich Spezifität, Zeitpunkt bzw. Lokalisation von SNX9 in der Infektion und der essentiell beteiligten Proteindomänen betrachtet werden.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollte somit eine weitere funktionelle Charakterisierung dieser potentiellen Effektorproteine erfolgen.

2 Material

2.1 Gebrauchsartikel

Tab. 2.1: Verwendete Gebrauchsartikel

Gebrauchsartikel	Hersteller
20 μ MACS™-Säulen	Miltenyi Biotec
0,45 μ m Filter mit Luer-Gewinde	Whatman
Corex-Röhrchen	Sartorius
Deckgläschen (#1 Ø 12 mm)	Thermo Fischer
Deckgläschen (#1,5 Hochpräzision, Ø 12 mm)	Roth
Dialyseschlauch (12-15 kDa; 3,5 kDa Ausschlussgröße)	Serva
Einwegspritze (5 ml, 10 ml, 50 ml) mit Luer-Gewinde	Omnifix
Elektroporations-Küvetten	Bio-Rad
Falcon (15 ml), steril	Sarstedt
Falcon (50 ml), steril	Sarstedt
Filterpapier für Westernblots	Whatman
Glaskolben (50 ml, 100 ml, 1000 ml)	Schott
Glasperlen (Ø ~0,5 mm)	Braun
Kryo-Röhrchen (1,8 ml)	Nunc
Küvetten	Sarstedt
Objektträger	Diagonal
PCR-Reaktionsgefäße	Bio-Rad
Petrischalen	Sarstedt
pH-Teststreifen	Machery-Nagel
Pipettenspitzen (10 μ l, 200 μ l, 1000 μ l)	Sarstedt
Polyethylen-Fritte	Thermo Fischer
Polystyren-Protein-Säulen	Thermo Fischer
PVDF-Membran für Westernblots (Immobilon-P)	Millipore
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf
Zellkulturflaschen (Polystyrol 25 cm ² /50 ml), steril	Nunc
Zellkulturflaschen (Polystyrol 80 cm ² /260 ml), steril	Nunc
Zellkulturplatte (24-Well)	Nunc
Zellkulturplatte (6-Well)	Nunc
Zellkulturplatte (96-Well)	Nunc
Zellschaber	Sarstedt
Zentrifugationsröhrchen (13 ml)	Sarstedt
Zentrifugationssäulen (Pierce spin columns)	Thermo Fischer

2.2 Geräte und Maschinen

Tab. 2.2: Verwendete Geräte und Maschinen

Gerät oder Maschine	Hersteller
BioPhotometer Plus	Eppendorf
C2 konfokales Laserscan Mikroskop	Nikon
Elektroporationssystem Gene Pulser	Bio-Rad
Feinwaage H110	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 50+	Zeiss
Geldokumentationssystem	Bio-Rad
Homogenisator precelly s24	bertin Technologies
Inkubator Multitron	Infors
Magnetrührer	IKA

Gerät oder Maschine	Hersteller
Mikrowelle	Bosch
Nano-Drop 2000C	Peqlab
Netzgerät EPS 301	GE Healthcare
PCR-Thermocycler C1000	Bio-Rad
PCR-Thermocycler PTC-200	MJ Research
pH-Meter WTW Series pH 720	inoLab
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Schüttler Unitron	Infors
SDS-Elektrophoreseapparat SE-260	Hofer
TCS SP8 STED 3X	Leica
Thermoblock	Labnet
Ultraschallstab Sonopuls HD2200	Bandelin
Ultraschallwasserbad RK102H	Bandelin
Ultrazentrifuge TL-100	Beckmann
UV-Licht-Tisch TFL 20M	Biometra
Vakuum-Konzentrator SC110	Savant
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage TE3102S	Sartorius
Wasserheizbad	Grant
Westernblotapparat (PierceG2 Fast Blotter)	Thermo Fischer
Zählkammer	Thoma
Zählkammer Thoma (Faktor 78.000)	Thoma
Zentrifuge Avanti J-25 (JLA10.500 r_{max} 166 mm, JA25-50 r_{max} 108 mm)	Beckmann Coulter
Zentrifuge Beckmann J2-21 (JA-20 r_{max} 108 mm)	Beckmann Coulter
Zentrifuge Megafuge 1.0R (#3360 r_{max} 87 mm)	Heraeus
Zentrifuge Biofuge Pico (#3324 r_{max} 85 mm)	Heraeus
Zentrifuge Biofuge Primo R (#7593 r_{max} 87 mm)	Heraeus
Zentrifuge Rotanta 460R (#4444, #4428 r_{max} 170mm)	Hettich

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 2.3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
μ MACS™ α -GFP microbeads	Miltenyi Biotec
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)	Sigma
Acrylamid (Rodiphorese 35)	Roth
Adenin	Roth
Agar	Difco/Gibco
Agarose	Biozym
Alanin	Merck
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck
Ammoniumsulfat	Roth
Amphotericin	life technologies
Ampicillin	Sigma
Arginin	Fluka
Asparagin	Merck
Asparaginsäure	Merck
Biofreeze	Biochrom
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva
Bradford-Reagenz	Bio-rad
Bromphenolblau	Fluka

Bezeichnung	Hersteller
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Grüssing
Casein Pepton	Difco
cOmplete Proteaseinhibitor	Roche
Coomassie Brilliant Blau G250 (CBB G250)	Serva
Cycloheximid	Sigma
Cystein	Merck
Cytochalsin D	Thermo Fischer
D(+)-Galaktose	Roth
D(+)-Glucose	Roth
D(+)-Raffinose	Sigma
Desoxynucleosid-5'-Triphosphate (dNTPs)	MBI Fermentas
Dimethylformamid (DMF)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ PO ₄)	Fluka
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Dynasore	Sigma
DMEM Zellkulturmedium	Life technologies
EGF-Alexa ⁵⁹⁴	Sigma
Essigsäure	Roth
Ethanol (96 %)	J. T. Baker
Ethanolamin	Sigma
Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)	Roth
Ethylendiamintetraacetat (Na ₂ -EDTA)	Roth
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma
Ficoll	Serva
Gastrografin	Bayer
Gentamycin	Life technologies
Glucose Monohydrat	Roth
Glutamin	Merck
Glutaminsäure	Sigma
Glutaraldehyd (50 % EM-Qualität)	Serva
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Guanidin/HCl	Serva
Hanks buffered salt solution (HBSS)	Life technologies
Harnstoff	J. T. Baker
Hefe Nitrogen Basis (YNB)	Difco
Hefeextrakt	Difco
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma
Histidin	Roth
Igepal CA-630	Sigma
Imidazol	Sigma
Immersionsöl 518 F (nd = 1,518)	Zeiss
Immersionsöl TypA Nikon C2 (nd = 1,515)	Nikon
Isoleucin	Roth
Isopropanol	Roth
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Peqlab
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Kanamycinsulfat	Sigma
Kalbsthymus-DNA (Carrier-DNA)	Sigma
Latexgranulat (Fluoresbrites™ microspheres)	Polysciences
Leucin	Roth
Lithiumacetat	Roth
Lysin	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth

Bezeichnung	Hersteller
Magnesiumsulfat	Sigma
Methanol (MeOH)	Riedel-deHaën
Methionin	Merck
Milchpulver ($\leq 1\%$ Fett)	Roth
N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin (Tricin)	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Roth
Natriumdodecylsulphat (SDS)	Roth
Natriumorthovanadat (NaVO ₃)	Sigma
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Fluka
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
NHS-Sepharose	GE Healthcare
Ni-NTA-Agarose (cOmplete his tag purification resin)	Roche
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma
Nocodazol	Sigma
Para-Formaldehyd (PFA)	Fluka
Phenylalanin	Acros
Plasmocin	InvivoGen
PMSF	Sigma
Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure) (PIPES)	Sigma
Polyethylenglycol 3350 (PEG)	Roth
Poly-L-Lysin	Sigma
Prolin	Merck
ProlongGold (Anti-fade, Einbettmedium)	Life technologies
Protein-G-Agarose	Roche
Ratio Phenol/Chloroform	Roth
Rhodamin-Phalloidin	Thermo Fischer
Salzsäure (HCl)	Roth
Saponin	Sigma
Serin	Merck
Sucrose	Roth
TEMED	Serva
Threonin	Merck
Triethanolamin	Merck
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Merck
Trypton Pepton	Difco
Tryptophan	Roth
Tween 20	Merck
Tyrosin	Merck
Uracil	Roth
Valin	Merck
Vectashield (Anti-fade, Einbettmedium)	Linaris
Xylen-Cyanol FF	Serva

2.4 Lösungen und Puffer

Tab. 2.4: Verwendete Lösungen und Puffer

Lösung / Puffer	Zusammensetzung
μ MACS-Elutionspuffer	1xSDS-Blaumarker (mit ddH ₂ O verdünnt) 50 mM DTT pH 6,8 (HCl/NaOH)

Lösung / Puffer	Zusammensetzung
µMACS-Waschpuffer	20 mM Tris pH 7,5 (HCl/NaOH)
1xPBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 (HCl/NaOH)
4xSammelgelpuffer	0,5 M Tris 0,4 % SDS pH 6,8 (HCl/NaOH)
4xSDS-Blaumarker	272 mM Tris 8 % SDS 0,08 % Bromphenolblau 40 % Glycerin pH 6,8 (HCl/NaOH)
4xTrenngelpuffer	1,5 M Tris 0,4 % SDS pH 8,8 (HCl/NaOH)
AmSNaPi	50 mM NH ₄ Cl in SNaPi-Puffer
Coomassie-Entfärbelösung	10 % Essigsäure 20 % Methanol
Coomassie-Färbelösung	0,02 % CBB-G250 35 mM (HCl/NaOH)
Detektionspuffer	0,1 M Tris 0,1 M NaCl 50 mM MgCl ₂ pH 9,5 (HCl/NaOH)
DNA-Blaumarker	0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylen-Cyanol FF 15 % Ficoll 10 mM Tris 10 mM EDTA
Erntepuffer (für <i>C. pn.</i> Gradientenreinigung)	0,7 mg/ml DNase 1,3 mM CaCl ₂ 0,8 mM MgCl ₂ 0,04 % Protease-Inhibitor (EDTA-frei) in HBSS
hsPBST	0,05 % Tween 20 300 mM NaCl in 1xPBS
IF-Blockierlösung	4 % BSA 0,05 % Tween 20 in 1xPBS
IP-Lysispuffer	150 mM NaCl 50 mM Tris 1 % Triton X-100 0,04 % Protease-Inhibitor (EDTA-frei) pH 8,0 (HCl/NaOH)
Kopplungspuffer (Antikörperreinigung und Präabsorption)	0,2 M NaHCO ₃ 0,5 M NaCl pH 8,3 (HCl/NaOH)
NaPi (0,1 M Natriumphosphat-Puffer)	77,4 mM Na ₂ HPO ₄ 22,6 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7,4 (HCl/NaOH)

Lösung / Puffer	Zusammensetzung
PBST	0,05 % Tween 20 in 1xPBS
PHEM (1,1x konzentriert für PFA-Zusatz)	110 mM PIPES 22 mM HEPES 5,5 mM EGTA 2,2 mM MgCl ₂ pH 6,8 (HCl/NaOH)
P-Lysis-Puffer	1 % Igepal CA-630 1 % Triton X-100 140 mM NaCl 20 mM Tris 2 mM EDTA 1 mM Na ₂ VO ₃ pH 6,8 (HCl/NaOH)
Puffer B	8 M Harnstoff 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris pH 8,0 (HCl/NaOH)
Puffer C	8 M Harnstoff 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris pH 6,3 (HCl/NaOH)
SDS-PAGE Laufpuffer	0,05 M Tris 0,2 M Glycin 0,1 % SDS pH 8,3 (HCl/NaOH)
SNaPi (Sucrose-Natriumphosphat-Puffer)	4 % Sucrose in NaPi-Puffer
SNaPiPfa	3,7 % PFA in SNaPi-Puffer
SPG-Puffer (Sucrose-Phosphat-Glutaminsäure-Puffer)	220 mM Sucrose 3,8 mM KH ₂ PO ₄ 10,8 mM Na ₂ HPO ₄ 4,9 mM Glutaminsäure pH 7,5 (HCl/NaOH)
Transferpuffer	48 mM Tris/HCl 39 mM Glycin 0,037 % SDS 20 % Methanol
WB-Blockierungslösung	3 % Milchpulver 0,05 % Tween 20 in 1xPBS

2.1 Enzyme

2.1.1 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme wurden nach Herstellerangaben (Thermo Fischer) während der Restriktionsanalysen von Plasmiden, zur Plasmid-Öffnung für homologe Rekombinationen oder der Ligationen verwendet. Verwendet wurden: *Sma*I, *Mlu*I, *Kpn*I, *Nde*I, *Eco*RI, *Bam*HI, *Hinc*II, *Bgl*I, *Xba*I, *Pst*I, *Bpu*10I, *Xba*I

2.1.2 Weitere Enzyme

Tab. 2.5: Weitere verwendete Enzyme

Name	Hersteller
AllIn-Polymerase	HighQu
DNase	Sigma
Lysozym	Sigma
Platinum Pfx DNA-Polymerase	Thermo Fischer
Proteinase K	Roche
RNase A	Qiagen
Taq-Polymerase	Eigene Herstellung (Fr. Volfson)
TrueStart-Polymerase	Thermo Fischer
Trypsin/EDTA	Thermo Fischer

2.2 Antikörper für Westernblot und Immunfluoreszenz

2.2.1 Primäre Antikörper

Tab. 2.6: Verwendete Primäantikörper

Name	gerichtet gegen	Ursprung	Verdünnung		Referenz
			Westernblot	IF	
α -Chlamydia	ganze <i>Chlamydiae</i> Bakterien	Maus		1:50	Loke diagnostics Aps
α -CIN85	humanes CIN85	Maus		1:50	Santa Cruz
α -CPn0677	rCPn0677 _{6xHis}	Kaninchen	1:100	1:10	(Murra 2009)
α -CPn0678	rCPn0677 _{6xHis}	Kaninchen	1:100	1:10	(Murra 2009)
α -Cpn0712	rCPn0712-A _{10xHis}	Kaninchen	1:100	1:25	(Hänsch 2011)
α -dsRED	rdsRed2	Maus	1:300		Santa Cruz
α -EGFR	humaner EGFR (AS 1198 – 1210)	Kaninchen		1:400	Thermo Fischer
α -GFP	rGFP	Maus	1:1000		Roche
α -GRB2	humanes GRB2	Kaninchen	1:300	X	Santa Cruz
α -IncA	<i>C. pn.</i> IncA	Maus		1:100	(Luo et al. 2007)
α -LPS (Pathfinder)	chlamydiales LPS (<i>C. tr.</i> , <i>C. psi.</i> , <i>C. pn.</i>)	Maus		1:4	Bio-rad
α -MEK1	humanes MEK1	Maus	1:200		Santa Cruz
α -Pentahis	5xHis-Tag	Maus	1:2500		Qiagen
α -Pmp21	rPmp21-N _{6xHis}	Kaninchen		1:100	(Becker 2013)
α -S1	<i>C. trachomatis</i> S1	Kaninchen	1:500	1:20	Birkelund
α -SNX	humanes SNX9	Ratte	1:1000		Lichtenthaler
α -SNX	humanes SNX9	Ziege		1:25	Novus Biologicals
α -Vimentin-Cy3	humanes Vimentin	Maus		1:200	Sigma
α - α Tubulin	humanes α -Tubulin	Maus		1:100	Acris

2.2.2 Sekundäre Antikörper

Tab. 2.7: Verwendete Sekundärantikörper

Name	gerichtet gegen	Ursprung	Verdünnung		Hersteller
			Westernblot	IF	
α -Kan.-AP	Kaninchen	Maus	1:7500		Promega
α -Maus-AP	Maus	Kaninchen	1:7500		Promega
α -Ratte-AP	Ratte	Ratte	1:30000		Promega
α -Kaninchen-Alexa ⁴⁸⁸	Kaninchen	Ziege		1:200	Thermo Fischer
α -Kaninchen-Alexa ⁵⁹⁴	Kaninchen	Ziege		1:200	Thermo Fischer
α -Ziege-Alexa ⁴⁸⁸	Ziege	Esel		1:200	Thermo Fischer
α -Maus-Alexa ⁴⁸⁸	Maus	Ziege		1:200	Thermo Fischer
α -Maus-Alexa ⁵⁹⁴	Maus	Ziege		1:200	Thermo Fischer

2.3 Kits

Tab. 2.8: Verwendete Kits

Kit-Name	Hersteller
PeqGold Gel-Extraction-Kit	PeqLab
Qiagen Plasmid-MIDI-Kit	Qiagen
Qiagen Gel-Extraction-Kit	Qiagen
μ MACS™ Epitope Tag Protein Isolation Kit	Miltenyi Biotec
Protein Transfektions-Kit ProJet	Thermo Fischer

2.4 Größenstandards

Tab. 2.9: Verwendete Größenstandards für Gelelektrophoresen

Größenstandard	Fragmente	Hersteller
1 kb DNA-Leiter Mix	10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.200, 1.000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 [bp]	Thermo Fischer
50 bp DNA-Leiter Mix	1.000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 [bp]	Thermo Fischer
PageRuler Plus™ Prestained	250, 130, 100, 70, 55, 35, 27, 15, 10 [kDa]	Thermo Fischer
PageRuler™ Prestained	170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17, 11 [kDa]	Thermo Fischer

2.5 Oligonukleotide

2.5.1 Oligonukleotide zur Klonierung

Tab. 2.10: Zu Klonierungen verwendete Oligonukleotide

Name	Nummer	Sequenz 5'-3'
DHPLC 678triple rev	C-1534	CCTCCTCCAGGAACCTGTGG
678-DelPRR1 fwd	C-2757	CCTGGAGGAGGGGCCCAACGTTTCATCAGGTAGC ACGACACTAAAGCCAGCACCCCAGCCT
678-DelPRR1 rev	C-2758	GCGCTTAGCATTGGTCCCACCTGTTTTAGGAGGC TGGGGTGTGCTGGCTTTAGTGTTCGTGCT
678Voll pKM55 fw	C-2857	ATTGATCGGGAGAGCCGGAGCGAGCAAGCTTAC CCGGGATGTCTGTTAATCCATCAGGAA
678Voll pKM55 rev	C-2858	CCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATG AATTCATCTTCGTCAGACCAGCTGAC
678 C pKM55 fw	C-2859	ATTGATCGGGAGAGCCGGAGCGAGCAAGCTTAC CCGGGATGCCTACGCGTCCGGCACCCC
678 N pKM55 rev	C-2860	CCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATG AATTCCTTTAGTGTCTGTCTACCTGA
rev 678 Voll pKM95	C-2938	GGCCATGTTATCCTCCTCGCCCTTGCTCACCATGA ATTCATCTTCGTCAGACCAGCTGAC
fw amphi-helix only 678 pKM55 +StartATG	C-2940	GATCGGGAGAGCCGGAGCGAGCAAGCTTACCCG GGATGCAAGGGTTATTAGCACGAATCA
rev amphi-helix only 678 pKM55	C-2941	CCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATG AATTCATCCGACTAAAAAACCCGGT

angegebene Nummern aus Oligonukleotidsammlung der AG Hegemann

2.5.2 Sonstige Oligonukleotide

Tab. 2.11: Zu Sequenzierungen verwendete Oligonukleotide

Name	Nummer	Sequenz 5'-3'
MGSO	C-118	TGCACCATCTGTCACTCCGTTAACCT C
GPO3	C-119	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCT
fw_ompa_SW_Primer	C-225	CCAATATGCACAGTCCAAACCTAA
SeqdsREDrev	C-1296	GAGGTGTGGGAGGTTTTTTA
seq-pKM55-s	C-1401	TATCGATTCTAGCCGAGTCC
seq-pKM55-as	C-1402	ACACGCTGAACTTGTGGCCG
EmGFP-forward-sequencing-primer	C-2125	GGCATGGACGAGCTGTACAA
MOMP qPCR rev	C-2191	CGCCAGCGTCTGTTGGCAAG

angegebene Nummern aus Oligonukleotidsammlung der AG Hegemann

2.6 Verwendete und neu erstellte Plasmide

Tab. 2.12: Verwendete und neu erstellte Plasmide

Der Organismus, für den die jeweiligen Plasmide verwendet wurden, ist in den ersten drei Spalten markiert.

<i>E. coli</i>	<i>S.c.</i>	Human	Name	Nummer	Beschreibung
	X		p423GAL1	480	Expressionsvektor für Konstrukte unter der Kontrolle des <i>GAL1</i> -Promotors mit C-terminalem HIS-Tag
	X		pUG34	848	yEGFP3 <i>Xba</i> I PCR Fragment in p413MET25
X			pGM5	1327	<i>C. pneumoniae</i> Cpn0677 generiert auf GiD genomischer DNA mit den Oligos C-699/C-700 und integriert über homologe Rekombination in pKM32 mit <i>Sma</i> I geschnitten.
X			pGM6	1328	<i>C. pneumoniae</i> Cpn0678 generiert auf GiD genomischer DNA mit den Oligos C-701/C-702 und integriert über homologe Rekombination in pKM32 mit <i>Sma</i> I geschnitten.
		X	pGM31	1739	mCherry-SNX9
		X	pKM55	1895	Transfektionskonstrukt exprimiert EGFP
	X		pHS1	1925	Volllänge-Cpn0712 mit Oligonukleotiden C-1403 / C-1404 amplifiziert und in p423GAL1 an <i>Sma</i> I-Restriktionsstelle durch homologe Rekombination integriert
X			pHS3	1927	712A-Fragment von Cpn0712 (nt: 268 – 1266) mit Oligonukleotiden C-1515 / C-1516 amplifiziert und in pFT25 an <i>Sma</i> I-Restriktionsstelle durch homologe Rekombination integriert
	X		pFRA3	2084	p423GAL1 mit <i>cpn0712</i> - Δ TMD über homologe Rekombination mit C-1403 und C-2002 für Teil 1 und C-2003 und C-1404 für Teil 2 an <i>Sma</i> I-Schnittstelle
	X		pFRA4	2085	pUG34 mit <i>cpn0712</i> -Voll über homologe Rekombination mit C-2205 und C-2206 an <i>Sma</i> I-Schnittstelle
	X		pFRA7	2088	pUG34 mit <i>cpn0712</i> - Δ TMD über homologe Rekombination mit C-2205 und C-2002 für Teil 1 und C-2003 und C-2206 für Teil 2 an <i>Sma</i> I-Schnittstelle
		X	pKM95	2373	Transfektionskonstrukt exprimiert mCherry
		X	PH-Btk-GFP	2453	Transfektionskonstrukt exprimiert PH-Btk-GFP
		X	PH-PLC γ -GFP	2454	Transfektionskonstrukt exprimiert PH-PLC γ -GFP
		X	pKM103	2456	Transfektionskonstrukt exprimiert CIN85-mCherry
		X	pKM106	2459	Transfektionskonstrukt exprimiert PH-Btk-mCherry
		X	pKM128	2527	Transfektionskonstrukt exprimiert GRB2-mCherry
		X	pHS16	2528	CPn0678 Volllänge (AA 1-213) mit C-2857 und C-2858 aus pGM6 amplifiziert und an <i>Sma</i> I in pKM55 mittels homologer Rekombination integriert
		X	pHS17	2529	CPn0678 C-Fragment (AA 137-213) mit C-2858 und C-2859 aus pGM32 amplifiziert und an <i>Sma</i> I in pKM55 mittels homologer Rekombination integriert
		X	pHS18	2530	CPn0678 N-Fragment (AA 1-136) mit C-2857 und C-2860 aus pGM6 amplifiziert und an <i>Sma</i> I in pKM55 mittels homologer Rekombination integriert
		X	pHS19	2531	CPn0678 mit Δ 6-Deletion (Deletion von AA 56-74) über C-2857 und C-2858 aus pGM32 amplifiziert und an <i>Sma</i> I in pKM55 mittels homologer Rekombination integriert

<i>E. coli</i>	<i>S.c.</i>	Human	Name	Nummer	Beschreibung
		X	pHS21	2533	CPn0678 mit Δ PRR1-Deletion (Deletion von 137-161) über Integration des Primer Dimers aus C-2757 und C-2758 in den an <i>Mlu</i> I geöffneten pHS16 über homologe Rekombination integriert
		X	pHS22	2534	Cpn0678 mit Trippleaustausch von Arginin R63, R68 und R73 gegen Alanin über C-2857 und C-1534 aus pGM34 amplifiziert und in den mit <i>Sma</i> I und <i>Kpn</i> I geöffneten pHS16 über homologe Rekombination integriert
		X	pHS25	2537	Erhalten von Arbeitsgruppe um Prof. Giorgio Scita aus Milan (Disanza et al. 2013). IRSp53 in pmCherryC1.
		X	pHS26	2538	Erhalten von Klemens Rottner aus Bonn (Oelkers et al. 2011). Murines Cortactin in pEGFPC1, bei dem EGFP gegen mCherry ausgetauscht wurde. Austausch an AA298 von Ser zu Pro festgestellt.
		X	pHS27	2539	CPn0678 amphi-helix-Fragment (AA 47-64) über C-2940 und C-2941 aus pGM6 amplifiziert und an <i>Sma</i> I in pKM55 mittels homologer Rekombination integriert
		X	pHS28	2540	CPn0678 Volllänge (AA 1-213) über C-2857 und C-2938 aus pGM6 amplifiziert und an <i>Sma</i> I in pKM95 mittels homologer Rekombination integriert
		X	pEGFP_Lact-C2	2561	Transfektionskonstrukt exprimiert Lactadherin-C2-GFP
X			pRE105	2563	Kodiert für Pdr5*, markiert ER (Wendler et al. 2004)

angegebene Nummern aus Plasmidsammlung der AG Hegemann

2.7 Zellen und Zelllinien

2.7.1 Eukaryotische Zellen und Zelllinien

Adhärenzte Zellkulturlinien:

HEp-2 Zelllinie: epitheliale Larynxcarzinom-Zelllinie, menschlichen Ursprungs, Hela-Morphologie (ATTC-Nr.: CCL-23)

HeLa229 Zelllinie: epitheliale Zervixkarzinom-Zelllinie menschlichen Ursprungs (ATTC-Nr.: CCL-2)

Saccharomyces cerevisiae:

Tab. 2.13: Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

Nummer	Name	Genotypische Beschreibung
#475	CEN/PK2	<i>MATa ura3-52; trp1-289; leu2-3, 11; his3-Δ1</i> <i>MATα ura3-52; trp1-289; leu2-3, 11; his3-Δ1</i>
#1585	ERG6-mRFP	<i>MATα ura3-Δ0; lys2-Δ0; leu2-Δ0; his3D1; -KanMX6</i>

angegebene Nummern aus Stammsammlung der AG Hegemann

2.7.2 Prokaryotische Zellen und Zelllinien

Chlamydia pneumoniae:

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

Escherichia coli:

XL₁-Blue: *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac-[F^c proAB lacI^p ZΔM15 Tn10(Tet^r)]*

Herkunft: Strategene

BL21: B F⁻ *dcm omp ThsdS*(_{r_B.m_B}) *galλ*(DE3)

Herkunft: Thermo Fischer (früher Invitrogen)

2.8 Medien und Medienzusätze

LB-Medium (*E. coli*):

Tab. 2.14: Zusammensetzung des LB-Mediums

	Festmedium	Flüssigmedium
Bacto-Trypton	10 g	10 g
Hefeextrakt	5 g	5 g
NaCl	5 g	5 g
Agar	13,5 g	

In 1 l deionisiertem Wasser lösen und autoklavieren, anschließend vor Zugabe von Ampicillin (Endkonzentration 50 mg/l) oder Kanamycin (Endkonzentration 15 mg/l) auf ca. 50 °C abkühlen.

YPD⁺-Medium (*S. cerevisiae*):**Tab. 2.15: Zusammensetzung des YPD⁺-Mediums**

	Festmedium	Flüssigmedium
Kohlenstoffquelle separat (s.u.)	(20 g)	(20 g)
Hefeextrakt	10 g	10 g
Casein Hydrolysat (Pepton)	20 g	20 g
Adeninstocklösung (2 mg/ml)	2 ml	2 ml
Tryptophanstocklösung (5 mg/ml)	4 ml	4 ml
Agar	13,5 g	

In 1 l deionisiertem Wasser lösen und autoklavieren.

SD-Medium (*S. cerevisiae*):**Tab. 2.16: Zusammensetzung des SD-Mediums**

	Festmedium	Flüssigmedium
Glukose	20 g	20 g
Ammoniumsulfat	5 g	5 g
Aminosäuremix	2 g	2 g
Hefe Nitrogen Base (YNB)	1,7 g	1,7 g
Agar	20 g	
5 M NaOH	auf pH 6	

In 1 l deionisiertem Wasser lösen und autoklavieren.

Zur Selektion wird die entsprechende Aminosäure oder Nukleobase nicht mit in den Aminosäuremix gegeben. Für das Flüssigmedium wird die Kohlenstoffquelle als 20 %ige Stocklösung separat autoklaviert und dem Medium nachträglich zugefügt (Glukose = SD-Medium, Raffinose = SR-Medium, Galaktose = SG-Medium)

Aminosäuremix+24:

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

Tab. 2.17: Zusammensetzung des Aminosäuremixes

Verbindung	Menge	Verbindung	Menge
Adenin	0,5 g	Leucin	10,0 g
Alanin	2,0 g	Lysin	2,0 g
Arginin	2,0 g	Methionin	2,0 g
Asparagin	2,0 g	Para-Aminobenzoensäure	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

Zellkulturmedium (HEp-2, HeLa229):

Die Kultivierung der humanen Zelllinien erfolgt in Zellkulturmedium, das auf DMEM-GlutaMAXTM + Glucose + Pyruvat (Gibco) basiert:

Tab. 2.18: Zusammensetzung des Zellkulturmediums

zu 500 ml DMEM-GlutaMAX TM + Glucose + Pyruvat	
50 ml hitzeinaktiviertes FKS (60 min bei 56 °C)	Endkonzentration 10 %
5 ml Vitamine (100x)	Endkonzentration 1x
5 ml nicht essentielle Aminosäuren (100x)	Endkonzentration 1x
5 ml Amphotericin B (250 µg/ml)	Endkonzentration 2,5 µg/ml
0,5 ml Gentamycin (50 mg/ml)	Endkonzentration 50 µg/ml

Für einige Anwendungen mussten modifizierte Ausführungen des oben beschriebenen Zellkulturmediums verwendet werden. Das serumfreie Zellkulturmedium wurde durch Weglassen des FKS hergestellt. Das serum- und antibiotikafreie Medium wurde durch Weglassen von FKS, Amphotericin B und Gentamycin hergestellt.

3 Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden stellen eine Kombination aus einer Vielzahl bereits bekannter Techniken und selbst optimierter bzw. entwickelter Techniken dar. Methoden, die nach Herstellerangaben verwendet wurden, wird deshalb lediglich verwiesen. Techniken, die in ihrer Form aus anderen Quellen weitestgehend übernommen wurden, sind durch entsprechende Referenzen gekennzeichnet.

3.1 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die verwendeten *S. cerevisiae* Stämme werden in den unter Kap. 2.8 beschriebenen Fest- und Flüssigmedien bei 30 °C kultiviert.

3.1.1 Induktion der Proteinexpression in *S. cerevisiae*

Die Induktion der Proteinexpression in *S. cerevisiae* erfolgte in einer im Rahmen dieser Arbeit betreuten Bachelor-Arbeit und folgte einem bereits zuvor beschriebenen Protokoll (Franken 2012, Hänsch 2011).

Die in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae*-Expressionsvektoren unterstanden der Kontrolle des *GAL1*-Promotors. Als Kohlenstoffquellen wurden daher zur Regulierung des Promotors Raffinose und Galaktose gewählt. 2 % raffinosehaltige SR-Medien (SR) bewirken dabei eine beschleunigte Aktivierung des *GAL1*-Promotors bei der anschließenden Induktion, da Raffinose im Gegensatz zu Glukose keinen reprimierenden Effekt auf den *GAL1*-Promotor ausübt. Die Induktion selbst findet dann mit 2 % galaktosehaltigen SG-Medien (SG) statt.

- Die Zellen werden in 5 ml 2 % raffinosehaltigem SR-Medium ü/N bei 30 °C und rotierendem Schütteln inkubiert.
- Die ü/N-Kultur wird in eine neue 5 ml 2 % galaktosehaltige SG-Kultur umgeimpft (Ziel-OD₆₀₀ = 0,1) und für den gewünschten Zeitraum unter rotierendem Schütteln inkubiert (in dieser Arbeit 24 h).

3.1.2 Serieller Verdünnungstropftest von *S. cerevisiae*

Der serielle Verdünnungstropftest von *S. cerevisiae* erfolgte in einer im Rahmen dieser Arbeit betreuten Bachelor-Arbeit und folgte einem bereits zuvor beschriebenen Protokollen (Franken 2012, Hänsch 2011).

Zur Beobachtung des Einflusses ektopisch exprimierter chlamydialer Proteine auf das Wachstumsverhalten des Modellorganismus *S. cerevisiae* werden transformierte Zellen in 2 % raffinosehaltigem SR-Medium ü/N kultiviert. Die Zellzahl der einzelnen Kulturen wird

mittels Thoma-Zählkammer (Faktor 78.000) bestimmt und durch serielle Verdünnung auf $2 \cdot 10^6$, $2 \cdot 10^5$, $2 \cdot 10^4$ und $2 \cdot 10^3$ Zellen pro ml eingestellt. Anschließend werden 5 μ l der jeweiligen Verdünnung auf induzierende (galaktosehaltige) und nicht induzierende (raffinosehaltige) Festmedienplatten aufgetropft. Die so aufgetropften Zellen (Zellzahl: 10^4 , 10^3 , 10^2 und 10 Zellen) werden anschließend für 2 Tage bei 30 °C oder 37 °C inkubiert.

3.1.3 Aufbereitung von *S. cerevisiae* Zellen für Fluoreszenzmikroskopie

Der serielle Verdünnungstropftest von *S. cerevisiae* erfolgte in einer im Rahmen dieser Arbeit betreuten Bachelor-Arbeit und folgte einem bereits zuvor beschriebenen Protokoll (Franken 2012, Hänsch 2011).

S. cerevisiae Zellen, die fluoreszente Proteine exprimieren (vgl. Kap. 3.1.1) werden fixiert bevor sie auf beschichtete Objektträger aufgebracht werden.

- Induzierte *S. cerevisiae* Zellen werden für die Fluoreszenzmikroskopie aufbereitet, indem diese in 3,7 % PFA in 1xPBS für 15 min bei 30° C inkubiert und anschließend zweimal mit 1xPBS gewaschen werden. Die so fixierten Zellen können bei 4 °C für einige Tage gelagert werden.
- Um die Zellen für die Mikroskopie auf dem Objektträger zu immobilisieren, werden 20 μ l Poly-L-Lysin (1 mg/ml) auf den Objektträger gegeben.
- Nach 2 min Inkubationszeit bei RT wird das Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen zweimal mit 500 μ l ddH₂O gespült und der Objektträger mit Druckluft luftgetrocknet.
- Anschließend werden 20 μ l der Zellsuspension auf die beschichtete Stelle getropft und die Zellen für 30 min adhären lassen.
- Der Objektträger wird danach bei RT zweimal mit 500 μ l ddH₂O gewaschen, und mit Druckluft luftgetrocknet.
- Die beschichtete Stelle mit den immobilisierten *S. cerevisiae* Zellen wird dann mit 1 μ l Vectashield eingebettet.

3.2 Kultivierung von *E. coli*

Die verwendeten *E. coli* Stämme werden in den unter Kap. 2.8 beschriebenen Fest- und Flüssigmedien bei 37 °C kultiviert.

3.2.1 Herstellung elektrokompetenter XL₁-blue Zellen

Die Herstellung von elektrokompetenten XL₁-blue Zellen folgte einem bereits zuvor beschriebenen Protokoll (Hänsch 2011).

- XL₁-blue Zellen aus der Stammsammlung werden auf einer LB-Platte mit Tetrazyklin (30 µl/Platte) ausgestrichen und ü/N bei 37 °C inkubiert.
- Es werden zwei 5 ml ü/N-Kulturen angesetzt.
- Die zwei 5 ml ü/N-Kulturen werden jeweils in 1 l LB-Medium überimpft und bei 37 °C inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,7 - 0,8 erreicht ist.
- Die 1 l-Kulturen werden 30 min auf Eis abgekühlt und 15 min bei 4000 Upm (1932 xg Beckmann J2-21) und 4 °C abzentrifugiert.
- Die pelletierten Zellen jeder 1 l-Kultur werden zweimal mit 1000 ml eiskaltem, sterilem ddH₂O gewaschen.
- Die Pellets werden anschließend in je 20 ml eiskaltem, sterilem 10 %igem Glycerin resuspendiert und erneut 15 min bei 4000 Upm (1932 xg Beckmann J2-21) und 4 °C abzentrifugiert.
- Die Zellen werden in je 2 – 3 ml 10 %igem Glycerin resuspendiert, aliquotiert und 1 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren.
- Die elektrokompetenten Zellen werden bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Induktion der Proteinexpression in *E. coli*

Zur Induktion der Proteinexpression unter der Kontrolle des *lac*-Promotors wurde IPTG verwendet.

- Transformierte *E. coli* Kulturen werden in 50 ml LB-Medium mit Ampicillin ü/N bei 37 °C unter rotierendem Schütteln als Vorkultur kultiviert.
- Die Kulturen werden dann in 1 l LB-Medium mit Ampicillin auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und bei 37 °C unter rotierendem Schütteln erneut kultiviert.
- Ab einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,4 wird mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) für 4 h bei 37 °C die Proteinexpression unter rotierendem Schütteln induziert.
- Die Zellen werden durch Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 5000 Upm (3018 xg Avanti J-25) geerntet und in 25 ml kaltem 1xPBS resuspendiert.
- Nach der erneuten Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 4600 Upm (2058 xg Heraeus Megafuge 1.0R) wird das Zellpellet in 1 ml 1xPBS resuspendiert und kann bei -20 °C gelagert werden.

3.3 Kultivierung humaner Zelllinien

Die verwendeten Humanzelllinien wurden in dem unter Kap. 2.8 beschriebenen Zellkulturmedium bei 37 °C und 6 % CO₂ kultiviert.

3.3.1 Mykoplasmen-Detektion und Behandlung von humanen Zelllinien

Initial erfolgte eine vollständige Behandlung aller in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und Chlamydienstämme. Im Anschluss erfolgte eine regelmäßige Prüfung der Zelllinien und Chlamydienstämme mittels spezifischer PCR und durch Mikroskopie von DNA-Färbungen. Zum weiteren Schutz vor Mykoplasmenkontamination wurden die humanen Zelllinien prophylaktisch mit Plasmocin nach Herstellerangaben kultiviert. Nachfolgend sind die Reinigungs- und Kontrollprotokolle aufgelistet:

Überprüfung einer Mykoplasmen-Kontamination über DNA-Isolation und PCR:

Zu allen Zeitpunkten des Protokolls müssen saubere Handschuhe getragen werden, um Kreuzkontamination durch Verunreinigungen zu vermeiden.

- 1,5 ml überstehendes Zellkulturmedium von kultivierten Zellen wird in neues Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen müssen mindestens 48 h ohne Medienwechsel kultiviert worden sein, um zuverlässige Auswertungen zu gewährleisten.
- Die Probe wird für 20 min bei 4 °C und 15000 Upm (21885 xg Biofuge Primo R) zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen und das entstandene Pellet zweimal mit 500 µl HBSS gewaschen.
- Anschließend wird die Probe erneut für 20 min bei 4 °C und 15000 Upm (21885 xg Biofuge Primo R) pelletiert.
- Das Pellet wird in 20 µl HBSS vollständig resuspendiert.
- Es werden 20 µl Proteinase K (20 µg/µl) hinzugefügt, gevortext und bei 55 °C für 1 h inkubiert.
- Anschließend erfolgt die Inaktivierung für 10 min bei 100 °C.
- Es werden 250 µl Phenol:Chloroform hinzugefügt. Dabei muss bei Phasentrennung im Phenol:Chloroform darauf geachtet werden, dass die untere Phase verwendet wird.
- Die Probe wird kräftig und ausdauernd gevortext.
- Es erfolgt die Zentrifugation für 10 min bei RT und 15000 Upm (21885 xg Biofuge Primo R) zur vollständigen Phasentrennung.
- Die obere Phase (~ 200 µl) wird ohne die Zwischenphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Erscheint die obere Phase immer noch trüb, kann eine erneute Phenol:Chloroform-Extraktion durchgeführt werden (bei Wiederholung nur 200 µl Phenol:Chloroform hinzufügen).
- Der Probe wird mit 1/10 Probenvolumen (~ 20 µl) an 3 M NaAc (pH 5) und 1 Probenvolumen (~ 200 µl) Isopropanol versetzt.
- Die Proben werden für mindestens 20 min bei -80 °C eingefroren.
- Nach dem Auftauen erfolgt die Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 15000 Upm (21885 xg Biofuge Primo R).

- Der Überstand wird entfernt und 500 µl 70 % Ethanol zugefügt (nicht vortexen).
- Es erfolgt die erneute Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 15000 Upm (21885 xg Biofuge Primo R).
- Das erhaltene Pellet wird im Vakuum-Konzentrator getrocknet und anschließend in 10 µl ddH₂O resuspendiert.
- Anschließend erfolgt die Mykoplasmen-PCR. **Die Mykoplasmen-PCR muss mit kommerzieller TrueStart-Polymerase durchgeführt werden**, da andere Polymeraseprodukte bereits Mykoplasmenreste enthalten und falsch-positive Signale zeigen. Die PCR zur Überprüfung der Chlamydien-DNA kann mit der Taq-Polymerase durchgeführt werden.

Myco-PCR-Ansatz		PCR-Programm		
Isolierte DNA	1 µl	95 °C	10 min	40x Zyklen
C-118	1 µl	95 °C	1 min	
C-119	1 µl	60 °C	1 min	
dNTPs (4 mM)	2,5 µl	72 °C	1 min	
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl	72 °C	7 min	
TrueStart Puffer (10x)	5 µl	16 °C	∞	
TrueStart Polymerase	0,25 µl	Produkt: ~300 bp		
ddH ₂ O	36,25 µl			

Zelllinien-Behandlung bei akuter Mykoplasmeninfektion:

- Zuerst wird die Mykoplasmen-Infektion über PCR überprüft.
- Zellen werden wie üblich passagiert und neu ausgesät (mit möglichst geringer Zellzahl, um die Effektivität der Reinigung zu steigern. Die Behandlung wird dennoch die Wachstumsrate senken).
- Zum Zellkulturmedium werden während der Kultivierung 25 µg/ml Plasmocin zugegeben. Die Behandlung muss für 2 Wochen durchgeführt werden. Plasmocin ist bei 37 °C nur wenige Tage stabil, weswegen das Medium mit Plasmocin alle 2 – 3 Tage ausgetauscht werden muss.
- Nach der Behandlung werden die Zellen zur Erholung 2 Wochen ohne Plasmocin kultiviert.
- Es wird eine erneute Mykoplasmen-PCR zur Bestimmung des Behandlungserfolges durchgeführt.

Prophylaktische Behandlung von Zelllinien während der Kultivierung:

- Plasmocin darf bzw. sollte zur Prophylaxe während der Kultivierung von Zelllinien mit 5 µg/ml eingesetzt werden.

Behandlung kontaminierter Chlamydienstämme:

Zuvor muss abgeschätzt werden, wieviel Chlamydien eingesetzt werden müssen. Die Behandlung der Chlamydien mit Igepal CA-630 senkt die Infektiosität der Chlamydien etwa um 75%! Weniger chlamydiale Partikel im Ansatz steigern die Effizienz der Behandlung, reduzieren aber unter Umständen die nachfolgende Infektionseffizienz zur Erholung. Als Richtwert sollte maximal 1 ml Chlamydien-Pool eingesetzt werden. Wenn mehr infektiöses Material benötigt wird, sollten mehrere Reinigungen parallel durchgeführt und zur Infektion vereint werden. Das hier dargestellte Protokoll repräsentiert eine modifizierte Version anderer Protokolle (Castilla & Wadowsky 2000).

- Die Chlamydien werden für 20 min bei 4 °C und 15000 Upm (21885 xg Biofuge Primo R) pelletiert.
- Das Pellet wird in 150 µl des verbleibenden Überstandes vollständig resuspendiert.
- Es werden nacheinander 840 µl HBSS und 10 µl 10 % Igepal CA-630-Lösung (in HBSS) hinzugefügt und die Probe durch Vortexen gemischt.
- Die Probe wird für 10 min bei 4 °C inkubiert und die Chlamydien anschließend durch Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 15000 Upm (21885 xg Biofuge Primo R) pelletiert.
- Das Chlamydien-Pellet wird insgesamt zweimal mit 500 µl HBSS gewaschen und durch Zentrifugation pelletiert.
- Die Chlamydien sollten anschließend sofort für eine Infektion in HEp-2 Zellen verwendet und nicht gelagert eingefroren werden.
- Die Infektion sollte mindestens 72 h bis 96 h erlaubt werden, bevor die Chlamydien geerntet und der Überstand erneut durch Mykoplasmen-PCR getestet wird.

In einigen Fällen werden zwei oder drei Behandlungsrunden benötigt, um einen Chlamydien-Pool vollständig und nachhaltig von Mykoplasmen zu befreien. Die Igepal CA630-Konzentration kann ebenfalls angepasst werden. Jedoch gilt: weniger als 0,04 % Igepal CA630 Endkonzentration ist nicht ausreichend, um Mykoplasmen abzutöten, mehr als 0,1% Igepal CA630 dagegen setzt die Infektionsrate nach der Behandlung extrem herab.

3.3.2 Auftauen humaner Zelllinien

Das Auftauen der humanen Zelllinien folgte einem bereits zuvor beschriebenen Protokoll (Engel 2015).

- Die Humanzellen werden zügig bei RT aufgetaut.
- Die Zellen werden kurz gemischt und in 10 ml Zellkulturmedium gegeben, um das Biofreeze-Reagenz oder verbleibendes DMSO (je nach Einfrieremethode der Zelllinie) auszuwaschen.

- Die Zellsuspension wird anschließend in ein Zentrifugations-Röhrchen überführt und 10 min bei RT und 500 UpM (47 xg Rotanta 460R) zentrifugiert.
- Die Zellen werden verdünnt und in einer 80 cm² Zellkulturflasche ausgesät.

3.3.3 Passagieren und Lagerung humaner Zelllinien

Das Passagieren humaner Zelllinien folgte einem bereits zuvor beschriebenen Protokoll (Engel 2015).

- Aus einer konfluent mit Zellen bewachsenen 80 cm² Zellkulturflasche wird das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit 10 ml HBSS gewaschen (etwa zweimal pro Woche abhängig von der Wachstumsrate der Zelllinie).
- Die Zellen werden mit 5 ml 0,5xTrypsin/EDTA-Lösung überschichtet und bis zum Ablösen der Zellen durch leichtes Schwenken bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert.
- Zum Inaktivieren des Trypsins werden 5 ml Zellkulturmedium hinzugefügt und die Zellsuspension in ein Zentrifugations-Röhrchen überführt.
- Die Zellsuspension wird für 10 min bei 20 °C und 500 Upm (47 xg Rotanta 460R) zentrifugiert.
- Das entstandene Zellpellet wird in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert oder zur längeren Lagerung bei -80 °C in Biofreeze nach Herstellerangaben eingefroren.
- Aus der Zellsuspension werden Zellen für ein erneutes Passagieren in einer 80 cm² Zellkulturflasche mit 15 ml Zellkulturmedium mit Plasmocin ausgesät, und die übrigen Zellen für weitere Experimente ohne Plasmocin kultiviert (vgl. Kap. 3.3.1).

3.3.4 Ektopische Expression durch Transfektion in HEp-2 Zellen

Die Expression von chlamydialen Proteinen in humanen HEp-2 Zellen wurde durch Transfektion von Expressionsplasmiden erzielt. Die Expression selbst stand unter der Kontrolle konstitutiver Promotoren und musste nicht gezielt induziert werden. Zur Transfektion wurde das Turbofect-Reagenz verwendet, wobei sich das nachfolgende Protokoll auf Zellkulturproben in 24-Well Platten bezieht.

- Die zu transfizierenden HEp-2 Zellen sollten ca. 24 h kultiviert werden und etwa halb-konfluent sein.
- Einen halben Tag vor der Transfektion wird das alte Zellkulturmedium gegen 500 µl neues Zellkulturmedium ohne Antibiotika-Zusätze ausgetauscht.
- Pro Ansatz werden 0,5 – 1 µg Plasmid-DNA zur Transfektion (Gesamtmenge bei Doppel-Transfektionen) in 100 µl serum- und antibiotikafreies Medium gegeben und durch Vortexen gemischt.
- Zum Transfektionsansatz werden dann 2 µl Turbofect-Reagenz gegeben und der gesamte Ansatz 10 – 15 mal durch Auf- und Abpipettieren gemischt.

- Die Transfektionslösung wird 15 min bei RT inkubiert.
- Anschließend wird die Transfektionslösung tropfenweise zu den HEp-2 Zellen pipettiert, ohne dass das alte Medium entfernt wird.
- Die 24-Well Platte wird dann ausgiebig und gleichmäßig geschwenkt und die Zellen mit der Transfektionslösung bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert, bis sie für Folgeexperimente weiter verarbeitet werden (in dieser Arbeit standardmäßig 15 h).

3.3.4.1 Transfektion mit Infektion

Zur Bestimmung des Einflusses von ektopisch exprimierten Proteinen auf die Infektion von *C. pneumoniae* wurden transfizierte Zellen infiziert und die gebildeten Inklusionen in transfizierten Zellen analysiert.

- Die HEp-2 Zellen werden, wie zuvor beschrieben, transfiziert (Kap. 3.3.4). Lediglich auf die Dichte der ausgesäten Zellen muss geachtet werden, damit diese nicht am Ende des Experimentes übereinander wachsen.
- Nach 15 h dauernder Transfektion wird das alte Zellkulturmedium mit der Transfektionslösung entfernt und zweimal mit je 0,5 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium gewaschen.
- *C. pneumoniae* (MOI=2) wird in 0,5 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium resuspendiert und die Infektion durch Zentrifugation für 60 min bei 30 °C und 2920 Upm (1620 xg Rotanta 460R) eingeleitet.
- Des Weiteren wird dann die Infektion unter Cycloheximid-Einfluss nach 24 hpi, wie unter Kap. 3.4.1 beschrieben, durch Fixierung gestoppt.

3.3.4.2 Transfektion mit Endozytose-Induktion

Zur Quantifizierung des Einflusses eines transfizierten Proteins auf die Endozytoserate wurde, durch Zugabe von EGF^{Alexa594} (epidermal growth factor) zu transfizierten HEp-2 Zellen, die Endozytose induziert und die Formation von EGF^{Alexa594}-positiven Vesikeln untersucht.

- Die HEp-2 Zellen werden, wie zuvor beschrieben, transfiziert (Kap. 3.3.4).
- Nach 15 h Transfektion wird das alte Zellkulturmedium mit der Transfektionslösung entfernt und zweimal mit je 0,5 ml vorgewärmtem serumfreiem Zellkulturmedium gewaschen.
- Die Zellen werden dann für weitere 5 h bei 37 °C und 6 % CO₂ in serumfreiem Zellkulturmedium inkubiert.
- Das alte Medium wird entfernt und die Endozytose durch Zugabe von 500 µl serumfreiem Zellkulturmedium mit 20 ng/ml EGF^{Alexa594} induziert.
- Die Zellen werden für 1 h bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert, danach zweimal mit je 1 ml warmem SNaPi-Puffer gewaschen, fixiert und mikroskopisch ausgewertet.

3.3.4.3 Transfektion mit Zytoskelett-Beeinflussung

Zur Quantifizierung des Einflusses der Zytoskelettkomponenten auf einen bestimmten Phänotyp wurden transfizierte Zellen mit Inhibitoren behandelt. Außerdem wurde in parallelen Ansätzen das Verhalten des Phänotyps nach dem Auswaschen von Nocodazol und anschließender Erholung des MT-Geflechts untersucht. Weiterhin wurde die Phänotypenänderung bei Dynasore-Anwesenheit während der Erholung analysiert. Veränderungen im Auftreten der Phänotypen wurden dann mikroskopisch ermittelt und quantifiziert.

- Die HEp-2 Zellen werden, wie zuvor beschrieben, transfiziert (Kap. 3.3.4).
- Das alte Zellkulturmedium wird entfernt und die Zellen einmal mit 0,5 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium gewaschen.
- Anschließend erfolgt die Aktin-Destabilisierung durch Inkubation mit 4 μM Cytochalasin D in 0,5 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium für 60 min bei 37 °C und 6 % CO_2 , oder MT-Destabilisierung durch 10 μM Nocodazol im gleichen Volumen vorgewärmten Zellkulturmedium und unter gleichen Bedingungen für 30 min.
- Die Cytochalasin D-behandelten Zellen und ein Teil der Nocodazol-behandelten Zellen werden dann auf einer separaten 24-Well Platte zweimal mit je 0,5 ml vorgewärmtem PHEM-Puffer gewaschen und für Folgeexperimente in PHEM-Puffer auf einer separaten Platte fixiert (vgl. Kap. 3.6.9).
- Der übrige Teil der Nocodazol-behandelten Zellen wird mit einer Pinzette herausgenommen und in 50 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium ausgiebig gewaschen.
- Die Deckgläschen werden dann in eine 24-Well Platte mit 0,5 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium mit 80 μM Dynasore oder ohne Dynasore zurückgelegt.
- Die Zellen werden zur Erholung des MT-Geflechts in An- oder Abwesenheit von Dynasore für 30 min bei 37 °C und 6 % CO_2 inkubiert.
- Abschließend werden die Zellen zweimal mit je 0,5 ml vorgewärmtem PHEM-Puffer gewaschen und für Folgeexperimente in PHEM-Puffer fixiert (vgl. Kap. 3.6.9).

3.3.5 Antikörpertransfektion

Die funktionale Transfektion von Antikörpern in infizierte Humanzellen wurde, wegen der höheren Transfektionseffizienz, in HeLa229 Zellen durchgeführt, Zur Transfektion selbst wurde das Pro-JectTM Reagenz verwendet und folgt den Herstellerangaben in modifizierter Form.

- Die HeLa229 Zellen werden in einer 24-Well Platte mit Deckgläschen nicht zu dicht ausgesät.

- Die Zellen werden nach 24 hpi (bei etwa 30 % - 50 % Konfluenz) mit *C. pneumoniae* (MOI=1) infiziert.
- Die Zellen werden dann zweimal mit serum- und antibiotikafreiem Zellkulturmedium gewaschen.
- Nach Möglichkeit werden 0,5 – 1 µg der zu transfizierenden Antikörper für die Transfektion eingesetzt (in dieser Arbeit verwendet: 10 µl α-CPn0712, 2 µl α-IncA, 0,25 µl α-Kaninchen-Alexa⁴⁸⁸). Die Antikörper sollten nach Möglichkeit in 1xPBS ohne Additiva gelöst sein.
- Die Antikörper werden mit HBSS auf max. 20 µl aufgefüllt, gemischt, zum getrockneten Project™-Film nach dem Auftauen hinzugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt.
- Das Transfektionsgemisch wird dann für 5 min bei RT inkubiert.
- Anschließend wird das Transfektionsgemisch mit 250 µl serum- und antibiotikafreiem Medium durch Auf- und Abpipettieren gemischt, das alte Zellkulturmedium von den Zellen entfernt und durch die Transfektionslösung ersetzt.
- Die Platte wird ausgiebig und gleichmäßig geschwenkt und die Zellen mit der Transfektionslösung für 4 h bei 37 °C inkubiert.
- Die Transfektionslösung wird entfernt und durch 1 ml serumhaltiges Zellkulturmedium ersetzt.
- Nach weiteren 24 h werden die Zellen mittels 3,7 % PFA fixiert.
- Die Permeabilisierung der Zellen erfolgt mit 0,5 % Saponin in 1xPBS für 20 min und die Färbung der Zellen mit entsprechendem Sekundärantikörper in 0,5 % Saponin haltigem 1xPBS.

3.4 Kultivierung von *C. pneumoniae*

Die Infektion von *C. pneumoniae* wurde, wenn nicht anders angegeben, standardmäßig in Hep-2 Zellen und Zellkulturmedium ohne Plasmocin in Anwesenheit von Cycloheximid (1,5 µg/ml) durchgeführt. Nur im Experiment der Antikörpertransfektion wurden HeLa229 Zellen infiziert (vgl. Kap. 3.3.5).

3.4.1 Mykoplasmenbehandlung chlamydialer Bakterienstämme

Initial erfolgte eine vollständige Behandlung aller in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und Chlamydienstämme. Das Testen eines Chlamydien-Pools erfolgte durch direkte Entnahme von 50 µl des Pools und die DNA-Isolation wurde mit diesem Material wie unter Kap. 3.3.1 durchgeführt. Bei Analysen des Chlamydien-Pools wurde zusätzlich zur Mykoplasmen-PCR (Kap. 3.3.1) eine PCR auf genomische chlamydiale DNA durchgeführt, um die erfolgreiche DNA-Isolation zu belegen.

Chlamydia-PCR-Ansatz		PCR-Programm	
Isolierte DNA	1 µl	95 °C	10 min
C-225	1 µl	95 °C	1 min
C-2191	1 µl	51 °C	1 min
dNTPs (25 mM)	0,48 µl	72 °C	1 min
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl	72 °C	7 min
Taq-PCR Puffer (10x)	3 µl	16 °C	∞
Taq Polymerase	0,3 µl		
ddH ₂ O	21,42 µl		

40x Zyklen

Produkt ~120 bp

Behandlung kontaminierter Chlamydienstämme:

Zuvor muss abgeschätzt werden, wieviel Chlamydien eingesetzt werden müssen. Die Behandlung der Chlamydien mit Igepal CA-630 senkt die Infektiosität der Chlamydien etwa um 75%! Weniger chlamydiale Partikel im Ansatz steigern die Effizienz der Behandlung, reduzieren aber unter Umständen die nachfolgende Infektionseffizienz zur Erholung. Als Richtwert sollten maximal 1 ml Chlamydien-Pool pro Ansatz eingesetzt werden. Wenn mehr infektiöses Material benötigt wird, sollten mehrere Reinigungen parallel durchgeführt und zur Infektion vereint werden. Das hier dargestellte Protokoll repräsentiert eine modifizierte Version anderer Protokolle (Castilla & Wadowsky 2000).

- Die Chlamydien werden für 20 min bei 4 °C und 15000 Upm (21885 xg Biofuge Primo R) pelletiert.
- Das Pellet wird in 150 µl des verbleibenden Überstandes vollständig resuspendiert.
- Es werden nacheinander 840 µl HBSS und 10 µl 10 % Igepal C-630-Lösung (in HBSS) hinzugefügt und die Probe durch Vortexen gemischt.
- Die Probe wird für 10 min bei 4 °C inkubiert und die Chlamydien anschließend durch Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 15000 Upm (21885 xg Biofuge Primo R) pelletiert.
- Das Chlamydien-Pellet wird insgesamt zweimal mit 500 µl HBSS gewaschen und durch Zentrifugation pelletiert.
- Die Chlamydien sollten anschließend sofort für eine Infektion zur Erholung in HEp-2 Zellen verwendet und nicht eingefroren gelagert werden (vgl. Kap. 3.4.2).
- Die Infektion sollte mindestens 72 h bis 96 h erlaubt werden, bevor die Chlamydien geerntet und der Überstand erneut durch Mykoplasmen-PCR getestet wird.
- Zur vollständigen Erholung der chlamydialen Partikel von der Behandlung sollten zwei weitere Infektionsrunden ohne Behandlung mit Anlegen eines Chlamydien-Pools durchgeführt werden. Dabei wird der Zustand des Bakterienstamms durch Mykoplasmen-PCR überwacht.

Eine prophylaktische Behandlung der chlamydialen Stämme ist nicht möglich, da Plasmocin auch zum vollständigen Absterben der Chlamydien führt. Deshalb sind in einigen Fällen zwei oder drei Behandlungsrunden nötig, um einen Chlamydien-Pool vollständig und nachhaltig von Mykoplasmen zu befreien. Die Igepal CA630 Konzentration kann ebenfalls angepasst

werden. Jedoch gilt: weniger als 0,04 % Igepal CA630 Endkonzentration ist nicht ausreichend, um Mykoplasmen abzutöten, mehr als 0,1% Igepal CA630 dagegen setzt die Infektionsrate nach der Behandlung extrem herab (Castilla & Wadowsky 2000).

3.4.2 Chlamydieninfektion und Kultivierung in Humanzellen

Durch das Anlegen eines sog. Chlamydien-Pools war es möglich, Chlamydien zu lagern und sofort auf infektiöse Partikel zuzugreifen, ohne eine langwierige Vorinfektion durchzuführen.

- HEp-2 Zellen werden in Zentrifugations-beständiges Zellkulturmaterial (Well Platten oder Zellkulturflaschen) ausgesät und bis zum gewünschten Grad der Konfluenz bei 37 °C und 6 % CO₂ im Inkubator kultiviert.
- Die Chlamydien aus einem geeigneten, Mykoplasmen-freien Pool werden bei RT aufgetaut.
- Die gewünschte Menge an chlamydialen Partikeln wird in neuem serumhaltigem Zellkulturmedium verdünnt.
- Das alte Zellkulturmedium wird von den Zellen entfernt und durch die Chlamydien suspension ersetzt.
- Die Effizienz der Infektion wird durch Zentrifugation der Humanzellen mit der Chlamydien suspension für 1 h bei 30 °C und 2920 Upm (1620 xg Rotanta 460R) signifikant gesteigert.
- Anschließend werden die Zellen bei 37 °C und 6 % CO₂ für 1 – 2 h inkubiert und danach das alte Zellkulturmedium gegen frisches Medium mit 1,5 µg/ml Cycloheximid ersetzt.
- Die Infektion wird dann bis zum gewünschten Zeitpunkt erlaubt und für Folgeexperimente weiterverarbeitet oder die Chlamydien zur Generierung eines Chlamydien-Pools geerntet.
- Zur Chlamydien ernte werden die infizierten HEp-2 Zellen in den Flaschen im verbleibenden Medium mittels Zellkulturschaber abgelöst.
- Die Freisetzung der Chlamydien in der Zellsuspension erfolgt über Ultraschallpulse (Sonopuls HD2200; Pulsfrequenz: dreimal 10 sek 40 % Puls, 10 sek Pause) bei Eiskühlung.
- Die aufgeschlossene Zellsuspension wird dann mittels zweimaliger Zentrifugation für 10 min bei RT und 2670 Upm (1355 xg Rotanta 460R) von groben Zellrückständen getrennt, wobei der Überstand aufbewahrt wird.
- Die so erhaltene Chlamydien suspension wird dann im Verhältnis 1:1 mit SPG-Puffer verdünnt, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.4.3 Bestimmung der Infektiösität einer Chlamydien suspension

Die Bestimmung der Infektiösität einer Chlamydien suspension, wie etwa einem Pool, folgte einem bereits zuvor beschriebenen Protokoll (Engel 2015). Die Infektiösität wurde dabei

durch Titration als inklusionsbildende Einheiten (IFU) pro ml Chlamydien suspension bestimmt.

- In einer 96-Well Platte werden Humanzellen ausgesät und 24 h zur vollständigen Konfluenz wachsen gelassen.
- Die zu testende Chlamydien suspension wird bis zur Verdünnung 10^{-10} schrittweise mit Zellkulturmedium verdünnt.
- Das alte Zellkulturmedium wird entfernt, die Zellen einmal mit 100 µl neuem Zellkulturmedium gewaschen und die Humanzellen mit je 100 µl der verdünnten Chlamydien suspension überschichtet.
- Die Platte wird anschließend für 1 h bei 37 °C und 2920 Upm (1620 xg Rotanta 460R) zentrifugiert und danach für 1 h bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert.
- Das alte Zellkulturmedium wird entfernt und Zellen vorsichtig mit 1 ml neuem Zellkulturmedium + 1,5 µg/ml Cycloheximid überschichtet.
- Die Zellen werden für 48 h bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert.
- Das alte Zellkulturmedium wird entfernt und die Zellen mit 100 µl HBSS gewaschen.
- Die Zellen werden dann für 10 min mit je 50 µl 96 % Methanol bei RT fixiert und mit Antikörpern gegen das chlamydiale LPS (Pathfinder) 30 min lang bei RT gefärbt.
- Die Zellen werden zweimal mit 100 µl 1xPBS gewaschen und die Platte mittels Druckluft getrocknet.
- Die Inklusionen pro Vertiefung wurden mittels Immunfluoreszenzmikroskopie gezählt und die Zahl der Inklusions-bildenden Partikel pro ml Chlamydien suspension berechnet.

3.4.4 Chlamydienreinigung über diskontinuierlichen Gastrografin-Gradient

Die Aufreinigung chlamydialer Partikel über einen Gastrografin-Gradient wurde verwendet um größere Mengen infektiöser chlamydialer Partikel mit einer höheren Reinheit zu gewinnen. Die Gradienten-gereinigten Chlamydien wurden dann hauptsächlich für Kurzzeitinfectionen verwendet, da dabei große Mengen infektiöser Chlamydien benötigt werden.

- 24 konfluent mit HEp-2 Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen werden mit *C. pneumoniae* infiziert (MOI=2) und 96 hpi in je 1 ml eiskaltem HBSS mit einem Zellkulturschaber geerntet.
- Verbleibende Zellen werden abermals mit 1 ml HBSS gelöst und alle erhaltenen Zellsuspensionen für 10 min bei 2920 Upm (1620 xg Rotanta 460R) zentrifugiert.
- Die erhaltenen Zellpellets werden vereinigt und in 10 ml Erntepuffer vollständig resuspendiert.

- Zum Freisetzen der chlamydialen Partikel aus den Zellen wird die Probe mit Ultraschallpulsen (Sonopuls HD2200; Pulsfrequenz: dreimal 10 sek 40 % Puls, 10 sek Pause) bei Eiskühlung aufgeschlossen.
- Die aufgeschlossene Zellsuspension wird für 30 min bei 37 °C inkubiert.
- Anschließend wird die Probe auf 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und für 10 min bei 4 °C und 15000 Upm (21885 xg Biofuge Primo R) zentrifugiert.
- Die erhaltenen Zellpellets werden vereinigt und in 2 ml Erntepuffer vollständig resuspendiert (wenn nötig unter Zuhilfenahme eines Ultraschallbades).
- In einem Corex-Röhrchen wird dann der diskontinuierliche Gastrografin-Gradient mit der Zellsuspension hergestellt, indem vorsichtig die einzelnen Schichten in der angegebenen Reihenfolge übereinander geschichtet werden:
 1. 1,6 ml 50 % Gastrografin
 2. 6,4 ml 20 % Gastrografin
 3. 2 ml der hergestellten Zellsuspension
- Der Gradient wird für 1 h bei 4 °C und 15000 Upm (27167 xg Beckmann J2-21) zentrifugiert.
- Die beiden oberen Schichten werden vorsichtig entfernt und die milchige Sprungschicht zwischen 20 % und 50 % Gastrografin, die chlamydiale Partikel enthält, isoliert (Abb. 3.1 A).

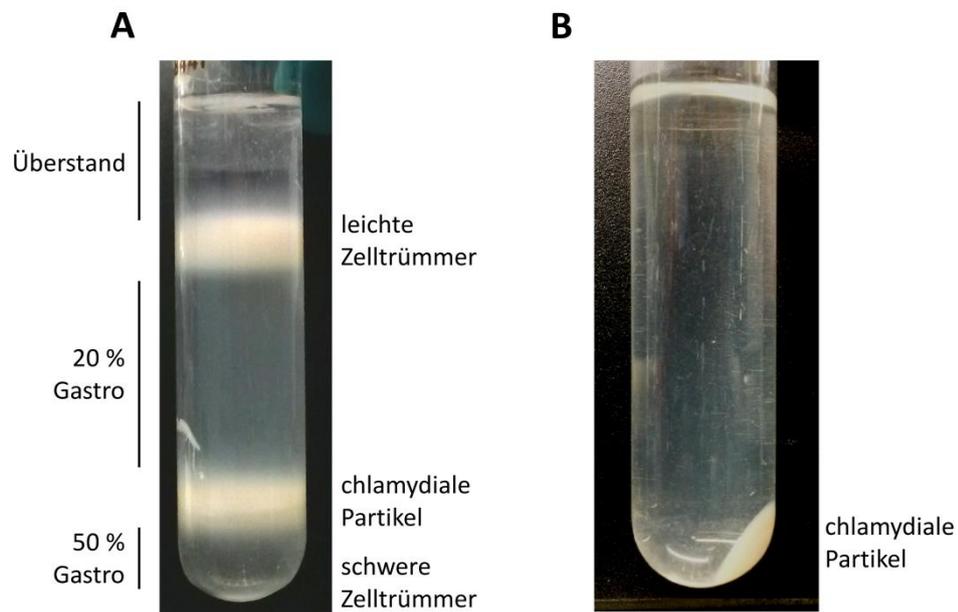


Abb. 3.1: Gradientenreinigung von chlamydialen Partikeln

(A) Beispielhafte Aufreinigung der aufgeschlossenen Zellsuspension mit chlamydialen Partikeln im diskontinuierlichen Gastrografin-Gradient. Die Dokumentation erfolgte nach der Zentrifugation mit Beschriftung der sichtbaren Fraktionen. (B) Isolierte chlamydiale Partikel nach Waschschritten in SPG-Puffer und Zentrifugation, aber bevor Resuspension in SPG-Puffer und Lagerung bei -80 °C erfolgte.

- Zu der erhaltenen Chlamydiensuspension werden 10 ml SPG-Puffer hinzugefügt und für 30 min bei 4 °C und 15000 Upm (27167 xg Beckmann J2-21) zentrifugiert.

- Das erhaltenen Pellet wird noch zweimal mit je 10 ml SPG-Puffer gewaschen und für 30 min bei 4 °C und 15000 Upm (27167 xg Beckmann J2-21) zentrifugiert (Abb. 3.1 B).
- Die gradientengereinigten Chlamydien werden abschließend in 1 ml SPG-Puffer resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.4.5 Kurzzeitinfektion in Humanzellen

Das Vorgehen bei der Kurzzeitinfektion gleiche weitestgehend dem Protokoll der normalen Infektion mit einigen Modifikationen. Die Angabe der Infektionsdauer (in dieser Arbeit standardmäßig 20 min pi) repräsentierte dabei den Zeitraum vom Start der Zentrifugation bis zur Zugabe der Fixierlösung.

- Für die Kurzzeitinfektion werden gradientengereinigte Chlamydien bei einer MOI von 50 verwendet.
- Die Chlamydien werden in je 200 µl vorgewärmtem Medium pro Well (bei einer 24-Well Platte) resuspendiert.
- Das alte Medium wird von den Zellen entfernt und durch die vorgewärmte Chlamydien suspension ersetzt.
- Die Platte wird kurz geschwenkt und unverzüglich für 10 min bei 37 °C und 2920 Upm (1620 xg Rotanta 460R) zentrifugiert.
- Anschließend werden die Zellen weitere 5 min bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert und das Zellkulturmedium durch 0,5 ml vorgewärmtem SNaPi-Puffer ersetzt. [Wird eine Fixiermethode in Abwesenheit von SNaPi benötigt, so kann dieser Schritt entfallen und die Inkubationsdauer im Zellkulturmedium auf 10 min erhöht werden.]
- Nach weiteren 5 min Inkubation bei 37 °C und 6 % CO₂ wird die Probe mit der gewünschten Fixiermethode behandelt (vgl. Kap. 3.6.9).

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 DNA-Amplifikation über Polymerase-Kettenreaktion

Die DNA-Amplifikation über Polymerase-Kettenreaktion folgte der bereits zuvor beschriebenen Vorgehensweise (Hänsch 2011).

Die Amplifikation erfolgt zyklisch, wobei jeder Zyklus die drei typischen Reaktionsschritte umfasst: Denaturierung, Annealing und Elongation. Die Temperatur des Annealing-Schrittes hängt dabei von der Beschaffenheit des eingesetzten Oligonukleotid-Primers und der verwendeten Polymerase ab:

$$(3 * x + 2 * y) - 2 \text{ °C} = [\text{°C}] \quad (\text{Taq- und Pfx}^{\text{TM}}\text{-Polymerase})$$

$$55 \text{ bis } 65 \text{ °C} \quad (\text{AllIn}^{\text{TM}}\text{-Polymerase})$$

$$50 \text{ °C} \quad (\text{Dimer-PCR})$$

x: Anzahl der Guanin- und Cytosin-Basen innerhalb der Oligonukleotidsequenz, die komplementär zur Matrize sind.

y: Anzahl der Adenin- und Thymin-Basen innerhalb der Oligonukleotidsequenz, die komplementär zur Matrize sind.

Die o. g. Formeln stellt die verwendete Temperatur der Annealing-Phase dar. Die Temperatur der Elongationsphase hängt von der Art der verwendeten thermostabilen DNA-Polymerase ab, wobei Taq-Polymerasen 72 °C und Pfx-Polymerasen 68 °C benötigen. Die Dauer der Elongationszeit beträgt dabei etwa 1 min pro 1000 nt. Zusammengefasst sind die Bedingungen und Zusammensetzungen der durchgeführten PCRs im Folgenden dargestellt. Die Amplifikationen mittels der AllInTM-Polymerase folgten den Herstellervorgaben.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
primäre Denaturierung	95 °C	5 min	25x
Denaturierung	95 °C	1 min	
Annealing	x [°C]	1 min	
Elongation	68 °C / 72 °C	x min	
finale Elongation	68 °C / 72 °C	7 min	
Abkühlen	16 °C	∞	

Pfx-PCR		Taq-PCR	
x µl	Template-DNA (ca. 100 ng)	x µl	Template-DNA (ca. 100 ng)
1 µl	Oligonukleotid 1 (50 pmol/µl)	1 µl	Oligonukleotid 1 (50 pmol/µl)
1 µl	Oligonukleotid 2 (50 pmol/µl)	1 µl	Oligonukleotid 2 (50 pmol/µl)
5 µl	dNTPs (4 mM)	5 µl	dNTPs (4 mM)
5 µl	Pfx-Puffer (10x)	5 µl	Taq-Puffer (10x)
1 µl	Pfx-Polymerase (1 U/µl)	1 µl	Taq-Polymerase (1 U/µl)
4 µl	MgSO ₄ (25 mM)	4 µl	MgCl ₂ (25 mM)
33 - x µl	ddH ₂ O	33 - x µl	ddH ₂ O

Eine Sonderform der PCR stellt die direkte PCR auf Zellmaterial dar. Dabei wird das Zellmaterial in angemessener Menge zuvor in 20 µl 0,02 mM NaOH resuspendiert und für etwa 30 min bei 100 °C inkubiert. Die aufgeschlossene Zellsuspension kann dann in einem modifizierten PCR-Protokoll getestet werden.

Schritt	Temp.	Zeit	PCR Ansatz
primäre Denaturierung	94 °C	10 min	5 µl Zellsuspension
Denaturierung	94 °C	1 min	0,3 µl Oligonukleotid 1 (50 pmol/µl)
Annealing	x [°C]	1 min	0,3 µl Oligonukleotid 2 (50 pmol/µl)
Elongation	72 °C	x min	0,24 µl dNTPs (25 mM)
Finale Elongation	72 °C	7 min	3 µl Taq-Puffer (10x)
Abkühlen	16 °C	∞	0,3 µl Taq-Polymerase (1 U/µl)
			1,8 µl MgCl ₂ (25 mM)
			14,06 µl ddH ₂ O

Eine weitere Sonderform stellt die PCR zur Generierung von doppelsträngigen PCR-Fragmenten aus Dimeren von Oligonukleotiden dar. Dafür werden Oligonukleotide vermischt, die einen komplementär überlappenden Bereich aufweisen und von dem eine Elongation stattfinden kann. Das so generierte PCR-Fragment kann zur homologen Rekombination verwendet werden.

Schritt	Temp.	Zeit	PCR-Ansatz
primäre Denaturierung	94 °C	1 min	5 µl Oligonukleotid 1 (50 pmol/µl)
Denaturierung	94 °C	30 sek	5 µl Oligonukleotid 2 (50 pmol/µl)
Annealing	x [°C]	30 sek	5 µl dNTPs (25 mM)
Elongation	72 °C	30 sek	5 µl Taq-Puffer (10x)
Finale Elongation	72 °C	30 sek	1 µl Taq-Polymerase (1 U/µl)
Abkühlen	16 °C	∞	4 µl MgCl ₂ (25 mM)
			25 µl ddH ₂ O

3.5.2 Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen

Die Spaltung von DNA-Proben erfolgte über die unter Kap. 2.1.1 beschriebenen Restriktionsenzyme nach Herstellerangaben.

3.5.3 Transformation *S. cerevisiae* und homologe Rekombination *in vivo*

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

Die Integration von DNA-Fragmenten in Plasmide über homologe Rekombination *in vivo* folgte der bereits zuvor beschriebenen Vorgehensweise (Hänsch 2011).

Um ein gewünschtes DNA-Fragment in einen Vektor zu integrieren, wird dieses mittels PCR amplifiziert. Für die PCR werden zwei Oligonukleotide verwendet, die jeweils am 5'-Ende 40 nt Homologie zur Integrationssequenz des Ziel-Plasmids tragen, sowie am 3'-Ende 18 - 22 nt Homologie zum Ziel-Gen besitzen. Für die Integration des Fragments in den Zielvektor wird dieses zusammen mit dem zuvor linearisierten Ziel-Plasmid in Hefe

transformiert. Das molare Verhältnis von linearisiertem Vektor zum PCR-Produkt sollte dabei im Idealfall bei 1:3 liegen. Infolge der homologen Bereiche des PCR-Produktes und des Ziel-Plasmides wird in der Hefe das amplifizierte Gen über homologe Rekombination in das Plasmid integriert und Transformanten können durch entsprechende Selektionsmedien identifiziert werden.

3.5.4 DNA-Isolation aus *S. cerevisiae*

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

3.5.5 Transformation von *E. coli* über Elektroporation

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

3.5.6 Transformation von *E. coli* über 1-Minuten-Protokoll

Die Transformation von *E. coli* über 1-Minuten-Protokoll folgte einem bereits zuvor beschriebenen Protokoll (Hänsch 2011).

- 7 µl DMSO kompetente Zellen (hergestellt durch die Arbeitsgruppen Hegemann und Fleig) werden auf Eis aufgetaut.
- Die Zellen werden mit 1 µl DNA (10 - 100 ng) auf Eis gemischt.
- Der Ansatz wird für 1 min bei 42 °C erhitzt.
- Die Probe wird sofort in 100 µl LB-Medium aufgenommen und auf einer LB-Selektivmedien-Platte ausplattiert.
- Die Platte wird ü/N bei 37 °C inkubiert.

3.5.7 Plasmid isolation im mini-Maßstab

Das Verfahren beruhte auf einer von der Firma Qiagen modifizierten Methode der alkalischen Lyse nach Maniatis (Sambrook 1989).

3.5.8 Plasmid isolation im MIDI-Maßstab

Die Methode beruhte auf dem Verfahren der alkalischen Lyse und der Reinigung der DNA über eine Säule. Diese Technik war als MIDI-Plasmid Kit (Qiagen) beschrieben und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.5.9 Auftrennung von DNA-Proben mittels Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Proben mittels Agarosegel-Elektrophorese folgte einem bereits zuvor beschriebenen Protokoll (Hänsch 2011).

Zur präparativen oder analytischen Auftrennung von DNA-Molekülen werden Agarosegele verwendet. Die Porengröße der Gele und damit auch ihre Auftrennungseigenschaft hängen dabei direkt von der Agarosekonzentration ab. Standardmäßig wurden 0,7 % Agarosegele verwendet. In Anwesenheit eines elektrischen Feldes (100 – 180 V) in der Elektrophoresekammer wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente Richtung Anode und werden aufgrund ihrer Größe aufgetrennt. Hierbei gilt: je kleiner das Fragment ist, desto schneller wandert es durch das Gel. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid (1 µg/ml), einem DNA-interkalierendem Farbstoff, kann die DNA unter UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht werden. Zur Größenbestimmung der einzelnen DNA-Fragmente wird ein Längenmarker aufgetragen.

3.5.10 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration folgte einem bereits zuvor beschriebenen Protokoll unter Verwendung des NanoDrop 2000C von PeqLab (Hänsch 2011).

- Zur Messung wird 1 µl der DNA-Probe (ca. 10 ng/µl – 10 µg/µl) eingesetzt. Der Abgleich wird mit 1 µl ddH₂O durchgeführt.
- Das Absorptionsergebnis bei 260 nm entspricht der Menge der DNA in µg/µl der Probe.
- Die Reinheit der DNA-Lösung kann durch Messung des Quotienten zwischen der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt werden. Dieser Quotient sollte im Optimalfall zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.6 Biochemische Methoden

3.6.1 Proteinaufreinigung mittels denaturierender Lyse und Dialyse

Der *E. coli* Stamm BL₂₁ wurde zur Expression der rekombinanten Proteine rCPn0712-A_{10xHis}, rCPn0677_{6xHis} und rCPn0678_{6xHis} verwendet. Nach der denaturierenden Lyse wurden die Proteine aus dem geklärten Lysat die Affinität des 10xHis- oder 6xHis-Tags zu Ni-NTA-Agarose gereinigt und konzentriert. Für rCPn0712-A_{10xHis} wurde die Ni-NTA-Agarose von Quiagen verwendet, während zur Aufreinigung der Proteine rCPn0677_{6xHis} und rCPn0678_{6xHis} die Ni-NTA-Agarose von Roche verwendet wurde. Die so aufgereinigten Proteine wurden

anschließend über Dialyse renaturiert. Das im Folgenden angegebene Protokoll stellt den Ablauf für die Reinigung von rCPn0677_{6xHis} und rCPn0678_{6xHis} dar. Abweichungen für die Aufreinigung von rCPn0712-A_{10xHis} sind in eckigen Klammern angegeben.

- Die Proteinexpression wird wie unter Kap. 3.2.2 induziert und die Zellen geerntet.
- Nach dem Auftauen werden die Zellen mit 5 ml Puffer B pro ml der aufgetauten Zellsuspension versetzt (durchschnittlich auf ca. 25 ml Gesamtvolumen).
- Zur Lyse werden die Zellen ü/N bei RT am Rad inkubiert.
- Um den Zellaufschluss zu unterstützen, wird das Lysat mit Ultraschallpulsen (Sonopuls HD2200; Pulsfrequenz: viermal 10 sek 40 % Puls, 10 sek Pause) auf Eiskühlung weiter verflüssigt.
- Das erhaltene Lysat wird zur Klärung für 20 min bei 12 °C und 15000 Upm (27167 xg Avanti J-25) zentrifugiert.
- Das geklärte Lysat im Überstand wird vom Pellet getrennt und mit 0,5 ml Ni-NTA-Agarose (cComplete his-tag purification resin, Roche) [rCPn0712-A_{10xHis} Lysat mit 20 mM Imidazol (Endkonzentration), Ni-NTA-Agarose, Qiagen] versetzt.
- Die Bindung der Proteine erfolgt durch Inkubation des Gemisches für 2 – 4 h bei RT am Rad.
- In eine Polystyren-Protein-Säule wird eine Polyethylen-Fritte eingelegt, das Protein-Agarose-Gemisch in die Säule gegeben und so die Agarose vom Durchfluss getrennt.
- Das an der Ni-NTA-Agarose gebundene Protein wird mit 10 ml Puffer B + 5 mM Imidazol gewaschen [rCPn0712-A_{10xHis} + 60 mM Imidazol] gewaschen.
- Das an der Ni-NTA-Agarose gebundene Protein wird dann mit 10 ml Puffer C + 5 mM Imidazol [rCPn0712-A_{10xHis} + 80 mM Imidazol] abermals gewaschen.
- Das gebundene Protein wird letztendlich fünfmal mit je 1 ml Puffer C + 250 mM Imidazol nach 5 min Inkubationszeit eluiert und aufgefangen.
- Nach der Messung der Analysen auf den Proteingehalt mittels Bradford Reagenz und Qualitätsprüfung in einer SDS-PAGE werden die Proteine mittels Dialyse renaturiert.
- Von einem Dialyseschlauch wird ein etwa 5 – 10 cm langes Stück abgeschnitten und 10 min in ddH₂O gekocht.
- Nach dem Abkühlen wird die Proteinprobe in den einseitig mit einer Klemme verschlossenen Schlauch pipettiert.
- Anschließend wird der Dialyseschlauch am anderen Ende mit einer weiteren Klemme möglichst luftblasenfrei verschlossen.
- Die Proteinprobe wird dreimal gegen je 1 l kaltes 1xPBS + 1 % Glycerin + 2 mM EDTA [rCPn0712-A_{10xHis} nur 1xPBS] unter leichtem Rühren bei 4 °C für mindestens 6 h oder ü/N, dialysiert.

- Zur schrittweisen Entfernung des Glycerins und des EDTAs werden die Proben abschließend dreimal gegen je 1 l kaltes 1xPBS unter leichtem Rühren bei 4 °C für mindestens 6 h oder ü/N dialysiert.

3.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford-Reagenz

Die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe erfolgt nach Herstellerangaben. Der ermittelte Umrechnungsfaktor betrug in dieser Arbeit 0,06. Zur Berechnung der Konzentration ergibt sich dann folgende Formel:

$$c = A / 0,06 / V$$

wobei gilt: c = Proteinkonzentration in µg/µl
A = Absorption bei 595 nm
V = Volumen der eingesetzten Probenmenge in µl

3.6.3 Aufbereitung von Proben für SDS-PAGE

Die Aufbereitung von Proben für die SDS-Page erfolgte, wenn nicht anders angegeben, durch Hinzufügen von (µl = 0,15 x Probenvolumen) 1 M DTT und (µl = 0,35 x Probenvolumen) SDS-Blaumarker. Die jeweilige Probe wurde dann durch Vortexen gemischt und für 10 min bei 100 °C inkubiert. Dieses Verfahren wurde hauptsächlich für Proteinproben angewendet.

Proteinproben aus unverarbeiteten Zellsuspensionen (z.B. infizierte HEp-2 Zellen, *E. coli* Zellen oder *S. cerevisiae* Zellen) mussten zusätzlich verflüssigt werden, damit eine Trennung in der SDS-PAGE erfolgen konnte. Dazu wurden die Zellproben in angemessenem Volumen P-Lysis-Puffer aufgenommen und falls nötig zuvor durch Zentrifugation pelletiert. Die P-Lysis-Zellsuspension wurde dann durch Ultraschallpulse (Sonopuls HD2200; Pulsfrequenz: viermal 10 sek 40 % Puls, 10 sek Pause) auf Eiskühlung weiter verflüssigt. DTT und SDS-Blaumarker wurden dann wie oben angegeben hinzugefügt, durch Vortexen gemischt und die Probe für 30 min bei 100 °C mit gelegentlichem Vortexen inkubiert.

3.6.4 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Gelelektrophorese folgte einem bereits zuvor beschriebenen Protokoll (Hänsch 2011).

Die Auftrennung folgt dem Prinzip, dass Proteine zuerst denaturiert, dann mittels einer Spannung der Größe nach in einem Polyacrylamid-Geflecht getrennt werden. Es wird für die Analyse von Proteinen je nach erwartetem Molekulargewicht die Acrylamid-Prozentigkeit des Gels angepasst.

- Hergestellte Gele werden in die dafür vorgesehene Kammer gespannt und mit 1xLaufpuffer soweit aufgefüllt, dass das Gel an beiden Seiten Kontakt zum Puffer hat.

- Anschließend werden die Gele pro Ladetasche mit der Probe beladen und an die Elektrophorese-Kammer wird eine Spannung angelegt (100 - 200 V bei max. 50 mA).
- Nach der Elektrophorese werden die Gele mit Coomassie-Brillant-Blau oder Westernblot analysiert.

3.6.5 Westernblot-Analyse und Immundetektion

Die Westernblot-Analyse folgte einem bereits zuvor beschriebenen Protokoll (Hänsch 2011). Dieses Verfahren beruht darauf, Proteine aus einem Polyacrylamidgel mittels Spannung auf eine PVDF-Membran zu übertragen und so zu immobilisieren.

- Es werden zwei Filterpapiere auf die Maße 7 x 9 cm zurechtgeschnitten und in Transferpuffer inkubiert.
- Es wird ein Stück PVDF-Membran (7 x 9 cm) kurz in Methanol inkubiert und dann mit Transferpuffer gespült.
- Ein Filterpapier wird sorgfältig auf die untere Edelstahlplatte der Westernblot-Kassette gelegt.
- Die Membran wird aufgelegt und sichergestellt, dass sich keine Luftblasen zwischen Membran und Filterpapier befinden.
- Die Elektrophorese-Apparatur wird auseinandergebaut, das Gel von der Aluminiumplatte gelöst und luftblasenfrei auf die Membran gelegt.
- Der Stapel wird mit dem verbleibenden Filterpapier bedeckt.
- Etwaige Luftblasen werden durch vorsichtiges Auswalzen mit einer sterilen Glaspipette entfernt.
- Die obere Hälfte der Westernblot-Kassette wird auf den Stapel gelegt und das geeignete semi-dry-Standardprogram ausgewählt.
- Die Dauer des Transfervorganges sollte entsprechend der Größe der Proteine angepasst werden: ~ 25 min (Proteine < 75 kDa) bzw. ~ 30 - 35 min (Proteine > 75 kDa).
- Der Strom wird ausgeschaltet, die Westernblot-Kassette abgebaut und die PVDF-Membran vorsichtig für 1 h unter leichtem Schütteln in WB-Blockierungslösung inkubiert.

Zur Analyse der Membranen aus einem Westernblot können spezifische Primär-Antikörper eingesetzt werden, die an die immobilisierten Proteine binden. Sekundär-Antikörper (mit alkalischer Phosphatase gekoppelt), die an die primären Antikörper binden, werden zur späteren Detektion über eine Farbreaktion eingesetzt.

- Die Membran wird mit dem Primär-Antikörper (verdünnt in 2 – 5 ml WB Blockierungs-Lösung) inkubiert.
- Die PVDF-Membran wird 1 h bei RT oder ü/N bei 4 °C in der Antikörperlösung unter rotierendem Schwenken inkubiert.

- Die Antikörperlösung wird entfernt und die Membran dreimal für jeweils 10 min mit 1xPBS gewaschen.
- Die Membran wird mit dem Sekundär-Antikörper (verdünnt in 2 – 5 ml Blockierungs-Lösung) 1 h bei RT oder ü/N bei 4 °C inkubiert.
- Die Membran wird dreimal für jeweils 10 min mit 1xPBS gewaschen.
- Die Membran wird für 5 min in 25 ml Detektionspuffer inkubiert.
- Anschließend wird die Membran zur Farbentwicklung mit 25 ml Farbsubstrat-Lösung (Detektionspuffer + 66 µl BCIP-Lösung + 66 µl NBT-Lösung) für 5 min bis zu mehreren Stunden inkubiert.
- Die Farbreaktion wird durch mehrfaches Waschen mit Wasser gestoppt.

3.6.6 Crosslinken von Proteinkomplexen in Lösung

Um oligomere Zustände von gereinigten Proteinen in Lösung zu fixieren, wurde Glutaraldehyd als unspezifische Crosslink-Chemikalie eingesetzt. Die renaturierten Proteine wurden durch Zugabe von Glutaraldehyd in Lösung fixiert, die Crosslink-Reaktion abgestoppt und die erhaltenen Komplexe in der SDS-Page getrennt.

- Rekombinante Proteine in Lösung (möglichst 1xPBS) werden durch Zentrifugation für 1 h bei 4 °C und 15000 Upm (21885 xg Biofuge Primo R) von möglichen Präzipitaten getrennt.
- Der Überstand, der nur lösliche Proteine enthält, wird vorsichtig vom entstandenen Pellet abgenommen.
- Die gewünschte Menge an Protein (in dieser Arbeit: 32,5 µl bei max. 0,69 µg/µl oder min. 0,08 µg/µl) wird mit 3 mM Glutaraldehyd (Endkonzentration) versetzt, gemischt und für 30 min bei RT inkubiert.
- Als Kontrollen dienen Proben, die nicht mit Glutaraldehyd versetzt werden oder die unmittelbar vor der Crosslink-Reaktion für 10 min bei 100 °C denaturiert werden.
- Durch Zugabe von 150 mM Tris pH 7 (Endkonzentration) wird die Crosslink-Reaktion gestoppt, anschließend gemischt und weitere 30 min bei RT inkubiert.
- Die Proben werden dann durch Zugabe von (µl = 0,15 x Probenvolumen) 1 M DTT und (µl = 0,38 x Probenvolumen) SDS-Blaumarker und durch Inkubation der Proben für 10 min bei 100 °C für die Analyse in der SDS-PAGE vorbereitet.
- Die Detektion erfolgt über Coomassie-Färbung im Polyacrylamidgel.
- Dafür wird das Proteingel in ddH₂O gelegt, 30 sek bei 360 Watt in der Mikrowelle erwärmt und anschließend 10 min unter leichtem Schwenken inkubiert (bis zu 3-mal).
- Die Färbung erfolgt nach Erhitzen für 30 – 60 sek bei 360 Watt in der Mikrowelle mit Coomassie-Brillant-Blau-Lösung und Inkubation für 10 min bis 2 h unter leichtem Schwenken.

- Die Coomassie-Lösung wird abgenommen und der Kontrast der Färbung durch Entfärben deutlich erhöht. Dazu wird das Proteingel für 30 – 60 sek bei 360 Watt in Coomassie-Entfärbelösung erhitzt und bis zum gewünschten Entfärbungsgrad unter leichtem Schwenken inkubiert.
- Das Proteingel wird abschließend mehrmals in ddH₂O in der Mikrowelle erhitzt und unter leichtem Schwenken einige Minuten inkubiert.

3.6.7 Antikörperaufreinigung

Die Aufreinigung von Antikörpern über Antigenaffinität folgte mit Modifizierungen einem Protokoll nach Harlow und Lane (Harlow & Lane 1999) und nach Herstellerangaben. Die gesamte Aufreinigung wurde bei 4 °C durchgeführt, wobei alle verwendeten Puffer und Lösungen vorgekühlt wurden.

- 1,5 ml NHS-Sepharose wird in eine Polystyren-Säule mit poröser Polyethylen-Fritte gegeben.
- Durch Zugabe von 20 ml 1 mM HCl wird die Sepharose gewaschen.
- Die NHS-Sepharose wird danach mit 10 ml Kopplungspuffer gewaschen.
- 2 mg rekombinantes Protein (1 mg möglich, aber weniger effizient) wird mit Kopplungspuffer gemischt (Verhältnis: 1xKopplungspuffer : 2xProteinvolumen).
- Das Gemisch wird am Rad zuerst bei 4 °C 1,5 h mit der NHS-Sepharose inkubiert gefolgt von 30 min Inkubation bei RT. Der Durchfluss kann zur Messung der Bindungseffizienz über Bradford-Reagenz aufgefangen werden.
- Zum Blockieren nicht gebundener Seitengruppen werden 4 ml 0,1 M Tris pH 8,5 hinzugefügt, kräftig gemischt und für 4 h bei 4 °C inkubiert.
- Anschließend wird die Sepharose insgesamt viermal gewaschen. Jeder Waschzyklus besteht dabei aus dreimaligem Spülen mit je 1 ml Puffer A1 (0,1 M Tris, pH = 8,0) gefolgt von dreimal 1 ml Puffer A2 (0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl, pH = 4,0). Abschließend wird dreimal mit je 1 ml Puffer A1 gespült.
- 3 ml polyklonales Antikörperserum wird mit 8 ml Puffer A1 gemischt und mit der NHS-Sepharose für 1 h bei RT am Rad inkubiert.
- Der Durchfluss wird aufgefangen, mit 10 ml 10 mM Tris pH = 7,5 gewaschen.
- Anschließend wird mit 10 ml 500 mM NaCl, 10 mM Tris pH = 7,5 gewaschen.
- Die Elution der spezifischen Antikörper teilt sich in saure und basische Elution:
- Um pH-Werte der folgenden Elution zu neutralisieren, werden die Eluate jeweils in 15 ml Falcon-Reaktionsgefäßen aufgefangen, in denen je 0,3 ml 1 M Tris pH = 9,0 vorgelegt werden.
- Die erste und zweite saure Elution der Antikörper werden mit je 3 ml 100 mM Glycin pH = 2,5 und Inkubationszeiten von jeweils 10 min durchgeführt.

- Die erste und zweite basische Elution der Antikörper werden mit je 3 ml 0,1 M Triethanolamin pH = 11,5 und Inkubationszeiten von jeweils 10 min durchgeführt.

Die affinitätsgereinigten Antikörper-Fractionen werden in kleineren Volumina aliquotiert, um wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden, und auf -20 °C gelagert. Zur zusätzlichen Stabilisierung der aufgereinigten Antikörper können diese mit gleichem Volumen an 96 % Glycerin gemischt werden (~ 50 % Endkonzentration), falls Stärke und Qualität der Antikörper dies zulassen. Im Falle von bereits vorhandenen α -CPn0678 Antikörpern wurde die Qualität über Abreicherung gegen unspezifische Proteine im Westernblot weiter erhöht:

- 25 cm² konfluente, mit *C. pneumoniae* infizierte (MOI=2) HEp-2 Zellen (~ 2,8*10⁶ Zellen) werden 84 hpi in 2 ml eiskaltem HBSS mittels Zellkulturschaber geerntet.
- Die infizierten Zellen werden durch Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 10000 Upm (9727 xg Biofuge Primo R) pelletiert.
- Das Zellpellet wurde dann in 650 μ l P-Lysis-Puffer vollständig resuspendiert.
- Die Probe wird durch Zugabe von 100 μ l 1 M DTT und 250 μ l SDS-Blaumarker mit anschließender Inkubation für 30 min bei 100 °C für die SDS-PAGE vorbereitet.
- Die Probe wird über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblot auf einer PVDF-Membran immobilisiert (vgl. Kap 3.6.5).
- Bereiche auf der Membran, die der Größe des spezifischen CPn0678-Proteins entsprechen werden entfernt und die Membran für 1 h in IF-Blockierlösung inkubiert.
- 500 μ l der ursprünglich antigengereinigten α -CPn0678 Antikörperlösung werden mit 1 ml Blockierlösung (4 % BSA mit 0,05 % Tween 20, sterilfiltriert) gemischt. Und zusammen mit der PVDF-Membran in einem 50 ml Falcon bei 4 °C am Rad ü/N inkubiert.
- Abschließend werden die Antikörper aufgefangen und über Präabsorptionstests auf Spezifität getestet.

3.6.8 Präabsorptionstest

Der Präabsorptionstest diente zur Bestimmung der Spezifität von Antikörpern. Zuvor aufgereinigtes und renaturiertes Antigen wurde dabei an Latexgranulat gekoppelt und mit den Antikörpern inkubiert. Der Überstand wurde zur Färbung infizierter Zellen benutzt. Das Ausbleiben eines spezifischen Signals nach der Präabsorption zeigte die Spezifität der Antikörper (und damit auch der Signale) zum verwendeten Antigen. Als Kontrolle wurde BSA an Latexgranulat eingesetzt, bei dem keine Absorption stattfinden sollte. Die Kopplung des Antigens an fluoreszentes Latexgranulat folgte dabei grob einem bekanntem Protokoll (Dersch & Isberg 1999). Geringere Mengen Antigen konnten eine Mehrfachdurchführung der

Präabsorption erforderlich machen. In jedem Fall wurde das verbleibende Latexgranulat auf gebundene Antikörper untersucht.

- $1 \cdot 10^9$ Latexgranulatpartikel werden in 1 ml 1xPBS resuspendiert.
- Die Partikel werden durch Zentrifugation für 5 min bei RT mit 13000 Upm (16060 xg Biofuge Pico) pelletiert.
- Das Pellet wird erneut mit 1 ml 1xPBS gewaschen und abzentrifugiert.
- Die Partikel werden in 1 ml Kopplungspuffer resuspendiert und erneut durch Zentrifugation pelletiert.
- 40 µg renaturiertes Protein wird als Antigen hinzugefügt (Volumen sollte 250 µl nicht überschreiten). Zur Vergleichskontrolle wird parallel kein Antigen hinzugefügt, sondern das entsprechende Volumen an BSA-Lösung 1 (40 mg/ml in Kopplungspuffer) eingesetzt.
- Das gleiche Volumen der Antigenprobe wird an Kopplungspuffer zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert.
- Zur Probe werden 500 µl Kopplungspuffer zugefügt und das Latexgranulat im Ultraschallbad für 3 min getrennt.
- Unbesetzte Bindestellen am Latexgranulat werden durch Hinzufügen von 500 µl BSA-Lösung 1 (40 mg/ml in Kopplungspuffer) und Inkubation für 1 h bei 37 °C blockiert.
- Das beschichtete Latexgranulat wird durch Zentrifugation für 5 min bei RT und 13000 Upm (16060 xg Biofuge Pico) erneut pelletiert und mit 500 µl BSA-Lösung 2 (1 mg/ml in 1xPBS) gewaschen.
- Nach erneutem Abzentrifugieren ist eine Lagerung des beschichteten Latexgranulats bei 4 °C in verdünnter BSA-Lösung 2 (0,2 mg/ml in 1xPBS) möglich, oder es wird mit der Präabsorption fortgefahren.
- Das pelletierte Latexgranulat wird in 50 µl der zu testenden Antikörperlösung resuspendiert und für ü/N bei 4 °C am Rad inkubiert.
- Das Latexgranulat wird durch Zentrifugation für 5 min bei RT und 13000 Upm (16060 xg Biofuge Pico) pelletiert und der antikörperhaltige Überstand für Immunfluoreszenz-Färbungen verwendet.
- Eine Gegenfärbung des Latexgranulats mit passend markiertem Sekundärantikörper zeigt zusätzlich spezifische Bindung des Primärantikörpers am Antigen-beschichteten Latexgranulat.

3.6.9 Immunfluoreszenz-Färbung

Die Proben für Immunfluoreszenz-Färbungen konnten auf vielfältige Art und Weise behandelt werden. Die Fixierungsmethode, die Antikörperkonzentrationen, die Färbeverfahren und das Eindeckmedium wurden jeweils auf die entsprechende experimentelle

Situation angepasst und optimiert. Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Verfahren, nach den oben genannten vier Einzelschritten geordnet und aufgezählt.

Fixiermethoden:

Die Fixierung unterteilt sich in die Primärfixierung (Fix.) der lebenden Zellen und eine potentielle Nachbehandlung (Post-Fix.), die in den meisten Fällen eine Permeabilisierung ist. Die gleichzeitige Permeabilisierung mit Detergenzien während der Primärfixierung kann in einigen Fällen zu einer Verbesserung des Signals beitragen. Wird die Fixierung in einem anderen Puffer als 1xPBS oder HBSS durchgeführt, so erfolgt eine Vorinkubation von 5 min der Probe vor dem Fixieren in dem angegebenen Puffer. Die Fixierdauer beträgt dabei immer max. 10 min. Generell sind Zellen nur im permeabilisierten Zustand für längere Zeit bei 4 °C stabil lagerbar.

- *C. pneumoniae*-Infektionen (20 min pi, 24 hpi, 48 hpi, 72 hpi) & Transfektion mit Infektion (20 min pi, 24 hpi):
Temp.: RT; **Fix.:** 3,7 % PFA in SNaPi; **Post-Fix.:** Methanol 96 %
- Transfektionen in HEp-2 Zellen & Endozytose-Assay:
Temp.: RT; **Fix.:** 3,7 % PFA + 0,2 % Triton X-100 in SNaPi; **Post-Fix.:** -/-
- Antikörpertransfektion:
Temp.: RT; **Fix.:** 3,7 % PFA in HBSS; **Post-Fix.:** 0,5 % Saponin
- Ektopische Expression in *S. cerevisiae*, Präabsorptionsassay (Latexgranulat-Gegenfärbung):
Temp.: RT; **Fix.:** 3,7 % PFA in 1xPBS; **Post-Fix.:** -/-
- Zytoskelettfärbungen:
Temp.: 37 °C; **Fix.:** 3,7 % PFA + 0,2 % Triton X-100 in PHEM; **Post-Fix.:** -/-
- Zugänglichkeitsanalysen für α -EGFR und α -SNX9 in uninfizierten Zellen:
Temp.: 4 °C (alle Puffer gekühlt bis zum abschließenden Fixieren der Färbung)
Fix.: 3,7 % PFA + 0,2 % Triton X-100 in SNaPi; **Post-Fix.:** -/-
- Zugänglichkeitsanalysen für α -CPn0678 und α -Chlamydia (20 min pi):
Temp.: RT; **Fix.:** 3,7 % PFA + 0,2 % Triton X-100, 0,005 % SDS in SNaPi;
Post-Fix.: 96 % Methanol
- Differenzielles Permeabilisieren:
Sonderfall: vgl. Kap. 3.6.9

Antikörperkonzentration:

Die Konzentration der Antikörper ist in den Abbildungsbeschriftungen angegeben und wird nach folgenden Richtwerten gewählt. Die Angaben beziehen sich auf die Tabellen der Primärantikörper (Tab. 2.6) und Sekundärantikörper (Tab. 2.7):

- STED-Mikroskopie (Stimulated Emission Depletion): 2x höhere Konzentrationen von Primärantikörpern und Sekundärantikörpern
- Differenzielles Permeabilisieren: 2x – 4x höhere Konzentration von Primärantikörpern und 2x von Sekundärantikörpern
- Sonst: 1x der angegebenen Konzentrationen für Primär- und Sekundärantikörper

Vollständiges Färbeverfahren:

Das nachfolgend aufgezeigte Färbeverfahren für die Primär- und Sekundärantikörper kann optional variiert werden. Diese Schritte sind in eckigen Klammern angegeben. Beispielsweise kann die Spezifität der Färbung über Verwendung von hsPBST und PBST statt 1xPBS auf Kosten der Signalintensität erhöht werden. hsPBST und PBST werden in allen STED-Färbungen verwendet. In STED-Färbungen darf weiterhin keine DAPI-Färbung erfolgen und es müssen bei Infektionen Hochpräzisions-Deckgläschen zum Aussäen der Zellen verwendet werden! Unpermeabilisierte Zellen müssen bei 4 °C und mit vorgekühlten Puffern behandelt werden.

- Die Zellen werden einmal zügig mit 0,5 ml HBSS gewaschen [optional: Das Medium der zu fixierenden Zellen wird abgenommen, 0,5 ml vorgewärmter SNaPi- oder PHEM-Puffer hinzugefügt und für weitere 5 min bei 37 °C inkubiert].
- Die Zellen werden mit 0,3 ml Fixativ [vorgewärmt falls nötig] pro Well einer 24-Well Platte für 10 min inkubiert.
- Das Fixativ wird verworfen und die Zellen einmal mit 0,5 ml des entsprechenden Puffers ohne Fixativ oder Detergenzien gewaschen.
- Der Puffer wird abgenommen, 0,3 ml des Post-Fix-Puffers hinzugefügt und für 10 min bei RT inkubiert [20 min bei Saponinbehandlung; Wird SNaPi mit Post-Fix.: 96 % Methanol verwendet, müssen die Zellen einmal zügig mit 0,5 ml HBSS gewaschen werden, bevor die Nachbehandlung durchgeführt wird].
- Der Post-Fix-Puffer wird entfernt und die Proben mindestens dreimal mit je 1 ml 1xPBS für 10 min bei RT inkubiert [optional: PBST, bei Saponinfärbungen: einmal 1xPBS + 0,5 % Saponin für 20 min].
- [Bei STED-Färbungen und optional zur Spezifitätserhöhung: Hinzufügen von 250 µl IF-Blockierlösung mit Inkubation für 20 min bei RT. Die IF-Blockierlösung wird anschließend verworfen.]
- Der verdünnte Primärantikörper wird in 1xPBS [bei Saponinfärbungen: in 1xPBS + 0,5 % Saponin; bei STED-Färbungen und optional: zur Spezifitätserhöhung in IF-Blockierlösung] verdünnt und pro Probe 25 µl der Antikörperlösung auf die Zellen gegeben.
- Es erfolgt eine Inkubation für 1 h bei RT.

- Anschließend wird dreimal mit 1xPBS gewaschen [bei Saponinfärbungen: mit 1xPBS + 0,5 % Saponin; bei STED-Färbungen und optional: zur Spezifitätserhöhung dreimal mit PBST, dann dreimal mit hsPBST und zuletzt wieder dreimal mit PBST und jeweils wenigen Minuten Inkubationszeit].
- Der Sekundärantikörper wird in 1xPBS [bei Saponinfärbungen: in 1xPBS + 0,5 % Saponin; bei STED-Färbungen und optional: zur Spezifitätserhöhung in IF-Blockierlösung] verdünnt und pro Probe 25 µl der Antikörperlösung auf die Zellen gegeben.
- Inkubation für 1 h bei RT.
- Anschließend wird dreimal mit 1xPBS gewaschen [bei Saponinfärbungen: mit 1xPBS + 0,5 % Saponin; bei STED-Färbungen und optional: zur Spezifitätserhöhung dreimal mit PBST, dann dreimal mit hsPBST und zuletzt wieder dreimal mit PBST und jeweils wenigen Minuten Inkubationszeit].
- [bei STED-Färbungen und optional: Die Färbung selbst kann durch Inkubation mit 0,3 ml 3,7 % PFA in 1xPBS fixiert werden, um länger haltbar zu sein. Wird die Färbung abschließend mit PFA fixiert, muss die Probe dreimal mit 0,5 ml 1xPBS + 50 mM NH₄Cl gewaschen werden.]
- Die DNA-Färbung erfolgt durch Zugabe von 1xPBS + 2 µg/ml DAPI und einer Inkubationszeit von 5 min bei RT [nicht bei STED-Färbungen!].
- Die Probe wird zuletzt dreimal mit 1 ml 1xPBS gewaschen.
- [optional: zum Entfernen von verbleibendem PBS, welches zu Salzresten in der Mikroskopie führen kann, sollte die Probe für einige Sekunden wiederholt in ddH₂O getaucht werden, bevor sie luftgetrocknet wird.
- Die Probe wird mittels Druckluft vollständig luftgetrocknet und eingebettet.

Das Eindeckmedium:

Als Eindeckmedium wird standardmäßig Vectashield verwendet und die Proben mit Nagellack auf dem Objektträger fixiert. Für STED-Färbungen wird dagegen ProlongGold genommen, mit einer Aushärtungszeit von etwa 15 h. ProlongGold wird ebenfalls in EGFR-Endozytose-Experimenten verwendet, da so der Kontrast vielfach höher erscheint und mögliche Vesikel besser erkannt werden. ProlongGold sollte nicht in Kombination mit dem fluoreszenten Markerprotein GFP (**g**reen **f**luorescent **p**rotein) werden.

3.6.10 Differenzielles Permeabilisieren

Das differenzielle Permeabilisieren wurde für Zugänglichkeitsanalysen von Antikörpern zu spezifischen Antigenen verwendet, bei denen chlamydiale Partikel unbedingt intakt bleiben mussten. Detergenzien wie Triton X-100 zeigten eine vollständige Permeabilisierung der chlamydialen Partikel, selbst bei geringen Konzentrationen wie 0,1 %, 0,05 % oder 0,025 %. Deshalb wurde zum Permeabilisieren Saponin bei einer Konzentration von 0,05 % verwendet,

welche die Bakterien nachweislich intakt belässt. Fixierte Zellen im nicht-permeabilisierten Zustand waren außerordentlich instabil (thermische oder mechanische Permeabilisierung erfolgt in der Regel sehr schnell), weshalb die Proben unbedingt unverzüglich verarbeitet wurden. Zur Verlässlichkeit der Ergebnisse mussten die Antikörper in ihrer Lokalisation abschließend abermals mit PFA fixiert werden. Alle Schritte des differenziellen Permeabilisierens mussten zur Stabilisierung in SNaPi-Puffer und bei 4°C bzw. auf Eis mit eiskalten Puffern bis zum finalen Fixieren durchgeführt werden. Die Antikörperfärbung wurde aufgrund der niedrigen Temperatur schwächer. Daher wurden die Antikörper nach Möglichkeit 2fach höher konzentriert eingesetzt. Für Kurzzeitinfectionen mit differenziellem Permeabilisieren wurden die Zellen vor der Fixierung nicht 10 min im Kühlschrank vorgekühlt, sondern unmittelbar vor dem Fixieren 5 min mit kaltem SNaPi im Kühlschrank inkubiert. Die PFA-Lösung wurde für jede Durchführung frisch hergestellt, um Permeabilisierung durch das Fixativ zu vermeiden. Wann immer im Protokoll PFA eingesetzt wurde, mussten Waschstreps mit Puffer + 50 mM NH₄Cl durchgeführt werden, um das PFA zu neutralisieren.

Herstellung der 30 % PFA-Stocklösung (1 ml)

- Es werden unter dem Abzug 0,3 g PFA-Pulver in einem 1,5 ml oder 2 ml Reaktionsgefäß eingewogen.
- Es werden 840 µl NaPi-Puffer (pH 7,4) und 16 µl 1 M NaOH hinzugefügt und die Probe durch ausgiebiges Vortexen gemischt.
- Die Probe wird so lange auf 58°C erhitzt und gelegentlich gevortext, bis die Lösung vollständig klar geworden ist (die Temperatur darf keinesfalls 60 °C überschreiten, da sonst eine chemische Veränderung des PFAs eintritt).
- Die Lösung wird abgekühlt, mit 16 µl 1M HCl versetzt und gemischt.

Alle Flüssigkeiten müssen bei 4 °C und / oder besser auf Eis vorgekühlt sein und die Durchführung muss so unverzüglich wie möglich bei 4 °C erfolgen!

- Die 24-Well-Platte wird mit *C. pneumoniae* (MOI=1, MOI=50 bei Kurzzeitinfectionen) infiziert.
- Die HEp-2 Zellen werden mit direktem Eiskontakt im Kühlschrank 10 min gekühlt [entfällt bei Kurzzeitinfectionen].
- Es wird einmal zügig mit 1 ml HBSS gewaschen [entfällt bei Kurzzeitinfectionen].
- Die Zellen werden dann für 5 min in 1 ml SNaPi bei 4 °C vorinkubiert und dann mit 0,3 ml SNaPiPfa für 5 min bei 4 °C fixiert.
- Die Proben werden zweimal mit je 1 ml AmSNaPi gewaschen, beim zweiten Mal 5 min bei 4 °C inkubiert und danach ein weiteres Mal mit 1 ml SNaPi gewaschen [Die Kontrollprobe, die mit Methanol permeabilisiert werden soll, wird einmal zügig mit 0,5 ml HBSS gewaschen].

- Das Permeabilisieren wird für 20 min mit 0,05 % Saponin in SNaPi-Puffer oder mit 96 % Methanol auf Eis bei 4 °C durchgeführt [Methanol-Permeabilisierung darf **keinesfalls** auf der gleichen 24-Well Platte wie die Saponin-Permeabilisierung durchgeführt werden, da Methanoldämpfe ebenfalls zur Permeabilisierung führen können. Methanol-permeabilisierte Zellen sollten mindestens dreimal mit 1 ml HBSS und dann mit 1 ml SNaPi-Puffer gewaschen werden, bevor sie wieder zu den Saponin-permeabilisierten Zellen zusammen in einer 24-Well Platte gefärbt werden].
- Es werden 25 µl der Primärantikörperverdünnung in SNaPi-Puffer + 0,05 % Saponin für 30 min bei 4 °C mit den Zellen inkubiert [Saponin-haltigen SNaPi-Puffer auch bei Methanol-permeabilisierten Zellen verwenden, um Funktionsverlust der Antikörper durch Saponin auszuschließen].
- Die Zellen werden dreimal mit je 1 ml 0,05 % Saponin in SNaPi-Puffer gewaschen.
- Es werden 25 µl der Sekundärantikörperverdünnung in SNaPi-Puffer + 0,05 % Saponin für 30 min bei 4 °C mit den Zellen inkubiert.
- Die Zellen werden dreimal mit je 1 ml 0,05 % Saponin in SNaPi-Puffer gewaschen.
- Die Färbung der DNA erfolgt durch Inkubation der Zellen mit 1 µg/ml DAPI in SNaPi-Puffer für 10 min bei 4°C.
- Die Zellen werden dreimal mit je 1 ml SNaPi-Puffer gewaschen.
- Die abschließende Fixierung der Färbung erfolgt durch Inkubation der Zellen in 0,3 ml SNaPiPfa für 10 min bei RT.
- Die Zellen werden dann zweimal mit je 1 ml AmSNaPi gewaschen, beim zweiten Mal 5 min bei RT inkubiert und danach drei weitere Male mit je 1 ml HBSS gewaschen.
- [optional: zum Entfernen verbleibenden HBSS, welches zu Salzresten in der Mikroskopie führen können, sollten die Proben für einige Sekunden in ddH₂O getaucht werden, bevor sie luftgetrocknet werden.
- Die Proben werden mittels Druckluft vollständig luftgetrocknet und eingebettet.

3.6.11 Koimmunpräzipitationen

Über **Koimmunpräzipitation** (Ko-IP) kann die Interaktionen von Proteinen miteinander gezeigt werden. In der hier verwendeten Arbeit wurde diese Technik in transfizierten, uninfizierten oder in Kurzzeit-infizierten HEp-2 Zellen verwendet. Dafür wurde bei transfizierten Zellen das µMACSTM-α-GFP System (Miltenyi Biotec), bei Kurzzeit-infizierten Zellen dagegen aufgereinigte Antikörper gekoppelt an Protein-G-Agarose benutzt.

3.6.11.1 Ko-IP aus transfizierten Zellen mittels µMACSTM

Das µMACSTM-System (Miltenyi Biotec) bedient sich eines magnetisierbaren Granulats, an welches Antikörper gekoppelt ist. Spezielle Trennsäulen mit einer magnetisierbaren

Stationären Phase werden dann zum Trennungsprozess einem starken Magnetfeld ausgesetzt. Die stationäre Phase wird so magnetisch und hält das magnetisierbare Granulat mit den gebundenen GFP-Fusionsproteinen und interagierenden Proteinen aus dem Zelllysat zurück. Diese können dann separat eluiert werden. Das Folgende Protokoll richtete sich in modifizierter Form nach den Herstellerangaben:

- Die HEP-2 Zellen werden wie zuvor beschrieben in einer 6-Well Platte transfiziert (Kap. 3.3.4).
- Die Zellen werden einmal vorsichtig aber zügig mit 1 ml eiskaltem HBSS gewaschen.
- Das Ablösen der Zellen erfolgt durch kräftiges Auf- und Abpipettieren von 1 ml eiskaltem IP-Lysispuffer mit anschließendem Vortexen der Zellsuspension in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß.
- Die Zellsuspension wird für weitere 30 min auf Eis inkubiert und gelegentlich gevortext.
- Eine vollständige Lyse der Zellen erfolgt dann durch Ultraschallpulse (Sonopuls HD2200; Pulsfrequenz: dreimal 10 sek 40 % Puls, 10 sek Pause) auf Eiskühlung.
- Das entstandene Lysat wird dann durch Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 10140 Upm (10000 xg Biofuge Primo R) geklärt.
- Das geklärte Lysat im Überstand wird vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt.
- Zu dem geklärten Lysat werden 50 µl α -GFP μ MACS™ hinzugefügt und das Gemisch für 60 min bei 4 °C am Rad inkubiert.
- Bevor mit den Waschsritten und der Elution begonnen wird, werden 300 µl μ MACS-Elutionspuffer auf 95 °C vorbereitend erhitzt.
- Die 20 μ MACS™-Trennsäule wird in den dafür vorgesehenen Magneten eingesetzt und mit 500 µl kaltem IP-Lysis-Puffer equilibriert.
- Das Lysat wird auf die Säule gegeben und der Durchfluss zu Analyse Zwecken aufgefangen.
- Die Säule wird viermal mit je 200 µl kaltem IP-Lysis-Puffer gespült.
- Anschließend wird die Säule zweimal mit je 200 µl kaltem μ MACS-Waschpuffer gespült.
- Zur Elution werden zweimal 50 µl μ MACS-Elutionspuffer bei 95 °C auf die Säule gegeben und bei RT für je 5 min inkubiert, bevor die Elutionsfraktionen aufgefangen und vereint werden.
- Zuletzt wird eine Totalelution des Säulenmaterials durchgeführt, indem die Säule aus dem Magnetfeld entfernt wird und mit 100 µl μ MACS-Elutionspuffer bei 95 °C gespült und die Totalelution separat aufgefangen wird.
- Die erhaltenen Fraktionen werden dann in der SDS-PAGE aufgetrennt und über Westernblot analysiert.

3.6.11.2 Ko-IP aus Kurzzeit-infizierten Zellen mittels Protein-G-Agarose

Zur Interaktionsbestimmung zweier Proteine *in vivo* während der frühen Infektion von *C. pneumoniae* (20 min pi) wurden die spezifische α -CPn0678 Antikörper an Protein-G-Agarose gekoppelt. Aus hergestelltem Zelllysat Kurzzeit-infizierter HEP-2 Zellen wurden

dann über die gekoppelte Protein-G-Agarose endogenes CPn0678 und potentiell interagierende Wirtszellproteine isoliert.

- Eine 25cm² Zellkulturflasche wird konfluent mit HEp-2 Zellen bewachsen.
- *C. pneumoniae* äquivalent zu einer MOI=600 werden als Gradienten-gereinigte Probe aufgetaut und eine Trennung der chlamydialen Partikel durch 1 min Ultraschallbehandlung im Wasserbad gewährleistet.
- Die getrennten Chlamydien werden in 1 ml vorgewärmtem Medium gemischt.
- Die Zellen in der Zellkulturflasche werden zweimal mit je 2 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium gewaschen.
- Das alte Medium von den Zellen wird entfernt und die vorgewärmte Chlamydiensuspension zugegeben.
- Die Zellkulturflasche wird kurz geschwenkt und unverzüglich mit der Zentrifugation für 10 min bei 37 °C und 2920 Upm (1620 xg Rotanta 460R) begonnen.
- Nach der Zentrifugation werden die Zellen weitere 10 min bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert und dann sofort zweimal mit je 2 ml eiskaltem HBSS gewaschen.
- Zu den Zellen werden 500 µl eiskalter IP-Lysispuffer gegeben und 5 min auf Eis bei 4 °C inkubiert.
- Die Zellen werden aus der Zellkulturflasche durch 2 min Ultraschallbehandlung im Wasserbad mit gelegentlichem Kühlen gelöst.
- Verbleibende Zellen werden durch auf- und abpipetieren von der Flasche getrennt und die Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.
- Die Zellkulturflasche wird mit weiteren 500 µl IP-Lysispuffer ausgespült und mit der ersten Zellsuspension vereint.
- Die Lyse der Zellen erfolgt für weitere 20 min auf Eis inkubiert mit gelegentlichem vortexen.
- Die Probe wird durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 15000 Upm (21885 xg Biofuge Primo R) in den löslichen Protein-Überstand und pelletierte Zellfragmente getrennt.
- Das Zellysat im Überstand wird vorsichtig isoliert und in neues Reaktionsgefäß überführt.
- 100 µl Protein-G-Agarose-Lösung (50 µl pure Protein-G-Agarose) werden in einer Zentrifugationssäule durch 2 min Zentrifugation bei RT mit 2000 Upm (380 xg Biofuge Pico) von der wässrigen Phase getrennt.
- Die Protein-G-Agarose wird dreimal mit 200 µl kaltem IP-Puffer gewaschen.
- Die gewaschene Protein-G-Agarose wird mit einer angemessenen Menge Antikörper (in dieser Arbeit 25 µl α-CPn0678 Antikörper) zum geklärten Zellysat gegeben und ü/N bei 4 °C auf dem Rad inkubiert.
- Das Gemisch wird in einer Zentrifugationssäule durch Zentrifugation für 2 min bei RT und 2000 Upm (380 xg Biofuge Pico) vom Durchfluss getrennt.

- Die Protein-G-Agarose wird dann viermal mit je 500 μ l eiskaltem IP-Lysispuffer und einer Zentrifugation für 2 min bei RT und 2000 Upm getrennt.
- Die Elution der gereinigten Probe erfolgt durch Zugabe von 50 μ l eiskaltem 250 mM Glycin pH 2,5 und einer Inkubation von 10 min auf Eis.
- Das Eluat wird durch Zentrifugation der Säule für 2 min bei RT und 2000 Upm (380 xg Biofuge Pico) in einem neuen Reaktionsgefäß von der Protein-G-Agarose getrennt.
- Die Elution wird wie oben beschrieben zwei weitere Male durchgeführt und die Elutionsfraktionen werden separat aufgefangen.
- Zuletzt erfolgt eine Totalelution, indem die getrennte Protein-G-Agarose in 100 μ l P-Lysis-Puffer resuspendiert und für 10 min bei 100 °C inkubiert wird.
- Die Proben werden dann durch Zugabe von (μ l = 0,15 x Probenvolumen) 1 M DTT und (μ l = 0,38 x Probenvolumen) SDS-Blaumarker mit Inkubation der Proben für 10 min bei 100 °C für die Analyse in der SDS-PAGE vorbereitet.
- Die Analyse erfolgt über Westernblot.

3.7 Bioinformatische Programme

Verschiedene Computerprogramme wurden für die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse verwendet, die im Folgenden aufgeführt werden. Die Anwendungen umfassten beispielsweise Vorhersagen, aber auch Visualisierungen von Modellen oder Datenbankrecherche.

Tab. 3.1: Verwendete bioinformatische Programme

Name	Anwendung	Link	Referenz (falls vorhanden)
<i>ClustalOmega</i>	Generierung der multiplen-Alignments	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/	(Sievers et al. 2011)
<i>Limbo</i>	Vorhersage der DnaK-Bindestellen	http://limbo.switchlab.org/	(Van Durme et al. 2009)
<i>Aliview</i>	Alignment-Visualisierungen	http://www.ormbunkar.se/aliview/	(Larsson 2014)
<i>MBF-ImageJ</i>	Intensitätsprofile in Mikroskopiebildern und Kolokalisationsanalyse für CPn0712 und IncA	http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/index.html	-/-
<i>Huygens professional</i>	Dekonvolution-Rekonstruktion der STED-Aufnahmen	https://svi.nl/HuygensProfessional	-/-
<i>Nikon NIS-Elements</i>	Konfokal und Weitfeld-Mikroskopie	https://www.nikoninstruments.com/en_DE/Products/Software	-/-
<i>heliQuest</i>	Helix-Projektionen und Simulationen von $\langle H \rangle$ und $\langle \mu H \rangle$ in Proteinen	http://heliquet.ipmc.cnrs.fr/	(Gautier et al. 2008)
<i>3D-HM</i>	Berechnung des 3D- $\langle \mu H \rangle$ -Vektors im APH-3D-Modell	http://www.ibg.kit.edu/HM/?page=index	(Reisser et al. 2014)
<i>NetsurfP</i>	Sekundärstruktur-Vorhersagen	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetSurfP/	(Petersen et al. 2009)

Name	Anwendung	Link	Referenz (falls vorhanden)
<i>UCSF Chimera</i>	3D-Modell-Visualisierung der APH & Berechnung der Helixoberfläche	https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/	(Pettersen et al. 2004)
<i>Bioedit</i>	Alignment-Visualisierungen	http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html	(Hall 1999)
<i>Leica AS X</i>	STED-Mikroskopie	http://www.leica-microsystems.com	-/-
<i>NCBI</i>	Beziehen der Sequenzen	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	-/-
<i>NCBI-CDD</i>	Identifizierung konservierter Domänen	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml	(Marchler-Bauer et al. 2015)
<i>Pfam</i>	Identifizierung konservierter Domänen	http://pfam.xfam.org/	(Finn et al. 2016)
<i>KEGG</i>	Bezug der Sequenzen	http://www.genome.jp/kegg/	(Kanehisa et al. 2016)
<i>NCBI-BLASTp</i>	Sequenzvergleiche gegen NCBI-Datenbank	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	(Altschul et al. 1990)

3.8 Mikroskopie

Die Mikroskopie wurde wie in den jeweiligen Abbildungen angegeben durchgeführt. Dazu wurde entweder Weitfeld-Mikroskopie, kLSM (**k**onfokale **L**aserscan **M**ikroskopie) oder 3D-gSTED mit den unter Kap. 2.2 angegebenen Mikroskopen durchgeführt. Laserlinie und Filterweiten der 3D-gSTED-Mikroskopie wurden den jeweils verwendeten Fluorophoren angepasst. Der experimentelle Aufbau der in den meisten Fällen verwendeten kLSM ist in einem groben Schema mit Laserlinien und verwendeten Filtern dargestellt (Abb. 3.2).

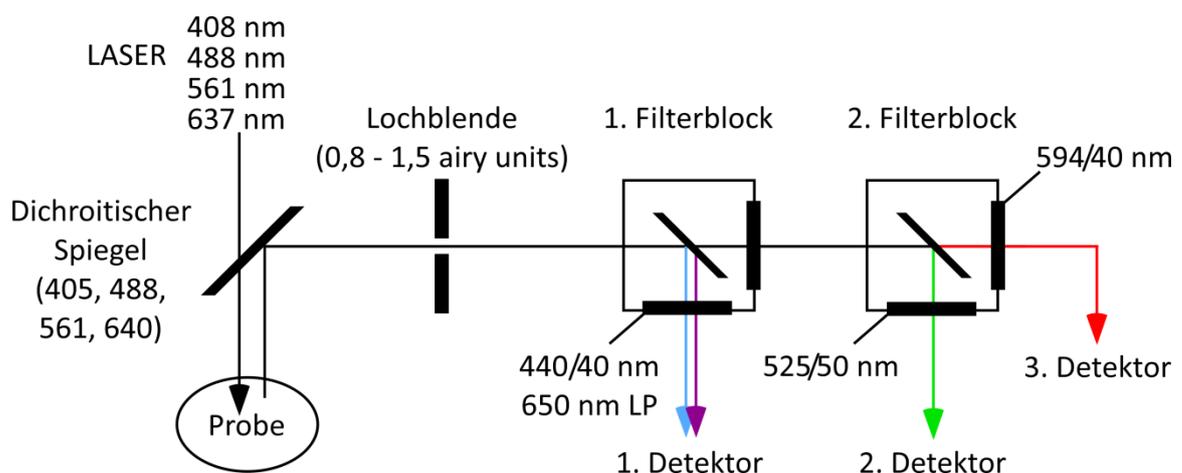


Abb. 3.2: Verwendete Einstellungen der durchgeführten kLSM

Beschriftet sind die verwendeten Laserlinien, die Eigenschaften des ersten dichroitischen Spiegels und die einzelnen Spiegel und Filter der Detektorfilter-Einheiten. Zahlen geben die Wellenlängen Nanometer der oder den Durchmesser der Lochblende in airy units an. LP, Langpassfilter.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollten Proteine untersucht werden bei, denen eine oder mehrere Eigenschaften für eine Funktion als potentielles Effektorprotein sprachen. Im Folgenden werden die Ergebnisse zu dem Protein CPn0712 dargestellt und im anschließenden Kapitel 4.2 die Ergebnisse zu CPn0677 und CPn0678.

4.1 CPn0712 – Strukturprotein des Typ-3 Sekretionssystems oder Effektorprotein?

CPn0712 wird als potentielles Effektorprotein diskutiert, da zum einen mehrere Literaturquellen auf eine solche Funktion hinweisen, zum anderen induzierte die Expression von CPn0712 in *S. cerevisiae* einen wachstumsdefekten Phänotyp, welcher für eine Effektorfunktion in eukaryotischen Zellen sprach (Herrmann et al. 2006, Muller et al. 2008, Tanzer & Hatch 2001) (vgl. Kap. 1.3.1). Außerdem wurde in früheren Zellfraktionierungsstudien ein Fragment von CPn0712 als möglicherweise sekretiert beobachtet (Hänsch 2011). Darüber hinaus deuteten Immunfluoreszenz-Analysen von CPn0712 auf eine Lokalisation außerhalb der bakteriellen Partikel oder gar außerhalb der Inklusion hin (Hänsch 2011, Herrmann et al. 2006, Muller et al. 2008). Daher sollte eine eingehende Analyse des Proteins CPn0712 erfolgen, die sich in die Überprüfung der Antikörperspezifität, detaillierter Lokalisations- und Expressionsanalysen und Untersuchungen zum induzierten Wachstumsdefekt in Hefe gliederte.

4.1.1 Überprüfung der Spezifität der verwendeten α -CPn0712 Antikörper

Um nachfolgende CPn0712-Analysen verlässlich durchführen zu können, musste zuerst analysiert werden, ob der verwendete Antikörper spezifisch auf endogenes CPn0712 reagiert. Dafür wurde der polyklonale α -CPn0712 Antikörper aufgereinigt und zuerst mittels Präabsorptionstest getestet.

Ein rekombinant hergestelltes und aufgereinigtes N-terminalen Fragment von CPn0712 (rCPn0712-A_{10xHis}) hatte als spezifisches Antigen zur Herstellung des Antikörpers gedient (Hänsch 2011). rCPn0712-A_{10xHis} wurde dafür im *E. coli* Stamm BL21 exprimiert, durch denaturierende Lyse freigesetzt und aufgereinigt (Abb. 4.1 A). Die Kontrolle der Elutionsfraktion von rCPn0712-A_{10xHis} im SDS-Gel wies eine Bande bei einer apparenten Größe von ca. 60 kDa auf (berechneten Größe 35,7 kDa). Diese abweichende, apparente

Größe war bereits früher für das Homolog CT664 aus *C. trachomatis* beschrieben worden (Tanzer & Hatch 2001). Nach der Dialyse zeigte sich im SDS-Gel, dass die Antigen-Probe vorwiegend aus Volllängen-rCPn0712-A_{10xHis} mit wenigen Degradationen bestand (Abb. 4.1 B).

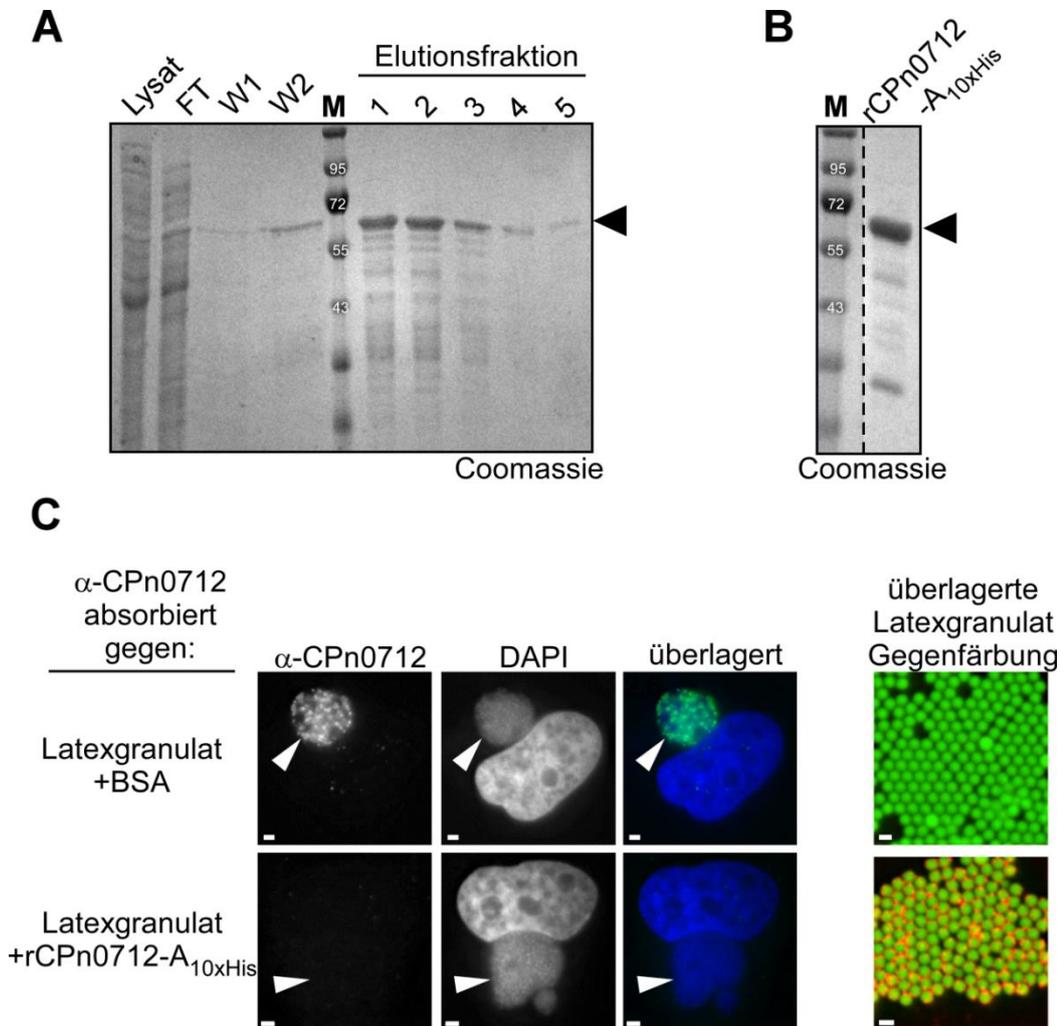


Abb. 4.1: Überprüfung der Spezifität des α -CPn0712 Antikörpers durch Präabsorptionstest

(A) rCPn0712-A_{10xHis} wurde mittels Harnstoff-Lyse und Ni-NTA-Agarose aus für 4 h induzierten *E. coli* BL21 Kulturen denaturiert aufgereinigt. Einzelfraktionen wurden während der Aufreinigung aufgefangen und je 16,5 μ l (2,5 μ l bei Lysat und FT) auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion erfolgte durch Coomassiefärbung. \blacktriangleleft rCPn0712-A_{10xHis}. Berechnete Größe: rCPn0712-A_{10xHis} 35,7 kDa. FT, Durchflussfraktion; W, Waschfraktion. M, Größenstandard: Prestained PageRuler™. **(B)** Überprüfung der rCPn0712-A_{10xHis} Probe nach Renaturierung mittels Dialyse gegen 1xPBS. 16,5 μ l wurden im 10 % SDS-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Coomassiefärbung. Pfeilspitze weist auf Laufhöhe von rCPn0712-A_{10xHis}. Gestrichelte Linien markieren nicht gezeigte Bereiche zwischen den relevanten Spuren auf demselben SDS-Gel. M, Größenstandard: Prestained PageRuler™. **(C)** Präabsorptionstests von α -CPn0712 gegen Latexgranulat beschichtet mit BSA (oben) bzw. rCPn0712-A_{10xHis} (unten). Antikörperhaltiger Überstand aus beiden Präabsorptionstest wurde anschließend für Immunfluoreszenz-Färbungen auf *C. pneumoniae* infizierte (MOI=2) HEp-2 Zellen 48 hpi (Fix.: PFA; Post-Fix.: -/-) verwendet (links). Signal des jeweiligen Überstandes ist grün gefärbt und DAPI blau gefärbt. Pfeilspitzen weisen auf Inklusionen hin. Latexgranulat (grün) wurde zur Überprüfung von präabsorbiertem α -CPn0712 Antikörper gegengefärbt (rot) (rechts). Primär: antikörperhaltiger Überstand 1:20. Sekundär: α -Kaninchen-Alexa⁵⁹⁴ (1:200). DAPI 2 μ g/ml. Größenstandard: 1 μ m. Zellfärbung Weitfeld Mikroskopie, Latexgranulat KLSM.

Das rCPn0712-A_{10xHis}-Fragment wurde anschließend als Antigen für die Aufreinigung des α -CPn0712 Antikörpers aus dem Kaninchen-Vollserum (#1520) verwendet (vgl. Kap. 3.6.7). Mit dem gewonnenen Antikörper wurden Präabsorptionstests durchgeführt, um die Spezifität des Antikörpers zu überprüfen (vgl. Kap. 3.6.8). Danach wurde der absorbierte, antikörperhaltige Überstand für Immunfluoreszenz-Färbungen von infizierten Zellen benutzt. Deutlich erkennbar war das Signal des Antikörpers aus der BSA-Kontrollabsorption (Abb. 4.1 C, links oben). Das Signal kolokalisiert mit der chlamydiengefüllten Inklusion, die durch das DNA-Signal der DAPI-Färbung identifiziert werden konnte. Im Gegensatz dazu verschwanden die Inklusions-assoziierten Signale bei der Färbung mit dem rCPn0712-A_{10xHis}-präabsorbierten Antikörper, und nur wenige Hintergrundsignale waren zu detektieren (Abb. 4.1 C, links unten). Also waren die Signale, die bei der BSA-Kontrolle sichtbar waren, spezifische Signale für endogenes CPn0712. Unterstützt wurde diese Beobachtung durch die Gegenfärbung der verwendeten Latexgranulate aus den Präabsorptionstests mit einem sekundären α -Kaninchen-Alexa⁵⁹⁴ Antikörper. Das auftretende Alexa⁵⁹⁴-Signal auf dem mit rCPn0712-A_{10xHis}-beschichteten grün fluoreszierenden Latexgranulat detektierte gebundenen α -CPn0712 Antikörper (Abb. 4.1 C, rechts unten).

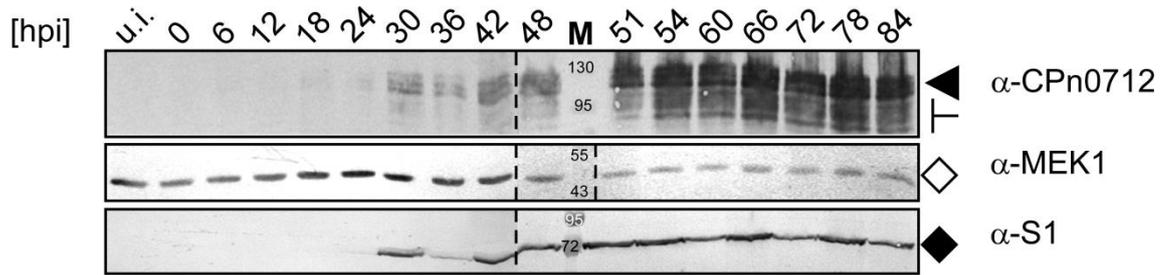
Durch dieses Experiment konnte die Spezifität des α -CPn0712 Antikörper für rCPn0712-A_{10xHis} und auch für endogenes CPn0712 belegt werden. Der Antikörper konnte deshalb in weiteren Experimenten zur detaillierten Untersuchung der Lokalisation und Expression von CPn0712 eingesetzt werden.

4.1.2 CPn0712 assoziiert mit Bakterien und teilweise mit der Inklusionsmembran

Im Folgenden wurden Untersuchungen zur Lokalisation und Expression während des Infektionszyklus mittels Westernblot und Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt.

Die Westernblot-Analysen von infizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten des chlamydialen Infektionszyklus sollten den Zeitpunkt der erstmaligen Expression näher bestimmen. Die Proben wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Astrid Engel angefertigt. Zur Kontrolle wurden die infizierten Proben mit α -MEK1 und α -S1 Antikörpern im Westernblot detektiert (Abb. 4.2 A). Die humane Kinase MEK1 diente dabei als Ladekontrolle, während das Signal der chlamydialen ribosomalen S1-Untereinheit zur Einschätzung der chlamydialen Partikelzahl diente.

A



B

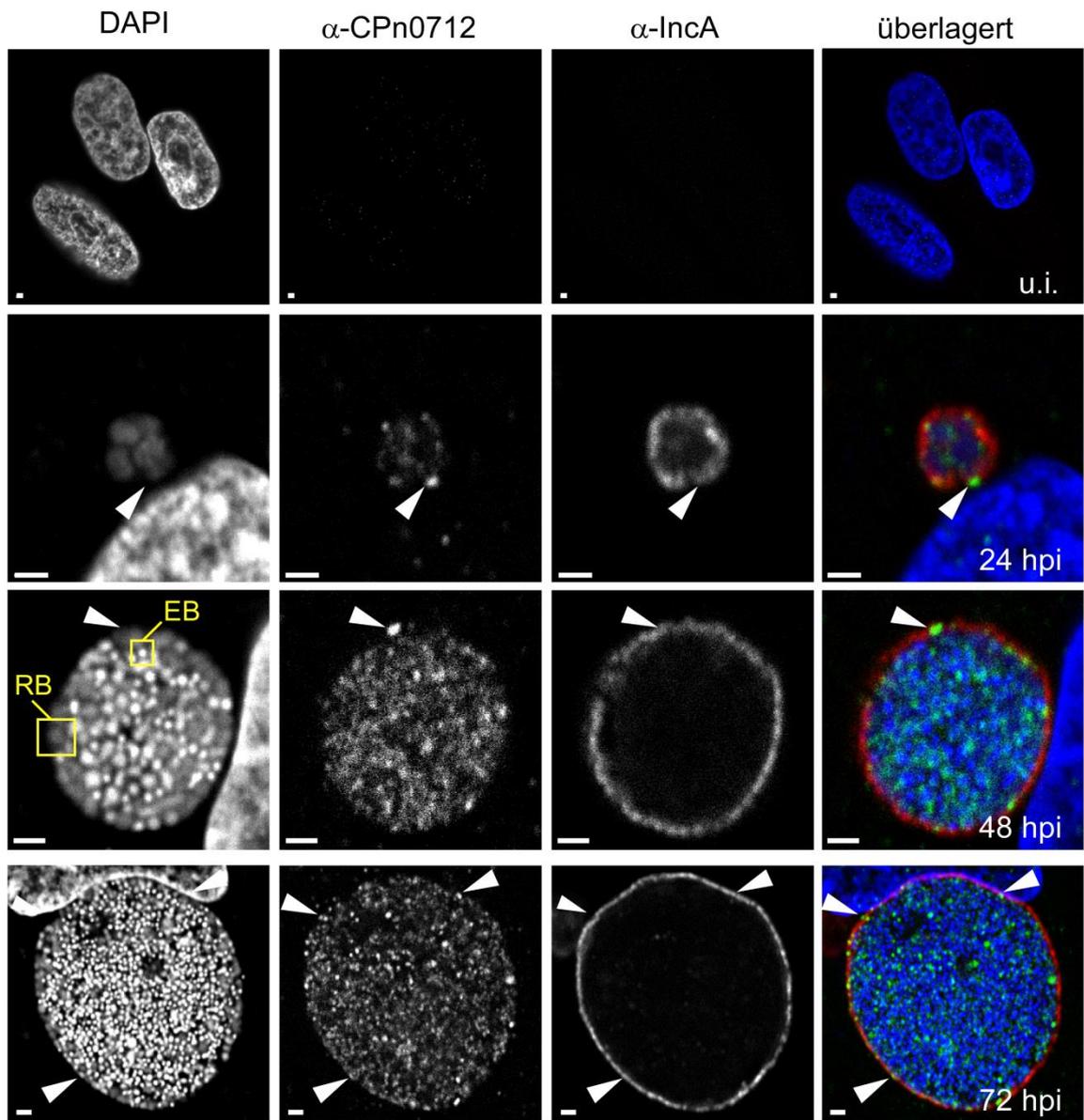


Abb. 4.2: Expression und Lokalisation von CPn0712 während des Infektionszyklus

(A) Expressionsanalyse von CPn0712 im Westernblot. Konfluente HEp-2 Zellen wurden in Zellkulturflaschen (25 cm²) mit *C. pneumoniae* infiziert (MOI=10) und zu angegebenen Zeitpunkten in 300 µl P-Lysis-Puffer lysiert. 5 µl der Proben wurden im SDS-Gel aufgetrennt und mittels Westernblot und angegebenen Antikörper detektiert. Gestrichelte Linien markieren Übergänge zwischen verschiedenen Westernblot-Membranen.

◀ CPn0712 Mehrfachbande, † vermutliche CPn0712 Degradationen, ◇ MEK1, ◆ S1. Berechnete Größen: CPn0712 93,1 kDa; MEK1 43,4 kDa, S1 65 kDa. Primär: α -CPn0712 1:100, α -MEK1 1:200, α -S1 1:500 Sekundär: α -Kaninchen-AP 1:7500, α -Maus-AP 1:7500. M, Größenstandard: Prestained PageRuler™; u.i., uninferiert **(B)** Lokalisationsanalyse von CPn0712 durch Immunfluoreszenz-Färbungen. HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* infiziert (MOI=2) oder zur Kontrolle uninferiert belassen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert (Fix.: PFA; Post-Fix.: Methanol) und mit α -CPn0712 (grün), α -IncA (rot) und DAPI (blau) gefärbt. Pfeilspitzen weisen auf kolokalisierende Signale von α -CPn0712 und α -IncA hin. Repräsentative DNA-Signale, die vermutlich auf Chlamydien im RB- oder EB-Stadium schließen lassen sind mit gelben Kästchen markiert. Primär: α -CPn0712 1:25, α -IncA 1:100. Sekundär: α -Kaninchen-Alexa⁴⁸⁸ 1:200, α -Maus-Alexa⁵⁹⁴ 1:200. DAPI 2 μ g/ml. Größenstandard: 1 μ m. kLSM.

Die MEK1 Ladekontrolle zeigte ein relativ konstantes Signal, welches sich jedoch ab 48 hpi abschwächte (Abb. 4.2 A, ◇). Dies könnte durch möglichen Zellverlust erklärt werden, da mit fortschreitender Infektion einige Zellen apoptotisch reagierten, sich ablösten und in den Waschschritten entfernt wurden. Das Signal des ribosomalen S1 ließ eine deutliche Zunahme der chlamydialen Partikel ab ca. 30 Stunden erkennen, was etwa der Replikation der RB-Chlamydien entspricht (Abb. 4.2 A, ◆). Weiterhin war zu erkennen, dass nicht alle Flaschen gleich stark infiziert waren und somit leichte Schwankungen in der Chlamydiendichte aufwiesen (z.B. 36 hpi). Die Antikörper gegen CPn0712 ließ eine Dreifach-Bande bei ca. 100 bis 130 kDa erkennen (Abb. 4.2 A, ◀). Darunter waren kleinere Banden von CPn0712 erkennbar, die vermutlich Degradationen sind (Abb. 4.2 A, †). Wie bereits zuvor beim rekombinanten Antigen wich die apparente Größe des endogenen CPn0712 von seiner berechneten Größe (93,1 kDa) ab (vgl. Abb. 4.1 B). Die Signale waren erstmals ab 18 hpi erkennbar, intensivierten sich bis ca. 48 hpi bis 52 hpi und blieben relativ konstant bis 84 hpi. Somit ähnelte die Expression von CPn0712 ungefähr der Expression des S1-Proteins was auf eine mögliche Funktion des Proteins in der EB- und RB-Form der Bakterien, aber auch für Funktion spät im Infektionszyklus hindeutete.

Anschließend wurde die subzelluläre Lokalisation von CPn0712 während des Infektionszyklus analysiert (Abb. 4.2 B). Die Kontrollfärbung uninferierter Zellen zeigte keine Signale für das Inklusionsmembranprotein IncA (**In**clusion membrane protein **A**) und nur sehr schwache Hintergrundsignale bei der Färbung von CPn0712. 24 hpi waren bereits Signale für CPn0712 erkennbar, die mit chlamydialen Partikeln assoziiert waren. Zusätzlich waren wenige deutliche Signale von CPn0712 kolokalisierend oder außerhalb der IncA markierten Inklusionsmembran detektierbar (Abb. 4.2 B, Pfeilspitzen). 48 hpi konnten aufgrund der Fixiertechnik mittels PFA und Methanol unterschiedliche Ausprägungen der DNA-Signale für Chlamydien identifiziert werden (Abb. 4.2 B, gelbe Kästchen). Berücksichtigt man die bekannten Daten zu den Kondensierungszuständen der DNA bei Chlamydien, handelte sich wahrscheinlich bei den diffusen, decondensierten Signalen um Chlamydien in RB-Form, während kleine kondensierte

DNA-Signale redifferenzierte EBs anzeigten (vgl. Kap. 1.1.3). Die CPn0712-Signale waren in einem punktierten Muster sowohl mit RBs als auch mit EBs assoziiert (Abb. 4.2 B). Dennoch waren vereinzelte besonders starke CPn0712-Signale in direkter Nähe zu IncA-Signalen bzw. mit ihnen kolokalisierend zu beobachten (Abb. 4.2 B, Pfeilspitzen). 72 hpi waren die meisten RBs zu EBs redifferenziert, was an den überwiegend kondensierten DNA-Signalen zu erkennen war. Nur wenige verbleibende RBs fanden sich im Randbereich der Inklusion. Das Lokalisationsmuster von CPn0712 veränderte sich gegenüber 48 hpi nicht grundlegend. Lediglich die Menge der punktierten Signale nahm mit der Chlamydienanzahl zu. Auch hier waren Signale, in deren direkter Nähe sich DNA-Signale befanden, mit der Inklusionsmembran assoziiert, während der größte Teil Bakterien-assoziiert erschien. Somit zeigte das Expressionsprofil von CPn0712 eine früh bis intermediär einsetzende Expression und die Lokalisation ein hauptsächlich Bakterien-assoziiertes Protein. Dennoch erschienen besonders deutliche CPn0712-Signale kolokalisierend mit der Inklusionsmembran außergewöhnlich für eine basale Strukturkomponente des T3SS.

4.1.3 Einige CPn0712-Signale kolokalisieren mit der Inklusionsmembran

Im Folgenden stellte sich die Frage, ob die kolokalisierenden Signale von CPn0712 mit der Inklusionsmembran eine Sekretion des Proteins repräsentieren könnten. Um dies einzuschätzen zu können, wurden detailliertere Auswertungen mittels des Bild-Prozessierungsprogramms „*MBF-ImageJ*“ angefertigt.

In den Auswertungen wurden signifikant kolokalisierende CPn0712- und IncA-Signale über ein selbst programmiertes Makro identifiziert. Die Abfolge der Makro-Schritte in Java-basierender Programmiersprache kann im Anhang eingesehen werden (Abb. 6.1 & Abb. 6.2). Kernelement war die Hervorhebung kolokalisierender Bereiche von CPn0712- und IncA-Signalen über positive sog. PDM-Werte (product of difference from the mean). Der Fokus lag also ausschließlich auf Inklusionsmembran-assoziierten CPn0712-Signalen. Die Intensitäten der einzelnen Signalkanäle wurden entlang einer Linie im Mikroskopiebild gemessen, die möglichst orthogonal zur Inklusionsmembran durch das betreffende CPn0712-Signal gezogen wurde (Abb. 4.3, gelbe Pfeile). Anhand der resultierenden Intensitäts-Diagramme wurde die Lage der Maxima von CPn0712 im Vergleich zur denen von IncA bestimmt. Ein repräsentatives Beispiel, welches alle drei beobachteten Kolokalisationszustände enthält, ist in Abb. 4.3 dargestellt. In den Intensitäts-Diagrammen konnte die Inklusionsmembran jeweils als klar definiertes Maximum im roten Kanal identifiziert werden. Weiterhin wurde das

Inklusionslumen in den Diagrammen (hier in den Diagrammen rechtsseitig vom Inca-Maximum) durch DNA-Signale der Chlamydien definiert.

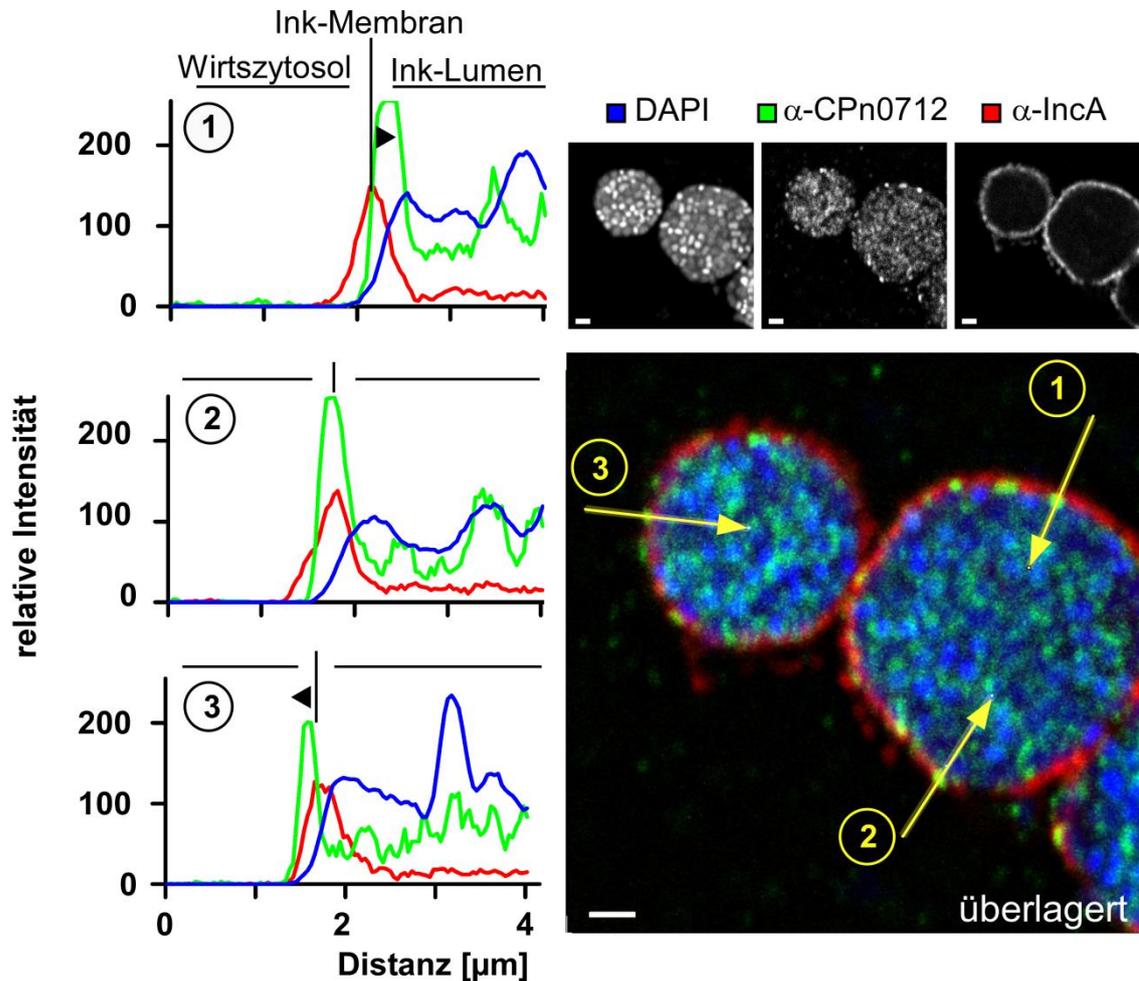


Abb. 4.3: Lokalisationsanalyse der CPn0712-Signale bezüglich der Inklusionsmembran

HEp-2 Zellen wurden wie in Abb. 4.2 B infiziert, 48 hpi fixiert (Fix.: PFA; Post-Fix.: Methanol) und gefärbt. Gelbe nummerierte Pfeile in der Überlagerung geben die Linien an, entlang denen Signalintensitäts-Messungen durchgeführt wurden (rechts). Signalintensitäts-Diagramme entsprechen der Nummerierung der Pfeile in der Überlagerung (links). Relative Signalintensitäten (0-255, y-Achse) wurden gegen die Distanzen (0 μm am Pfeilanfang, hin zur jeweiligen Pfeilspitze, x-Achse) aufgetragen. Farblegende der Intensitäts-Diagramme entspricht, den zugeordneten Farben über den monochromen Kanalbilder bzw. der Überlagerung. Ink, Inklusion. Primär: α -CPn0712 1:25, α -Inca 1:100. Sekundär: α -Kaninchen-Alexa⁴⁸⁸ 1:200, α -Maus-Alexa⁵⁹⁴ 1:200. DAPI 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Größenstandard 1 μm . kLSM.

Die Signalmaxima von CPn0712 konnten in drei unterschiedliche Lokalisationen eingeordnet werden: Vershoben in Richtung des Inklusionslumen (Abb. 4.3, 1), vollständig überlappend mit Inca (2) und verschoben in Richtung des Wirtszellzytosols (3). Bei einer Quantifizierung dieser drei Zustände zeigte sich etwa eine Gleichverteilung mit leichter Präferenz zur vollständigen Kolo-kalisation (insgesamt 181 signifikant mit der Inklusionsmembran kolo-kalisierende CPn0712-Signale untersucht, davon 22 % verschoben zum Inklusionslumen, 36 % zum Wirtszellzytosol und 42 % vollständig kolo-kalisierend mit Inklusionsmembran).

Obwohl die absolute Anzahl von CPn0712-Signalen außerhalb bzw. kolokalisierend mit der Inklusionsmembran im Vergleich zur Gesamtheit relativ gering erschien, könnten diese Signale CPn0712-Moleküle markieren, welche mit Komponenten der Wirtszelle interagieren.

4.1.4 CPn0712 ist während der Infektion nicht vom Wirtszellzytosol zugänglich

Um die CPn0712-Lokalisation deutlicher zu klären wurde die Zugänglichkeit von CPn0712 durch Antikörper in infizierten Zellen bestimmt. Dazu wurde die Technik der Antikörpertransfektion verwendet, bei der funktionale Antikörper in das Zytosol der Wirtszelle transfiziert und ihre Lokalisation nach der Fixierung detektiert wird (Abb. 4.4 A).

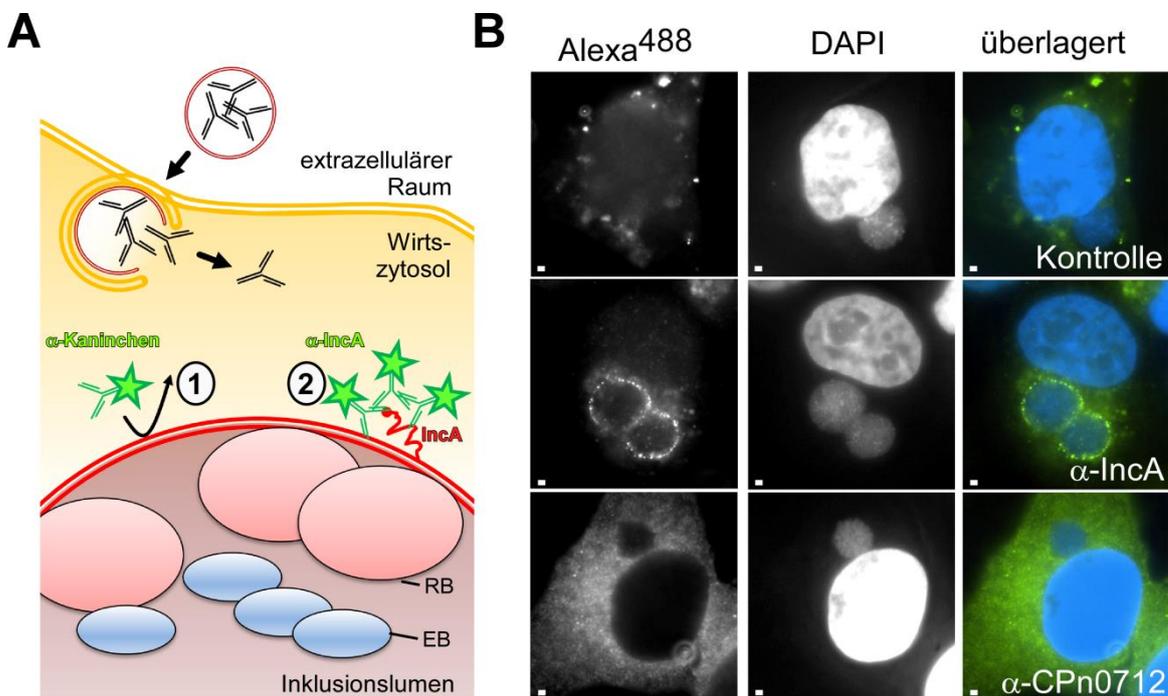


Abb. 4.4: Antikörpertransfektion von α -CPn0712 während der chlamydialen Infektion

(A) Schema der Antikörpertransfektion. Dargestellt sind die zwei möglichen Zugänglichkeitszustände für α -IncA als Positivkontrolle und α -Kaninchen als Negativkontrolle. RB Retikularkörperchen, EB Elementarkörperchen. (B) Antikörpertransfektion in infizierte HeLa229 Zellen. HeLa229 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* infiziert (MOI=1) und 20 hpi mit $\sim 0,5 - 1 \mu\text{g}$ des α -CPn0712, α -IncA bzw. α -Kaninchen-Alexa⁴⁸⁸ Antikörpers (Kontrolle) transfiziert. 48 hpi erfolgte die Fixierung mittels PFA und Permeabilisierung durch Saponin, mit anschließender Färbung der transfizierten Antikörper über entsprechenden Sekundäntikörper (grün) und der DNA über DAPI (blau). Sekundär: α -Kaninchen-Alexa⁴⁸⁸ 1:200, α -Maus-Alexa⁴⁸⁸ 1:200. DAPI 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Größenstandard 1 μm . Weitfeld Mikroskopie.

Ein transfizierter α -Kaninchen-Alexa⁴⁸⁸ Antikörper wurde als Negativkontrolle verwendet, da er kein spezifisches Antigen in der infizierten Humanzelle besitzt (Abb. 4.4 A, 1). Als Positivkontrolle wurde α -IncA-Antikörper transfiziert, der Wirtszellzugänglichkeit belegen sollte (Abb. 4.4 A, 2). Der transfizierte α -Kaninchen-Alexa⁴⁸⁸ Antikörper der Negativkontrolle zeigte keine spezifische Lokalisation an der Inklusion (Abb. 4.4 B, oben). Die Inklusion

konnte durch die DNA-Signale der Chlamydien definiert werden. Die Antikörper der Positivkontrolle IncA zeigten nach der Färbung eine klare Akkumulation an der Inklusionsgrenze (Abb. 4.4 B, Mitte). Die Lokalisation des transfizierten α -CPn0712 Antikörpers ließ keine Akkumulation an der Inklusionsmembrangrenze erkennen (Abb. 4.4 B, unten). Die Antikörper lokalisierten gleichmäßig im Zytosol, was eine erfolgreiche Transfektion belegte. Sowohl im Zellkern als auch im Inklusionslumen wurden für alle getesteten Antikörper deutlich weniger oder keine Signale detektiert. Daher passierten die transfizierten Antikörper nicht die Membrangrenzen der Inklusion und des Zellkerns. Sie markierten also lediglich Proteine, die Zugang zum Wirtszellzytosol hatten.

Durch die Antikörpertransfektion konnte keine Zugänglichkeit von CPn0712 zum Wirtszellzytosol detektiert werden. Eine Effektorfunktion von CPn0712, welche die Prozesse des Wirtszellzytosols direkt beeinflusst, ist somit unwahrscheinlich. Da jedoch die Menge an potentiell zugänglichem IncA-Protein im Vergleich zu CPn0712 weit höher war, bestand die Möglichkeit, dass die geringen Mengen CPn0712 unterhalb der Detektionsgrenze lagen oder dass CPn0712 extrachlamydial lokalisierte, ohne die Inklusion zu verlassen.

4.1.5 Während der Infektion ist CPn0712 intrachlamydial lokalisiert

Im Folgenden wurde daher überprüft, ob CPn0712 in das Inklusionslumen sekretiert wird, ohne die Inklusion zu verlassen. Um diese Hypothese zu testen, wurde im Laufe der Arbeit die Technik der sog. differentiellen Permeabilisierung optimiert, welche die gezielte Detektion von extrachlamydialen Proteinen innerhalb der Inklusion erlaubt.

Bei dieser Technik wird die unterschiedliche Permeabilisierungsstärke von Chemikalien nach der Fixierung genutzt (vgl. Kap 3.6.10). Wird Methanol verwendet, sind Wirtszell- und Inklusionsmembran, aber auch die chlamydialen Partikel permeabilisiert (Abb. 4.5 A, rechts). In einem parallelen Ansatz wird Saponin statt Methanol verwendet, welches die Wirtszell- und Inklusionsmembran permeabilisiert, aber die chlamydialen Partikel unpermeabilisiert belässt (Abb. 4.5 A, links). Um diese beiden Permeabilisierungszustände im Experiment überprüfen zu können, wurden Kontroll-Antikörper verwendet. Ein Antikörper gegen das intrachlamydiale S1-Protein agierte als Negativkontrolle, ein Antikörper gegen das chlamydiale Oberflächenprotein Pmp21 als Positivkontrolle (Abb. 4.5 A).

Nach beiden Permeabilisierungen konnten die DNA der Bakterien angefärbt werden, aber es gab Unterschiede bei den Signalen der Proteine (Abb. 4.5 B oben). Bei Methanol-Permeabilisierung waren die Signale beider Proteine gut erkennbar (Abb. 4.5 B oben).

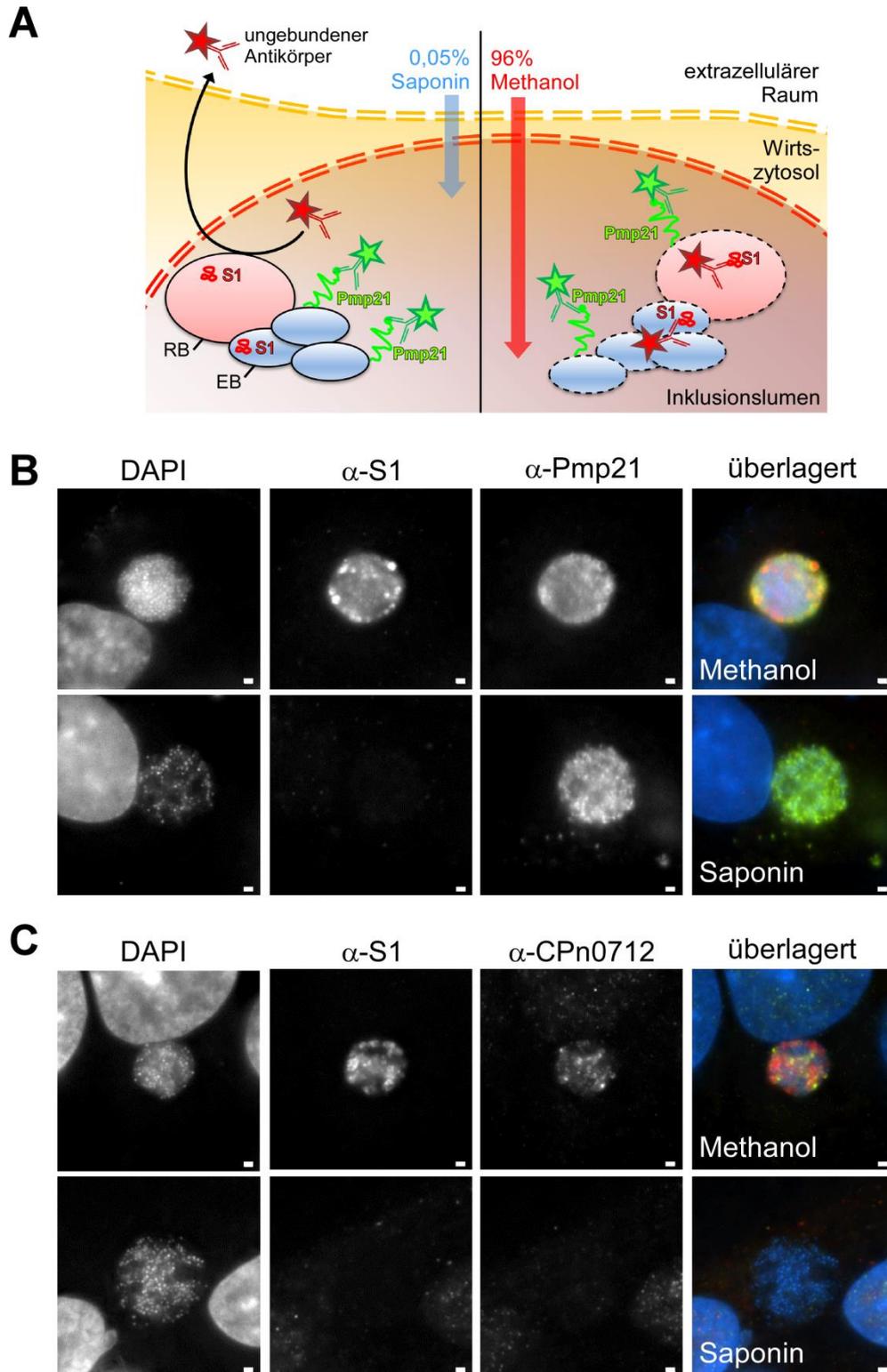


Abb. 4.5: Zugänglichkeitsanalyse von CPn0712 mittels differenzieller Permeabilisierung in der Infektion
(A) Schema der Technik des differentiellen Permeabilisierens. Dargestellt ist die unterschiedliche Zugänglichkeit der α -Pmp21 (grün) und α -S1 Kontrollantikörper (rot). Permeabilisierte Strukturen sind durch gestrichelte Linien angedeutet. Pmp21, polymorphic membrane protein 21; S1, chlamydiale ribosomale Untereinheit S1; RB, Retikularkörperchen; EB, Elementarkörperchen. **(B+C)** Differenzielles Permeabilisieren der Infektion mit *C. pneumoniae*. HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* (MOI=2) infiziert und 48 hpi unter nicht permeabilisierenden Bedingung auf Eis fixiert. Anschließend erfolgte die differentielle Permeabilisierung mit Methanol (jeweils oben) oder Saponin (jeweils unten) und die immunfluoreszente Färbung ebenfalls auf Eis. Die Färbung wurde gegen das oberflächenexponierte Pmp21 (grün) und gegen das intrachlamydiale Kontrollprotein

S1 (rot) **(B)** oder gegen CPn0712 (grün) und S1 (rot) **(C)** gerichtet. Zusätzlich wurde die DNA über DAPI (blau) gefärbt. Primär: α -S1 1:5, α -Pmp21 1:25, α -CPn0712 1:5. Sekundär: α -Kaninchen-Alexa⁴⁸⁸ 1:100, α -Maus-Alexa⁵⁹⁴ 1:100. DAPI 2 μ g/ml. Größenstandard 1 μ m. Weitfeld Mikroskopie.

Während Pmp21-Signale auch in Saponin-permeabilisierten Zellen detektiert wurden, konnten keine S1-Signale nach dieser Permeabilisierung erkannt werden (Abb. 4.5 B unten). Dieses Kontroll-Experiment belegte, dass durch differenzielles Permeabilisieren die chlamydialen Partikel intakt bleiben, aber extrachlamydiale Proteine gezielt durch Immunfluoreszenz-Färbungen angefärbt werden können.

Anschließend wurde die Zugänglichkeit von CPn0712 zusammen mit dem S1-Protein als Kontrolle überprüft. Bei der Methanol-Permeabilisierung konnten sowohl S1- als auch CPn0712-Signale detektiert werden (Abb. 4.5 C, oben). Eine leichte Erhöhung der Hintergrundsignale war in der CPn0712-Färbung vor allem im Bereich des Zellkerns zu beobachten. Diese Hintergrundsignale sind vermutlich auf die verringerte Färbetemperatur (4 °C) zurückzuführen, welche eingehalten werden muss, um unkontrollierte Permeabilisierung zu verhindern (vgl. Kap. 3.6.10). Bei Saponin-Permeabilisierung belegte das Ausbleiben der S1-Signale in der Inklusion bei gleichbleibenden Hintergrundsignalen die Unversehrtheit der Chlamydien (Abb. 4.5 C, unten). Interessanterweise waren spezifische extrachlamydiale Signale für CPn0712 bei Saponin-permeabilisierten Zellen nicht detektierbar (Abb. 4.5 C, unten).

Somit musste CPn0712 intrachlamydial lokalisiert sein, und eine potentielle Funktion als extrachlamydial agierendes Effektorprotein schied weitestgehend aus.

4.1.6 CPn0712 lokalisiert in Partikeln dicht unter der Inklusionsmembran

Trotz intrachlamydialer Lokalisation erschien CPn0712 in der konfokalen Laserscan-Mikroskopie (kLSM) teilweise mit der Inklusionsmembran assoziiert (vgl. Abb. 4.3). Deswegen sollte der Ursprung der CPn0712-Signale aufgeklärt werden, die kolokalisierend mit der Inklusionsmembran erschienen. Dafür wurden mikroskopische Daten der superhoch-auflösenden gSTED-Fluoreszenzmikroskopie (gated Stimulated Emission Depletion) ausgewertet, die parallel mit den Zugänglichkeitsstudien angefertigt wurden und signifikant zur Klärung des Signalursprunges beitragen.

Mit Hilfe der gSTED-Mikroskopie kann eine deutlich höhere laterale (xy-Ebene) und axiale (z-Achse) Auflösung erreicht werden, als es bei der kLSM möglich ist. Eine weitere Erhöhung der Bildqualität wird durch die Rekonstruktion der Signale durch Dekonvolution erreicht. Bei der Dekonvolution wird die Streuung jedes fluoreszenten Signals, durch aufgezeichnete

Eigenschaften in den Metadaten der Aufnahme, berechnet. Anschließend erfolgt die Rekonstruktion der ursprünglichen Signale im Mikroskopiebild abzüglich der berechneten Streuung.

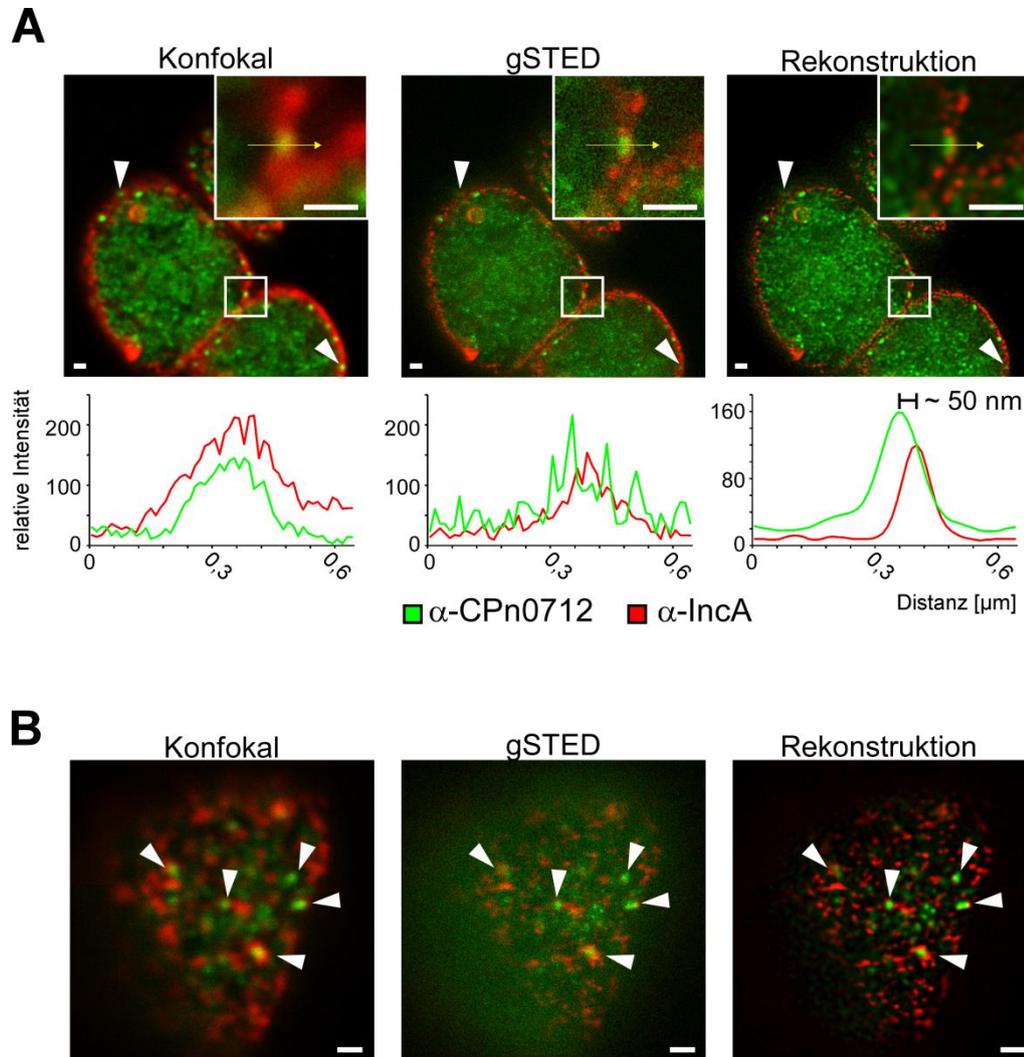


Abb. 4.6: Lokalisationsanalyse von CPn0712 und IncA mittels superhoch-auflösender Mikroskopie

HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* infiziert (MOI=2), 48 hpi fixiert (Fix.: PFA; Post-Fix.: Methanol) und mit α -CPn0712 (grün) und α -IncA (rot) Antikörpern gefärbt. Aufnahmen desselben Bereichs wurden zu Vergleichszwecken mittels kLSM-Einstellungen (links) und gSTED-Mikroskopie (Mitte) aufgenommen. Außerdem wurde durch Dekonvolution mit Hilfe des Programms „*Huygens professional*“ die gSTED-Aufnahme rekonstruiert (rechts). **(A)** Intensitätsmessungen entlang der gelben Pfeile in den vergrößerten Bildausschnitten wurden analog zu Abb. 4.3 durchgeführt und in Signalintensitäts-Diagrammen dargestellt (unten). Die Farben der Datenreihen entsprechen den Signalfarben in den überlagerten Mikroskopiebildern und Vergrößerungen. Pfeilspitzen deuten auf CPn0712-Signale, die mit zunehmender Auflösung verschwanden. **(B)** Aufnahme der Aufsicht einer chlamydialen Inklusion. Die aufgenommenen Ebene schnitt möglichst parallel durch die Inklusionsmembran. Pfeilspitzen markieren Bereiche, in denen Signale der α -CPn0712 und α -IncA Antikörper besonders eng assoziiert sind. Primär: α -CPn0712 1:12,5, α -IncA 1:50. Sekundär: α -Kaninchen-Alexa⁴⁸⁸ 1:100, α -Maus-Alexa⁵⁹⁴ 1:100. Größenstandard 0,5 µm. gSTED mit etwa 40 % 3D-STED Intensität zur Erhöhung der axialen Auflösung.

Die Lokalisation von CPn0712 und IncA wurde im selben Bereich mit kLSM, superhochauflösender Mikroskopie und Rekonstruktion über Dekonvolution analysiert. Es wurden außerdem jeweils Signalintensitäts-Messungen durchgeführt (vgl. Abb. 4.3). In der kLSM konnte CPn0712 Bakterien- und Inklusionsmembran-assoziiert detektiert werden. In der Vergrößerung ist erkennbar, dass CPn0712-Signale besonders eng mit der Inklusionsmembran assoziiert sein konnten und die Maxima von IncA und CPn0712 vollständig überlagert erschienen (Abb. 4.6 A, links). In der Untersuchung mittels gSTED-Mikroskopie zeigte sich in der Übersichtsaufnahme eine starke Erhöhung der Auflösung (Abb. 4.6 A, Mitte). Die Intensitätsmessung im vergrößerten Bereich ließ bereits eine leichte Verschiebung des CPn0712-Signals im Vergleich zum IncA-Maximum erkennen. Körnige Hintergrundsignale erschwerten in der gSTED-Aufnahme jedoch die eindeutige Einschätzung der Lokalisation von CPn0712 und IncA zueinander. Die mittels Dekonvolution rekonstruierten Bilder wiesen dagegen hohe Klarheit bei wenig Signalschwankung auf (Abb. 4.6 A, rechts). Dies schlug sich besonders in der Intensitätsmessung wieder, welche die Verschiebung des CPn0712-Signals gegenüber dem IncA-Signal in Richtung Inklusionslumen verdeutlichte. Der berechnete Distanzunterschied beider Signal-Maxima betrug etwa ~ 50 nm und zeigt die dichte Assoziation von CPn0712 an der dem Lumen zugewandten Seite der Inklusionsmembran. Einige CPn0712 Signale verschwanden aufgrund des axialen Auflösungsgewinns gänzlich aus der Aufnahme (Abb. 4.6 A, Pfeilspitzen). Somit konnte gezeigt werden, dass vermeintlich kolokalisierende Signale mit zunehmender Auflösung deutlich getrennt werden können.

Darüber hinaus muss IncA als sekretiertes Inklusionsmembranprotein zu bestimmten Zeitpunkten in enger Verbindung zum T3SS stehen, denn auch dieses Protein wird in heterologen Sekretionsassays sekretiert (Subtil et al. 2001). Da CPn0712 vermutlich auch die Funktion als T3SS-Strukturkomponente besitzt, könnten starke CPn0712-Signale an der Inklusionsmembran auch die Lokalisation von CPn0712 im T3SS repräsentieren. Deshalb sollte analysiert werden, ob IncA in Inklusionsmembranbereichen akkumuliert, die in direkter Nähe zu dominanten CPn0712-Signalen liegen. Um die laterale IncA-Verteilung in der Inklusionsmembran zu untersuchen, wurden mikroskopischen Aufnahmen einer Inklusionsaufsicht angefertigt.

Bei diesen Aufnahmen wurde die Fokusebene möglichst parallel durch die obere Inklusionsmembran gelegt, um so eine parallele Ansicht weiter Bereiche der Inklusionsmembran zu erhalten. Auch hier wurden vom selben Bereich Aufnahmen durch kLSM-, gSTED-Mikroskopie- und die Rekonstruktion durch Dekonvolution angefertigt. Es zeigte sich, dass IncA nicht gleichmäßig in der Inklusionsmembran verteilt war, sondern abschnittsweise akkumuliert in der Inklusionsmembran vorlag (Abb. 4.6 B). Dominante

Signale von CPn0712 und IncA konnten an einigen Stellen lateral dicht assoziiert detektiert werden (Abb. 4.6 B, Pfeilspitzen). Außerdem konnten beide Proteine gemeinsam in einer Fokusebene detektiert werden, was zu der dichten Assoziation von CPn0712 an der dem Lumen zugewandten Seite der Inklusionsmembran von etwa 50 nm passt (vgl. Abb. 4.6 A, rechts). Diese Ergebnisse verdeutlichten die biologisch enge Assoziation von CPn0712 und IncA an der Inklusionsmembran, die vermutlich während des Sekretionsvorganges von IncA in der Inklusionsmembran besteht.

Somit wurden die in der kLSM detektierten kolokalisierenden CPn0712-Signale mit der Inklusionsmembran vermutlich durch eine Kombination aus biologisch enger Assoziation und technischen Gegebenheiten hervorgerufen.

4.1.7 Der CPn0712-induzierte wachstumsdefekte Phänotyp geht von einer Transmembrandomäne aus

Bei Expression von CPn0712 konnte ein wachstumsdefekter Phänotyp in *S. cerevisiae* Zellen beobachtet werden, der Anlass zur Annahme einer möglichen Effektorfunktion war (Hänsch 2011, Sisko et al. 2006). Um dies näher zu untersuchen, sollte der Ursprung dieses Phänotyps in einer im Rahmen dieser Doktorarbeit betreuten Bachelorarbeit aufgeklärt werden (Franken 2012).

Zur ektopischen Expression in Hefe wurden das Volllängen-Protein CPn0712 (CPn0712_{6xHis}) und der Leervektor als Negativkontrolle verwendet. Das endoplasmatische Retikulum (ER) könnte bei der hohen Expression von bakteriellen Proteine mit TMDs in Eukaryoten beeinflusst sein, da exprimierte Proteine dort fehlgefaltet und akkumulieren könnten. Die daraus resultierende Stresssituation könnte zu einer veränderten Wachstumsrate auf exprimierenden Zellen führen. Deshalb wurde eine CPn0712-Variante überprüft, bei der die C-terminale TMD deletiert wurde (AS 546-568, CPn0712- Δ TMD_{6xHis}) (Abb. 4.7 A). Zur Überprüfung der Expression, wurden zunächst Zellysate aus exprimierenden *S. cerevisiae* Zellen mittels Westernblot untersucht. Im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle konnte eine deutliche Expression von CPn0712_{6xHis} und CPn0712- Δ TMD_{6xHis} bei ca. 120 kDa in ähnlichen Mengen detektiert werden. Eine Veränderung des apparenten Laufverhaltens von CPn0712- Δ TMD_{6xHis} (berechnet: 92,8 kDa) gegenüber CPn0712_{6xHis} (berechnet: 95,2 kDa) konnte nicht erkannt werden (Abb. 4.7 B). Außerdem waren einige Degradationsbanden erkennbar, die sich in ihrer Größe und Ausprägung zwischen CPn0712_{6xHis} und CPn0712- Δ TMD_{6xHis} nicht unterschieden.

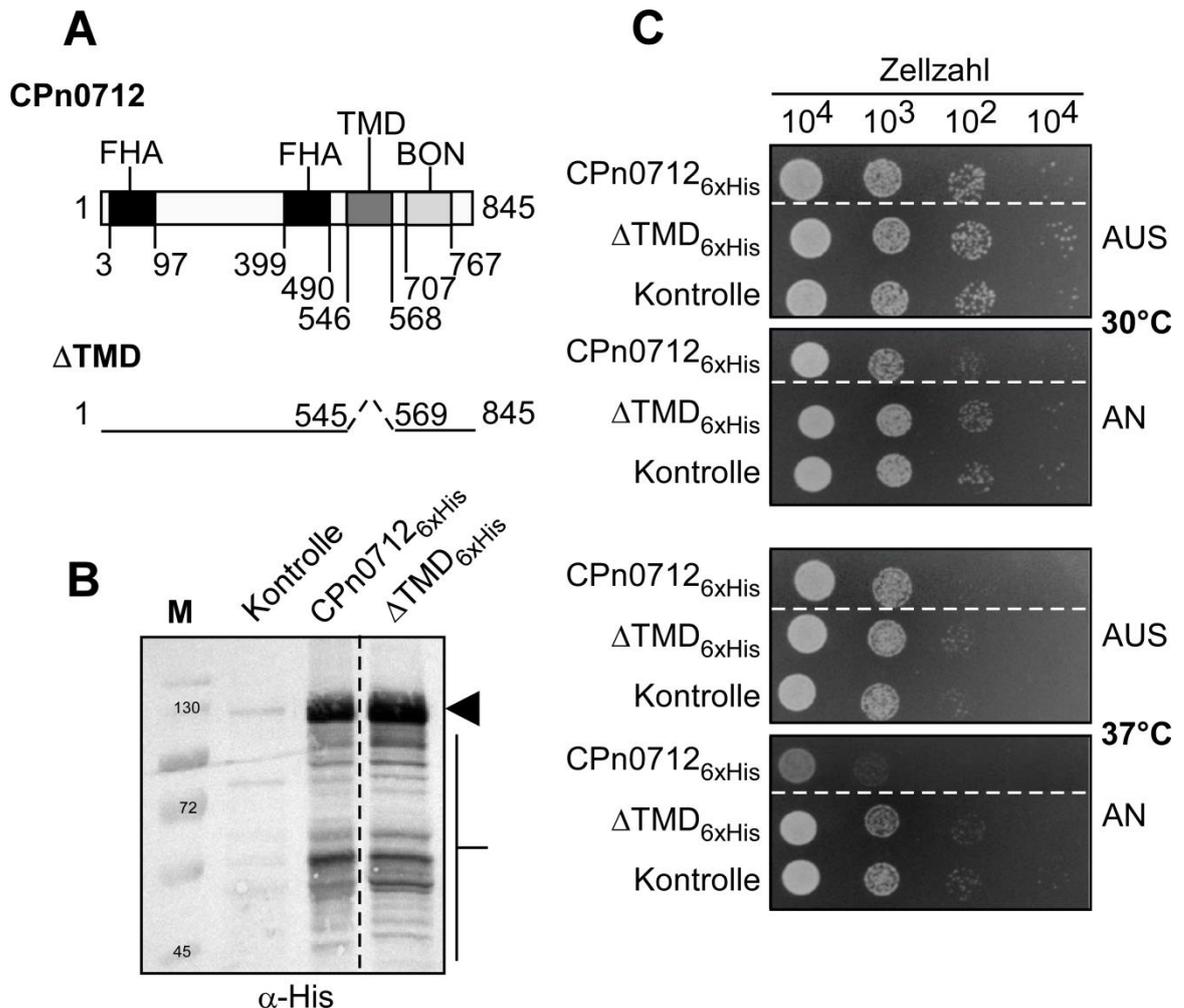


Abb. 4.7: Analyse des Wachstumsphänotyps von CPn0712 in *S. cerevisiae*

(A) Schematische Darstellung von CPn0712 mit Domänenübersicht und der TMD-Deletionsvariante (CPn0712- Δ TMD) im Vergleich. Aminosäurepositionen sind durch Zahlen angegeben. Deletierte Bereiche sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. TMD, Transmembrandomäne; FHA, fork-head-associated domain; BON, bacterial OsmY and nodulation-domain. (B) Expressionskontrolle von CPn0712_{6xHis} und CPn0712- Δ TMD_{6xHis} in Hefezellen. Transformierte CEN.PK2 Zellen wurden ü/N in induzierendem Medium (SG-Medium) kultiviert, in Lysispuffer1 lysiert und je 15 μ g Gesamtprotein auf einem 10 % SDS-Gel aufgetrennt. Im Westernblot wurden 6xHis-markierte Proteine detektiert. Die Detektion erfolgte über den fusionierten 6xHis-Tag. Gestrichelte Linien markieren nicht gezeigte Bereiche zwischen den dargestellten Spuren auf derselben Westernblotmembran. Kontrolle = Leervektor p423GAL1. \blacktriangleleft CPn0712_{6xHis} bzw. CPn0712- Δ TMD_{6xHis}, \perp vermutliche CPn0712_{6xHis} bzw. CPn0712- Δ TMD_{6xHis} Degradationen. Berechnete Größen: CPn0712_{6xHis}: 95,2 kDa; CPn0712- Δ TMD_{6xHis} 92,8 kDa. Primär: α -His 1:2500. Sekundär: α -Maus-AP 1:7500. M, Größenstandard: Prestained PageRuler™ (modifiziert nach Franken 2012) (C) Serieller Verdünnungstropftest von CPn0712_{6xHis}- und CPn0712- Δ TMD_{6xHis}-exprimierenden CEN.PK2 Zellen. Die Vorkultur wurde ü/N in nicht-induzierendem SR-Medium kultiviert, verdünnt auf die Selektivmedienplatten aufgetropft und unter induzierenden (AN, SG-Medium) und nicht induzierenden (AUS, SR-Medium) Bedingungen für 2 Tage bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Gestrichelte Linien markieren nicht gezeigte Bereiche zwischen den dargestellten Proben auf derselben Selektivmedienplatte. (Modifiziert nach Franken 2012).

Nach Feststellung der erfolgreichen Expression wurden die exprimierenden Zellen für Wachstums-Analysen durch serielle Verdünnungstropftests eingesetzt (Abb. 4.7 C). Alle Zellen wiesen auf Selektivmedien der Wachstumskontrolle (Promotor reprimiert) bei allen

Temperaturen ein ähnliches Wachstum auf (Abb. 4.7 C, AUS). Auf induzierenden Selektivmedien (Promotor nicht reprimiert) konnte ein schwacher wachstumsdefekter Phänotyp bei Expression von CPn0712_{6xHis} bei 30 °C beobachtet werden (Abb. 4.7 C, AN). Dieser Phänotyp verstärkte sich durch Expression von CPn0712_{6xHis} bei 37 °C. Wurde CPn0712-ΔTMD_{6xHis} exprimiert, so konnte der wachstumsdefekte Phänotyp weder bei 30 °C noch bei 37 °C beobachtet werden. Somit besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der C-terminalen TMD und dem induzierten Wachstumsphänotyp.

Im Zusammenhang mit dem Wachstumsphänotyp wurde zuvor in Hefezellen die Lokalisation von CPn0712^{GFP} zu Lipidtröpfchen (LDs, **L**ipid **d**roplets) beobachtet und als potentielle eukaryotische Zielstruktur des Proteins gedeutet (Hänsch 2011). LDs werden in eukaryotischen Zellen in der Membran ER gebildet und danach abgeschnürt (Pol et al. 2014). Die Akkumulation von CPn0712 im ER könnte deshalb ebenfalls eine Assoziation des fehlgefalteten Proteins an LDs bewirken. Da der wachstumsdefekte Phänotyp von der C-terminalen TMD in CPn0712 hervorgerufen wurde, sollte im Rahmen der oben genannten Bachelorarbeit die Lokalisation der im Wachstumstest verwendeten CPn0712-Varianten bezüglich LDs in Hefe untersucht werden (Franken 2012). Dazu wurden die Lokalisation von CPn0712^{GFP} und CPn0712-ΔTMD^{GFP} in *S. cerevisiae* Zellen untersucht.

Für die Analysen wurde ein *S. cerevisiae*-Stamm ausgewählt, der zusätzlich konstitutiv mRFP-fusioniertes (**m**onomeric **r**ed **f**luorescent **p**rotein) Erg6p als Markerprotein für LDs exprimiert (Huh et al. 2003). GFP allein diente als Negativkontrolle und zeigte keine auffällige Lokalisation zu LDs (Abb. 4.8 A, oben). Für CPn0712^{GFP} konnte eindeutig eine akkumulierte Assoziation mit Erg6p^{mRFP} markierten LDs in *S. cerevisiae* Zellen beobachtet werden (Abb. 4.8 A, Pfeilspitzen Mitte). Wurde im Gegensatz dazu CPn0712-ΔTMD^{GFP} exprimiert, so war keine Lokalisation zu LDs und eine Lokalisation ähnlich zum Leervektor zu erkennen (Abb. 4.8 A, unten). Die C-terminale TMD von CPn0712 ist also wie beim Wachstumsphänotyp auch essentiell für die Assoziation von CPn0712^{GFP} mit LDs in *S. cerevisiae* Zellen.

Da bekannt ist, dass LDs in eukaryotischen Zellen häufig aus dem ER abgeschnürt werden, sollte abschließend die Lokalisation des Erg6p^{mRFP} LD-Markerproteins und dem ER zueinander verglichen werden (Pol et al. 2014). Dazu wurde das ER-markierende Protein Pdr5*^{GFP} (**P**leiotropic **d**rug resistance protein **5**) im LD-markierten Stamm exprimiert (Plemper et al. 1998).

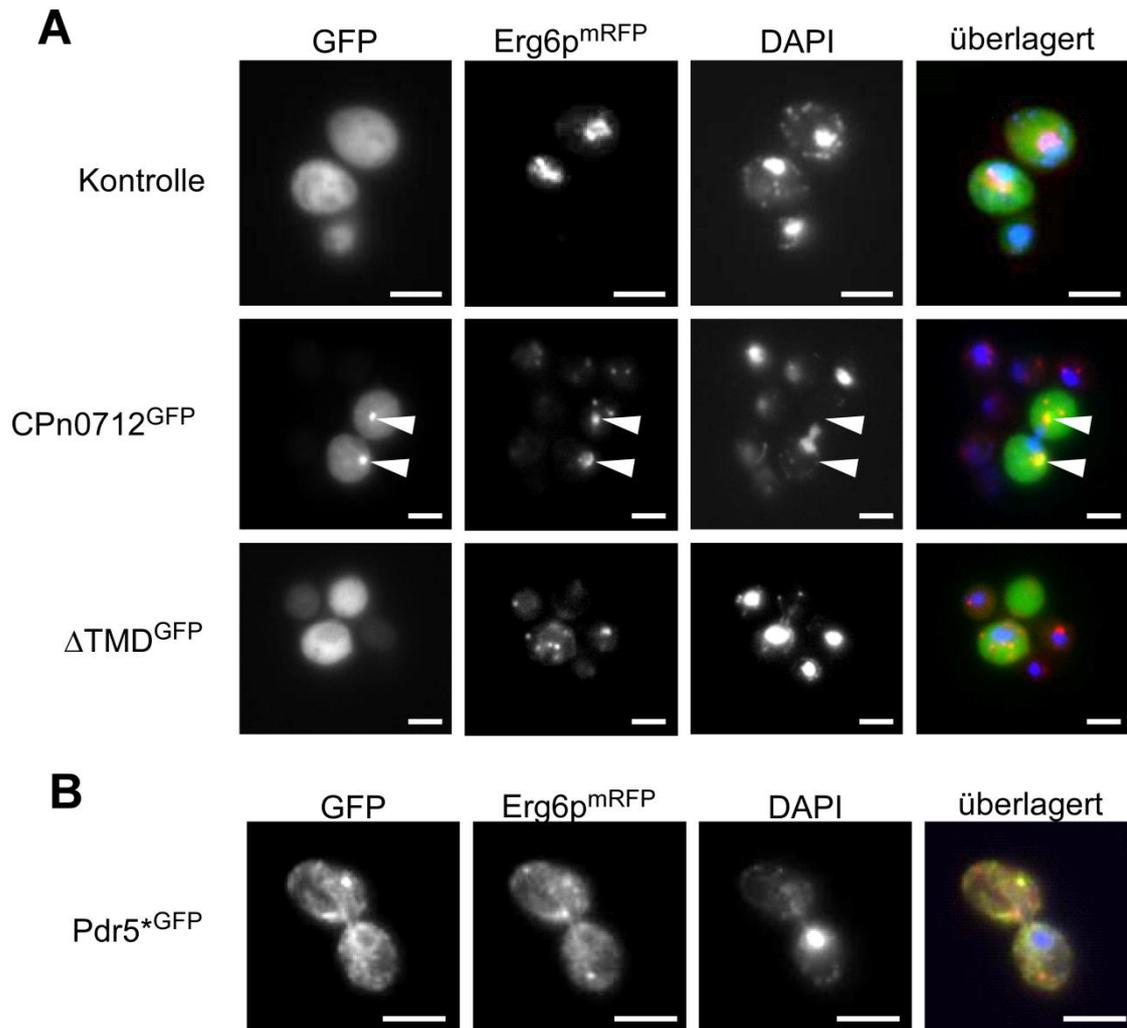


Abb. 4.8: Lokalisation von CPn0712^{GFP} und CPn0712-ΔTMD^{GFP} in *S. cerevisiae*

(A+B) CPn0712^{GFP}, CPn0712-ΔTMD^{GFP} oder GFP allein (grün) (A) bzw. Pdr5*^{GFP} (grün) (B) wurde im *S. cerevisiae* Stamm EY1671 für 24 h exprimiert und die Zellen fixiert (Fix.: PFA; Post-Fix.: -/-). GFP diente als Kontrolle. LD-markierendes Erg6p^{mRFP} ist in rot dargestellt. Die DNA wurde mittels DAPI (blau, 2 μg/ml) gefärbt. Pfeilspitzen markieren kolocalisierende und assoziierende Signale von Cpn0712^{GFP} und Erg6p^{mRFP}. Größenstandard 1 μm. Weitfeld Mikroskopie. (Modifiziert nach Franken 2012).

Pdr5*^{GFP} wies eine distinkte Verteilung innerhalb der Hefezelle auf und umschloß teilweise den Zellkern der Hefezelle (Abb. 4.8 B). Erg6p^{mRFP} zeigte in den Aufnahmen größtenteils eine deutliche Kolokalisation mit Pdr5*^{GFP}-Signalen. Dieses Ergebnis bestätigt die Entstehung von LDs im ER, legt aber auch indirekt die Vermutung nahe, dass CPn0712 in *S. cerevisiae* ebenfalls im ER lokalisiert.

Zusammenfassend wird der Wachstumsphänotyp von CPn0712 essentiell durch die C-terminale TMD von CPn0712 bestimmt. Vermutlich wird der Phänotyp bei ektopischer Expression durch die akkumulierte Assoziation von CPn0712 am ER und mit im ER gebildeten LDs hervorgerufen, was zur Störung physiologischer Prozesse führen kann.

Somit konnte der Verdacht, dass CPn0712 oder ein N-terminales Teil-Fragment dieses Proteins eine Effektorproteinfunktion besitzt, ausgeräumt werden. Darüber hinaus konnte

durch detaillierte Analysen der Lokalisation in der Infektion und durch die ektopische Expression in *S. cerevisiae* frühere Beobachtungen erklärt werden, welche ursprünglich zur Annahme einer Effektorfunktion geführt hatten.

4.2 CPn0678 – Adhäsion oder Effektorprotein?

Als weitere potentielle Effektorproteine wurden CPn0677 und CPn0678 eingehender untersucht. Sie wurden als sehr spät exprimierte chlamydiale Proteine identifiziert und als mit SNX9 interagierende Adhäsine klassifiziert (Murra 2009). Experimentell wurden funktionale T3SS-Signalsequenzen für diese Proteine gefunden. Auch bestanden limitierte strukturelle Homologien in ihren PRR zu denen des sekretierten Effektorproteins EspF aus *EPEC*. Deshalb wurde im zweiten Teil der Arbeit die Bedeutung der Proteine CPn0677 und CPn0678 unter dem Aspekt von potentiellen Effektorproteinen während des chlamydialen Infektionszyklus untersucht. Nach anfänglichen Experimenten für beide Proteine wurde dann der Fokus auf CPn0678 gelegt, für das verglichen mit CPn0677 mehr experimentelle Ergebnisse vorlagen.

4.2.1.1 Überprüfung der Spezifität der α -CPn0677 und α -CPn0678 Antikörper

Zuerst mussten die vorhandenen Antikörper auf ihre Spezifität gegenüber dem Antigen getestet werden. Dies erfolgte über Präabsorptionstests analog zu den Arbeiten mit dem α -CPn0712 Antikörper (vgl. Kap. 4.1.1).

Es wurden jeweils rCPn0677_{6xHis} bzw. rCPn0678_{6xHis} in *E. coli* exprimiert, denaturiert aufgereinigt und durch Dialyse renaturiert verwendet. Nach der Präabsorption gegen das Kontrollprotein BSA war für beide Antikörper 72 hpi eine punktierte Färbung innerhalb der späten, IncA-markierten Inklusion zu erkennen (Abb. 4.9 A + B). Über Gegenfärbungen der zur Präabsorption verwendeten Latexgranulate, konnten keine absorbierten Antikörper bei der BSA-Kontrolle detektiert werden. Wurde das Latexgranulat dagegen mit dem jeweils spezifischen Antigen (rCPn0677_{6xHis} bzw. rCPn0678_{6xHis}) beschichtet, so waren deutliche Mengen gebundenen Antikörpers am Granulat zu detektieren. Gleichzeitig verschwanden die punktierten Antikörper-Signale innerhalb der chlamydialen Inklusion. Somit konnte die Spezifität beider Antikörper gezeigt werden, die für weitere Experimente verwendet wurden. Die beobachteten distinkten Signale für CPn0677 und CPn0678 in der Inklusion wurden im Folgenden näher betrachtet.

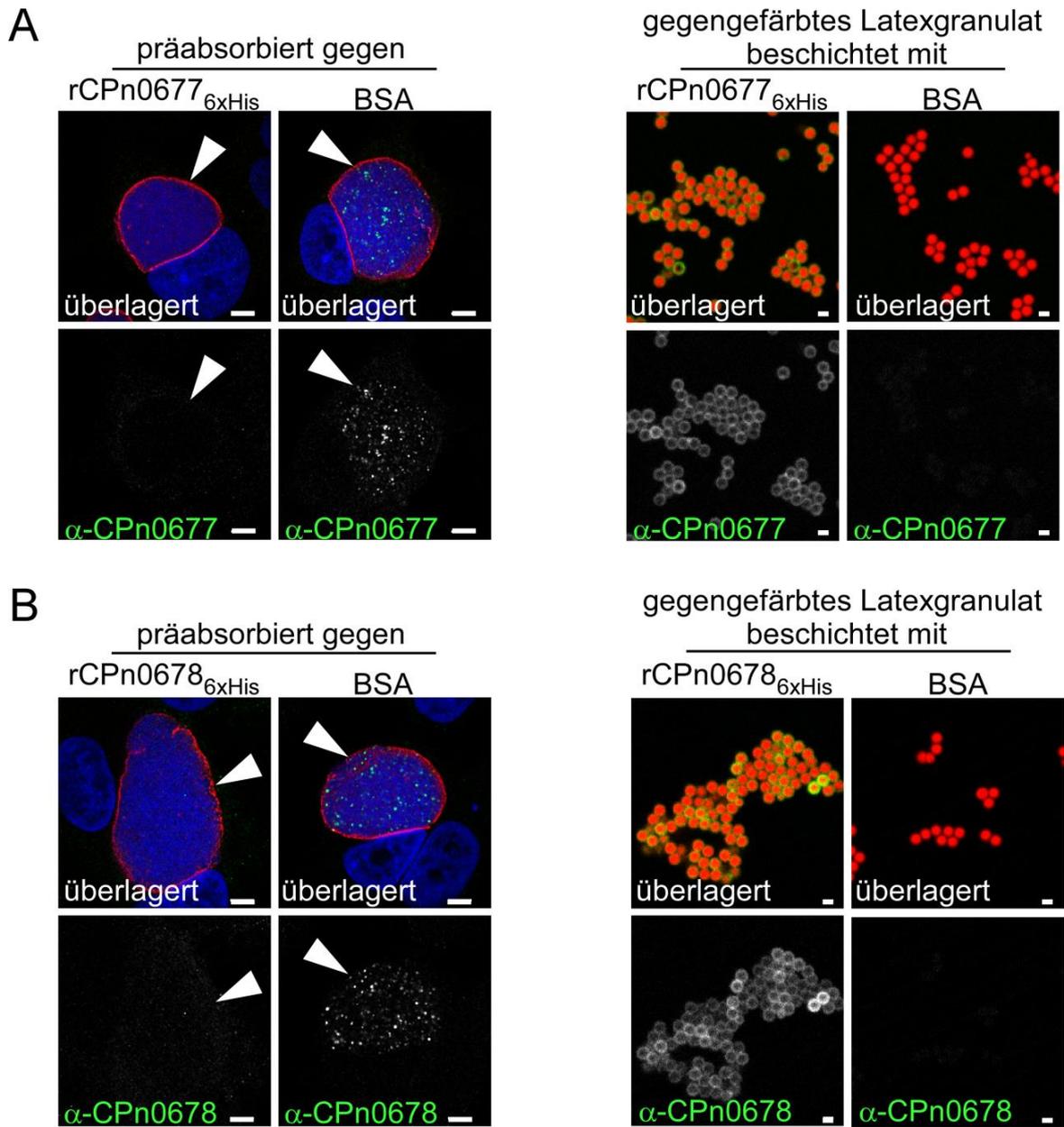


Abb. 4.9: Präabsorptionstest zur Überprüfung der Spezifität der α -CPn0677 und α -CPn0678 Antikörper
 Präabsorptionstest von α -CPn0677 (**A**) und α -CPn0678 (**B**) gegen Latexgranulat beschichtet mit BSA oder rCPn0677_{6xHis} bzw. rCPn0678_{6xHis}. Der Antikörper-haltige Überstand aus beiden Präabsorptionstests wurde für Immunfluoreszenz-Färbungen von infizierten HEp-2 Zellen (MOI=2) 72 hpi, verwendet (grün) (jeweils links) (Fix.: PFA; Post-Fix.: Methanol). Inklusionen wurden auch mit α -IncA gefärbt (rot). Pfeilspitzen markieren Inklusionen. Proteinbeschichtetes Latexgranulat (rot) wurde zum Nachweis des präabsorbierten Antikörpers mit α -Kaninchen-Alexa⁵⁹⁴ gegengefärbt (jeweils rechts, hier falschfarben in grün dargestellt). Primär: absorbierte Antikörper (1:5), α -IncA (1:100). Sekundär: α -Kaninchen-Alexa⁴⁸⁸ 1:200, α -Kaninchen-Alexa⁵⁹⁴ 1:200, α -Maus-Alexa⁵⁹⁴ 1:200. DAPI 2 μ g/ml. Größenstandard Zellfärbung 5 μ m / Latexgranulat 1 μ m. kLSM.

4.2.1.2 CPn0677 und CPn0678 kolokalisieren mit redifferenzierten EBs innerhalb der späten Inklusion

Mittels unterschiedlicher Fixier-, Färbe- und Mikroskopietechniken wurde nun die genauere Lokalisation von CPn0677 und CPn0678 im Verlauf der Infektion charakterisiert. Zu diesem Zweck wurden HEp-2 Zellen mit *C. pneumoniae* infiziert, zu angegebenen Zeitpunkten fixiert und Immunfluoreszenz-Färbungen angefertigt.

Aufgrund des speziellen Fixierverfahrens waren anhand der Beschaffenheit des DNA-Signals unterschiedliche Stadien chlamydialer Partikel erkennbar (Abb. 4.10 A). 24 hpi wurden ausschließlich große, diffuse Signale DNA-Signale detektiert. 72 hpi traten hauptsächlich kleine, kompakte Signale auf. Aufgrund dieser Signale und der bekannten Daten zur DNA-Kondensation in Chlamydien wurden, wie auch bei Studien zu CPn0712, große und dekondensierte DNA-Signale als RBs bzw. kleine und kondensierte Signale als EBs definiert (vgl. Kap. 1.1.3 & Abb. 4.2). Daher zeigte sich 48 hpi eine Mischung aus RBs und redifferenzierten EBs innerhalb einzelner Inklusionen. Entwicklungsunterschiede zwischen benachbarten Inklusionen waren ebenfalls erkennbar (Abb. 4.10 A, Pfeilspitze). Die mit chlamydialen Partikeln gefüllten IncA-markierten Inklusionen, nahmen im Verlauf der Infektion deutlich an Größe zu. Die Färbungen mit α -CPn0677 und α -CPn0678 zeigten das gleiche Lokalisationsmuster für beide Proteine (Abb. 4.10 A + B). 24 hpi waren, bis auf wenige Hintergrundsignale, keine Signale der Proteine innerhalb der Inklusionen erkennbar. Diese Beobachtung deckte sich mit bekannten Expressionsdaten aus Westernblot-Analysen (Murra 2009). 48 hpi waren sehr distinkte, kleine Signale beider Proteine innerhalb der Inklusionen erkennbar, welche meist scharf abgegrenzt waren. Einzelne Inklusionen, die ausschließlich Chlamydien in RB-Form enthielten, zeigten keine Proteinsignale, wie beispielsweise in der 48 hpi-Färbung mit α -CPn0677 gezeigt (Abb. 4.10 A, Pfeilspitze). 72 hpi nahm die Anzahl der beobachteten Signale deutlich zu, ohne dass sich das Verteilungsmuster änderte. Aufgrund der Entwicklungsstatus-abhängigen Signalhäufung lag die Vermutung nahe, dass beide Proteine hauptsächlich in redifferenzierten EBs detektierbar waren. Deshalb sollten die auftretenden späten Signale beider von CPn0677 und CPn0678 auf genauere Kolokalisation mit RBs oder EBs untersucht werden. Daher wurden vergrößerte Ansichten der gefärbten Bereiche betrachtet (Abb. 4.11 A). Die Pfeilspitzen markieren CPn0677- und CPn0678-Signale der 48 hpi-Färbung, die eine deutliche Assoziation mit kondensierten DNA-Signalen von Chlamydien in EB-Form aufwiesen. Selten wurde eine Assoziation zu diffusen DNA-Signalen beobachtet.

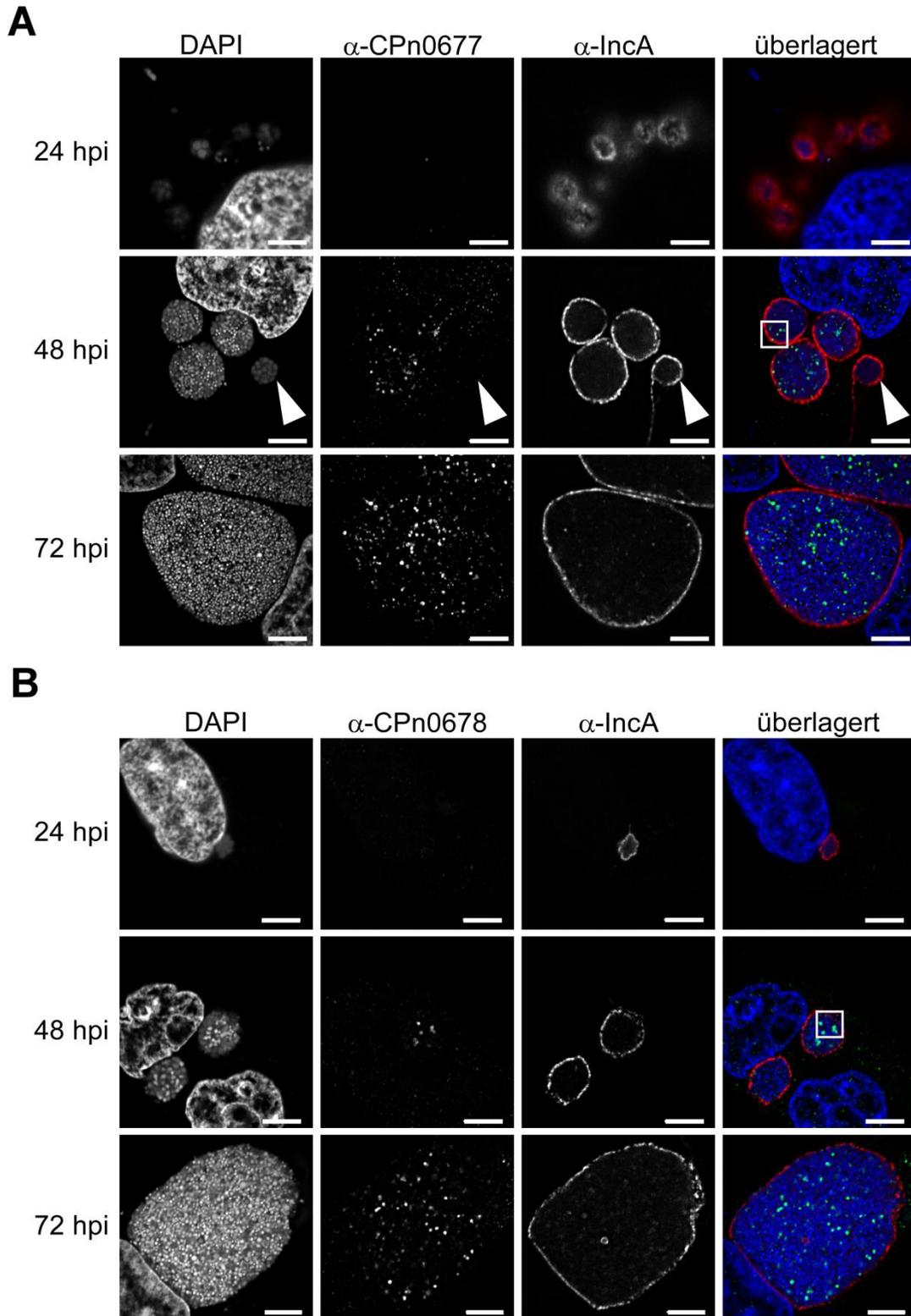


Abb. 4.10: Lokalisation von CPn0677 und CPn0678 im Infektionsverlauf von *C. pneumoniae*
(A+B) Lokalisationsanalyse von CPn0677 und CPn0678 in Immunfluoreszenz-Färbungen. HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* infiziert (MOI=2), zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert (Fix.: PFA; Post-Fix.: Methanol), und mit α -CPn0677 **(A)** oder α -CPn0678 **(B)** (grün) und α -IncA (rot) bzw. DAPI (blau) gefärbt. Weiße Kästchen markieren die vergrößerten Bereiche in Abb. 4.11. Pfeilspitze markiert eine Inklusion, die ausschließlich RBs enthält. Primär: α -CPn0677 1:10, α -CPn0678 1:10, α -IncA 1:100. Sekundär: α -Kaninchen-Alexa⁴⁸⁸ 1:200, α -Maus-Alexa⁵⁹⁴ 1:200. DAPI 2 μ g/ml. Größenstandard 5 μ m. kLSM.

Um einen genaueren Einblick in die Proteinlokalisierung von CPn0677 und CPn0678 mit redifferenzierten EBs zu erlangen wurden 48 hpi Aufnahmen mittels superhoch-auflösender Mikroskopie angefertigt (Abb. 4.11 B). Zu Vergleichszwecken wurden Aufnahmen mit kLSM und gSTED-Technik angefertigt. Außerdem wurde aus der gSTED-Aufnahme eine Rekonstruktion über Dekonvolution generiert.

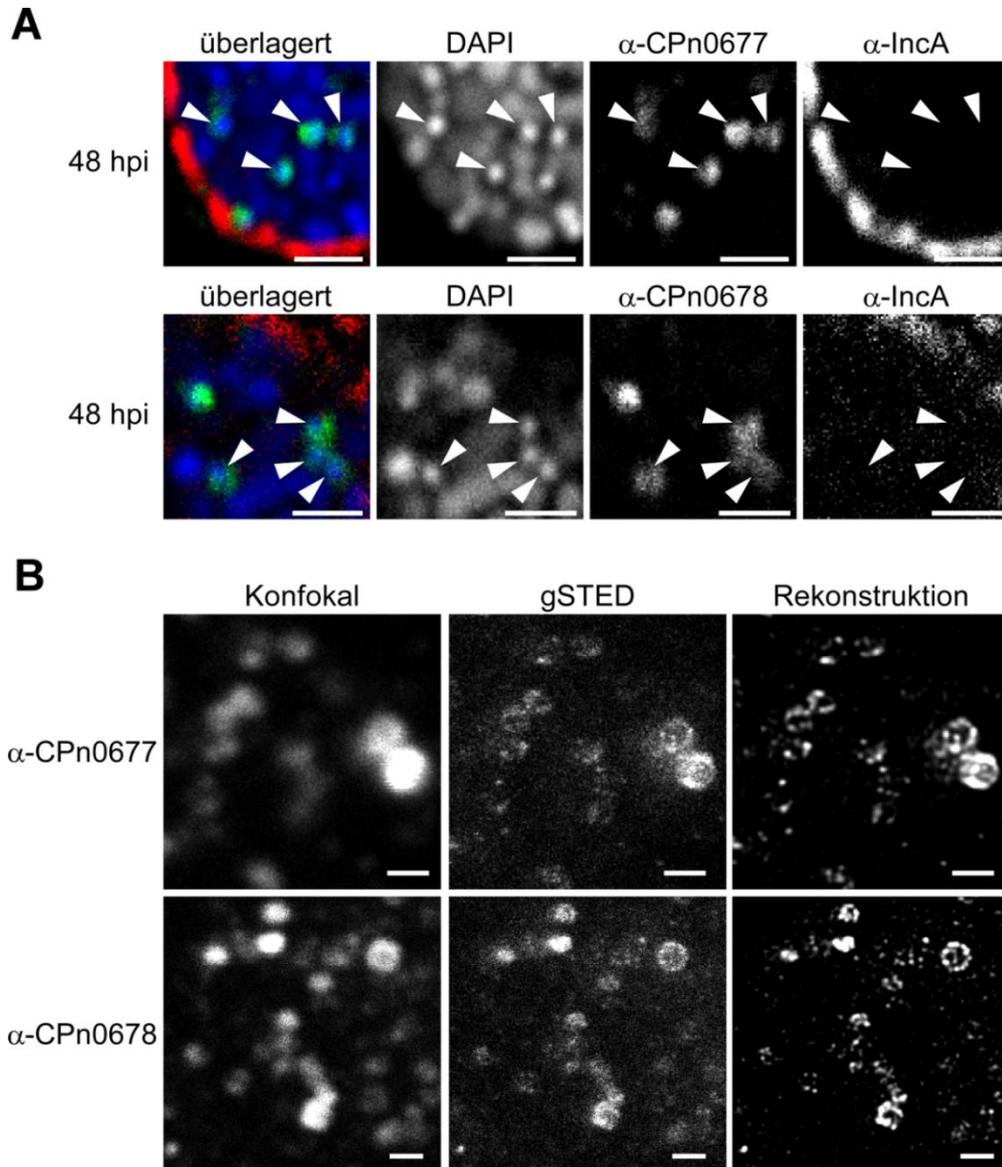


Abb. 4.11: Detaillokalisierung von CPn0677 und CPn0678 in EBs in infizierten HEP-2 Zellen

(A) Vergrößerte Ansicht der Färbung aus Abb. 4.10. Größenstandard 1 μm . kLSM. **(B)** HEP-2 Zellen wurden infiziert, fixiert (Fix: PFA; Post-Fix: Methanol) und mit α -CPn0677 oder α -CPn0678 gefärbt, analog zur Vorgehensweise in Abb. 4.10. Aufnahmen desselben Bereichs wurden zu Vergleichszwecken mittels kLSM-Einstellungen (links) und gSTED-Mikroskopie (Mitte) aufgenommen. Ebenfalls wurde durch Dekonvolution mit Hilfe des Programms „*Huygens Professional*“ das jeweilige gSTED-Bild rekonstruiert (rechts). Größenstandard 0,5 μm .

In der kLSM (Abb. 4.11 B, links) nur diffus zu erkennende Signale beider Proteine sind bereits in der gSTED-Aufnahme (Abb. 4.11 B, Mitte) deutlich besser aufgelöst und in der Rekonstruktion (Abb. 4.11 B, unten) noch deutlicher sichtbar. In diesen Aufnahmen lässt sich

die subzelluläre Lokalisation als punktiert ringartig beschreiben. Es handelt sich also nicht um eine gleichmäßige Verteilung der Proteine im Inneren von redifferenzierten EBs. Die Größe der Signalringe betrug dabei durchschnittlich ca. 250 bis 300 nm, wobei das Lumen der Ringe nur wenig Signal aufwies. Einige größere ringartige Signale wiesen eine Größe von maximal 450 nm auf (Abb. 4.11 B).

Zusammengefasst unterstützt die Größe der Signale die Hypothese der Assoziation des Proteins mit redifferenzierten EBs. Die Größe einiger weniger 450 nm-Signale lag unter der durchschnittlichen Größe eines RBs (0,5 bis 1 μm), war aber zu groß für Chlamydien in EB-Form (300 bis 400 nm). Das Auftreten dieser Signale kann für eine Assoziation der Proteine mit Chlamydien sprechen, die sich vermutlich gerade in der Übergangsphase von RBs zu EBs befinden.

4.2.1.3 CPn0678 ist kein chlamydiales Oberflächenprotein und wird zu frühen Infektionszeitpunkten sekretiert

Durch die Assoziation von CPn0677 und CPn0678 mit redifferenzierten EBs in späten Inklusionen mussten die Proteine auch früh in der Folgeinfektion präsent sein. Daher wurde als Nächstes analysiert, ob diese Proteine einem Adhäsins gleich auf der Oberfläche exponiert werden, oder verborgen im Inneren der Chlamydien bei der frühen Infektion als sekretiertes Protein eine Funktion besitzen könnten. Um die Oberflächenzugänglichkeit der beiden Proteine CPn0677 und CPn0678 zu klären, wurde die bereits in Kap. 4.1.5 bewährte Technik der differentiellen Permeabilisierung angewendet.

Da die höchste Signalstärke der Proteine spät im Infektionszyklus zu beobachten war, wurden für dieses Experiment zuerst infizierte Zellen 72 hpi verwendet (Abb. 4.12). Die Kontrollfärbung mit Methanol-permeabilisierten Zellen zeigte deutlich Signale für das intrachlamydiale Kontrolle-Protein S1, aber auch für CPn0677 und CPn0678 (Abb. 4.12, oben). Somit erlaubte die Kontrollpermeabilisierung die vollständige intrachlamydiale Zugänglichkeit und Färbung in Chlamydien. Wurde die Färbung dagegen nach Permeabilisierung mit Saponin durchgeführt, konnten keine Signale für CPn0677, CPn0678 und das ribosomale S1-Kontrollprotein detektiert werden (Abb. 4.12, unten). Dies zeigt, dass weder CPn0677 noch CPn0678 auf der Oberfläche von redifferenzierten EBs präsentiert werden. Die Funktion von CPn0677 und CPn0678 als chlamydiale Adhäsine konnte daher weitestgehend ausgeschlossen werden.

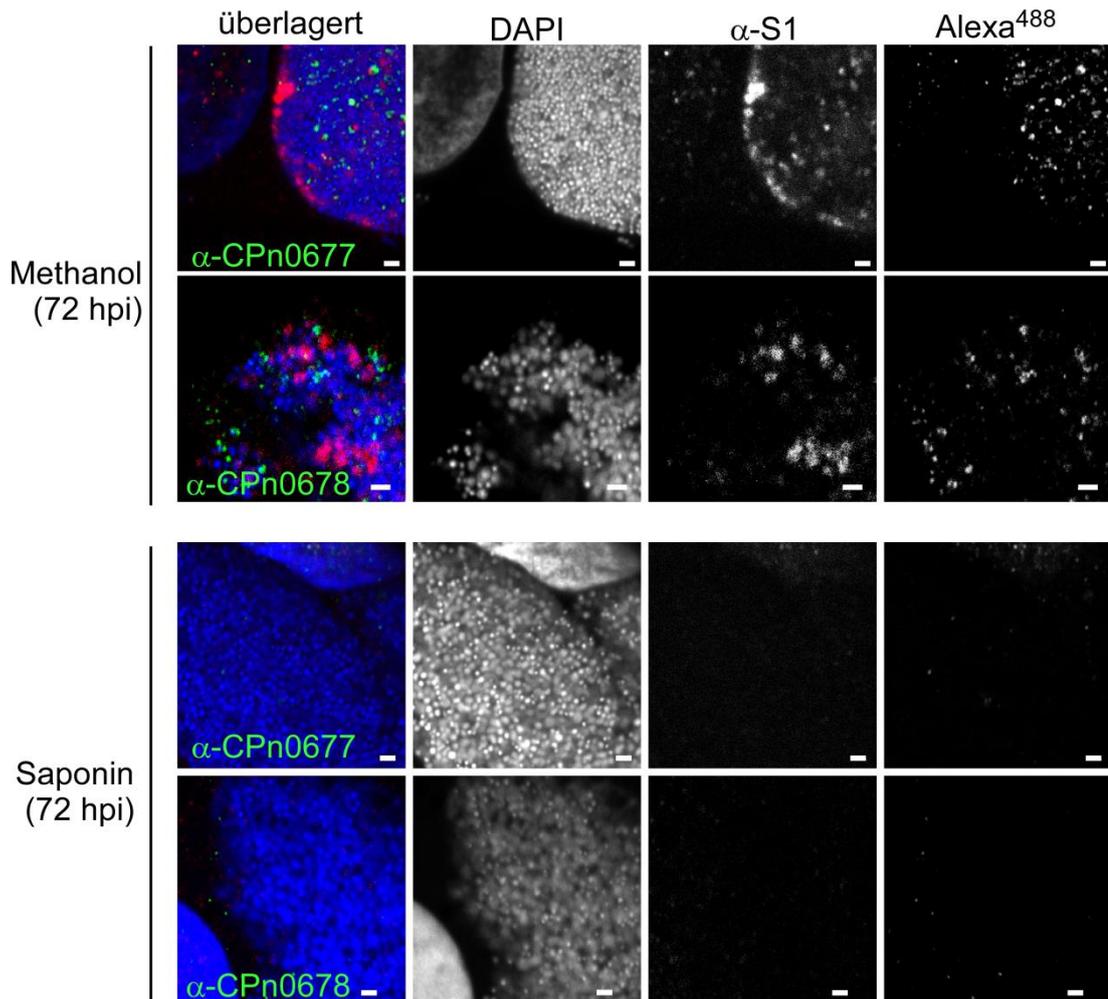


Abb. 4.12: Zugänglichkeitsanalysen von CPn0677 und CPn0678 mittels differentieller Permeabilisierung
 Differenzielles Permeabilisieren der Infektion mit *C. pneumoniae*. HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* infiziert und 72 hpi (MOI=2) unter nicht permeabilisierenden Bedingungen auf Eis fixiert. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung mit Methanol oder Saponin und immunfluoreszente Färbung, ebenfalls auf Eis. Die Detektion erfolgte mittels α -S1 (rot) als intrachlamydiale Kontrolle und α -CPn0677 oder α -CPn0678 (grün). Die DNA wurde mittels DAPI gefärbt (blau). Primär: α -S1 1:5, α -CPn0677 1:2,5, α -CPn0678 1:2,5. Sekundär: α -Kaninchen-Alexa⁴⁸⁸ 1:100, α -Maus-Alexa⁵⁹⁴ 1:100. DAPI 2 μ g/ml. Größenstandard 1 μ m. kLSM.

Für weitere Analysen wurde der Fokus auf das Protein CPn0678 gelegt, für das verglichen mit CPn0677, mehr experimentelle Ergebnisse vorlagen (vgl. Kap. 1.5). Für CPn0677 und CPn0678 konnten bereits zuvor funktionale T3SS-Signalsequenzen in heterologen Sekretionsassays identifiziert werden (Murra 2009). Deshalb sollte untersucht werden, ob CPn0678 früh in der Infektion sekretiert werden könnte. Hierzu wurden Zellen sehr kurz nach der Infektion (20 min pi) differentiell permeabilisiert und die Lokalisation analysiert.

Nach der Permeabilisierung mit Saponin konnte CPn0678 als extrachlamydiales Protein detektiert werden (Abb. 4.13). Signale für extrachlamydiales CPn0678 waren besonders deutlich und häufig in Bereichen zu erkennen, in denen mehrere Chlamydien parallel adhärten oder vermutlich erst kürzlich internalisiert wurden. Die extrachlamydialen

CPn0678-Signale erschienen dann meist ringartig, welche die kondensierten DNA-Signale der chlamydialen Partikel umgaben.

Zusammengenommen konnte CPn0678 zu frühen Zeitpunkten der Infektion, als sekretiert identifiziert werden. Diese Beobachtungen passen zur zuvor identifizierten funktionalen T3SS-Signalsequenz aus den heterologen Sekretionsstudien (Murra 2009).

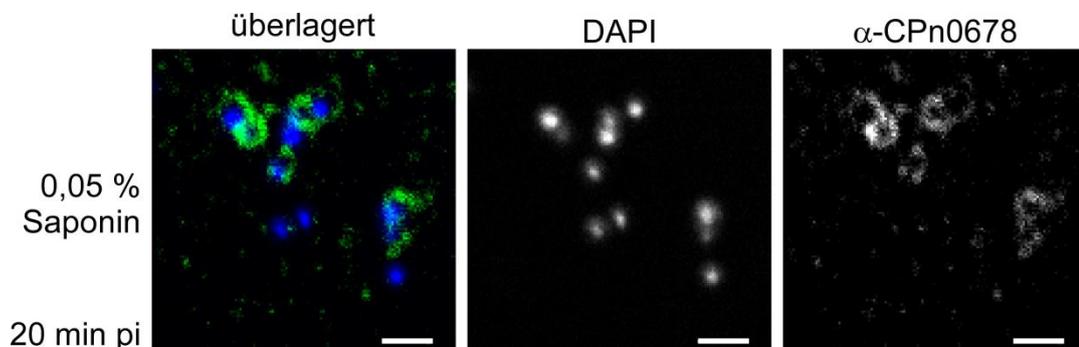


Abb. 4.13: Zugänglichkeitsanalyse von CPn0678 während der frühen Infektion

Differenzielles Permeabilisieren der frühen Infektion mit *C. pneumoniae*. HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* infiziert und 20 min pi (MOI=50) unter nicht permeabilisierenden Bedingungen auf Eis fixiert. Anschließend erfolgte differenzielles Permeabilisieren mit Saponin und immunfluoreszente Färbung ebenfalls auf Eis. Die Detektion erfolgte mittels α -CPn0678 (grün). DNA wurde mittels DAPI gefärbt (blau). Primär: α -CPn0678 1:2,5. Sekundär: α -Kaninchen-Alexa⁴⁸⁸ 1:100, α -Maus-Alexa⁵⁹⁴ 1:100. DAPI 2 μ g/ml. Größenstandard 1 μ m. kLSM.

4.2.1.4 CPn0678 kolokalisiert mit endozytotischen Strukturen in den Frühphasen der Infektion

Im Folgenden sollte eine weitere Charakterisierung der frühen Sekretion von CPn0678 in der Infektion erfolgen, bzw. generell eine Verifikation der frühen CPn0678-Sekretion erfolgen. Dazu wurden Immunfluoreszenz-Färbungen mit dem Rezeptor EGFR durchgeführt, da er bereits als kolokalisierend mit internalisierten Chlamydien und als essentieller humaner Interaktionspartner in der *C. pneumoniae* Infektion beschrieben wurde (Molleken et al. 2013).

Zur Untersuchung wurden Kurzzeit-infizierte Zellen fixiert und mit α -CPn0678 und α -EGFR Antikörpern gefärbt. Die chlamydialen Partikel konnten deutlich durch ihr kondensiertes DNA-Signal identifiziert werden und waren von EGFR-Signalen in vesikelartiger Struktur umgeben (Abb. 4.14 A). Die Chlamydien wiesen CPn0678-Signale auf, welche ähnlich zur differenziellen Permeabilisierung der frühen Infektion waren (vgl. Abb. 4.13). Die CPn0678-Signale waren weniger ringartig ausgeprägt, was vermutlich auf die unterschiedliche Fixierung zurückzuführen war. Es war eine räumliche Abgrenzung der chlamydialen Partikel zu dem durchgängigen EGFR-Signal an der PM möglich. Deshalb konnte hier von teilweise oder vollständig internalisierten Chlamydien ausgegangen werden. Eine Funktion als sekretiertes Protein während der Internalisierung in der frühen Infektion lag für CPn0678 also nahe.

Die Hypothese, ob CPn0678 auch an vollständig internalisierten Chlamydien lokalisiert, sollte in einem Folgeexperiment untersucht werden. Dazu wurden Kurzzeit-Infektionen mit weiteren unterschiedlichen Detergenzien permeabilisiert und vergleichende Färbungen angefertigt. Die Zugänglichkeit chlamydialer Antigene innerhalb vollständig geschlossener endozytotischer Vesikel ist zu frühen Zeitpunkten deutlich erschwert. Lediglich die Permeabilisierung mittels starker Detergenzien (wie SDS) ermöglicht eine ausreichende Zugänglichkeit der Antikörper in Immunfluoreszenz-Färbungen.

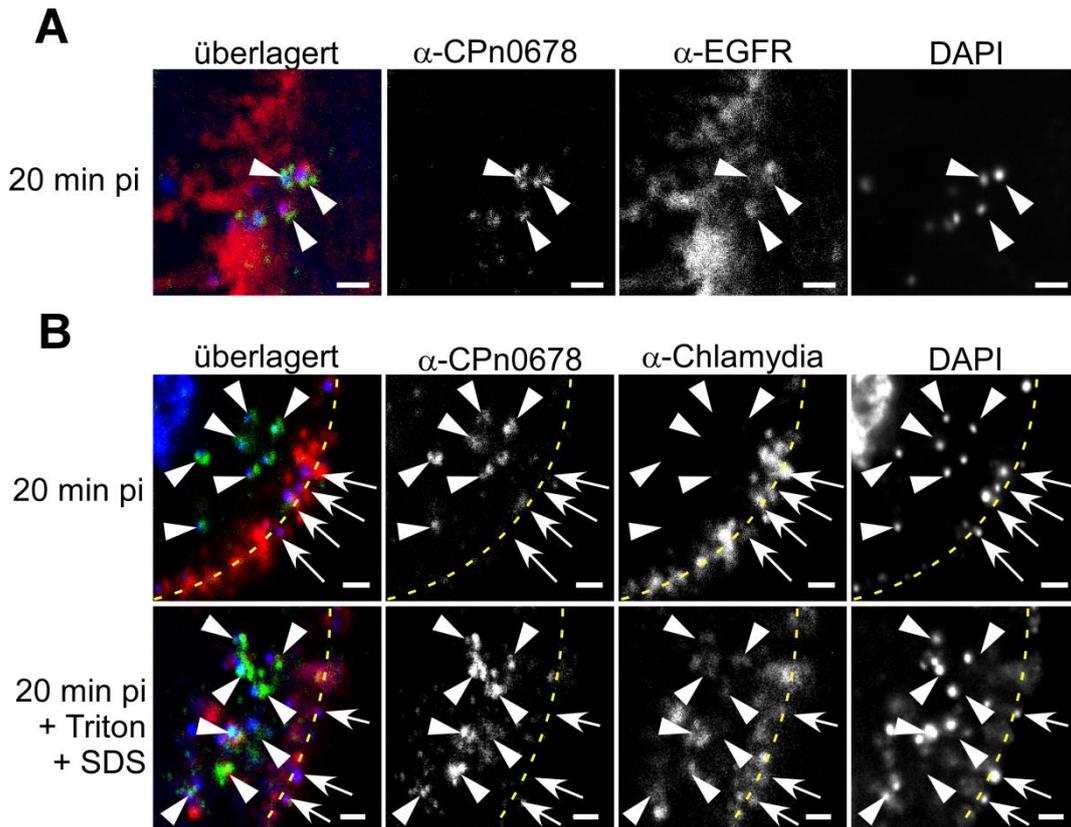


Abb. 4.14: Kolokalisationsstudien von CPn0678 mit Wirts- und Chlamydien-spezifischen Antikörpern

Kolokalisationsanalyse von CPn0678 in Immunfluoreszenz-Färbungen. Hep-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* infiziert (MOI=50) und 20 min pi fixiert. **(A)** Nach der Fixierung (Fix.: PFA; Post-Fix.: Methanol) wurden die Zellen mit α -EGFR (rot), α -CPn0678 (grün) und DAPI (blau) gefärbt. Pfeilspitzen markieren chlamydiale Partikel mit umgebenden CPn0678- und EGFR-Signalen. **(B)** Nach der Fixierung (Fix.: PFA; Post-Fix.: Methanol) (oben) oder (Fix.: PFA + 0,2 % Triton X-100 + 0,005 % SDS; Post-Fix.: Methanol) (unten) wurden die Zellen mit α -Chlamydia (rot), α -CPn0678 (grün) und DAPI (blau) gefärbt. Pfeilspitzen markieren internalisierte Chlamydien mit umgebendem CPn0678-Signal. Pfeile markieren chlamydiale Partikel auf der Zelloberfläche. Gelbe gestrichelte Linie deutet die ungefähre Lage der Wirtszellmembran an. Primär: α -CPn0678 1:10, α -Chlamydia (Loke) 1:50, α -EGFR C-term (1:50). Sekundär: α -Kaninchen-Alexa⁴⁸⁸ 1:200, α -Maus-Alexa⁵⁹⁴ 1:200. DAPI 2 μ g/ml. Größenstandard 1 μ m. kLSM.

Bei Färbungen ohne Detergenzien-Behandlung, wurden Chlamydien von dem α -Chlamydia Antikörper nicht oder nur schlecht erkannt, die bereits in das Zytoplasma der Wirtszelle aufgenommen waren (Abb. 4.14 B, Pfeilspitzen oben). Gleichzeitig konnten Chlamydien, welche sich auf der Oberfläche der Zelle befanden, problemlos detektiert werden (Abb.

4.14 B, Pfeile oben). Diese chlamydialen Signale auf der Zelloberfläche belegen die korrekte Funktionalität des Antikörpers in der Färbung. Das ausbleibende Signal des α -Chlamydien Antikörpers ist also vermutlich auf die vollständige Schließung des endozytotischen Vesikels zurückzuführen.

Als Gegenkontrolle erfolgte eine Färbung nach der Permeabilisierung mit SDS und Triton, die deutliche α -Chlamydia-Signale an internalisierten EBs (Abb. 4.14 B, Pfeilspitzen unten) und adhären EBs an der Zelloberfläche (Abb. 4.14 B, Pfeile unten) erkennen ließ. CPn0678 konnte sowohl ohne als auch mit Detergenzien-Behandlung an internalisierten EBs detektiert werden, was die wirtszellzytosolische Lokalisation von CPn0678 an internalisierenden Chlamydien nahelegt.

Zusammen lassen diese Ergebnisse die Lokalisation von CPn0678 an internalisierenden bereits internalisierten Chlamydien erkennen. Darüber hinaus passen sie zur Sekretion von CPn0678, denn sie zeigen die Detektion CPn0678 außerhalb des endozytotischen Vesikels auf der wirtszytosolisch zugewandten Seite. Wie lange CPn0678 an den endozytierten Vesikeln verbleibt, konnte anhand der vorliegenden Daten allerdings nicht bestimmt werden.

4.2.2 Eigenschaften von CPn0678

4.2.2.1 Eine N-terminale Region von CPn0678 vermittelt spezifische Lokalisation zur Plasmamembran der Wirtszelle

Nachdem CPn0678 detailliert in den chlamydialen Entwicklungszyklus eingeordnet werden konnte, wurde die mögliche Effektorprotein-Funktion von CPn0678 unter der Annahme der frühen Sekretion analysiert. Dafür wurden zuerst die proteineigenen Charakteristika untersucht, bevor der Fokus auf etwaige Interaktionspartner und Funktionsweisen im Wirtszellorganismus gerichtet wurde. Zu diesem Zweck wurden die Phänotypen bei ektopischer Expression von CPn0678 in Humanzellen analysiert, da die genetische Manipulation von *C. pneumoniae* nicht möglich war. Ähnliche frühere Studien wurden in HEK293T Zellen durchgeführt, welche aufgrund der massiven Überexpression anfällig für Artefaktbildung sein können (vgl. Kap. 1.5). Daher wurden neue Expressionskonstrukte hergestellt, um eine angemessene Expressionsrate in HEp-2 Zellen zu ermöglichen.

Getestet wurden das Volllängenprotein CPn0678, eine N-terminale Variante (AS 1 – 136) und eine C-terminale Variante (AS 137 – 213), welche mit GFP-fusioniert wurden (Abb. 4.15 A). Ferner wurde eine Deletionsvariante „ $\Delta 6$ “ getestet, bei der 19 N-terminale Aminosäuren (AS 56 bis 74) fehlten. Der fehlende Bereich dieser Variante wurde bereits zuvor als essentiell für die Adhäsion an die Außenmembran von Humanzellen identifiziert (Stallmann 2010). Auch

wenn CPn0678 nachweislich nicht als chlamydiales Adhäsion fungieren kann, so könnten diese Ergebnisse dennoch auf eine wichtige Rolle dieses kleinen N-terminalen Abschnittes im Gesamtgefüge der Proteinfunktion hindeuten. Deshalb wurde diese Deletionsvariante in die phänotypischen Untersuchungen mit einbezogen.

Die Verteilung von GFP der Leervektor-Kontrolle zeigt eine gleichmäßige Lokalisation des fluoreszenten Proteins im Zytoplasma der Zelle und eine leichte Akkumulation im Zellkern (Abb. 4.15 B). Wurde dagegen CPn0678^{GFP} exprimiert, so war eine spezifische Lokalisation des Proteins zur humanen PM zu erkennen. CPn0678^{GFP} assoziierte dabei häufig stark und unregelmäßig mit der PM. Diese spezifische Lokalisation wurde ebenfalls für CPn0678-N^{GFP} beobachtet. Zusätzlich waren sowohl für CPn0678^{GFP}- als auch für CPn0678-N^{GFP}-exprimierende Zellen filamentartige Strukturen des Signals im Zytoplasma sichtbar. Durchschnittlich zeigten für CPn0678^{GFP} etwa 40 % und für CPn0678-N^{GFP} etwa 12 % der transfizierten Zellen Filamente im Zytoplasma, die unterschiedlich stark ausgeprägt sein konnten. Diese Filamente schienen in stärker exprimierenden Zellen häufiger aufzutreten, als in Zellen mit schwacher Expression. Ferner waren die Filamente teilweise mit der PM verbunden und liefen in einem oder mehreren Knotenpunkten zusammen. Für CPn0678-C^{GFP} zeigte sich weder eine Lokalisation an der PM noch eine Filament-Bildung des Signals. Interessanterweise konnte auch bei der Transfektion mit CPn0678-Δ6^{GFP} keine PM-Assoziation oder Bildung von Filamenten beobachtet werden. CPn0678-Δ6^{GFP} und CPn0678-C^{GFP} zeigten dagegen die gleiche Lokalisation der GFP Leervektorkontrolle.

Diese hier ermittelten Daten zeigen, dass CPn0678 in der Lage ist spezifisch zur Innenseite der humanen PM zu lokalisieren und die Fähigkeit zur Filament-Bildung besitzt. Beide Phänotypen hängen dabei vom N-terminalen Teil von CPn0678 ab und werden essentiell von Regionen der Δ6-Deletion beeinflusst.

Daher wurde untersucht, ob der Δ6-deletierte Bereich bezüglich der Membranassoziation strukturelle Besonderheiten aufweist. Einzig auffällig erschien eine vorhergesagte α-Helix, die in der Δ6-Deletion zu 50 % entfernt worden war (AS 47 – 64, Programm „NetSurfP“, Grenzwert α-Helix-Wahrscheinlichkeit > 50 %). Die Projektion dieser α-Helix verdeutlicht einen amphipatischen Charakter, wobei sich eine hydrophobe Seite bildete, die auf beiden Seiten von positiv geladenen Aminosäuren flankiert wird und gegenüberliegend eine negativ geladene Aminosäure aufweist (Abb. 4.15 C). Zwei Parameter, durch die APHs beschrieben werden können, sind die Gesamthydrophobizität (<H>), welche durch die Anzahl und Stärke hydrophober Aminosäuren beeinflusst wird, und das hydrophobe Moment (<μH>), welches angibt wie asymmetrisch die Hydrophobizität in der Helix verteilt ist.

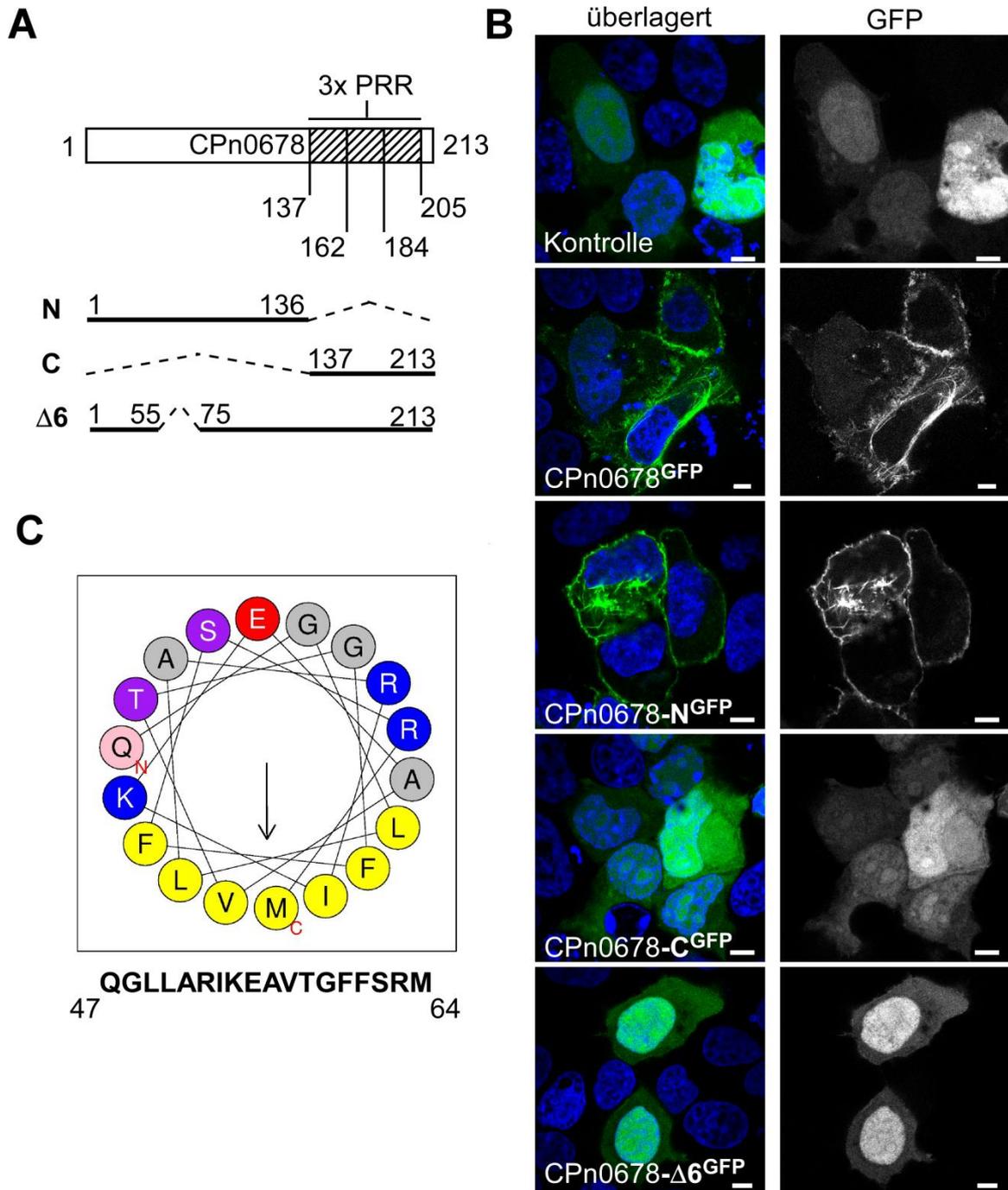


Abb. 4.15: Ektopische Expression GFP-fusionierter CPn0678-Varianten in HEP-2 Zellen

(A) Schematische Darstellung von CPn0678 mit Domänenübersicht und CPn0678-Varianten, die in der Transfektion in **(B)** eingesetzt wurden. Aminosäurepositionen sind durch Zahlen angegeben. Deletionen sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. PRR, prolinreiche Region. **(B)** Transfektion zur Untersuchung der Membranassoziation von CPn0678. HEP-2 Zellen wurde mit GFP allein (Kontrolle) oder den GFP fusionierten CPn0678 Varianten aus **(A)** transfiziert (grün). Zellen wurden nach 15 h fixiert (Fix.: PFA+ 0,2 % Triton X-100; Post-Fix.: -/-) und DAPI gefärbt (blau). DAPI 2 µg/ml. Größenstandard 5 µm. kLSM. **(C)** Helikale Projektion der mittels „NetSurfP“ vorhergesagten α -Helix im N-terminalen Bereich von CPn0678. Die Projektion wurde mit „heliQuest“ erstellt. Zahlen geben Aminosäureposition an, und Aminosäureabfolge ist von N- nach C-terminal markiert. Eigenschaften der Aminosäurereste sind farbkodiert: ungeladen amidisch (rosa), ungeladen hydroxyl (lila), polar negativ geladen (rot), polar positiv geladen (blau), hydrophob (gelb), sonstige (grau). Richtung des hydrophoben Moments ist als Pfeil dargestellt.

Die errechneten Werte der APH von CPn0678 liegen bei $\langle \mu H \rangle = 0,523$ und $\langle H \rangle = 0,456$ (Abb. 4.16 A). Damit liegen sie etwa im Bereich anderer APHs, die mit Membranassoziation in Verbindung gebracht werden. Beispielsweise besitzen der APHs aus dem endozytotisch membrankrümmenden Arf1 (AS 1-17) oder des Golgi- und MT-assoziierten Proteins GMAP-210 (AS 1-38) Werte bei etwa $\langle \mu H \rangle = \sim 0,45$ und $\langle H \rangle = \sim 0,425$ (Drin & Antony 2010). Der einseitig hydrophobe Charakter der Helix wurde besonders deutlich, wenn die Oberflächenhydrophobizität der Helix errechnet wurde (Abb. 4.16 B).

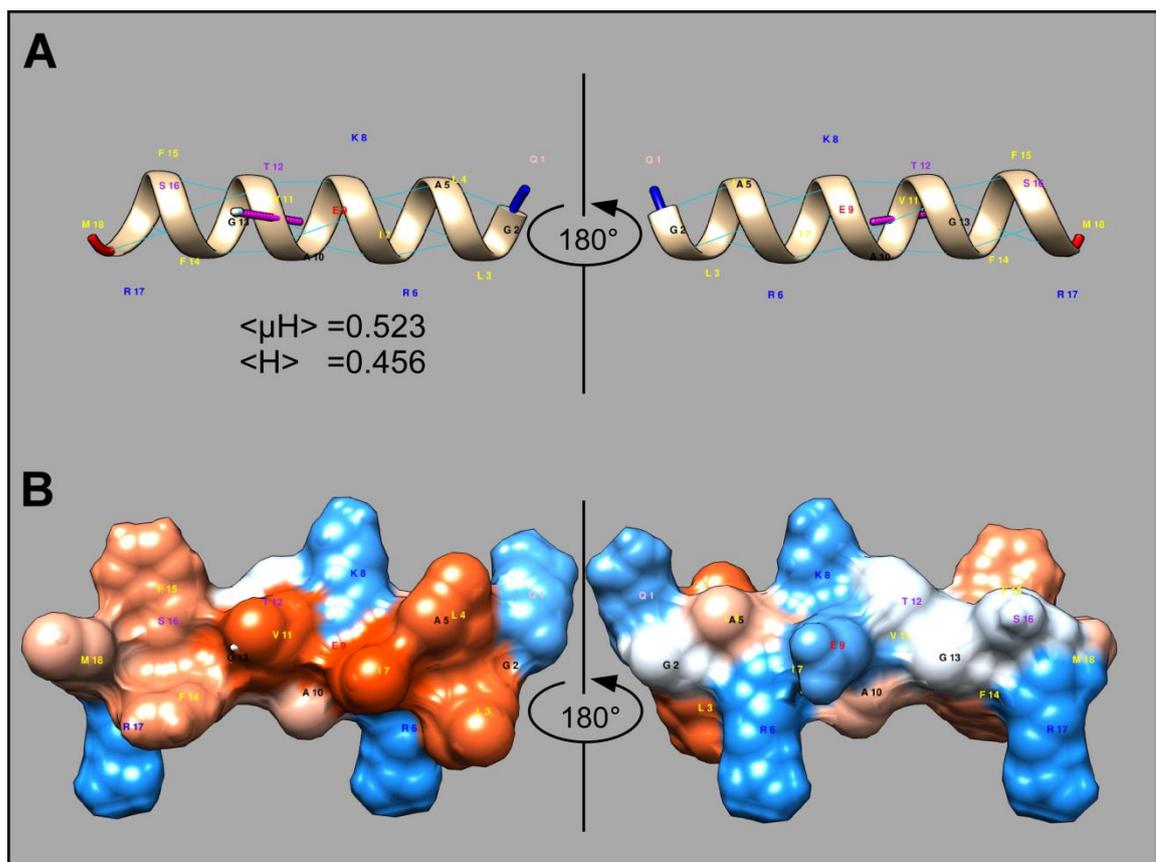


Abb. 4.16: Simulation der amphipathischen Helix im N-terminalen Bereich von CPn0678

(A) α -helikale Simulation der AS 47 – 64 von CPn0678 mittels „3D-HM“. Türkise Haarlinien in den Windungen der Helix zeigen berechnete Wasserstoff-Brücken-Bindungen an. Farbschema des Einbuchstaben-Aminosäurecodes entspricht Abb. 4.15 C. Zahlen repräsentieren Aminosäure-Positionen in der APH. N-terminales Sequenzende ist in blau, C-terminales ist in rot gekennzeichnet. 180° Rotation um die Z-Achse derselben Helix ist rechts dargestellt. Berechnung der absoluten Werte für das hydrophobische Moment ($\langle \mu H \rangle$) und der Gesamthydrophobizität ($\langle H \rangle$) erfolgten über „heliQuest“. Darstellung der exakten Ausrichtung des hydrophoben Moments in der 3D-Simulation erfolgte über „3D-HM“ und ist als dicke pinke Linie dargestellt.

(B) Berechnung der Oberflächenhydrophobizität der APH. Zugrundeliegendes Modell gleicht (A). Die Oberfläche der Helix wurde entsprechend ihrer Hydrophobizität eingefärbt. Hydrophobe Bereiche sind rot, hydrophile und geladenen in blau, und neutrale Bereiche in grau eingefärbt. Visualisierung der errechneten 3D-Modelle erfolgte über „UCSF Chimera“.

Aufgrund der Berechnungen ist eine Seite der Helix nahezu vollständig hydrophob (Abb. 4.16 B, links). Die gegenüberliegende Seite weist dagegen neutrale und geladene

Aminosäurereste auf (Abb. 4.16 B, rechts). Die positiv geladenen Reste sind seitlich angeordnet. Die Fähigkeit zur Membranassoziation über die APH von CPn0678 wurde im Folgenden genauer untersucht.

4.2.2.2 Die membranbindende amphipathische Helix vermittelt Spezifität über flankierende, positiv geladene Aminosäuren

Es ist bekannt, dass Proteine über APHs Membranassoziation vermitteln können und durch Interaktion positiv geladener Aminosäurereste mit den negativ geladenen Kopf-Gruppen von Membranlipiden interagieren können (vgl. Kap. 1.2.1). Deshalb sollte in weiteren Transfektions-Experimenten überprüft werden, ob die APH von CPn0678 tatsächlich Membranassoziation auslösen kann und ob flankierende positive Aminosäuren Spezifität zur PM vermitteln. Zu diesem Zweck wurde der Bereich der APH von CPn0678 allein mit GFP fusioniert (CPn0678-APH^{GFP}) und in Humanzellen exprimiert (Abb. 4.17 A). Darüber hinaus besitzt CPn0678 innerhalb und in der Nähe seiner N-terminalen APH positiv geladene Aminosäuren (Abb. 6.3). Von diesen wurden im CPn0678-Vollängenprotein drei positiv geladene Arginin-Aminosäuren in direkter Nähe zur APH gegen drei Alanine ausgetauscht (R63A, R68A, R73A; CPn0678-RRRA^{GFP}) (Abb. 4.17 A). Diese Aminosäuren wurden ausgewählt, da die Änderung die Vorhersage der α -Helix nicht beeinflusste. Sec61 β ^{mCherry} wurde jeweils als ER-Marker kotransfiziert, um Teile des Endomembransystems identifizieren zu können.

CPn0678^{GFP} lokalisierte deutlich an der PM, während im Zytosol oder am ER kaum Protein erkennbar war (Abb. 4.17 B, oben). Zur besseren Veranschaulichung von möglichen Proteinen im Zytosol wurden repräsentative Aufnahmen von Zellen ausgewählt, die keine CPn0678-induzierten Filamente aufwiesen. Wurde CPn0678-RRRA^{GFP} transfiziert, assoziierte das Protein nur zum Teil mit der PM, jedoch waren starke CPn0678-RRRA^{GFP}-Signale in der Nähe des Zellkerns detektierbar und umgab diesen sogar (Abb. 4.17 B, Mitte). Die Signale traten nicht diffus verteilt auf, sondern kolokalisierten größtenteils mit dem Sec61 β ^{mCherry}-Signal. Darüber hinaus konnten weitere membranähnliche Signale von CPn0678-RRRA^{GFP} im Zytoplasma beobachtet werden, deren Verteilung möglicherweise auf unmarkierte Komponenten des Endomembransystems schließen ließ. Eine deutlichere Veränderung der Membranassoziation wurde bei der Expression von CPn0678-APH^{GFP} beobachtet (Abb. 4.17 B, unten). CPn0678-APH^{GFP} lokalisierte nicht mehr an der PM sondern zeigte ausschließlich eine zytosolische Verteilung in Mustern ähnlich zu CPn0678-RRRA^{GFP}, welche mit den definierten Strukturen des ERs teilweise kolokalisierten.

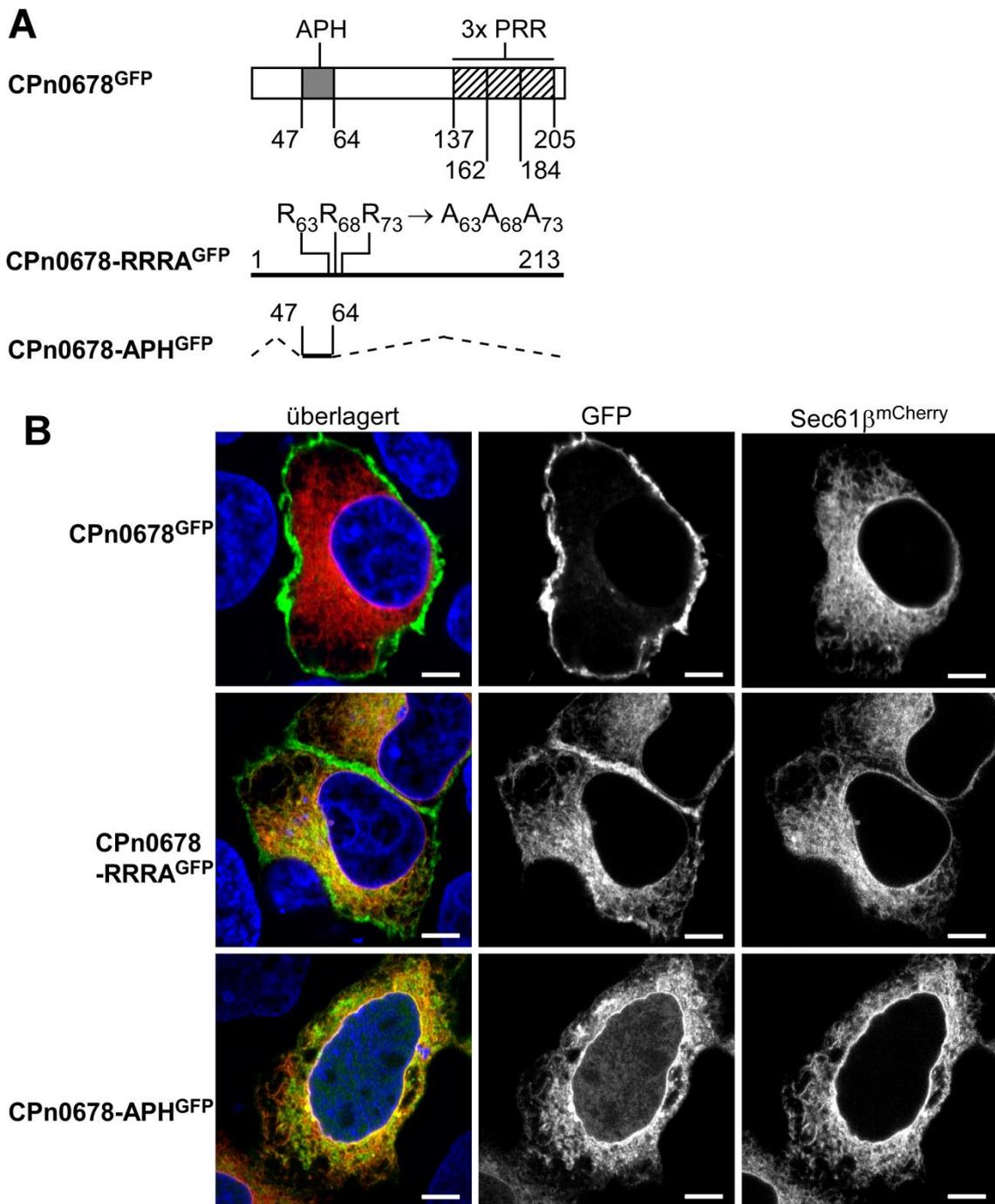


Abb. 4.17: Charakterisierung der APH-abhängigen Membranbindung von CPn0678

(A) Schematische Darstellung von CPn0678 mit seinen Domänen und der CPn0678-Varianten, die in der Transfektion (B) eingesetzt wurden. Aminosäurepositionen und Aminosäureaustausche im CPn0678-RRRA^{GFP}-Konstrukt sind durch Zahlen angegeben. CPn0678-APH^{GFP}-Konstrukt exprimiert die APH aus CPn0678 allein. Deletionen sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. PRR, prolinreiche Region. (B) Kotransfektion der CPn0678^{GFP}-Varianten aus (A) (grün) mit Sec61 β ^{mCherry} (rot) als Marker für das ER in HEp-2 Zellen. Zellen wurde nach 15 h fixiert (Fix.: PFA+ 0,2% Triton X-100; Post-Fix.: -/-) und DAPI gefärbt (blau). DAPI 2 μ g/ml. APH amphipathische Helix. Größenstandard 5 μ m. kLSM.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die APH von CPn0678 bereits allein in der Lage war Membranassoziation zu vermitteln, jedoch mit veränderter Spezifität. Die Spezifität

für die PM wird höchstwahrscheinlich durch APH-nahe positive Aminosäuren vermittelt, denn ihre Mutationen änderten auch die Spezifität der Membranassoziation. Eine solche Spezifität würde möglicherweise auf negativ geladene Lipide oder Membranbestandteile der PM beschränkt sein, wie es in APHs anderer Proteine der Fall ist (vgl. Kap. 1.2.1).

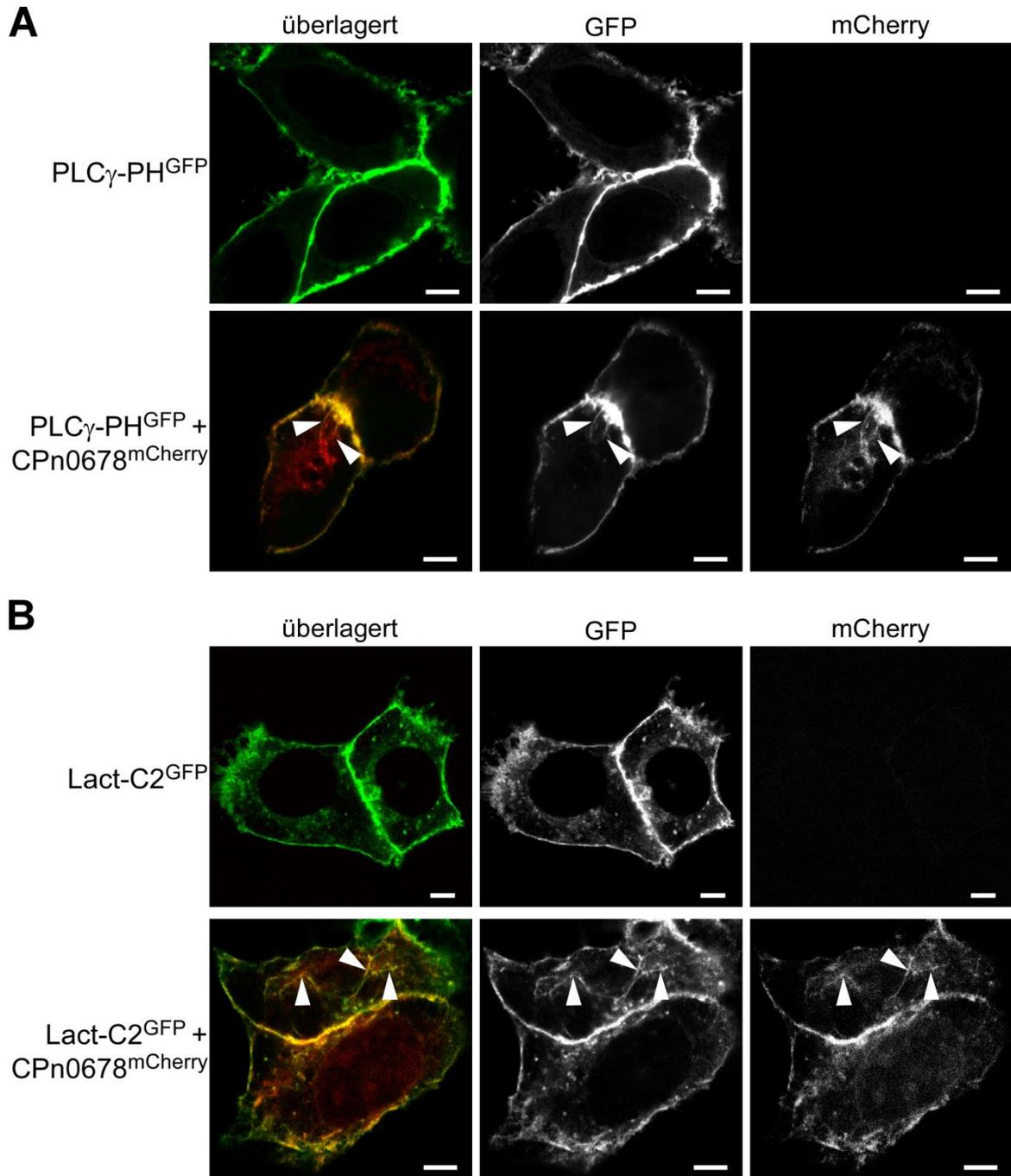


Abb. 4.18: Kolokalisation von CPn0678 mit Marker-Proteinen für negativ geladene Phospholipide

(A+B) HEp-2 Zellen wurden mit GFP-fusionierten PLC γ -PH- (grün) (A) oder Lact-C2-Domänen (grün) (B) allein transfiziert (jeweils oben) oder in Kotransfektion mit CPn0678^{mCherry} (rot, jeweils unten). Zellen wurden nach 15 h fixiert (Fix.: PFA+ 0,2 % Triton X-100; Post-Fix.: -/-). Pfeilspitzen weisen auf Kolokalisationen von CPn0678^{mCherry} mit PLC γ -PH^{GFP} oder Lact-C2^{GFP} an Filamenten hin. Größenstandard 5 μ m. kLSM.

Daher wurde durch weitere Experimente analysiert, ob eine Verbindung zwischen der PM-Lokalisation von CPn0678 und negativ geladene Membranlipiden besteht. Zu diesem Zweck wurde die Lokalisation von PM-definierendem PtdSer und PI(4,5)P₂ anhand von Markerproteinen in Kotransfektion mit CPn0678^{mCherry} analysiert (vgl. Kap. 1.2.1).

Als spezifisches GFP-fusioniertes Markerprotein für PI(4,5)P₂ wurde die PH-Domäne (**P**lekstrin **H**omologie) des Proteins PLCγ (**P**hosphoinositid-**P**hospholipase **C** Typ **γ**) verwendet, und als Marker für PtdSer die C2-Domäne des Proteins Lact (**L**actadhärin) (Fairn et al. 2011, Halet 2005). Sowohl Lact-C2^{GFP} als auch PLCγ-PH^{GFP} lokalisierten in unregelmäßigen Muster zur humanen PM (Abb. 4.18 A + B, jeweils oben). Die Lokalisation von Lact-C2^{GFP} und PLCγ-PH^{GFP} an der PM änderte sich nicht, wenn CPn0678^{mCherry} kotransfiziert exprimiert wurde (Abb. 4.18 A + B, jeweils unten). Es konnte eine Kolokalisation von CPn0678^{mCherry} mit PLCγ-PH^{GFP} bzw. Lact-C2^{GFP} an der PM erkannt werden. Auch an den CPn0678-induzierten Filamenten konnten kolokalisierende Bereiche beobachtet werden, weshalb zur besseren Veranschaulichung repräsentative Bilder von Zellen mit Filamenten ausgewählt wurden. Diese Filamente waren ausgehend von der PM nur über kurze Distanz positiv für PLCγ-PH^{GFP} (Abb. 4.18 A, Pfeilspitzen). Die Kolokalisation der CPn0678-Filamente mit Lact-C2^{GFP} war dagegen deutlich ausgeprägt und markierte sie meist über die gesamte Länge (Abb. 4.18 B).

Die deutliche Kolokalisation von CPn0678 und den Markerproteinen für PtdSer und PI(4,5)P₂ an der PM war ein deutlicher Hinweis für die mögliche Interaktion von CPn0678^{GFP} mit diesen Membranlipiden. Die Experimente zeigen zusätzlich, dass es sich bei den beobachteten CPn0678-induzierten Filamenten um Membranen handelt. Im Rest der Arbeit werden diese deshalb als CPn0678-induzierte Membrantubuli bezeichnet. Diese Struktur könnte beispielsweise über starke Selbstinteraktion und gleichzeitiger Membranbindung gebildet werden.

4.2.2.3 CPn0678 kann Tetramere in Lösung bilden

Eine genauere Charakterisierung der postulierten Selbstinteraktion von CPn0678 sollte durch Crosslink-Experimente analysiert werden. Bei dieser Technik wird rekombinantes Protein unter Einwirkung einer unspezifischen Crosslink-Chemikalie irreversibel in seinem oligomeren Zustand fixiert und anschließend durch SDS-PAGE analysiert.

Für die Experimente wurde rekombinantes CPn0678 (rCPn0678_{6xHis}) in nativem Zustand verwendet und Glutaraldehyd, wie bereits in anderen ähnlichen experimentellen Ansätzen, als unspezifische Crosslink-Chemikalie eingesetzt (Brady et al. 2015). Die unterschiedlichen oligomeren Zustände wurden dann nach durchgeführter SDS-PAGE verglichen (Abb. 4.19).

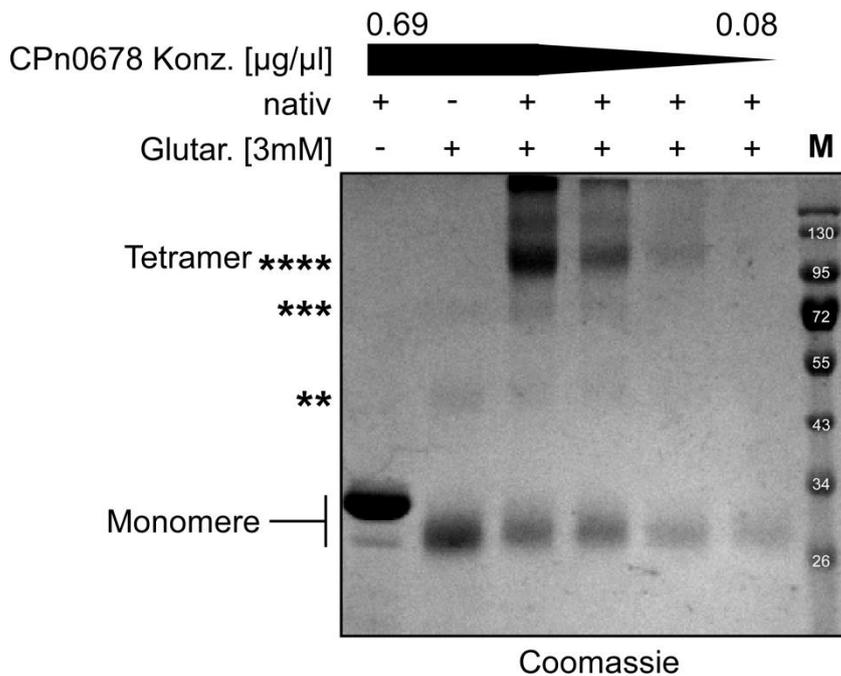


Abb. 4.19: Crosslink-Experiment von rCPn0678_{6xHis} zur Analyse oligomerer Formen

Crosslink-Experiment unter Verwendung von Glutaraldehyd und anschließender Auftrennung mittels SDS-PAGE (10 %) (vgl. Kap. 3.6.6). rCPn0678_{6xHis} wurde in *E. coli* exprimiert, denaturiert aufgereinigt und durch Dialyse renaturiert. Es wurden verschiedene Proteinkonzentrationen eingesetzt (Konz.: 0,69 / 0,35 / 0,17 / 0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Der native Zustand wurde bis vor dem Experiment erhalten oder durch Erhitzen der Probe auf 100 °C für 10 min zerstört (nativ +/-). Native Proben wurden mit Glutaraldehyd behandelt oder ohne Glutaraldehyd als Kontrolle aufgetrennt (Glutar. +/-). Berechnete Größen: CPn0678_{6xHis} 23,8 kDa. Oligomere Zustände der Crosslink-Proben wurden am linken Bildrand gekennzeichnet: | Monomer apparent ~27 kDa, ** Dimer apparent 50 - 55 kDa, *** Trimer apparent 75 - 85 kDa, **** Tetramer apparent 100 - 130 kDa. Detektion durch Coomassie-Färbung. M, Größenstandard: Prestained PageRuler™

Zur Überprüfung des Experiments wurden zwei Kontrollen verwendet. Als erste Kontrolle wurde natives rCPn0678_{6xHis} ohne Einfluss von Glutaraldehyd analysiert. In der äußerst linken Spur dieser Kontrolle war eine dominante Bande bei etwa 30 kDa zu erkennen, die dem denaturierten monomeren rCPn0678_{6xHis} entsprach (Abb. 4.19, linke Spur) (Murra 2009). Wenige, schwache Degradationsbanden waren darunter zu erkennen. Als zweite Kontrolle wurde rCPn0678_{6xHis} unmittelbar vor Zugabe des Glutaraldehyds durch Erhitzen denaturiert (Abb. 4.19, zweite Spur von links). Bei dieser Kontrolle wurde das rCPn0678_{6xHis}-Monomer mit leicht verändertem apparentem Laufverhalten bei ca. 27 kDa detektiert. Diese Veränderungen werden in bekannten Experimenten mit anderen Proteinen durch die chemische Modifikation durch Glutaraldehyd hervorgerufen. Intramolekulares Crosslinken verhindert bei diesen Proteinen die vollständige Entfaltung in der SDS-PAGE, welche sich durch niedrigeres apparentes Molekulargewicht äußert (Brady et al. 2015, Flynn 2016, Goswami et al. 2012). Nur sehr geringe Mengen an Dimeren und Trimeren konnten bei dieser Kontrolle detektiert werden (Abb. 4.19, zweite Spur von links, Sterne). Dies zeigt entweder, dass oligomere Zustände von CPn0678 unvollständig denaturiert wurden, oder durch

Glutaraldehyd bei denaturiertem Protein sehr geringe Mengen an Oligomeren gebildet werden. Weiterhin wurden Proben mit absteigender Proteinkonzentration analysiert, bei denen sowohl der native Zustand erhalten, als auch Glutaraldehyd hinzugefügt wurde (Abb. 4.19, dritte bis sechste Spur). Im Vergleich zu den Kontrollen ließen sich geringere Mengen des monomeren rCPn0678_{6xHis} erkennen und ebenfalls nur geringe Mengen an Dimeren und Trimeren (Abb. 4.19, Sterne). Darüber waren nun mehrere höhermolekulare Signale zu detektieren. Die stärksten waren bei etwa 100 bis 130 kDa zu sehen und entsprechen berechneten rCPn0678_{6xHis}-Tetrameren. Lediglich die geringste Konzentration ($\sim 0,08 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) zeigte kaum Tetramere. Die Konzentration dieser Probe lag aber nahe der Detektionsgrenze der Coomassie-Färbung. In den zwei höchsten konzentrierten Probe waren weitere Oligomere erkennbar, deren Größe aufgrund der langsamem Laufgeschwindigkeit nicht mit aufgetragenen Größenstandards bestimmt werden konnte (Abb. 4.19, dritte Spur und vierte oberer Bildrand). Die Experimente zeigen, dass rCPn0678_{6xHis} in Lösung Tetramere bilden kann.

CPn0678 ist also in der Lage mit sich selbst zu interagieren und Membranen zu binden, was die Bildung von Membrantubuli möglicherweise begünstigt. Durch weitere Experimente sollte aufgeklärt werden, ob über den Phänotyp der Membrantubulation weitere Eigenschaften von CPn0678 abgeleitet werden könnten.

4.2.2.4 CPn0678^{GFP}-Membrantubuli werden vom Wirtszellzytoskelett beeinflusst und kolokalisieren teilweise mit diesem

Es ist bekannt, dass überexprimierte Proteine endozytotischer Prozesse (wie Caveoline, GRAF1 oder SNX9) Membrantubulation induzieren können (Lundmark et al. 2008, Shin et al. 2008, Verma et al. 2010). Diese Tubulationen entstehen aus Störungen der Endozytose und tubulärer Verlängerung der endozytotischen Strukturen. Die Destabilisierung von Aktin ruft bei diesen Proteinen eine Erhöhung der Tubulation hervor und die Destabilisierung von MT eine Reduktion (Lundmark et al. 2008, Shin et al. 2008, Verma et al. 2010). Deshalb wurde in der Transfektion überprüft, ob CPn0678-induzierte Membrantubuli mit Komponenten des Zytoskeletts kolokalisieren. Darüber hinaus wurde analysiert ob die CPn0678-induzierte Tubulationsrate abhängig von intaktem F-Aktin, MT oder Dynamin ist, denn auch Dynamin zeigt unterschiedliche Einflüsse auf die Tubulationsrate von Caveolinen, GRAF1 oder SNX9 (Lundmark et al. 2008, Shin et al. 2008, Verma et al. 2010).

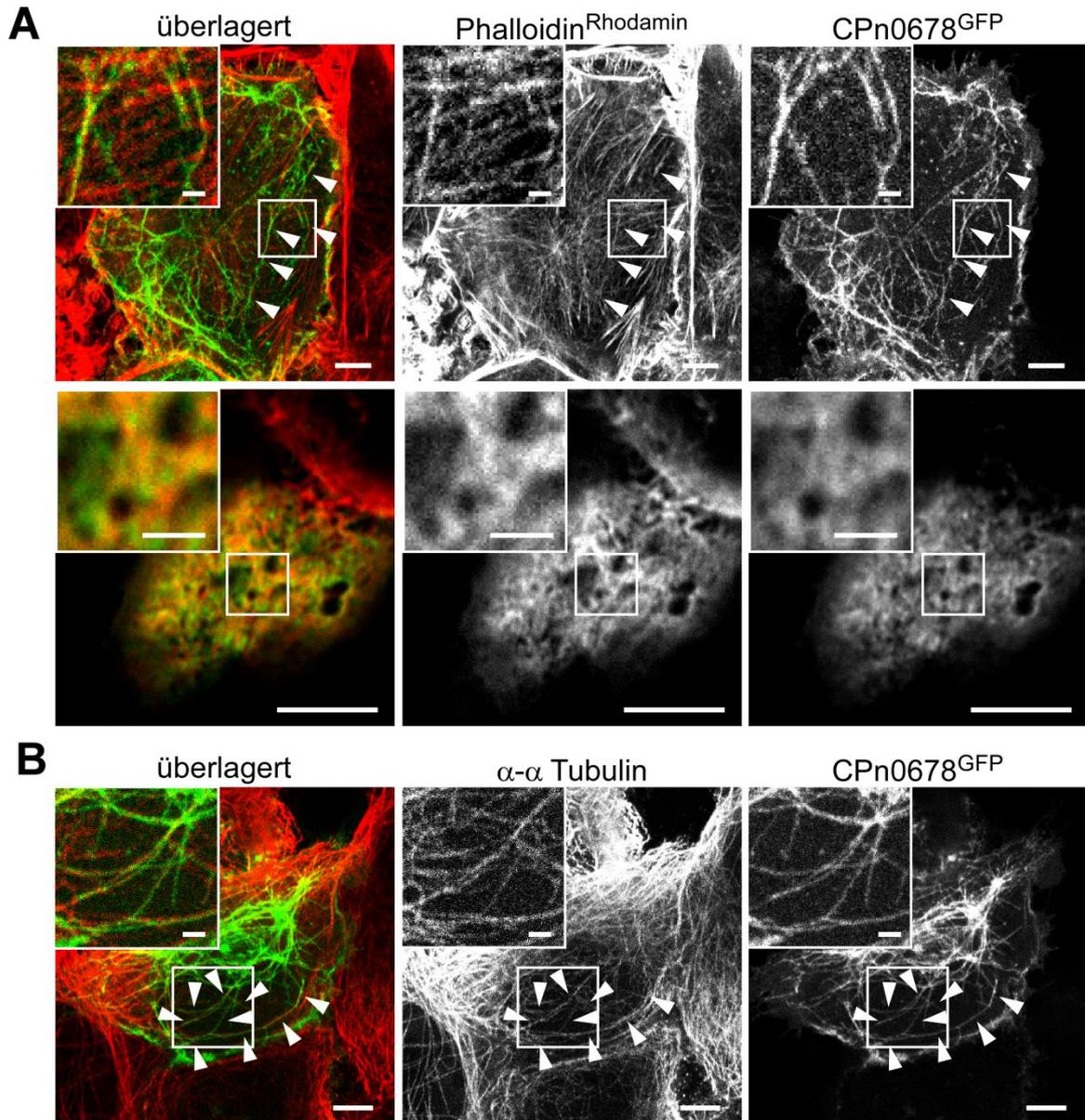


Abb. 4.20: Untersuchung der Kolokalisation von CPn0678^{GFP} mit F-Aktin und Mikrotubuli

Transfektion von CPn0678^{GFP} mit anschließender Immunfluoreszenz-Färbung von Bestandteilen des Zytoskeletts. HEp-2 Zellen wurde mit CPn0678^{GFP} (grün) transfiziert und nach 15 h in vorgewärmtem PHEM-Puffer bei 37 °C fixiert (Fix.: PFA + 0,2 % Triton X-100; Post-Fix.: -/-). **(A)** F-Aktin wurde mit Phalloidin^{Rhodamin} (rot) gefärbt. Querschnitte durch die Zelle (oben), angeschnittene Aufsicht auf Zellkortex (unten). Pfeilspitzen weisen auf kolokalisierende Strukturen von CPn0678^{GFP} und F-Aktin hin. Phalloidin^{Rhodamin} 1:25. **(B)** MT mittels spezifischem α-α Tubulin Antikörper (rot) gefärbt. Pfeilspitzen weisen auf kolokalisierende Strukturen von CPn0678^{GFP} und MT hin. Primär: α-α Tubulin 1:100. Sekundär: α-Maus-Alexa⁵⁹⁴ 1:200. Teilvergrößerte Darstellungen jeweils in oberer linker Ecke, wobei weiße Kästchen in der Übersicht den vergrößerten Bereich markieren. Größenstandard 5 μm, in Vergrößerung 1 μm. kLSM.

Zuerst wurde CPn0678^{GFP} in Humanzellen exprimiert und durch Immunfluoreszenz-Färbungen die Kolokalisation mit F-Aktin und MT untersucht (Abb. 4.20). Zur besseren Veranschaulichung wurden repräsentative Aufnahmen mit deutlichen CPn0678-induzierten Membrantubuli ausgewählt.

F-Aktin wurde dominant im Zellkortex beobachtet, während im Zellinneren feine Filamente auftraten (Abb. 4.20 A, oben). CPn0678^{GFP}-Membrantubuli konnten nur in seltenen Fällen im Zytoplasma der Zelle mit F-Aktin assoziiert vorgefunden werden (Abb. 4.20 A, Pfeilspitzen oben). Eine Aufsichtsaufnahme einer Humanzelle zeigt deutlich, dass im Bereich des Kortex und der Zellmembran CPn0678^{GFP} weitaus häufiger kolokalisierend mit F-Aktin-Signalen beobachtet werden konnte (Abb. 4.20 A, unten). Da F-Aktin in diesen Bereichen besonders stark lokalisierte, war eine spezifische Kolokalisation von einzelnen Aktin-Filamenten und CPn0678^{GFP}-Membrantubuli nicht auszumachen. Anschließend wurde die Kolokalisation der Membrantubuli zu MT betrachtet (Abb. 4.20 A, unten). Häufig konnte eine deutliche Assoziation von CPn0678^{GFP}-Membrantubuli über weite Bereiche parallel mit MT beobachtet werden (Abb. 4.20 B, Pfeilspitzen). Dennoch konnten CPn0678^{GFP}-Membrantubuli detektiert werden, welche unabhängig von MT lokalisierten. Im Bereich der Membran oder des Zellkortex war keine Assoziation mit MT zu erkennen.

Zusammenfassend konnte eine deutliche Assoziation der CPn0678^{GFP}-Membrantubuli mit MT beobachtet werden. Eine Assoziation mit Aktin im Bereich des Zellkortex war zwar vorhanden aber nicht eindeutig auf Aktin zurückzuführen. Die Assoziation von CPn0678^{GFP}-Membrantubuli mit einzelnen Filamenten des F-Aktin-Geflechts war nur außerordentlich selten erkennbar. Aufgrund der möglichen Assoziation zu F-Aktin und MT wurde der Einfluss dieser Zytoskelettkomponenten auf die CPn0678^{GFP}-Membrantubulation ermittelt. Hierzu wurde CPn0678^{GFP} oder CPn0678-N^{GFP} transfiziert und die Humanzellen nach der Transfektion mit Cytochalasin D bzw. Nocodazol behandelt. CPn0678-N^{GFP} wurde in die Untersuchungen eingeschlossen, da für den N-terminale Bereich von CPn0678 zuvor Membranbindung und Tubulation detektiert werden konnte (vgl. Abb. 4.15 B). Cytochalasin D bewirkt die Depolymerisation von F-Aktin, während Nocodazol eine ähnliche Wirkung auf MT hat.

Ohne Behandlung zeigten etwa 40 % der CPn0678^{GFP}-transfizierten Zellen Membrantubulation, wohingegen für transfiziertes CPn0678-N^{GFP} nur etwa 10 % der Zellen diesen Phänotyp zeigten (Abb. 4.21 A + B). Ein massiver Anstieg der Membrantubulation konnte sowohl für CPn0678^{GFP} als auch für CPn0678-N^{GFP} nach der Cytochalasin D-Behandlung verzeichnet werden. Nach der Cytochalasin D-Behandlung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Varianten erkannt werden (Abb. 4.21 A + B). Fast alle Zellen wiesen nun stark vernetzte Membrantubuli auf. Beispielfhaft ist eine Cytochalasin D-behandelte Zelle dargestellt, welche die starke Tubulation durch CPn0678^{GFP} deutlich erkennen ließ (Abb. 4.22 A). Die Membrantubuli schienen unregelmäßig verzweigt und dicker

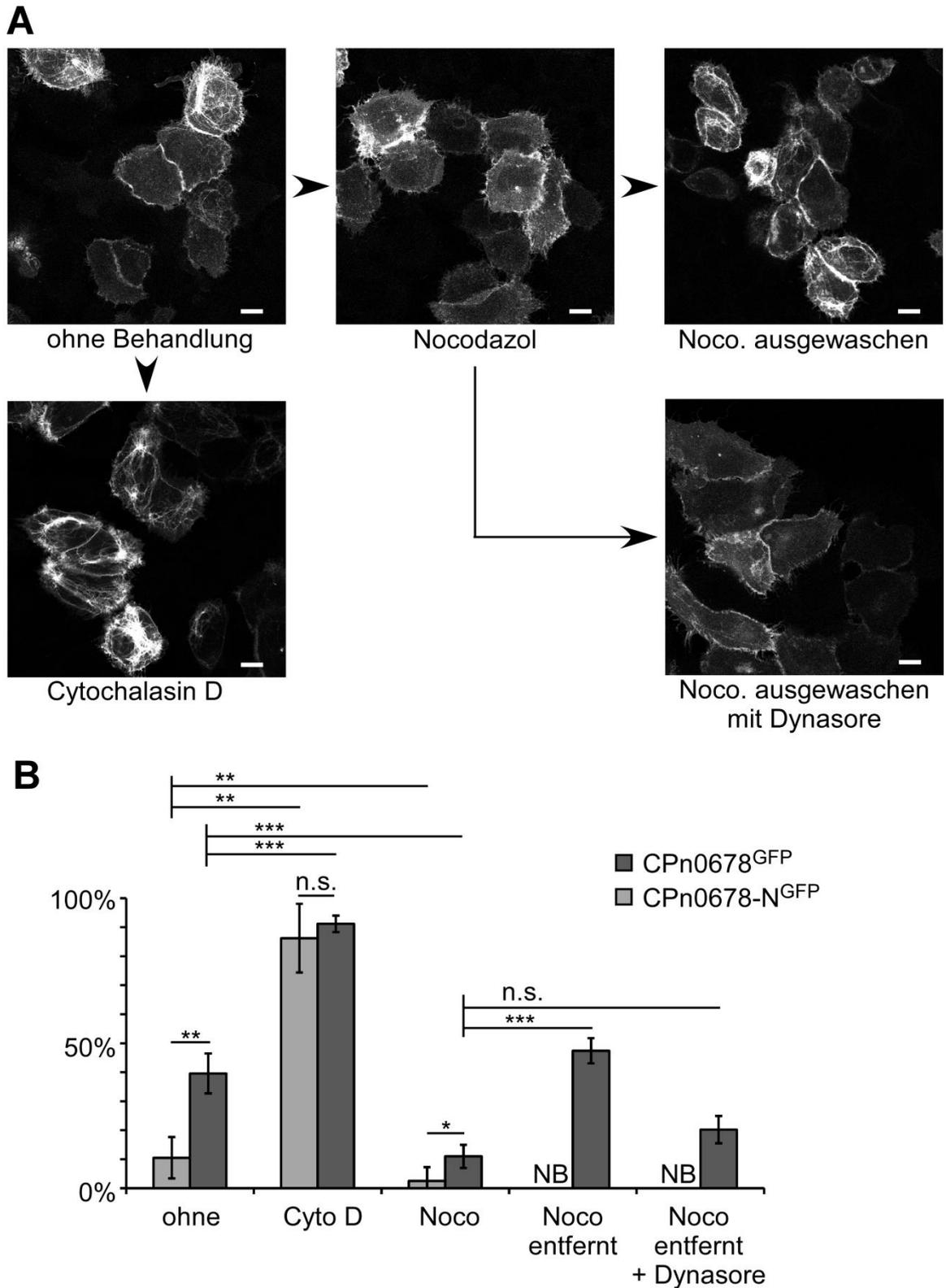


Abb. 4.21: Veränderung des Membrantubulationsverhaltens von CPn0678^{GFP} bei Inhibitor-Behandlung
(A) Repräsentative Übersichtsaufnahmen von CPn0678^{GFP}-transfizierten Zellen ohne jegliche Behandlung als Kontrolle, nach Inkubation bei 37 °C mit Cytochalasin D (4 µM, 60 min) oder Nocodazol (10 µM, 30 min). Die Membrantubulation wurde auch nach dem Auswaschen von Nocodazol und einer Erholungszeit ohne Inhibitor von 60 min untersucht, oder in Anwesenheit von Dynasore während der Erholungszeit (80 µM, 60 min). Zellen wurden zur Stabilisierung des Zytoskeletts bei 37 °C fixiert (Fix.: PFA + 0.2 % Triton X-100; Post-Fix.: -/-). Größenstandard 10 µm. kLSM. **(B)** Quantifizierung der prozentualen Anteile transfizierter Zellen, die Membrantubuli mikroskopisch erkennen ließen. Pro Datensatz wurden mindestens 7 Gesichtsfelder in

Duplikaten (CPn0678-N^{GFP}, Ø = 158 Zellen pro Zählung) oder in Triplikaten (CPn0678^{GFP}, Ø = 80 Zellen pro Zählung) gezählt. Die Mittelwerte sind in einem Balkendiagramm mit entsprechenden Standardabweichungen dargestellt. Werte für CPn0678-N^{GFP} nach Nocodazol-Auswaschen bzw. nach Erholung in Anwesenheit mit Dynasore konnten aufgrund des Zustands der transfizierten Zellen nicht bestimmt werden (NB). Signifikanzlevel wurden über zweiseitige T-Tests berechnet. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001. n.s., nicht signifikant.

als ohne Cytochalasin D-Behandlung (vgl. Abb. 4.20). Stark verklumpte F-Aktin-Signale implizierten eine erfolgreiche Destabilisierung von F-Aktin, dennoch waren verbleibende F-Aktin-Filamente erkennbar. Eine gesteigerte Assoziation von CPn0678^{GFP}-Membrantubuli mit verbleibendem F-Aktin konnte dabei nicht beobachtet werden.

Wurden transfizierte Zellen mit Nocodazol behandelt, war die Anzahl der Zellen mit Membrantubulation für CPn0678^{GFP} und CPn0678-N^{GFP} signifikant reduziert (auf ~10 % bei CPn0678^{GFP} bzw. ~2 % bei CPn0678-N^{GFP}) (Abb. 4.21 A + B). Nach der Behandlung war ein signifikanter Unterschied zwischen CPn0678^{GFP} und CPn0678-N^{GFP} zu verzeichnen (Abb. 4.21 A + B). Beispielhafte Detailaufnahmen der Zellen nach Nocodazol-Behandlung zeigen, dass bei etwa 90 % der Zellen das MT-Geflecht weitestgehend depolymerisiert war (Abb. 4.22 B, oben). In diesen Zellen waren keine CPn0678^{GFP}-Membrantubuli erkennbar. Etwa 10 % der Zellen wiesen unvollständig depolymerisiert MT auf, die auffällig mit verbleibenden CPn0678^{GFP}-Membrantubuli assoziiert waren (Abb. 4.22 B, Pfeilspitzen unten). Durch diese Ergebnisse konnte die beobachtete Assoziation der CPn0678^{GFP}-Membrantubuli mit MT zusätzlich bestätigt und eine Abhängigkeit der CPn0678^{GFP}-Membrantubulationsrate von F-Aktin und MT gezeigt werden.

Weiterhin wurde bestimmt, ob die CPn0678-induzierten Membrantubuli eine statische oder dynamische Struktur darstellen, indem Nocodazol ausgewaschen wurde, was die Neubildung von MT innerhalb einer Stunde ermöglichte. Anschließend wurde durch Quantifizierung der Tubulationsrate bestimmt, ob mit der Neubildung der MT ein erneuter Anstieg der CPn0678-induzierten Membrantubulation zu verzeichnen wäre. Das häufig MT-assozierte Dynamin besitzt bei anderen membrantubulierenden Proteinen (wie Caveoline, GRAF1 oder SNX9) auch großen Einfluss auf die Tubulationsrate. Deshalb wurde darüber hinaus bestimmt, ob die Inhibierung von Dynamin während der MT-Neubildung einen Einfluss auf die CPn0678^{GFP}-induzierte Membrantubulationsrate zeigt.

Die Tubulationsraten dieser Experimente wurden nur für CPn0678^{GFP} und nicht für CPn0678-N^{GFP} bestimmt. Für CPn0678-N^{GFP} trat nach Nocodazol-Auswaschen bzw. Dynasore-Behandlung eine starke Reduktion der Fluoreszenz ein, welche eine verlässliche Identifikation transfizierter Zellen zu stark beeinträchtigte.

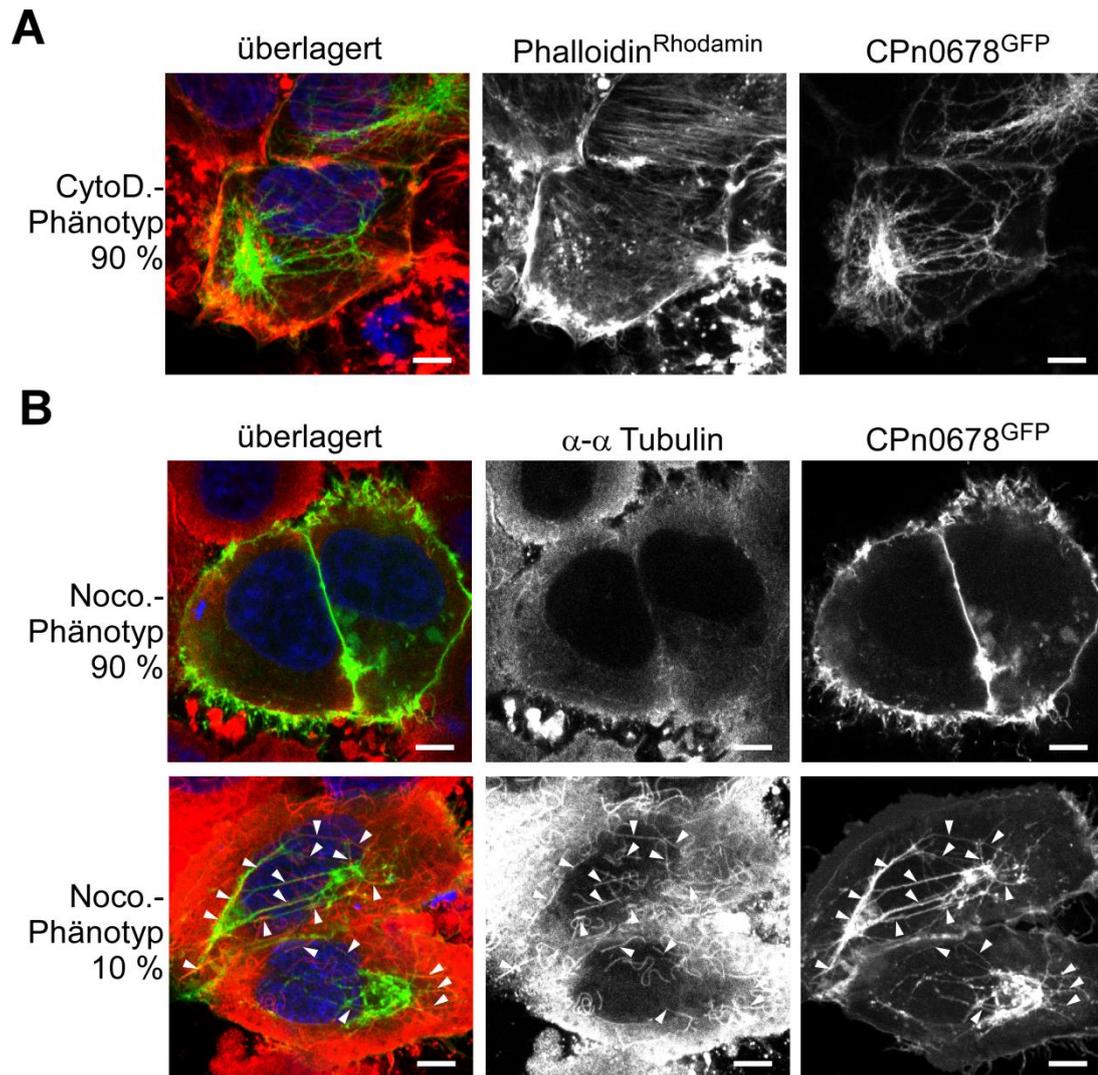


Abb. 4.22: Detailaufnahmen der CPn0678^{GFP} Lokalisation nach Inhibitor-Behandlung

(A+B) Transfektion für 15 h mit anschließender immunfluoreszenter Färbung zur Untersuchung einer möglichen Kolo-kalisation von CPn0678^{GFP} (grün) mit Bestandteilen des Zytoskeletts (rot) nach Behandlung mit Cytochalasin D (A) oder Nocodazol (B). Transfektion, Fixierung und Färbung mit Phalloidin^{Rhodamin} (A) und der MT (B) mittels spezifischem α - α Tubulin Antikörper erfolgte analog zu Abb. 4.20. Häufigkeiten der dargestellten Phänotypen an der Gesamtheit der transfizierten Zellen sind in Prozent angegeben. Pfeilspitzen weisen auf kolo-kalisierende Strukturen von CPn0678^{GFP} und MT hin. Primär: α - α Tubulin 1:100. Sekundär: α -Maus-Alexa⁵⁹⁴: 1:200. DAPI (blau) 2 μ g/ml. Größenstandard 5 μ m. kLSM.

Wurde Nocodazol aus CPn0678^{GFP}-transfizierten Zellen ausgewaschen, zeigte sich ein erneuter signifikanter Anstieg der Tubulation auf etwa das Ausgangsniveau ohne Behandlung (47 % der Zellen nach Erholung, Abb. 4.21 A + B). Wurde dagegen während der einstündigen Erholungsphase Dynamin durch Dynasore inhibiert, konnte kein signifikanter Anstieg der induzierten Membrantubuli beobachtet werden (20 % mit Dynasore, Abb. 4.21 A + B). Zusammen sprechen diese Ergebnisse deutlich für eine Abhängigkeit des CPn0678-Phänotyps von intakten MT und von Dynamin.

Diese Experimente belegen, dass die induzierte Membrantubulation von CPn0678 in der Transfektion signifikant steigt, wenn F-Aktin zerstört wurde und sinkt, wenn MT destabilisiert wurden. Darüber hinaus wird aktives Dynamin für die Bildung der Membrantubuli benötigt. Weiterhin ist der N-Terminus von CPn0678 bereits allein in der Lage ist, Membrantubulation in Humanzellen zu erzeugen, jedoch mit reduzierter Effizienz. Die induzierten Membrantubuli des Volllängenproteins kolokalisierten dabei im Zellkortex mit Regionen, die reich an F-Aktin waren. Eine deutliche Assoziation der CPn0678-induzierten Membrantubuli war mit MT zu beobachten. Eine ähnliche Abhängigkeit der CPn0678-Membrantubuli von Komponenten des Zytoskeletts zu der Abhängigkeit anderer membrantubulierender Proteine (wie Caveoline oder GRAF1) war also in der Transfektion vorhanden.

Nachdem so einige Eigenschaften von CPn0678 identifiziert werden konnten, wurde der Fokus auf eine mögliche Funktion dieses chlamydialen Proteins gelegt.

4.2.3 Die Funktion von CPn0678

4.2.3.1 Die erste prolinreiche Region von CPn0678 ist essentiell für die Interaktion mit Sorting nexin 9

Vorherige Studien in HEK293T Zellen legten eine Interaktion von CPn0678 mit SNX9 nahe, konnten aber nicht eindeutig klären, welcher Bereich für die Interaktion mit SNX9 essentiell ist (Murra 2009). Deshalb wurde die Lokalisation von CPn0678 mit SNX9 durch Transfektionsexperimente in HEp-2 Zellen und heute fortschrittlicher Mikroskopier-technik charakterisiert.

Zuerst wurde der ektopische Expressionsphänotyp beider Proteine in HEp-2 Zellen kontrolliert. Bei der Koexpression von CPn0678^{GFP} und mCherry konnte die deutliche PM-Lokalisation von CPn0678^{GFP} beobachtet werden (Abb. 4.23, oben). mCherry lokalisierte diffus im Zytosol und im Zellkern. Bei der Kotransfektion von GFP mit SNX9^{mCherry} konnte eine zytosolische Verteilung von SNX9^{mCherry} mit einigen in der Größe variierenden Akkumulationen detektiert werden (Abb. 4.23, unten). GFP zeigte ähnlich dem mCherry eine Lokalisation im Zytosol und akkumulierte im Zellkern.

Bereits zuvor konnte erkannt werden, dass das RxxPxxP-Motiv in EspF für die SNX9-Bindung verantwortlich ist und nur in der PRR1 von CPn0678 vorkommt (Murra 2009). Daher wurde überprüft, ob die erste PRR eine zentrale Rolle bei einer möglichen Kolokalisation mit SNX9 einnimmt. Zu diesem Zweck wurden SNX9^{mCherry} und CPn0678^{GFP} bzw. Deletionsvarianten von CPn0678 in HEp-2 Zellen transfiziert und auf mögliche Kolokalisation untersucht. Als CPn0678-Varianten wurden CPn0678^{GFP}, CPn0678-N^{GFP} und

CPn0678-C^{GFP} transfiziert und auch eine Deletionsvariante ohne die erste PRR (CPn0678- Δ PRR1^{GFP}) verwendet (Abb. 4.24 A).

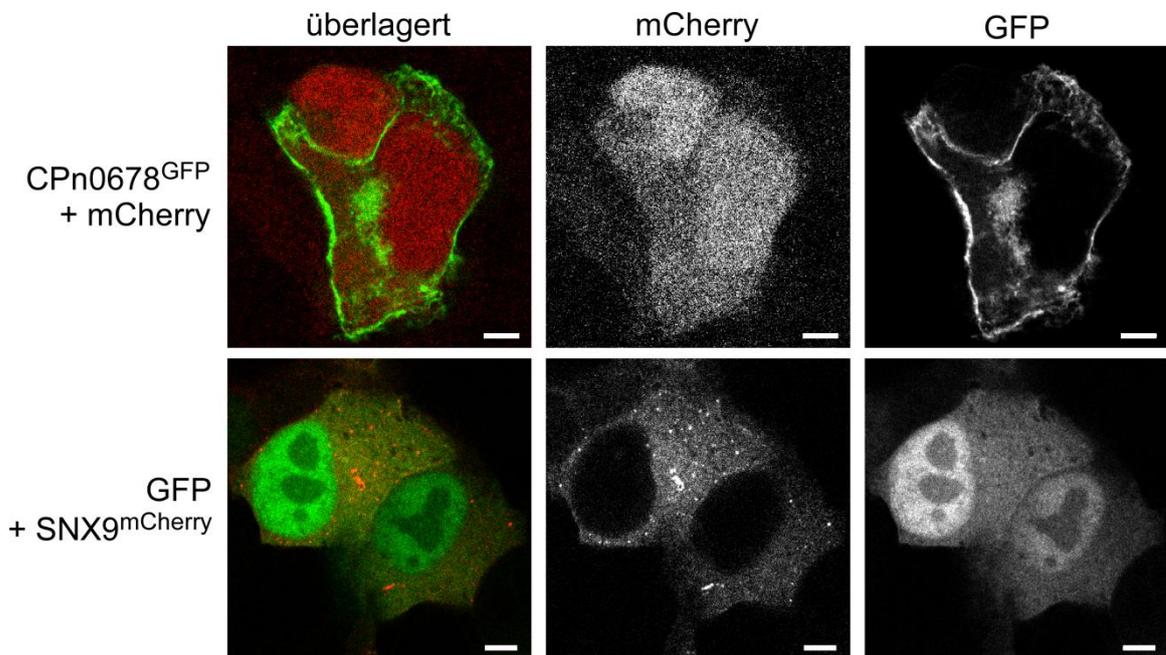


Abb. 4.23: Separate Lokalisationsbetrachtung von CPn0678 und SNX9 in Transfektion

HEp-2 Zellen wurden mit CPn0678^{GFP} (grün, oben) und mCherry allein (rot, oben) oder SNX9^{mCherry} (rot, unten) und GFP allein (grün, unten) kotransfiziert. Zellen wurden nach 15 h fixiert (Fix.: PFA+ 0,2 % Triton X-100; Post-Fix.: -/-). Größenstandard 5 μ m. kLSM.

Die Kotransfektion von CPn0678^{GFP} und SNX9^{mCherry} zeigte eine nahezu vollständige Kolokalisation beider Proteine an der PM und an CPn0678-induzierten Membrantubuli (Abb. 4.24 B). Verglichen mit der Leervektorkontrolle konnte eine Rekrutierung von SNX9 zu CPn0678^{GFP} beobachtet werden (Abb. 4.23). Wurde nun CPn0678-N^{GFP} mit SNX9^{mCherry} kotransfiziert, so konnte für CPn0678-N^{GFP} eine Lokalisation an der PM mit vereinzelter Membrantubulation verzeichnet werden (Abb. 4.24 B). SNX9^{mCherry} zeigte dagegen ein Verteilungsmuster, wie zuvor bei Expression mit der Leervektor-Kontrolle (Abb. 4.23, unten). CPn0678- Δ PRR1^{GFP} lokalisierte an der PM und bildete Membrantubuli. Für SNX9^{mCherry} konnte keine spezifische Kolokalisation mit CPn0678- Δ PRR1^{GFP} beobachtet werden (Abb. 4.24 B). Wurde CPn0678-C^{GFP} mit SNX9^{mCherry} kotransfiziert, so zeigte SNX9^{mCherry} die gleiche Lokalisation wie in der Leervektorkontrolle (Abb. 4.24 B, vgl. Abb. 4.23, unten). CPn0678-C^{GFP} lokalisierte aufgrund des fehlenden N-terminus nicht an der PM, sondern kolokalisierte teilweise mit akkumuliertem SNX9^{mCherry} im Zytosol. Ob weitere Kolokalisation von Cpn0678-C^{GFP} mit SNX9^{mCherry} im Zytosol stattfand, war aufgrund der zytosolisch diffusen Verteilung beider Proteine nicht bestimmbar.

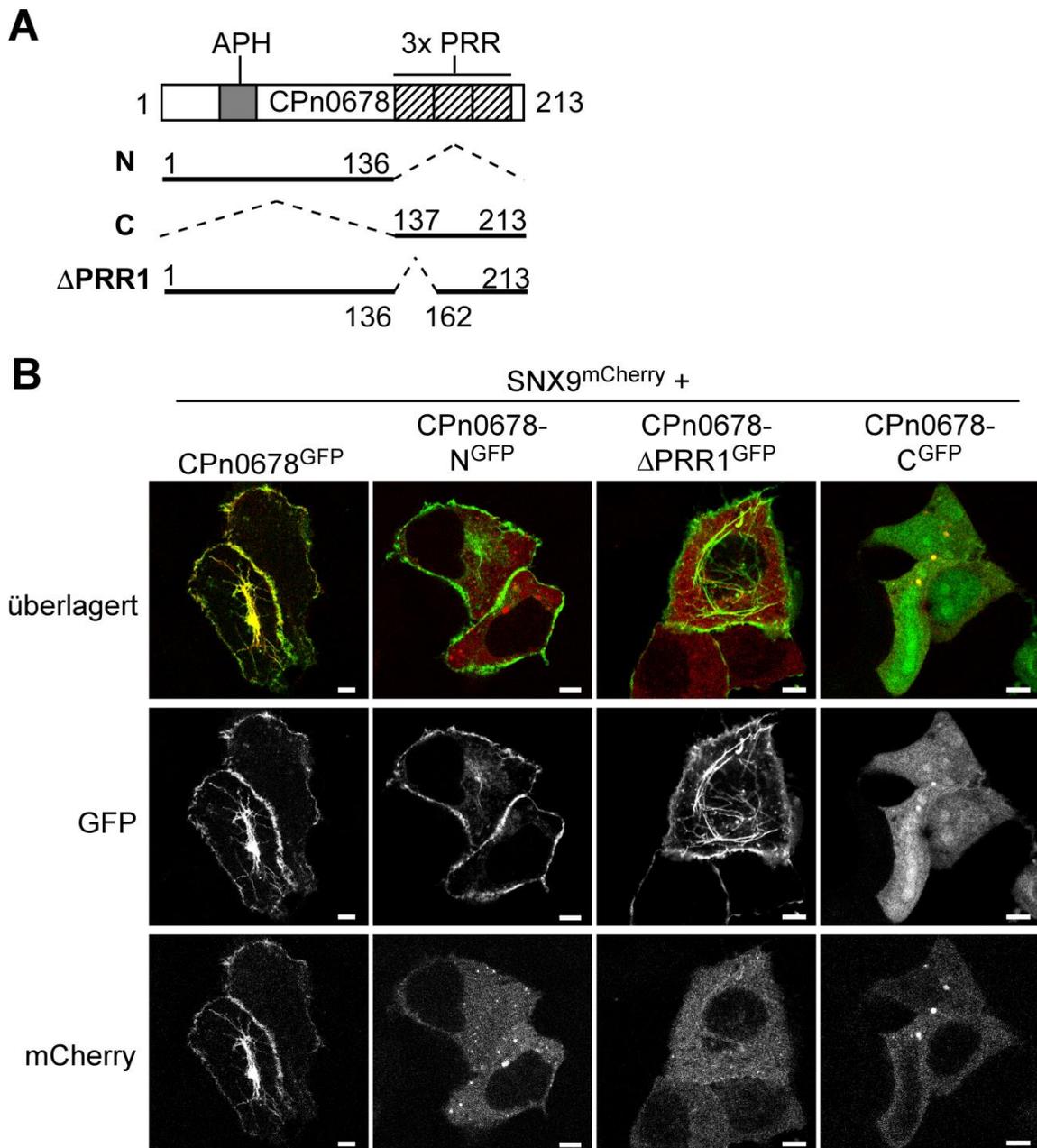


Abb. 4.24: Kolokalisationsanalysen von CPn0678 und SNX9 in der Transfektion

(A) Schematische Darstellung mit Domänenübersicht von CPn0678 und den CPn0678-Varianten, die in Transfektionen in (B) eingesetzt wurden. Aminosäurepositionen sind durch Zahlen angegeben. Deletionen sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. PRR, prolinreiche Region; APH, Amphipathische Helix. (B) HEP-2 Zellen wurden mit SNX9^{mCherry} (rot) und den angezeigten GFP fusionierten CPn0678-Varianten (grün) transfiziert, die in (A) dargestellt sind. Zellen wurden nach 15 h fixiert (Fix.: PFA+ 0,2 % Triton X-100; Post-Fix.: -/-). Größenstandard 5 µm. kLSM.

Somit konnte gezeigt werden, dass eine aktive Rekrutierung von SNX9 durch CPn0678 stattfindet. Ferner ist die erste PRR für die SNX9-Rekrutierung essentiell. Diese Hypothese wird von der ausbleibenden Rekrutierung von SNX9 durch CPn0678-N^{GFP} und CPn0678-ΔPRR1^{GFP} bzw. von der Kolokalisation von CPn0678-C^{GFP} und SNX9^{mCherry} im Zytosol

unterstützt. Die fehlende Rekrutierung von SNX9 durch CPn0678-N^{GFP} und CPn0678-ΔPRR1^{GFP} zeigt außerdem, dass Membrantubulation von CPn0678 nicht die Ursache für die Rekrutierung von SNX9 ist (vgl. Kap. 1.2.3). Eine zufällige Kolo-kalisation im gleichen Zellkompartiment ist deshalb unwahrscheinlich. Dies lässt auf eine direkte und spezifische Interaktion schließen, die im Folgenden über eine **Koimmunpräzipitation** (Ko-IP) biochemisch überprüft wurde.

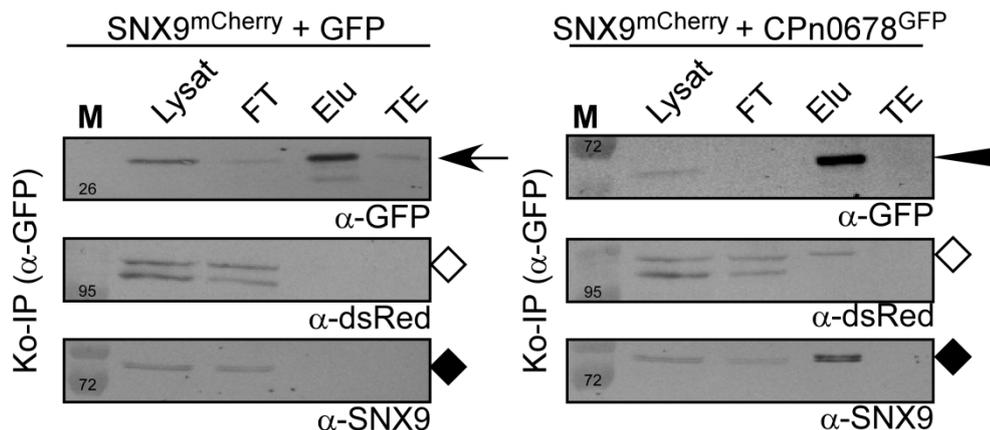


Abb. 4.25: Ko-IP-Analysen mit CPn0678^{GFP} und SNX9^{mCherry} transfizierten Zellen

HEp-2 Zellen (je $\sim 1,2 \cdot 10^6$) wurden mit angezeigten Konstrukten transfiziert und die Expression wurde für 15 h erlaubt. Als Kontrolle dienten Zellen die GFP aus der Leervektorkontrolle und SNX9^{mCherry} koexprimierten (links), während parallel CPn0678^{GFP} und SNX9^{mCherry} kotransfizierte Zellen verwendet wurden (rechts). Zellen wurden 1 ml IP-Lysis-Puffer lysiert (Lysat). Nach Zugabe des mit α -GFP beschichteten, magnetischen Granulats und Inkubationszeit für 1 h bei 4 °C, wurde das Granulat isoliert und der Durchfluss verworfen (FT). Anschließend wurde das Granulat gewaschen und eine Elution mit 120 μ l IP-Elutionspuffer durchgeführt (Elu). Zuletzt wurde eine Totalelution durch Kochen des Granulats in 120 μ l IP-Elutionspuffer durchgeführt (TE). Von allen Proben wurden 25 μ l auf einem 10 % SDS-Gel getrennt und nach Westernblot mit den angezeigten Antikörpern inkubiert. α -dsRed wurde zur Detektion von SNX9^{mCherry} verwendet. Berechnete Größen: GFP 26,9 kDa, CPn0678^{GFP} 49,1 kDa, SNX9^{mCherry} 93,5 kDa, SNX9 66,6 kDa. \leftarrow GFP, \blacktriangleleft CPn0678^{GFP}, \diamond SNX9^{mCherry}, \blacklozenge SNX9. Primär: α -GFP 1:1000, α -dsRed: 1:300, α -SNX9 1:1000. Sekundär: α -Maus-AP: 1:7500, α -Ratte-AP 1:7500. M, Größenstandard: Prestained PageRulerTM.

Zu diesem Zweck wurde eine Ko-IP mit Lysaten von transfizierten Zellen durchgeführt, die SNX9^{mCherry} mit CPn0678^{GFP} exprimierten bzw. mit GFP allein als Leervektorkontrolle. Zur Extraktion wurde magnetisches Granulat verwendet, das mit α -GFP Antikörpern beschichtet war (μ MACS).

In der Auswertung der Proben mittels Westernblot war für die GFP Leervektorkontrolle eine erfolgreiche Detektion der drei getesteten Proteine in der Lysatfraktion zu erkennen. GFP konnte bei ca. 27 kDa, endogenes humanes SNX9 bei ca. 75 kDa und für SNX9^{mCherry} als eine Doppelbande bei ca. 100 und 130 kDa detektiert werden (Abb. 4.25, links). Vom GFP ungebundenes endogenes SNX9 und SNX9^{mCherry} waren in der Durchflussfraktion zu sehen.

In der erste Elutionsfraktion konnte ausschließlich GFP detektiert werden, welches über den α -GFP Antikörper gebunden wurde (Abb. 4.25, links). Eine unspezifische Bindung von SNX9^{mCherry} und endogenem SNX9 war in den Elutionsfraktionen nicht zu erkennen.

In der Lysatfraktion der Zellen, welche SNX9^{mCherry} mit CPn0678^{GFP} exprimierten, konnten CPn0678^{GFP}, SNX9^{mCherry} und endogenes SNX9 erfolgreich detektiert werden (Abb. 4.25, rechts). In der Elutionsfraktion aus der Ko-IP mit diesen Zellen konnte ein deutliches Signal für CPn0678^{GFP} detektiert werden, welches die erfolgreiche Bindung an den α -GFP Antikörper belegte. Das Signal für CPn0678^{GFP} war bei ca. 70 kDa erkennbar. Im Gegensatz zur Leervektor-Kontrolle, konnte in der Elutionsfraktion Signale der oberen Doppelbande von ko-präzipitiertem SNX9^{mCherry} erkannt werden. In weitaus stärkerem Maße wurde ko-präzipitiertes endogenes SNX9 in dieser Fraktion beobachtet.

Zusammen zeigen die Ergebnisse, dass CPn0678^{GFP} mit SNX9^{mCherry} bzw. mit endogenem SNX9 mit CPn0678^{GFP} interagieren kann. Das lässt darauf schließen, dass die Kolokalisation von CPn0678 und SNX9 in der Transfektion auf eine direkte Interaktion zurückzuführen ist und keine zufällige Kolokalisation repräsentiert. Darüber hinaus wurde diese Kolokalisation essentiell von der ersten PRR von CPn0678 beeinflusst. Die essentielle Rolle des ersten PRR passt zu anfänglichen Ergebnissen, in denen die SH3-Domäne von SNX9 als essentielle Domäne der Interaktion zu rekombinantem CPn0678 identifiziert wurde (vgl. Kap. 1.2.3 & Kap. 1.5).

4.2.3.2 Die Interaktion von SNX9 und CPn0678 ist spezifisch

In Humanzellen wird eine Vielzahl an Proteinen mit SH3-Domänen exprimiert, die potentiell Bindung an PRR zeigen könnten. Deshalb sollte die Spezifität der Kolokalisation in der Transfektion von CPn0678 und SNX9 anhand humaner Kontrollproteine mit SH3-Domänen überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden CIN85 (**C**bl **i**nteracting protein of **85** kDa) und GRB2 als Kontrollproteinen ausgewählt.

CIN85 und GRB2 weisen wie SNX9 SH3-Domänen auf (Abb. 4.26 A). CIN85 wurde als Kontrollprotein ausgewählt, da es im Rahmen dieser Arbeit erstmals mit frühen *C. pneumoniae*-Infektionen assoziiert vorgefunden werden konnte (Abb. 4.26 B). GRB2 besitzt ein breites Bindungsspektrum von PRR, und weist Affinität zu RxxPxxP-Motiven auf (Yeow-Fong et al. 2005, Zucconi et al. 2001). Beide Proteine agieren als Adaptorproteine des EGFR, welcher in der frühen chlamydialen Infektion nachweislich aktiviert wird und diese Proteine eng mit der frühen Infektion verbindet (Molleken et al. 2013, Schmidt & Dikic 2005, Wang & Moran 1996) (vgl. Kap. 1.2.4).

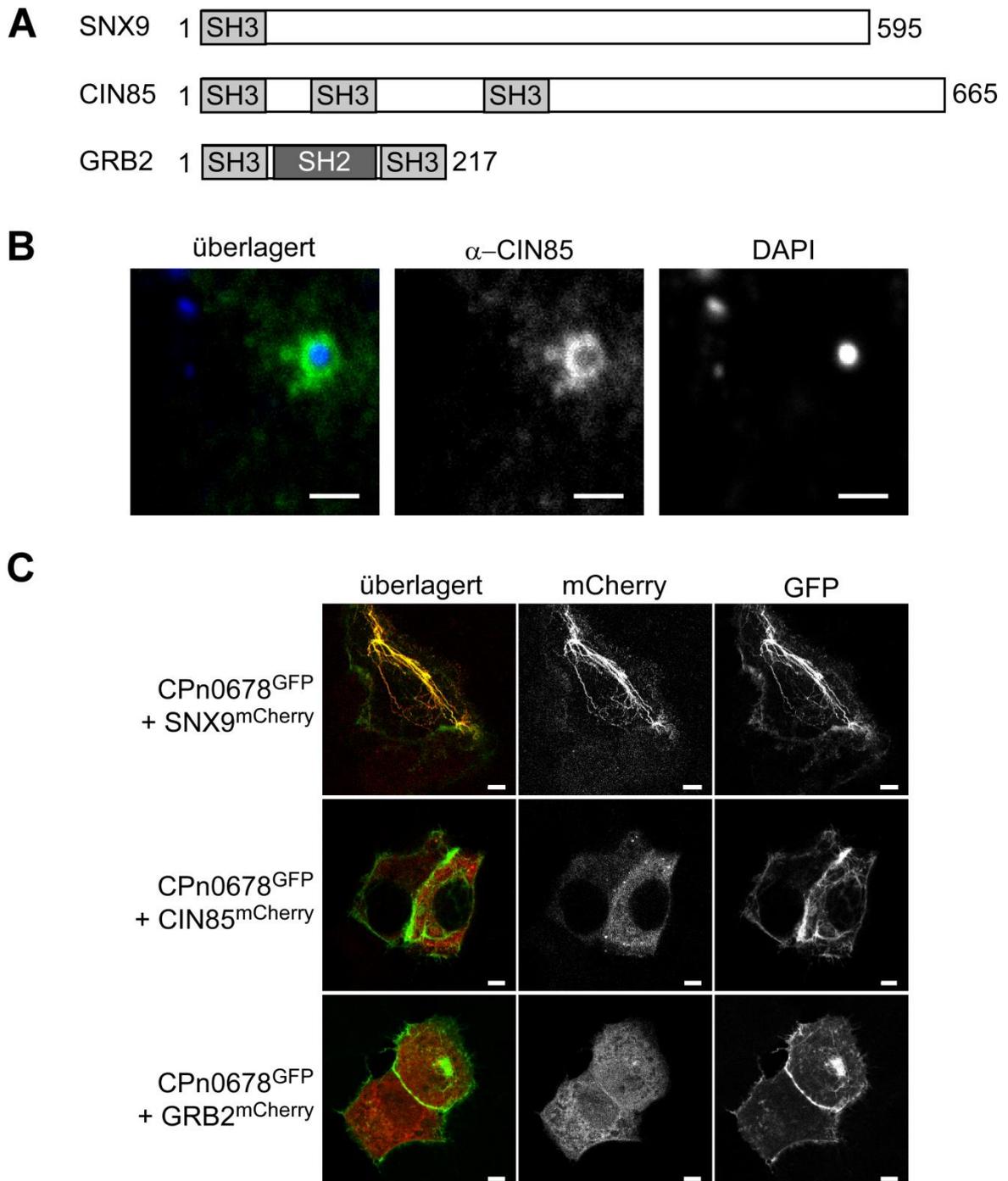


Abb. 4.26: Spezifitätstests der CPn0678-SNX9 Kolokalisation über GRB2 und CIN85 in der Transfektion
(A) Darstellung der SH3- und SH2-Domänen in SNX9, CIN85 und GRB2. Aminosäurepositionen sind durch Zahlen angegeben. **(B)** Repräsentative Lokalisation von CIN85 in Immunfluoreszenz-Färbungen der frühen Infektion. HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* infiziert (MOI=50), zu frühen Zeitpunkten (20 min pi) fixiert (Fix: PFA; Post-Fix: Methanol) und mit einem spezifischen α -CIN85 Antikörper und DAPI gefärbt. Primär: α -CIN85 1:50, Sekundär: α -Maus-Alexa⁴⁸⁸ 1:200. DAPI 2 μ g/ml. Größenstandard 1 μ m. kLSM. **(C)** HEp-2 Zellen wurden mit SNX9^{mCherry}, CIN85^{mCherry} oder GRB2^{mCherry} (rot) und jeweils CPn0678^{GFP} (grün) kotransfiziert. Die Zellen wurde nach 15 h fixiert (Fix.: PFA+ 0,2 % Triton X-100; Post-Fix.: -/-). Größenstandard 5 μ m. kLSM.

Die Koexpression von CPn0678^{GFP} und SNX9^{mCherry} zeigte den bekannten Phänotyp einer nahezu vollständigen Kolo-kalisation (Abb. 4.26 C, oben) (vgl. Abb. 4.24 B). Wurden CIN85^{mCherry} oder GRB2^{mCherry} mit CPn0678^{GFP} koexprimiert, so konnte keine spezifische Kolo-kalisation oder Assoziation zu CPn0678^{GFP} beobachtet werden (Abb. 4.26 C, Mitte bzw. unten). Beide humane Kontrollproteine lokalisierten diffus im Zytoplasma mit vereinzelt Akkumulationen (Abb. 4.26 C, Mitte bzw. unten).

Die Interaktion der ersten PRR von CPn0678 mit der SH3-Domäne von SNX9 ist somit wahrscheinlich spezifischer Natur, denn andere Proteine mit SNX9-ähnlichen Bindungsmotiven und Verbindung zur frühen chlamydialen Infektion zeigen keine Lokalisation zu CPn0678. Da allerdings nur eine der drei PRR das vermutlich relevante RxxPxxP-Motiv aufweist, wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass die beiden anderen PRR mit ihren veränderten Motiven andere spezifische Bindungspartner besitzen könnten.

4.2.3.3 CPn0678 kolo-kalisiert mit IRSp53 und Cortactin in der Transfektion

In der ersten PRR von CPn0678 befindet sich ein RxxPxxP-Motiv (wie in EspF), wohingegen die Motive der zweiten und dritten PRR aus CPn0678 (wie in EspFu) ähnliche Motive ohne Arginin an vorderer Position besitzen (vgl. Kap. 1.5 & Kap. 1.5.1). Es ist bekannt, dass die veränderten Motive in EspFu kein SNX9 binden können, sondern Interaktion zu IRSp53 und Cortactin vermitteln (Cantarelli et al. 2007, Morita-Ishihara et al. 2009, Weiss et al. 2009). Deshalb wurde im Folgenden überprüft, ob IRSp53 und Cortactin wie SNX9 möglicherweise mit CPn0678 in Transfektionsexperimenten kolo-kalisieren.

IRSp53 und Cortactin wurden als mCherry-fusionierte Variante einzeln transfiziert oder jeweils mit CPn0678^{GFP} kotransfiziert. In den Einzeltransfektionen beider mCherry-fusionierten Proteine war eine ungleichmäßige Lokalisation an der humanen PM zu erkennen (Abb. 4.27 A + B, jeweils oben). Zytosolische Ansammlungen von IRSp53^{mCherry} und Cortactin^{mCherry} waren seltener zu beobachten. Aufgrund einer stark reduzierten Transfektionseffizienz von IRSp53^{mCherry} und Cortactin^{mCherry} wurden in der Kotransfektion mit CPn0678^{GFP} überwiegend Zellen ohne induzierte Membrantubuli beobachtet (Abb. 4.27 A + B, jeweils unten). In der Kotransfektion konnte sowohl für IRSp53^{mCherry} als auch für Cortactin^{mCherry} eine Kolo-kalisation mit CPn0678^{GFP} an der humanen PM beobachtet werden. IRSp53^{mCherry} und Cortactin^{mCherry} zeigten eine unregelmäßige Verteilung an der PM und akkumulierten in denselben Bereichen wie CPn0678^{GFP}.

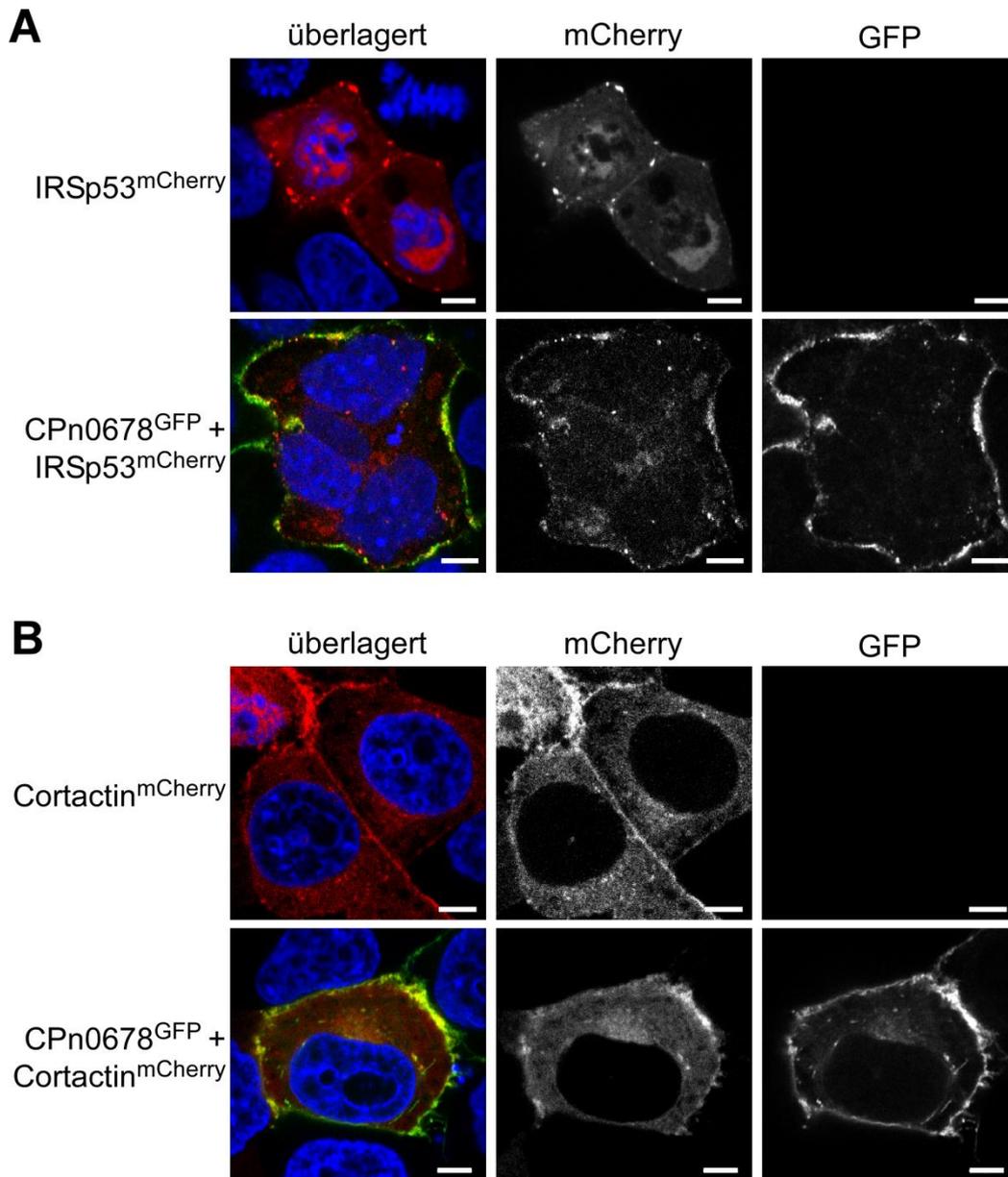


Abb. 4.27: Lokalisationsanalyse von IRSp53^{mCherry} oder Cortactin^{mCherry} bei CPn0678^{GFP} Kotransfektion (A+B) Transfektion zur Überprüfung einer möglichen Kolo­kalisierung von CPn0678 mit IRSp53 und Cortactin. HEp-2 Zellen wurden mit IRSp53^{mCherry} (A, rot) oder Cortactin^{mCherry} (B, rot) transfiziert (jeweils oben) oder mit CPn0678^{GFP} (grün, jeweils unten) kotransfiziert. Zellen wurde nach 15 h fixiert (Fix.: PFA+ 0,2 % Triton X-100; Post-Fix.: -/-) und DAPI-gefärbt (blau) (2 µg/ml). Größenstandard 5 µm. kLSM.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Kolo­kalisierung von CPn0678 mit IRSp53 oder Cortactin vorhanden war. Da beide Proteine auch ohne CPn0678 an der humanen PM lokalisierten konnte allein durch die Kotransfektion keine Rekrutierung oder Interaktion von IRSp53 bzw. Cortactin zu CPn0678 bestimmt werden. Eine Interaktion von CPn0678 mit IRSp53 oder Cortactin bleibt somit spekulativ.

Nachdem eine detaillierte Charakterisierung möglicher Interaktionen von CPn0678 in Experimenten mit uninfiziertem Hintergrund erstellt wurde, sollte eine nähere Einordnung von SNX9 und CPn0678 während der chlamydialen Infektion erfolgen.

4.2.3.4 CPn0678 und SNX9 interagieren im Wirtszellzytosol in den Frühphasen der chlamydialen Infektion

Endogenes CPn0678 wurde in den Frühphasen der chlamydialen Infektion als sekretiert identifiziert (vgl. Abb. 4.13). Deshalb wurde getestet, ob SNX9 subzellulär zu frühen Infektionsereignissen von *C. pneumoniae* lokalisiert und ob die Interaktion zwischen SNX9 und CPn0678 auch in der chlamydialen Infektion nachgewiesen werden kann. Zu diesem Zweck wurden zuerst Immunfluoreszenz-Färbungen mit einem α -SNX9 Antikörper von Kurzzeit-infizierten Zellen angefertigt.

In den Färbungen 20 min pi war SNX9 weitestgehend punktiert zytosolisch lokalisiert, wobei auch einige Signale im Zellkern detektiert werden konnten (Abb. 4.28 A, oben). Adhärenzte oder bereits internalisierte chlamydiale Partikel, konnten durch ihr kondensiertes DNA-Signal identifiziert werden. An diesen zeigte sich bei einigen eine deutliche SNX9-Akkumulation (Abb. 4.28 A, unten). Diese Akkumulationen befanden sich in direkter Nähe zu den Chlamydien, ohne direkt zu kolokalisieren. Durchschnittlich konnte bei etwa 30 % der Chlamydien ein akkumuliertes SNX9 beobachtet werden, welches stärker war als zytosolische SNX9-Signale. Somit kann von einer Rekrutierung von SNX9 während der frühen Phasen der chlamydialen Infektion ausgegangen werden.

Des Weiteren stellte sich die Frage, ob die Interaktion von endogenem CPn0678 und endogenem SNX9 auch in der natürlichen frühen Infektion stattfindet. Um dies zu überprüfen wurde eine Ko-IP mit endogenem CPn0678 als Köderprotein durchgeführt.

Für dieses Experiment wurden Lysate infizierter Zellen 20 min pi verwendet (Abb. 4.28 B). Die Detektion der endogenen Proteine in der Lysatfraktion der Ko-IP zeigte CPn0678 bei etwa 27 kDa, SNX9 bei etwa 75 kDa und GRB2 als unspezifisches Kontrollprotein bei etwa 27 kDa. In keiner der Elutionsfraktionen konnte das Kontrollprotein GRB2 nachgewiesen werden. In den ersten beiden Elutionsfraktionen konnte eine große Menge an gebundenem CPn0678 detektiert werden (Abb. 4.28 B, Pfeil). Die Menge an CPn0678 reduzierte sich in den nachfolgenden Elutionsfraktionen. Bei der zweiten Bande knapp oberhalb des CPn0678-Signals handelt es sich um die leichte Kette der IgG-Antikörper (30 kDa), welche in der Ko-IP eingesetzt wurden (Abb. 4.28 B, Pfeilspitze). Interessanterweise konnte in der ersten Elutionsfraktion endogenes SNX9 detektiert werden. Somit konnte erstmalig biochemisch eine Interaktion von endogenem SNX9 und CPn0678 in der frühen chlamydialen Infektion gezeigt werden.

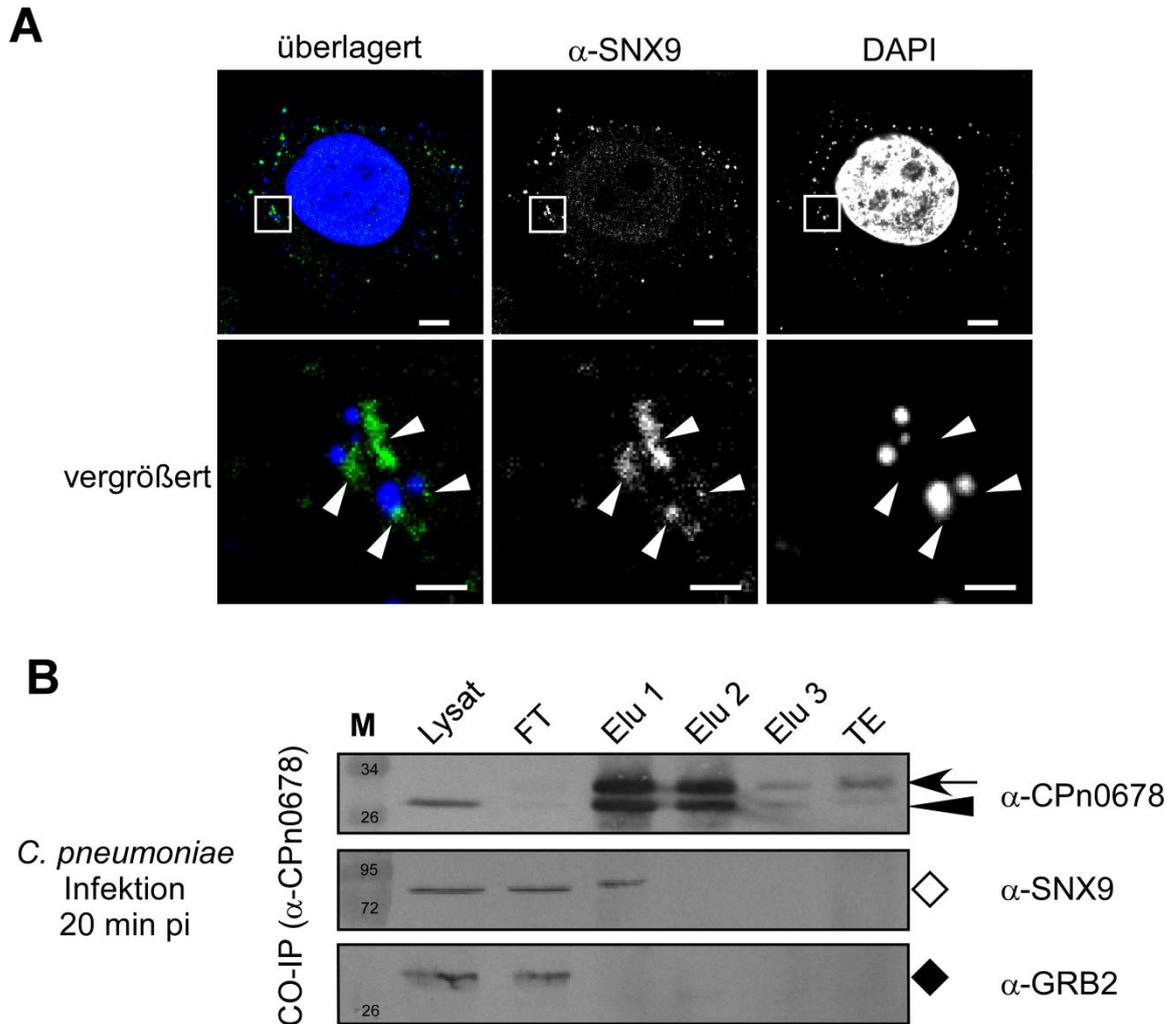


Abb. 4.28: Lokalisation von SNX9 in der frühen Infektion und Interaktion mit CPn0678

(A) Lokalisationsanalyse von SNX9 in Immunfluoreszenz-Färbungen. HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* infiziert (MOI=50), 20 min pi fixiert (Fix: PFA: Post-Fix: Methanol), und mit einem spezifischen α -SNX9 Antikörper (grün) bzw. DAPI (2 μ g/ml, blau) gefärbt (oben). Weiße Kästchen markieren vergrößerte Bereiche (unten). Primär: α -SNX9 1:25, Sekundär: α -Ziege-Alexa⁴⁸⁸ 1:200. Größenstandard 5 μ m in Übersicht, 1 μ m in Vergrößerung. kLSM. **(B)** Ko-IP gerichtet gegen endogenes CPn0678 in der frühen chlamydialen Infektion. HEp-2 Zellen (je $\sim 2,8 \cdot 10^6$) wurden mit *C. pneumoniae* (MOI=600) für 20 min pi infiziert. Zellen wurden dann in 1 ml IP-Lysis-Puffer lysiert, gelöst und das entstandene Zellysate per Zentrifugation geklärt (Lysat). Nach Zugabe des α -CPn0678 Antikörpers und Protein-G-Agarose und Inkubation ü/N bei 4 °C, wurde die Agarose isoliert und der Durchfluss verworfen (FT). Anschließend wurde die Agarose gewaschen und dreimal eine Elution (je 50 μ l) durchgeführt (Elu). Zuletzt wurde eine Totalelution durch Kochen des Granulats angewendet (TE). Von allen Proben wurden 16 μ l auf einem 12 % SDS-Gel getrennt und nach Westernblot mit den angezeigten Antikörpern detektiert. Berechnete Größen: CPn0678 21,8 kDa, SNX9 66,6 kDa, GRB2 25,2 kDa. \leftarrow IgG leichte Kette des Ko-IP-Antikörpers, \blacktriangleleft CPn0678, \diamond SNX9, \blacktriangleright GRB2. Primär: α -CPn0678 1:100, α -SNX9 1:1000, α -GRB2 1:300. Sekundär: α -Maus-AP: 1:7500, α -Ratte-AP 1:7500, α -Kaninchen-AP 1:7500. M, Größenstandard: Prestained PageRuler™.

Das ursprüngliche Modell postulierte eine Oberflächenexponierung von SNX9 zum Interzellularraum hin, an dem das vermeintliche Adhäsion CPn0678 binden sollte (Murra 2009) In der Literatur ist SNX9 allerdings ausschließlich als intrazelluläres Protein bekannt. Um die

mögliche intrazelluläre oder oberflächenlokalisierte Lokalisation von SNX9 eindeutig zu bestimmen, wurden Zugänglichkeitsstudien von SNX9 mit unpermeabilisierten Zellen durchgeführt und mit Methanol-permeabilisierten Zellen verglichen.

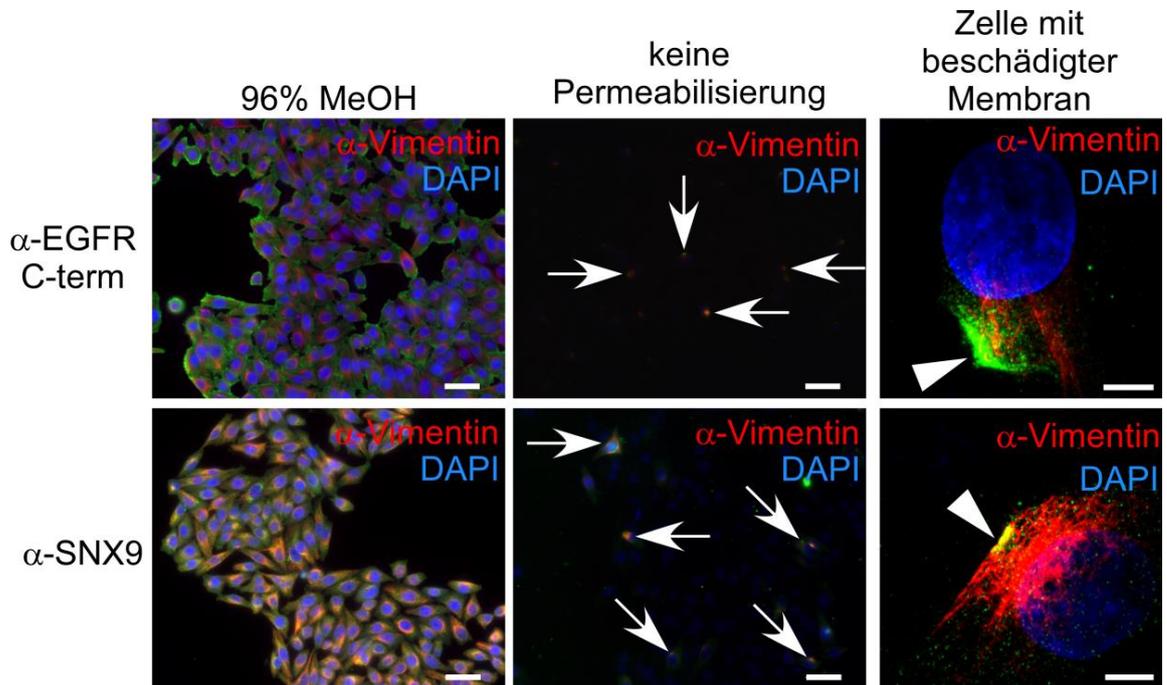


Abb. 4.29: Zugänglichkeitsanalyse für SNX9 in uninfizierten HEp-2 Zellen

HEp-2 Zellen wurden unter nicht permeabilisierenden Bedingungen auf Eis fixiert und anschließend mit Methanol permeabilisiert oder unpermeabilisiert belassen. Die Immunfluoreszenz-Färbung erfolgte mittels Antikörpern gegen die intrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors (α -EGFR C-term) (grün, oben) oder α -SNX9 (grün, unten). Zur Kontrolle für permeabilisierte Zellen wurde zusätzlich immer ein direkt-markierter α -Vimentin-Cy3 Antikörper verwendet (rot). Abschließend erfolgte eine DAPI-Färbung (blau). Pfeile markieren vereinzelte permeabilisierte Zellen. Beispielaufnahmen von Zellen mit einzelnen Membranschäden sind rechts dargestellt. Pfeilspitzen markieren vermutliche Membranschäden und die potentielle Eintrittsstelle der Antikörper. Die Übersichtsbilder beider Methanol-Permeabilisierungen und der SNX9-Färbung ohne Permeabilisierung sind unter identischen Einstellungen aufgenommen worden. Die EGFR-Färbung ohne Permeabilisierung, wurde mit etwa doppelter Belichtungszeit aller Kanäle aufgenommen wurde (Mitte oben). Primär: α -EGFR C-term 1:400, α -SNX9 1:25, α -Vimentin-Cy3 1:200. Sekundär: α -Kaninchen-Alexa⁴⁸⁸ 1:100. α -Ziege-Alexa⁴⁸⁸ 1:100 DAPI 2 μ g/ml. Größenstandard in Übersichten 10 μ m, 5 μ m in Einzelaufnahmen. Übersichtsbilder Weitfeldmikroskopie Einzelaufnahmen kLSM.

Bei diesen Experimenten war eine intrazelluläre Kontrolle unerlässlich, da fixierte unpermeabilisierte Zellen wegen mechanischer und thermischer Einflüsse nur temporär stabil sind. Als intrazelluläre Kontrolle wurde in allen Färbungen ein direkt-markierter Antikörper gegen die Zytoskelett-Komponente Vimentin eingesetzt. Als Färbung eines intrazellulären Vergleichsproteins wurde ein Antikörper gegen die intrazelluläre, C-terminale Domäne des EGFR verwendet. In Methanol-permeabilisierten Zellen zeigte die Färbung deutliche Signale des EGFR, des Vimentins und der DNA (Abb. 4.29, oben). Wenn keine Permeabilisierung angewandt wurde, trugen nur vereinzelte Zellen ein schwaches EGFR-Signal, die aber gleichzeitig durch das Signal mit dem Vimentin Antikörper als permeabilisiert identifiziert

werden konnten (Abb. 4.29, Pfeile oben). Außerdem war die DNA-Färbung, verglichen mit dem permeabilisierten Zustand, schwächer was vermutlich auf die Membranimpermeabilität des DAPI-Farbstoffs zurückzuführen war. In Detailaufnahmen dieser Zellen konnten sogar die vermutlichen Positionen der Membranschäden identifiziert werden. An jenen Stellen wurde durch einströmende Antikörper eine spezifische Färbung für die intrazelluläre EGFR-Domäne und Vimentin ausgelöst (Abb. 4.29, oben, Pfeilspitzen). Diese Beobachtung spiegelte neben der Spezifität der Methode ebenfalls ihre Sensitivität wider.

Wurde dieses Experiment mit dem α -SNX9 Antikörper durchgeführt, so zeigte SNX9 in Methanol-permeabilisierten Zellen eine Lokalisation im Zytosol der Humanzellen (Abb. 4.29, unten). Wurde keine Permeabilisierung angewandt, zeigten ausschließlich Vimentin-positive Zellen Signale für SNX9 (Abb. 4.29, Pfeile unten). Auch für SNX9 ließ sich eine intrazelluläre Lokalisation in Zellen erkennen, die einzelne Membranschäden aufwiesen (Abb. 4.29, Pfeilspitzen unten). SNX9 konnte somit eindeutig als intrazelluläres Protein charakterisiert werden.

Zusammengefasst konnte SNX9, wie auch CPn0678, an frühen Ereignissen der Infektion lokalisiert beobachtet werden. Darüber hinaus konnte über die Ko-IP erstmals die Interaktion von endogenem CPn0678 und endogenem intrazellulärem SNX9 in der natürlichen frühen Infektion gezeigt werden. Daher wird die beobachtete Rekrutierung von SNX9 während der frühen Infektion möglicherweise durch CPn0678 ausgelöst. Die ausschließliche intrazelluläre Lokalisation von SNX9 passt weiterhin zu den Ergebnissen der Sekretion von CPn0678 (vgl. Abb. 4.13). Als nächstes wurde untersucht, ob CPn0678 eine wichtige Rolle während der Infektion einnimmt.

4.2.3.5 CPn0678^{GFP} induziert einen dominant-negativen Effekt in der chlamydialen Infektion

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob ein messbarer Einfluss von ektopisch exprimiertem CPn0678 auf die Infektion ausgeübt wird. Um dies einschätzen zu können, wurden CPn0678^{GFP}-transfizierte Zellen mit *C. pneumoniae* infiziert und die Infektionsratenänderung durch die Quantifizierung von gebildeten Inklusionen 24 hpi bestimmt. Dabei wurden neben dem Volllängenprotein auch N- und C-terminale Fragmente von CPn0678 verwendet, die mögliche Unterscheide zwischen Membran-bindenden oder SNX9-interagierenden Bereichen verdeutlichen sollten.

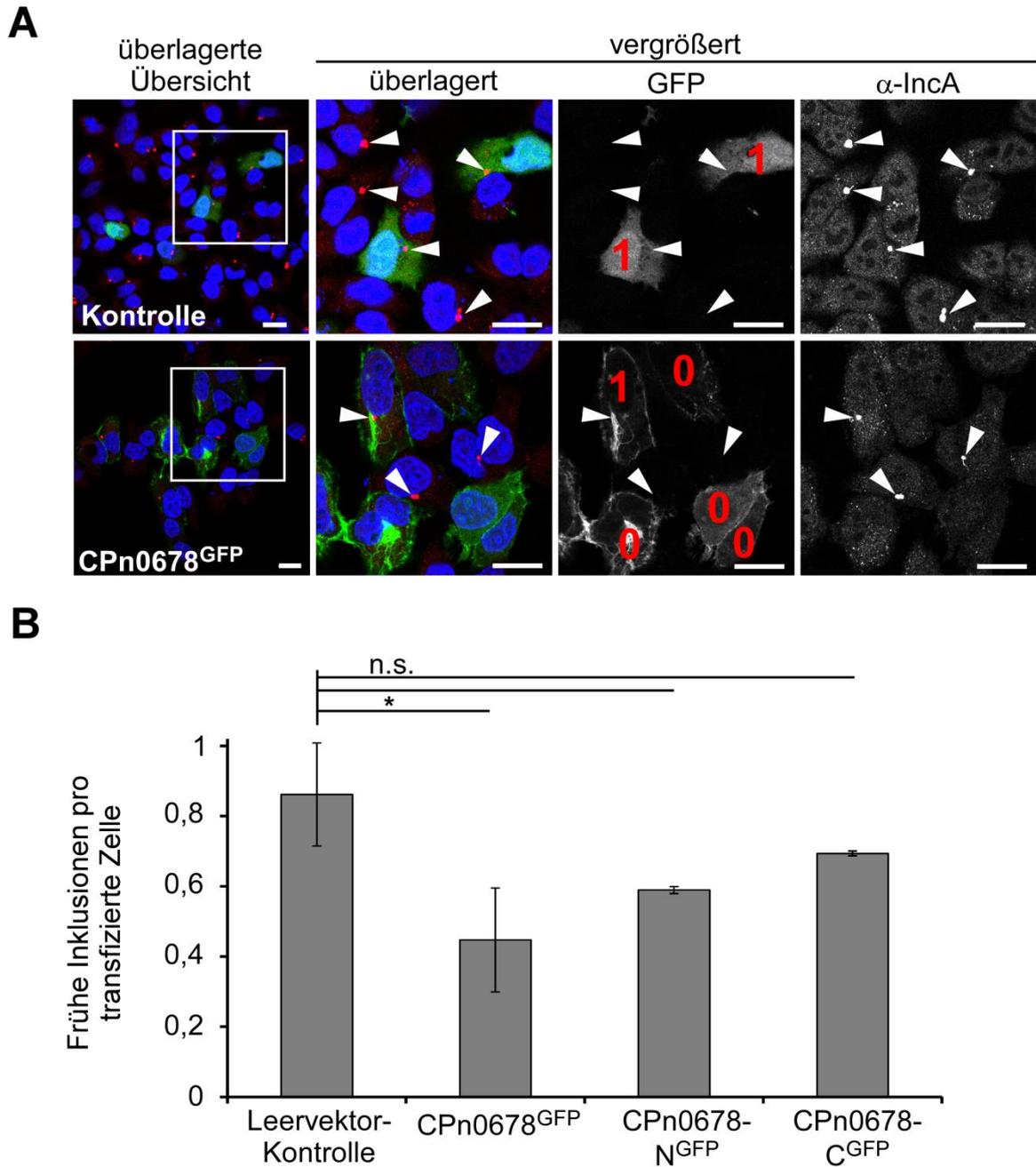


Abb. 4.30: Einfluss von transfizierten CPn0678^{GFP}-Varianten auf die Infektionsrate von *C. pneumoniae*
(A) Beispielbilder der Transfektion mit nachfolgender Infektion zur Bestimmung der Infektionsratenänderung in transfizierten Zellen mit GFP allein als Leervektor-Kontrolle (grün, oben) oder CPn0678^{GFP} (grün, unten). HEp-2 Zellen wurde nach 15 h Expression mit *C. pneumoniae* infiziert (MOI=2) und 24 hpi fixiert (Fix.: PFA; Post-Fix.: Methanol). Färbung erfolgte über spezifischen α -IncA Antikörper (rot) und DAPI (blau). Weißer Kasten in der Übersicht markiert jeweils vergrößerte Bereiche. Weiße Pfeilspitzen markieren Inklusionen. Rote Zahlen geben die gezählten Inklusionen pro Zelle an. Primär: α -IncA 1:100. Sekundär: α -Maus-Alexa⁵⁹⁴ 1:200. DAPI 2 μ g/ml. Größenstandard 15 μ m. kLSM. **(B)** Quantifizierung der Infektionsraten. Probenpräparation erfolgte analog zu (A). Quotient aus Inklusionen pro transfizierter Zelle wurde pro Gesichtsfeld bestimmt. Für jede Variante wurden Triplikate mit je mindestens 20 Gesichtsfeldern ausgezählt (\emptyset gezählte Zellen pro Replikat: GFP = 103, CPn0678^{GFP} = 103, CPn0678-^NGFP = 101, CPn0678-^CGFP = 102). Resultierende Mittelwerte der Triplikate mit Standardabweichung sind im Balkendiagramm dargestellt. Signifikanzlevel wurden über zweiseitige T-Tests berechnet. * $p < 0.05$. n.s., nicht signifikant.

Die Zellen wurden zuerst 15 h transfiziert, anschließend 24 h infiziert und nach der Fixierung bzw. Permeabilisierung mit einem spezifischen Antikörper gegen das Inklusionsmembranprotein IncA gefärbt. Anhand der gebildeten Inklusionen wurde dann die Infektionsrate in transfizierten Zellen bestimmt. Mit dem Leervektor transfizierte Zellen exprimierten nur GFP und dienten zu Bestimmung der Basis-Infektionsrate. Bei dieser Kontrolle zeigte sich die zuvor beobachtete Verteilung des GFPs als zytosolisch und kernlokalisiert (Abb. 4.30 A, oben). Deutlich waren die IncA-markierten Inklusionen zu erkennen (Abb. 4.30 A, Pfeilspitzen oben). In der Vergrößerung ist die Anzahl der frühen Inklusionen in den jeweiligen transfizierten Zelle angegeben (Abb. 4.30 A, rote Zahlen oben). Für die Leervektorkontrolle konnte in der Quantifizierung ein Wert von 0,87 Inklusionen pro transfizierter Zelle als Infektionsrate bestimmt werden (Abb. 4.30 B). Wurde statt der Leervektorkontrolle CPn0678^{GFP} exprimiert, lokalisierte das Protein an der PM und induzierte vereinzelt Membrantubuli (Abb. 4.30 A, unten). Interessanterweise war die Anzahl der Inklusionen in CPn0678^{GFP}-transfizierten Zellen geringer als bei der Leervektorkontrolle (Abb. 4.30 A, unten, rote Zahlen). Durch die Quantifizierung konnte eine Reduktion auf durchschnittlich 0,44 Inklusionen pro transfizierter Zelle verzeichnet werden, was einer signifikanten Reduktion von etwa 50 % gegenüber der Leervektorkontrolle entspricht (Abb. 4.30 B). Die Morphologie der gebildeten frühen Inklusionen erschien dabei unverändert (Abb. 4.30 A, Pfeilspitzen unten).

CPn0678-N^{GFP} und CPn0678-C^{GFP} zeigten ein unverändertes Lokalisationsmuster verglichen mit vorherigen Daten (vgl. Abb. 4.15). Bei der Quantifizierung der Inklusionen in den transfizierten Zellen wurden für CPn0678-N^{GFP} 0,58 Inklusionen / transf. Zelle (33 % Reduktion) und für CPn0678-C^{GFP} 0,69 Inklusionen / transf. Zelle (20 % Reduktion) bestimmt (Abb. 4.30 B). Eine tendenzielle Reduktion war also für beide Varianten von CPn0678 erkennbar, erreichte aber kein signifikantes Maß verglichen mit der Leervektorkontrolle (Abb. 4.30 B).

Die Ergebnisse zeigen also einen signifikant dominant-negativen Effekt durch transfiziertes CPn0678^{GFP} in der chlamydialen Infektion. Dieser Effekt benötigt allerdings die Funktion des vollständigen Gesamtproteins, denn eine Trennung in C- und N-Terminus bzw. eine Trennung von Membranbindung und SNX9-Interaktion, schwächte diesen Effekt stark ab. CPn0678^{GFP} musste darüber hinaus Einfluss auf sehr frühe Ereignisse der chlamydialen Infektion genommen haben, da der Effekt vor 24 hpi eintrat.

4.2.3.6 Transfiziertes CPn0678^{GFP} und SNX9^{mCherry} kolokolisieren an frühen *C. pneumoniae*-Infektionsereignissen

Die frühe Sekretion von CPn0678 und die Interaktion mit dem endozytotischen Protein SNX9 legten die Vermutung nahe, dass der dominant-negative Effekt auf eine Beeinflussung der frühesten Infektionsereignisse wie die Endozytose und Internalisierung von *C. pneumoniae* zurückzuführen sein könnte. Deshalb wurde ermittelt, ob transfiziertes CPn0678^{GFP} direkt an Ereignissen der frühen Infektion beteiligt ist. Darüber hinaus wurde auch transfiziertes SNX9 in der frühen Infektion betrachtet, um eine Beteiligung von SNX9 an den frühen Infektionsprozessen weiter charakterisieren zu können.

Dafür wurden je CPn0678 bzw. SNX9 zusammen mit der PH-Domäne der **B**ruton **T**yrosin**k**inase (BTK-PH) in HEp-2 Zellen kotransfiziert und anschließend Kurzzeit-infiziert. Die PH-Domäne von BTK bindet spezifisch an PI(3,4,5)P₃, welches an der frühen endozytotischen Membran gebildet wird und dort akkumuliert (Halet 2005, Laketa et al. 2014). Somit gilt BTK-PH als früher Endozytose-Marker an endozytotischen Invaginationen bis der endozytotische Vesikel geschlossen ist (Halet 2005).

BTK-PH bildete teils ringartige Strukturen um die DNA-markierte Bakterien, was die frühen Ereignisse der Infektion anzeigte (Abb. 4.31 A). Interessanterweise konnten sowohl CPn0678^{GFP} als auch SNX9^{mCherry} kolokolisierend mit BTK-PH an früh internalisierenden Chlamydien beobachtet werden (Abb. 4.31 A, Pfeile). Beide Proteine konnten aber auch ohne BTK-PH an internalisierten Chlamydien detektiert werden (Abb. 4.31 A, Pfeilspitzen).

Die Kolokolisation mit PI(3,4,5)P₃ weist auf eine direkte Verbindung von transfiziertem CPn0678^{GFP} und SNX9^{mCherry} zur Internalisierung während der Infektion hin. Die vesikelartige Kolokolisation von CPn0678^{GFP} mit internalisierten Chlamydien ohne BTK-PH-Signal zeigt weiterhin, dass CPn0678^{GFP} seine Funktion über die frühesten Ereignisse der Endozytose ausdehnen kann. Diese Ergebnisse passen zu den Daten der Immunfluoreszenz-Färbungen die vermutlich geschlossenen endozytotische Vesikel untersuchten (vgl. Abb. 4.14 A + B). Die Asynchronität der chlamydialen Infektion ermöglicht in diesen Färbungen, vermutlich die gleichzeitige Betrachtung verschiedener sehr früher Infektionsstadien.

Anschließend wurde die Lokalisation von kotransfiziertem CPn0678^{GFP} und SNX9^{mCherry} in der frühen Infektion betrachtet, um das gemeinsame Zusammenspiel beider Proteine in der frühen Infektion weiter zu charakterisieren.

Es konnte zu frühen Zeitpunkten die vesikelartigen Kolokolisation von CPn0678^{GFP} zusammen mit SNX9^{mCherry} um internalisierten Chlamydien beobachtet werden (Abb. 4.31 B, oben). Außerdem umgaben CPn0678^{GFP} und SNX9^{mCherry} zusammen ausgehend von CPn0678-induzierten Membrantubuli internalisierte chlamydiale Partikel (Abb. 4.31 B, unten). Die

Assoziation der CPn0678-induzierten Membrantubuli mit frühen internalisierten Chlamydien deutet auf eine Verbindung dieser Strukturen zu endozytotischen Prozessen hin.

Die Ergebnisse legen nahe, dass der beobachtete dominant-negative Effekt von CPn0678^{GFP} auf die chlamydiale Infektion wahrscheinlich auf der Beeinflussung der Internalisierung und Endozytose beruht. Eine direkte funktionelle Verbindung von CPn0678 auf die generelle Endozytose der humanen Wirtszelle schien deswegen unvermeidlich und wurde im Folgenden geprüft.

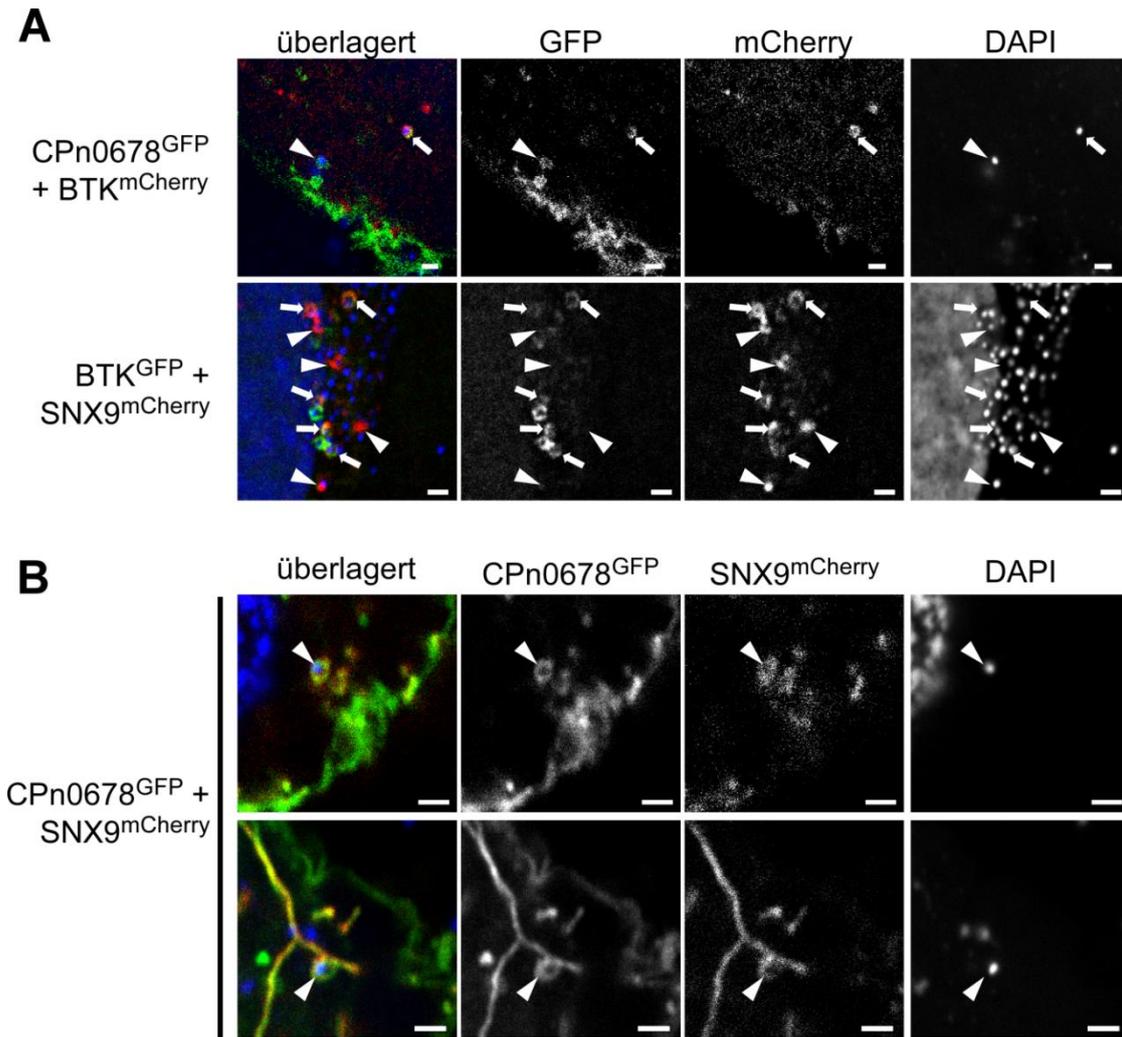


Abb. 4.31: Lokalisation von transfiziertem CPn0678 und SNX9 während der frühen Infektion

Transfektion zur Bestimmung der einzelnen **(A)** und gemeinsamen Lokalisation **(B)** von transfiziertem CPn0678 und SNX9 in den frühen Phasen der chlamydialen Infektion. Transfizierte HEp-2 Zellen wurden nach 15 h Expression mit *C. pneumoniae* infiziert (MOI=50) und 20 min pi fixiert (Fix.: PFA; Post-Fix.: Methanol). **(A)** Zur Transfektion wurden CPn0678^{GFP} (grün, oben) oder SNX9^{mCherry} (rot, unten) jeweils zusammen mit dem komplementär fluoreszent fusioniertem frühen Endozytose-Marker BTK-PH (rot, oben bzw. grün, unten) verwendet. Pfeilspitzen markieren Assoziation von DNA-markierten Chlamydien mit SNX9^{mCherry} oder CPn0678^{GFP} allein. Pfeile markieren Assoziation von DNA-markierten Chlamydien mit SNX9^{mCherry} und BTK-PH oder CPn0678^{GFP} und BTK-PH. **(B)** Zur Kotransfektion wurden CPn0678^{GFP} (grün) und SNX9^{mCherry} (rot) verwendet. Pfeilspitzen markieren Kolo-kalisation von DNA-markierten Chlamydien mit vesikulären Strukturen (oben) oder CPn0678-induzierten Membrantubuli (unten). DNA-Färbung erfolgte über DAPI (blau) (2 µg/ml). Größenstandard 1 µm. kLSM.

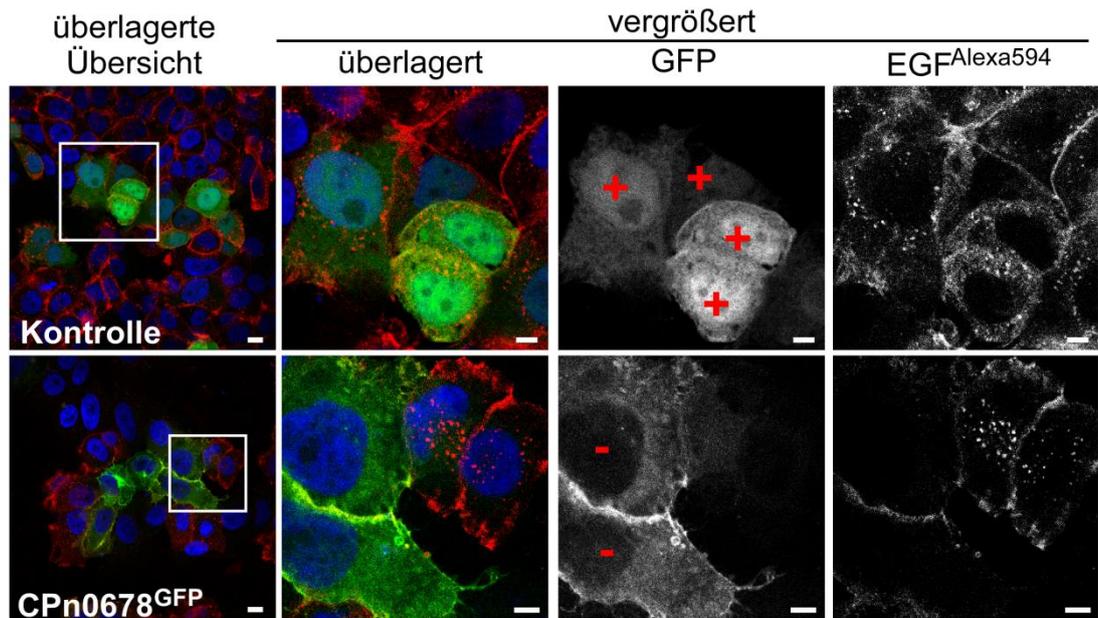
4.2.3.7 Transfiziertes CPn0678^{GFP} hat einen negativen Einfluss auf die Endozytoseprozesse der Humanzelle

Abschließend wurde bestimmt, ob transfiziertes CPn0678^{GFP} einen direkten und messbaren Einfluss auf die humane Endozytose nimmt, um so eine konkrete funktionelle Einordnung dieses frühen chlamydialen Effektorproteins vornehmen zu können. Hierzu wurde in CPn0678^{GFP}-transfizierten Zellen die rezeptorvermittelte Endozytose mittels markiertem EGF (**E**pidermal **g**rowth **f**actor) induziert. Bereits zuvor konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des EGFR einen kritischen und essentiellen Schritt in der Infektion von *C. pneumoniae* darstellt, weshalb eine Aktivierung dieses Endozytoseweges der natürlichen Infektion besonders nahe kommen sollte (Molleken et al. 2013).

Die GFP-Leervektorkontrolle ließ die zytosolische und kernakkumulierte Lokalisation von GFP erkennen (Abb. 4.32 A, oben). EGF^{Alexa594} war in der Leervektorkontrolle teilweise an den Zellgrenzen lokalisiert und zeigte in transfizierten und untransfizierten Zellen deutlich EGF^{Alexa594}-Akkumulationen im Zytoplasma. Für diese Kontrolle wurde die Gesamtzahl der transfizierten Zellen mit sichtbaren EGF^{Alexa594}-Vesikel quantifiziert, da diese Zellen mit aktiver Endozytose repräsentieren. Es konnte bestimmt werden, dass durchschnittlich 76 % der transfizierten Zellen endozytisiertes EGF^{Alexa594} aufwiesen (Abb. 4.32 B).

Anschließend wurde CPn0678^{GFP} transfiziert und die Endozytose induziert. In untransfizierten Zellen konnten weiterhin EGF^{Alexa594}-Akkumulationen beobachtet werden (Abb. 4.32 A, oben). CPn0678^{GFP} transfizierte Zellen wiesen im Vergleich zur Leervektorkontrolle nur selten EGF^{Alexa594}-Akkumulationen im Zytoplasma auf. EGF^{Alexa594} verblieb häufig deutlich an der Oberfläche transfizierter Zellen und akkumulierte an Membranabschnitten, an denen ebenfalls CPn0678^{GFP} lokalisierte. Der Wert der Zellen mit EGF^{Alexa594}-Akkumulationen im Zytoplasma lag für CPn0678^{GFP}-transfizierte Zellen bei etwa 31 % (Abb. 4.32 B). Dies entspricht einer signifikanten Reduktion von 60 % im Vergleich zur Leervektorkontrolle. CPn0678-N^{GFP}- und CPn0678-C^{GFP}-transfizierten Zellen zeigten das gleiche Lokalisationsmuster wie zuvor (Abb. 4.15). Der Anteil transfizierter endozytischer Zellen lag für CPn0678-N^{GFP} bei 75 % (1,3 % Reduktion zur Kontrolle) und für CPn0678-C^{GFP} bei 78 % (2,6 % Steigerung zur Kontrolle) (Abb. 4.32 B). Beide Varianten ließen keine Tendenz zur Reduktion der Endozytoserate erkennen und waren nicht signifikant unterschiedlich zur Leervektorkontrolle (Abb. 4.32 B).

A



B

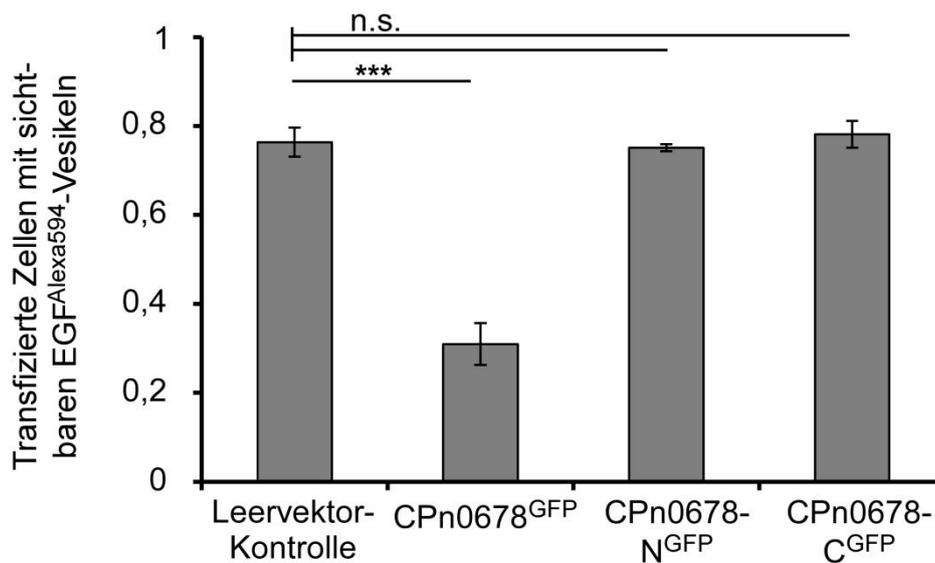


Abb. 4.32: Einfluss von transfiziertem CPn0678^{GFP} auf die Endozytose von Humanzellen

(A) Beispielbilder der Transfektion mit nachfolgender Bestimmung der Endozytoserate in transfizierten Zellen mit GFP allein als Leervektor-Kontrolle (grün, oben) oder CPn0678^{GFP} (grün, unten). HEp-2 Zellen wurden nach 15 h Expression mit Alexa⁵⁹⁴-markiertem EGF (rot) (20 ng/ml) für 1 h bei 37 °C inkubiert und fixiert (Fix.: PFA + 0,2 % Triton X-100; Post-Fix.: -/-). Färbung erfolgte über DAPI (blau). Weißer Kasten in der Übersicht markiert jeweils vergrößerten Bereich. Rote Kreuze geben an ob die jeweilige Zelle sichtbare zytosolische EGF-Vesikel aufwies oder nicht. DAPI 2 µg/ml. Größenstandard 5 µm. kLSM. **(B)** Quantifizierung der EGF-Endozytoserate in transfizierten Zellen. Probenpräparation analog zu (A). Der Quotient aus Zellen mit sichtbaren zytosolischen EGF-Vesikeln zu der Gesamtzahl transfizierter Zellen wurde pro Gesichtsfeld bestimmt. Für jede Variante wurden Triplikate mit je 10 Gesichtsfeldern ausgezählt (Ø gezählte Zellen pro Replikat: GFP = 127, CPn0678^{GFP} = 121, CPn0678-^NGFP = 112, CPn0678-^CGFP = 132). Resultierende Mittelwerte der Triplikate mit Standardabweichung sind im Balkendiagramm dargestellt. Signifikanzlevel wurden über zweiseitige T-Tests bestimmt. *** p < 0,001. n.s., nicht signifikant.

Somit konnte für transfiziertes CPn0678^{GFP} ein deutlicher negativer Einfluss auf die humane Endozytose festgestellt werden. Dies ließ die Vermutung zu, dass CPn0678 auch in der natürlichen Infektion an diesem Prozess beteiligt ist. Die Beeinflussung dieses Humanzellprozess zum Vorteil von *C. pneumoniae* stellt somit aller Wahrscheinlichkeit nach die übergeordnete Funktion dieses früh sekretierten Effektorproteins dar. Der Einfluss auf die Endozytose ist in der transfizierten Situation negativ, da durch die große Menge an transfiziertem CPn0678 vermutlich eine Fehlregulation verglichen mit der natürlichen Situation eintritt.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse zu CPn0678, dass es ein spät exprimiertes Protein ist, das nicht auf der Oberfläche der chlamydialen Partikel präsentiert wird. CPn0678 wird dann in frühen Phasen der Infektion in die Wirtszelle sekretiert. Dort ist CPn0678 vermutlich in der Lage spezifisch die humane PM über eine N-terminale APH zu assoziieren. Außerdem besitzt es die Fähigkeit Tetramere oder höhere Oligomere zu bilden. Ferner zeigt CPn0678 sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* eine spezifische Interaktion mit humanen SNX9. Die PRR1 von CPn0678 nimmt bei dieser Interaktion eine zentrale Rolle ein. CPn0678 kann in der Transfektion direkten Einfluss auf die humane Endozytose nehmen. Die Beeinflussung der Endozytose kann daher auch für endogenes CPn0678 als Funktion während der frühen Infektion postuliert werden. Daher konnte CPn0678 erstmalig erfolgreich als neues chlamydiales Effektorprotein charakterisiert werden.

5 Diskussion

Während aller Phasen der Infektion werden Effektorproteine von *C. pneumoniae* sekretiert, um die humane Wirtszelle zu manipulieren. Auch zu frühen Phasen der Infektion müssen diese Effektoren freigesetzt werden, die neben der Adhäsion auch die Internalisierung des infektiösen EBs in die Wirtszelle gewährleisten können. Die Erforschung dieser Effektorproteine stellt ein wichtiges Ziel beim Verständnis der Pathogenität von *C. pneumoniae* dar. Allerdings sind vor allem für die frühen Phasen der Infektion nur wenige Effektoren bekannt. Um diese Proteinklasse während der chlamydialen Infektion besser zu verstehen, wurden CPn0712, CPn0677 und vor allem CPn0678 untersucht, denn für diese drei chlamydialen Proteine gab es Hinweise auf mögliche Funktionen als Effektorproteine.

5.1 CPn0712 – Sekretionsapparat und / oder Effektor?

CPn0712 (CdsD) besitzt in seinem C-Terminus deutliche Homologie zu dem Protein YscD und es konnten bereits Funktionen für CPn0712 gezeigt werden, welche deutlich für die Funktion als basale Strukturkomponente des T3SS sprechen, (vgl. Kap. 1.3.1) (Johnson et al. 2008, Stone et al. 2008). Daher wird CPn0712 sicherlich die Funktion eines Strukturproteins des chlamydialen T3SS besitzen. CPn0712 weist, verglichen mit ähnlichen Proteinen anderer Gram-negativer Bakterien, fast die doppelte Größe auf und besitzt einen Chlamydien-spezifischen N-Terminus. Daher können für CPn0712 weitere Chlamydien-spezifische Funktionen postuliert werden. Verschiedene Experimente, wie die beobachtete Kollokalisierung mit der Inklusionsmembran oder die mögliche Lokalisation von CPn0712 außerhalb der Inklusion, legten eine potentielle Effektorfunktion nahe (Hänsch 2011, Herrmann et al. 2006, Muller et al. 2008). Außerdem konnte ein wachstumsdefekter Phänotyp bei der ektopischen Expression in *S. cerevisiae* Zellen beobachtet werden, der als Anzeichen für eine potentielle Effektorfunktion gilt (Hänsch 2011, Sisko et al. 2006). Deshalb wurde neben der Funktion als T3SS-Strukturkomponente eine potentielle Funktion als Effektorprotein vermutet, welche im Chlamydien-spezifischen N-Terminus von CPn0712 begründet sein könnte.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnte die ausschließlich intrachlamydale Lokalisation von CPn0712 während der Infektion auch für N-terminale Regionen des Proteins nachgewiesen werden (Abb. 4.4 B & Abb. 4.5 C). Gleichzeitig konnten Inklusionsmembran-assoziierte Signale beobachtet werden, die sehr wahrscheinlich auf die enge Assoziation von CPn0712 mit dem Markerprotein IncA zurückzuführen sind (Abb. 4.6). Weiterhin konnte als Ursprung des zuvor beobachteten induzierten wachstumsdefekten Phänotyps in *S. cerevisiae* die C-terminalen TMD ausgemacht werden, welche die vermutlich wachstums-beeinflussende

Lokalisation von CPn0712 in der Hefezelle bewirkt (Abb. 4.7 & Abb. 4.8 C). Daher konnte eine mögliche Effektorfunktion von CPn0712 im Rahmen dieser Arbeit deutlich widerlegt werden.

5.1.1 CPn0712 lokalisiert intrachlamydial

Die exakte Lokalisation von CPn0712 galt jeher als umstritten, weswegen die Untersuchung diesbezüglich einen der kritischsten Punkte der Untersuchungen darstellte (vgl. Kap. 1.3.1) (Hänsch 2011, Herrmann et al. 2006, Johnson et al. 2008, Muller et al. 2008). Für die Lokalisationsstudien wurde ein spezifischer antigengereinigter Antikörper gegen eine N-terminale Region des Proteins verwendet (Abb. 4.1 C) (Hänsch 2011). Alle Lokalisationsergebnisse können daher sowohl auf das Vollängen-Protein wie auch auf die N-terminalen Fragmente bezogen werden.

Analysen zu *cpn0712* bestimmen den Transkriptionsstart auf 8 hpi (Muller et al. 2008). In dieser Arbeit konnte nun das erstmalige Auftreten des CPn0712-Proteins auf etwa 18 hpi bestimmt werden (Abb. 4.2 A). Die dabei beobachteten Zwei- / Dreifachbanden des CPn0712 Vollängen-Proteins können vermutlich auf Modifikationen oder Degradation des Proteins zurückgeführt werden. Geringe Größenunterschiede des Vollängen-Proteins in SDS-Gelen und die multiplen Phosphorylierungen von CPn0712 sind bereits in anderen Studien beobachtet worden (Johnson & Mahony 2007, Johnson et al. 2008).

Der detektierte Zeitpunkt der Expression deckt sich weitestgehend mit dem beobachteten Nachweis von CPn0712 in den Immunfluoreszenz-Färbungen, bei denen das Protein ab 24 hpi erkennbar ist (Abb. 4.2 B). Eine in der Literatur erwähnte deutliche Sekretion von CPn0712 konnte allerdings zu keinem Zeitpunkt während der Infektion beobachtet werden (Muller et al. 2008). In Immunfluoreszenz-Färbungen kolokalisierten CPn0712-Signale teilweise mit der Inklusionsmembran, wobei einige Signale Zugang zum Wirtszellzytosol vermuten ließen (Abb. 4.3). Im Gegensatz dazu belegen Zugänglichkeits-Experimente deutlich die intrachlamydiale Lokalisation (Abb. 4.4 B & Abb. 4.5 C). Somit sind weder CPn0712 noch seine Teilfragmente extrachlamydial zugänglich und eine Effektorfunktion des Proteins im Wirtszellzytosol oder im Inklusionslumen ist ausgeschlossen.

Die Auflösung der kLSM könnte CPn0712-Signale als wirtszellzytosolisch zugänglich erscheinen lassen. Die gSTED-Mikroskopie zeigt, dass vermeintlich Inklusionsmembran-assoziiertes CPn0712 mit zunehmender Auflösung als im Inklusionslumen lokalisiert detektiert werden konnte (Abb. 4.6 A). IncA- und CPn0712-Signale assoziieren in der Immunfluoreszenz-Färbung mit nur berechneten 50 nm Abstand sehr eng miteinander, und IncA war in der Inklusionsmembran ungleichmäßig verteilt (Abb. 4.6 A + B). Dies erschwert

vermutlich zusätzlich die genaue Lokalisationsbestimmung von CPn0712 mittels Mikroskopie. Ein detaillierter Erklärungsansatz erfolgt in einem späteren Kapitel (Kap. 5.1.3). Somit können die Inklusionsmembran-assoziierten CPn0712-Signale in der Mikroskopie auch bei ausschließlich intrachlamydialer Lokalisation von CPn0712 erklärt werden. Im Rahmen der aktuell verfügbaren Techniken kann also eine Sekretion von CPn0712 ausgeschlossen werden, wodurch eine in der Literatur diskutierte Effektorprotein-Funktion von CPn0712 widerlegt wurde.

5.1.2 Die TMD von CPn0712 erzeugt den wachstumsdefekten Phänotyp

Parallel zu den Lokalisationsstudien wurde der Ursprung des wachstumsdefekten Phänotyps über Expression von Deletionsvarianten von CPn0712 in *S. cerevisiae* aufgeklärt. Dabei stellte sich heraus, dass der Phänotyp von der C-terminalen TMD hervorgerufen wird, der im YscD-homologen Bereich liegt (Abb. 4.7). Die durch TMDs verursachte Membranassoziation und -modulation ist eine wichtige Eigenschaft von Proteinen (McMahon & Gallop 2005). Außerdem können TMDs, die in erster Linie der Membranverankerung dienen, enzymatische oder membrankrümmende Funktion aufweisen (Takagi et al. 2010) (vgl. Kap. 1.2.1). Zwar konnte eine Effektorfunktion von CPn0712 ausgeschlossen werden, dennoch wäre eine katalytische Funktion ein interessanter Fakt im Verständnis des chlamydialen T3SS. Aufgrund der Homologie zu YscD im Bereich der TMD liegt die Vermutung nahe, dass die TMD von CPn0712 ähnliche Aufgaben übernimmt, wie in Proteinen der YscD-Klasse. Die betreffende TMD in YscD wurde bereits Analysen unterzogen, die nach weiteren möglichen Funktionen neben der Membranverankerung suchten (Ross & Plano 2011). Da die Funktion von YscD beim Austausch der TMD durch eine andere TMD mit ähnlicher Größe und Aufbau aber ohne weiterer Funktion, vollkommen unbeeinflusst ist, bedeutet dies, dass die TMD in YscD ausschließlich die Verankerung in der Membran dient (Ross & Plano 2011). Die Funktion ist aufgrund der Homologie höchstwahrscheinlich auf die TMD von CPn0712 übertragbar.

Der beobachtete wachstumsdefekte Phänotyp bedeutet, dass eine Stresssituation durch die Expression von CPn0712 entsteht. Bereits zuvor konnte in Hefe die Assoziation von ektopisch exprimiertem CPn0712 zu LDs in punktierten Mustern beobachtet werden (Hänsch 2011). LDs werden im ER von eukaryotischen Zellen gebildet und danach abgeschnürt (Pol et al. 2014). Dies wird durch teilweise Kollokalisierung der verwendeten ER- und LD-Marker in dieser Arbeit belegt (Abb. 4.8 B). Es bedeutet indirekt, dass CPn0712 ebenfalls im ER lokalisieren könnte, wobei eine Membranverankerung durch die C-terminale TMD naheliegt. Das ER kann bei der hohen Expression von bakteriellen Proteinen mit TMDs in seiner

Funktion beeinträchtigt sein, da Proteine dort fehlgefaltet und akkumulieren können. Zellen können auf diese Art von Stress durch die vermehrte Bildung von LDs aus dem ER reagieren, was ebenfalls die Assoziation von CPn0712 mit LDs erklären könnte (Fei et al. 2009, Lee et al. 2012). Dies könnte in weiteren Experimenten beispielsweise durch vergleichende Quantifizierung der LDs in CPn0712-transfizierten Zellen gegenüber einer Leervektorkontrolle überprüft werden. Darüber hinaus können sog. Einschlusskörperchen (IB, **i**nclusion **b**ody) durch die Akkumulationen von hochexprimiertem oder fehlgefaltetem Protein entstehen. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Erg6p^{mRFP} als LD-Marker in Stresssituationen von Hefezellen mit IBs kolokalisiert, da die Lipide aus LDs benötigt werden um IBs abzubauen (Moldavski et al. 2015). Das Lokalisationsmuster der IBs und Erg6p^{mRFP} ähnelt dabei auffallend deutlich der in dieser Arbeit beobachteten Lokalisation von CPn0712 in Hefe (Abb. 4.8 A).

Zusammenfassend könnte die Assoziation von ektopisch exprimiertem CPn0712 mit LDs über zwei Hypothesen erklärt werden. Zum einen könnte CPn0712 im ER exprimiert akkumulieren und durch ER-Stress die Synthese von LDs anregen und deshalb mit LDs kolokalisieren. Zum anderen könnten große Mengen an fehlgefaltetem CPn0712 zur Bildung von CPn0712-haltigen IBs führen, die wiederum mit LDs kolokalisieren, da die eukaryotische Zelle versucht, die IBs aktiv über LD-Lipide aufzulösen. Auch wären beide Prozesse gleichzeitig möglich. Die TMD von CPn0712 könnte sowohl für die Verankerung im ER als auch für eine Fehlfaltung verantwortlich sein. In beiden Fällen würde eine Stresssituation durch die TMD auf die CPn0712-exprimierenden Hefezellen ausgelöst, die sich in reduziertem Wachstum äußern kann, ohne dass eine Beeinflussung durch eine spezifische Effektorfunktion vorliegt.

5.1.3 CPn0712-Signale erscheinen kolokalisiert mit der Inklusionsmembran

Obwohl die hier vorliegenden Daten gegen eine extrachlamydale Lokalisierung von CPn0712 sprechen, konnten in der Immunfluoreszenz kolokalisierende Bereiche der Inklusionsmembran und CPn0712 beobachtet werden, die teilweise in Richtung des Wirtszellzytosols verschoben erschienen (Abb. 4.3). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten allerdings an, dass diese Lokalisation durch eine Kombination von biologischen und technisch-physikalischen Gegebenheiten erzeugt wird.

Die technisch begrenzte Auflösung der konventionellen Konfokalmikroskopie bewirkt vermutlich lateral überlappend erscheinende Signale von CPn0712 und IncA, die in Wirklichkeit getrennt sind. So konnte durch gSTED-Mikroskopie Signale lateral getrennt

werden, die in der Konfokalmikroskopie als vollständig kolokalisierend erschienen (Abb. 4.6 A).

Allerdings hat vermutlich nicht nur die laterale, sondern auch die axiale Auflösung Einfluss auf die CPn0712-Kolokalisation mit der Inklusionsmembran. Technisch bedingt ist die axiale Auflösung schlechter als die laterale. Die Auflösung der kLSM weist selbst unter perfekten Bedingungen eine axiale Streuung von der Größenordnung etwa eines ganzen chlamydialen EBs, bzw. einem Drittel RB auf und könnte so zu einstreudenden Signalen führen. Starke CPn0712-Streusignale von Chlamydien über und unter der Fokusebene könnten deshalb in die Fokusebene projiziert werden. Hinzu kommt, dass die Inklusionsmembran in axialer Richtung nur selten parallel zur Z-Achse verläuft und IncA in den Immunfluoreszenz-Färbungen ungleichmäßig in der Inklusionsmembran verteilt ist (Abb. 5.1 A & Abb. 4.6). Dadurch könnten CPn0712-Signale kolokalisierend mit der Inklusionsmembran erscheinen, die aber vermutlich von Chlamydien oberhalb oder unterhalb der Fokusebene erzeugt werden. Eine schematisch dargestellte Mikroskopie-Simulation veranschaulicht diesen technischen Aspekt der axialen Auflösung (Abb. 5.1 B). Hier ist zu erkennen, dass bei geringer axialer Auflösung (Abb. 5.1 B, hohe Streuung) CPn0712-Signale außerhalb der Fokusebene in das aufgenommene Bild einstreuen können und außerhalb der Inklusion erscheinen (Abb. 5.1 B, grüne Pfeilspitze). Mit zunehmender axialer Auflösung (Abb. 5.1 B, niedrige Streuung) wird dieser Effekt reduziert und wirtszellzytosolische Signale verschwinden. Dieser Effekt war auch bei Aufnahmen der gSTED-Aufnahmen zu beobachten, bei denen einige Inklusionsmembran-assoziierte CPn0712-Signale der kLSM fast gänzlich verschwanden, obwohl sie in der kLSM kolokalisierend mit der Inklusionsmembran erschienen (Abb. 4.6 A, Pfeilspitzen).

Neben den technischen Gegebenheiten begünstigen biologische Faktoren dieses Phänomen. Bei der CPn0712-Lokalisation war die starke polare Verteilung vor allem in der Inklusionsmembrannähe auffallend (Abb. 4.2 B). Vermutlich werden diese starken CPn0712-Signale durch die bekannte polare Verteilung der T3SS auf einer Seite der chlamydialen Partikel erzeugt (Nans et al. 2014). CPn0712 als Strukturkomponente des T3SS würde auf der T3SS-beladenen Seite des Bakteriums der Inklusionsmembran zugewandt, damit eine Sekretion stattfinden kann. Auf ähnliche Weise erscheint beispielsweise die intrachlamydiale C-Ring-assoziierte ATPase des T3SS CdsQ in *C. trachomatis* ebenfalls bei frühen bis mittleren Infektionen an Chlamydien ähnlich gebündelt (Spaeth et al. 2009).

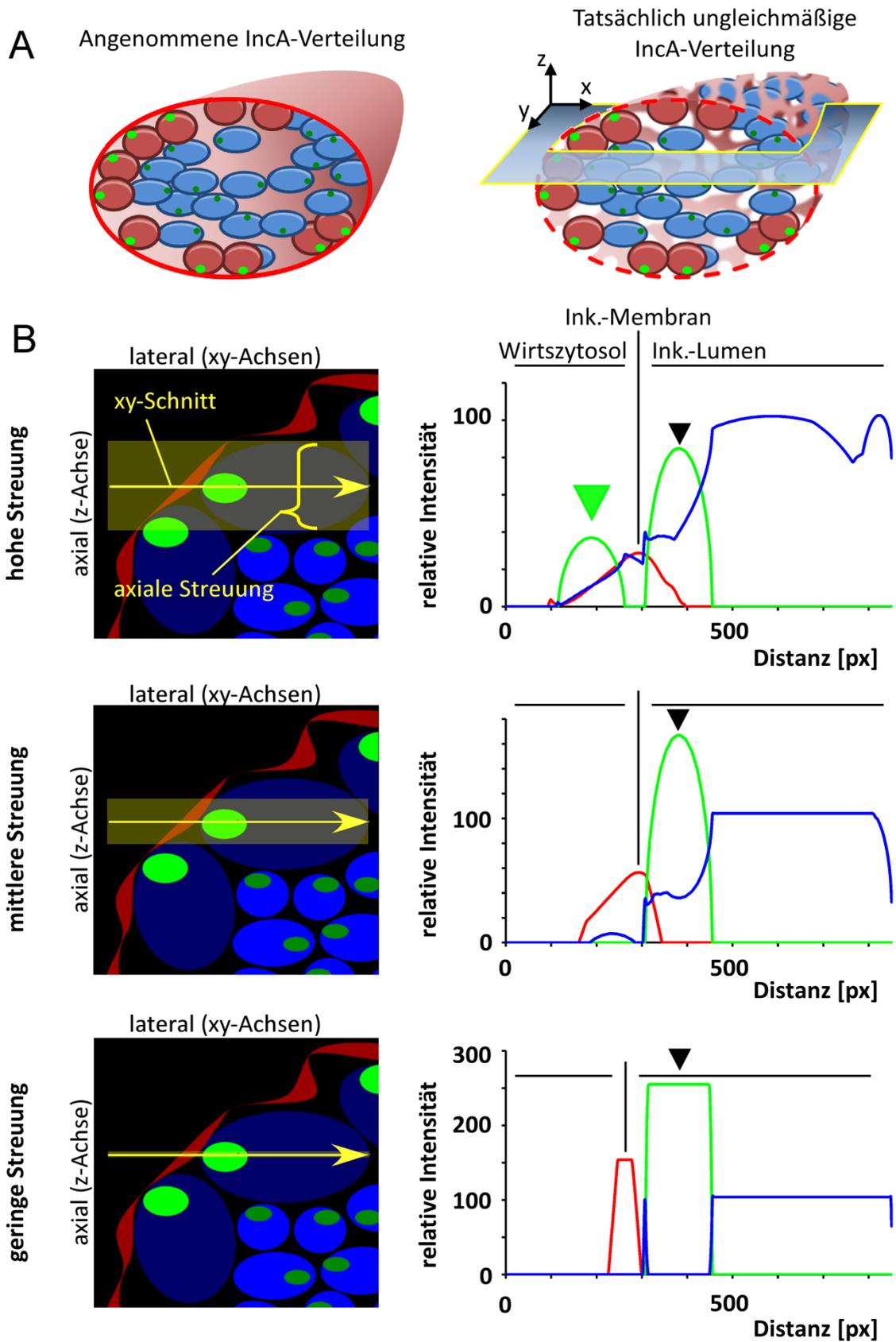


Abb. 5.1: Simulation der CPn0712-IncA Assoziation in der Mikroskopie

(A) Dargestellt ist die vereinfachte Verteilung von IncA in der Inklusionsmembran (links) und die tatsächliche Verteilung des IncA-Proteins in Immunfluoreszenz-Färbungen (vgl. Abb. 4.2 B & Abb. 4.6) (rechts). Ebenfalls

ingezeichnet ist ein xy-Anschnitt der Inklusion, in der die Inklusionsmembran nicht parallel zur Z-Achse verläuft. CPn0712 ist in grün, Chlamydien in blau und die Inklusion mit IncA rot dargestellt. **(B)** Simulation einer Mikroskopie eines Inklusionsausschnitts in der xy-Ebene mit Einbeziehung der axialen Streuung. Signalintensität entlang des Pfeils wurde in xy-Richtung gemessen und eine hohe (oben), mittlere (mitte) oder geringe (unten) Streuung in z-Richtung simuliert (links). DNA ist in blau, die Inklusionsmembran in rot und CPn0712 in grün angedeutet. Gemessene relative Intensitäten gegen die Distanz in Diagrammen aufgetragen (rechts). Schwarze Pfeile markieren CPn0712-Signale, die von der Inklusionsmembran aus zum Inklusionslumen verschoben sind. Grüner Pfeil zeigt ein CPn0712-Signal, das zum Wirtszellzytosol hin verschoben erscheint, obwohl es sich innerhalb der Inklusion befindet. CPn0712 ist in grün, IncA in rot und DNA in blau dargestellt. px, Pixel; Ink, Inklusion.

Die superhoch-auflösenden Aufnahmen der Inklusionsaufsicht dokumentieren, dass die biologische Assoziation von CPn0712 und dem Inklusionsmembranprotein IncA sehr eng ist (Abb. 4.6 B). Da IncA ein sekretiertes Protein ist, muss es zwangsläufig während des Sekretionsprozesses durch das T3SS in besonders nahem Kontakt zu CPn0712 stehen. Die berechnete Distanz der Signale von IncA und CPn0712 in den superhoch-auflösenden Bildern beträgt etwa 50 nm (Abb. 4.6 A). Elektronenmikroskopische Daten des T3SS aus *C. trachomatis* zeigen, dass die Distanz zwischen innerer chlamydialer Membran und der Inklusionsmembran etwa 60 nm beträgt (Dumoux et al. 2015, Nans et al. 2014). Die gemessene Distanz zwischen IncA und CPn0712 entspricht also den Daten anderer Arbeitsgruppen und spiegelt die enge Assoziation von CPn0712 und IncA wider, welche die Lokalisationsbestimmungen von CPn0712 zur Inklusionsmembran zusätzlich erschweren.

Zusammengefasst wurde die vermeintliche Kollokalisierung von CPn0712 und IncA vermutlich durch eine Kombination aus technischen und biologischen Faktoren hervorgerufen. Diese konnten unter Verwendung neuester Techniken beobachtet werden, weshalb die mikroskopischen Beobachtungen zu CPn0712 nicht im Gegensatz zur ausschließlich intrachlamydialen Lokalisation der Zugänglichkeitsanalysen stehen.

5.1.4 CPn0712 bietet weitere Perspektiven, aber nicht als Effektor

Der einzigartige Chlamydien-spezifische N-terminale Teil von CPn0712 eröffnet die Möglichkeit für neue Funktionen des Proteins. Die Ergebnisse, dass auch der N-terminale Teil ausschließlich intrachlamydial agieren muss, schränken die Möglichkeiten jedoch ein. Erst vor wenigen Monaten wurde herausgefunden, dass das zu CPn0712 homologe Protein CT664 aus *C. trachomatis* eine Kontraktion des inneren Membranringes bei der Sekretion bewirkt (Nans et al. 2015). Möglicherweise nimmt der N-terminale Teil von CPn0712 dabei auch eine entscheidende Rolle ein.

Die einzige identifizierbare Domäne im N-terminalen Teil von CPn0712 ist die zusätzliche FHA-Domäne. FHA-Domänen sind bekannt für phosphorylierungsabhängige Protein-Protein-Interaktionen (vgl. Kap. 1.3.1). Ein Alignment von 100 phylogenetisch weit entfernten

repräsentativen FHA-Domänen kann im elektronischen Anhang eingesehen werden, von dem eine verkürzte Ausführung in Abb. 6.4 dargestellt ist. Insgesamt konnten 20 konservierte Aminosäuren identifiziert werden (identisch in > 50 % der Sequenzen). Davon sind 5 hochkonserviert (identisch in > 75 % der Sequenzen) mit einer besonders auffälligen Histidin-Aminosäure (identisch in > 90 % der Sequenzen). Die hochkonservierten Aminosäuren sind in anderen FHA-Domänen häufig essentiell an ihrer Funktion beteiligt (Cigliano et al. 2011, Durocher et al. 2000). Lediglich das hochkonservierte Glycin (AS 28 bzw. AS 425 & 409) ist in beiden FHA-Domänen von CPn0712 und CT664 zu finden (Abb. 5.2, grüne Pfeilspitzen). Auffällig ist außerdem, dass das zentrale Histidin nur in den C-terminalen FHA-Domänen aus CPn0712 und CT664 konserviert ist (Abb. 5.2, schwarze Pfeilspitzen). Dieses Histidin beeinflusst die Sekundärstruktur der FHA-Domäne (Cigliano et al. 2011). Eine Mutation dieser Aminosäure in der N-terminalen FHA-Domänen von CPn0712 und CT664 könnte entweder zu einem vollständigen Funktionsverlust oder zu einer Spezifitätsänderung führen. Ein fehlendes Histidin muss aber nicht zwangsläufig die Funktionslosigkeit der FHA-Domäne bedeuten. Von zumindest einer FHA-Domäne ohne Histidin ist eine bindende Funktion beschrieben worden (Benavides et al. 2013). Diese Histidin-Aminosäure ist auch in YscD konserviert, nicht aber im homologen Protein aus beispielsweise *Shigella* (Gamez et al. 2012). Unterschiede sind also auch in anderen Gram-negativen Bakterien bekannt. Mutationen im YscD-Protein in direkter Nähe zur Histidin-Position führten interessanterweise zu einer veränderten Bindung anderer T3SS-Strukturkomponenten und Chaperonen wie YscQ, YscH und SycH (Gamez et al. 2012). So könnte auch die N-terminale FHA-Domäne von CPn0712 veränderte Bindungseigenschaften zeigen.

Von dem chlamydialen T3SS Chaperon Slc1 konnte bereits gezeigt werden, dass es mit CT664 interagiert, ohne dass die Interaktionsregion genauer spezifiziert werden konnte (Chen et al. 2014). Zentrales Element von Slc1 ist wie auch bei SycH aus *Yersinia* eine CesT-Domäne (chaperone for E. coli secretion of Tir), welche an Effektorproteine bindet und die eigentliche Chaperonfunktion vermittelt. Interessanterweise befindet sich mit *cpn0713* ein solches potentiell CesT-Chaperon-kodierendes Gen auch im gleichen Operon mit *cpn0712*, was ein Hinweis auf eine Beteiligung im Prozess der Sekretion sein kann (de Daruvar et al. 2002, Rogozin et al. 2002). Außerdem wurde gezeigt, dass das CPn0713 Homolog CT663 (je nach Studie Slc2 oder Scc4 genannt) an der Bindung und Sekretion des Effektorproteins CopN beteiligt ist und so auch CPn0713 funktionelle Verbindung zum T3SS besitzen könnte (Shen et al. 2015, Silva-Herzog et al. 2011). Möglicherweise werden, ähnlich zu YscD, auch bei den N-terminalen FHA-Domänen von CPn0712 und CT664 durch Mutation konservierter Aminosäuren die Bindungseigenschaften auf bestimmte Chaperonen erweitert (Gamez et al.

2012). Dem zytosolischen Bereich könnte somit eine wichtigere Rolle als Bindungsplattform direkt vor der eigentlichen Sekretion am T3SS zukommen. Ob die N-terminale Region von CPn0712 allerdings in der Lage ist, mit Chaperonen zu interagieren und CPn0713 möglicherweise an diesem Prozess beteiligt wäre, sollte Gegenstand folgender Arbeiten sein.

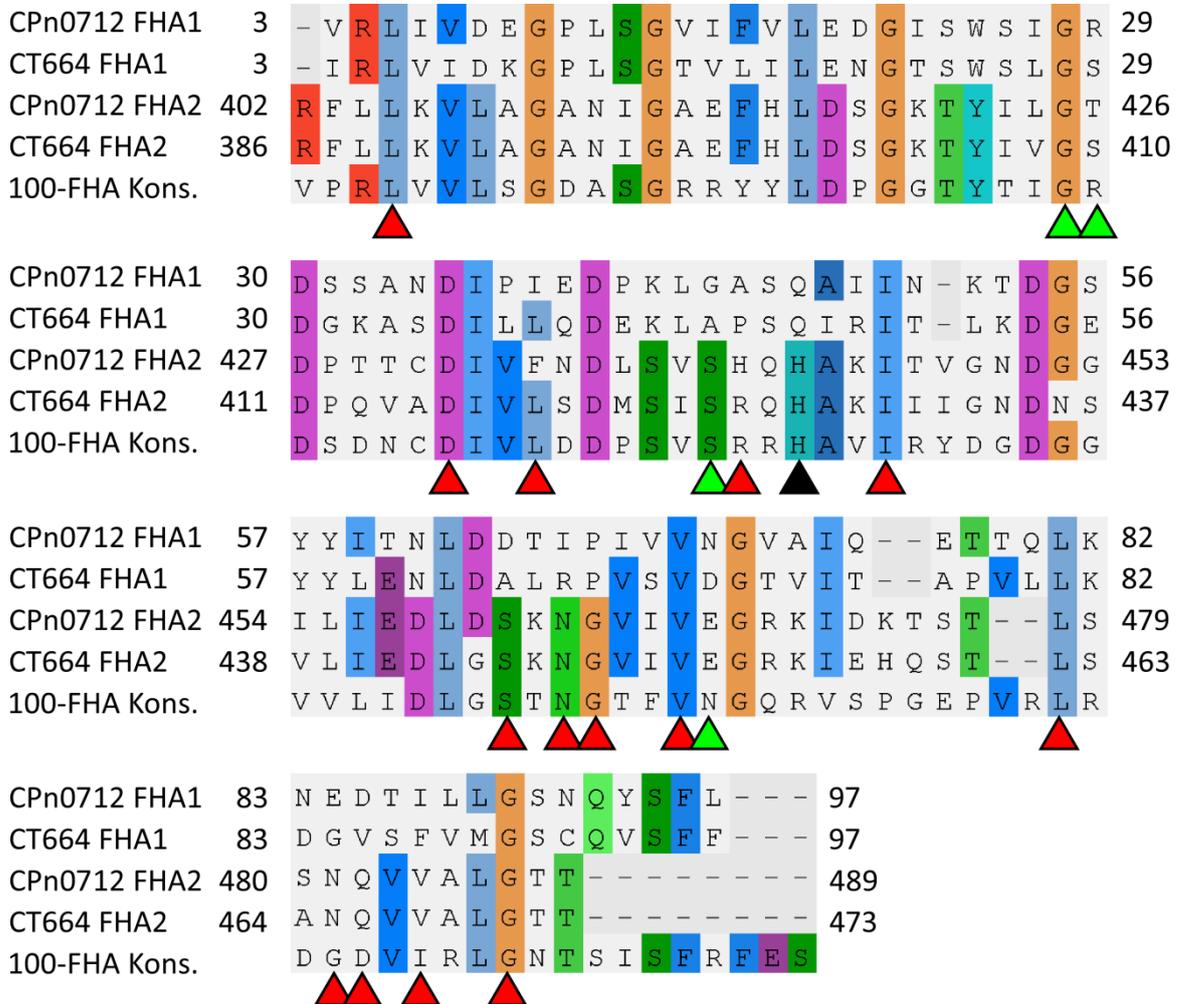


Abb. 5.2: Vergleich der FHA-Domänen von CPn0712 und CT664

Alignment der beiden FHA-Domänen aus CPn0712 und CT664 mit der Konsensussequenz aus 100 phylogenetisch divergenten FHA-Domänen. Das Alignment, der 100 FHA-Domänen aus dem die Konsensussequenz entstanden ist, kann im Anhang eingesehen werden (Abb. 6.4). Pfeilspitzen markieren Aminosäuren, die in mehr als 50 % (rot), 75 % (grün) oder 90 % (schwarz) der 100-FHA Domänen identisch waren. Aminosäurepositionen sind durch Nummern gekennzeichnet. Alignment wurde mittels „ClustalOmega“ durchgeführt und mit „AliView“ visualisiert. FHA, forkhead associated domain; Kons, Konsensussequenz.

Zusammenfassend konnte eine in der Literatur diskutierte mögliche Effektorfunktion des Proteins CPn0712 weitestgehend ausgeschlossen werden. CPn0712 agiert somit vermutlich hauptständig intrachlamydial als Strukturkomponente des chlamydialen T3SS. Sollte der Chlamydien-spezifischen N-terminalen Bereich dennoch eine zusätzliche Funktion besitzen, so wird diese höchstwahrscheinlich intrachlamydial beschränkt sein.

5.2 CPn0678 als frühes Effektorprotein

CPn0677 und CPn0678 wurden zuvor als chlamydiale Adhäsionsproteine beschrieben, die während der Infektion mit humanem SNX9 interagieren sollten. Gene chlamydialer Spezies im Genom an ähnlicher Position kodieren für Proteine, deren Funktion als Effektorprotein bewiesen wurde und die nachweislich sekretiert werden. Die fehlende Homologie zwischen diesen Genen war allerdings kein Beweis für direkte Parallelen zwischen den kodierten Proteinen. Das Protein EspF aus *EPEC*, welches mit den PRR aus CPn0677 und CPn0678 limitierte Homologie zeigt, erfüllt seine Funktion ebenfalls im Wirtszellzytosol nach seiner Sekretion.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CPn0677 und CPn0678 in späten chlamydialen EBs detektierbar sind, aber nicht auf der Oberfläche von Chlamydien exponiert werden (Abb. 4.12). Allerdings konnte die Sekretion von CPn0678 zu frühen Zeitpunkten der Infektion nachgewiesen werden, was zur Interaktion mit dem intrazellulär lokalisiertem SNX9 passt (Abb. 4.13, Abb. 4.28 B & Abb. 4.29). In Schlüsselexperimenten konnte diese Interaktion sowohl *in vitro* nach Transfektion, wie auch *in vivo* in der Infektion gezeigt werden. Für diese Interaktion stellte sich die erste der drei PRR von CPn0678 als essentiell heraus (Abb. 4.24 B). CPn0678 besitzt darüber hinaus die Fähigkeit zur Tetramerbildung (Abb. 4.19) In Transfektions-Experimenten zeigte CPn0678 zur Membranbindung (Abb. 4.15 B), welche durch eine N-terminal lokalisierte APH vermittelt wird und dessen flankierende Aminosäuren vermutlich die Membranbindungsspezifität verursachen (Abb. 4.17 B). Als sekretiertes Effektorprotein nimmt CPn0678 wahrscheinlich Einfluss auf die humane Endozytose. Dies konnte über vergleichende Infektions- und Endozytoseassays in transfizierten Zellen herausgearbeitet werden (Abb. 4.30 & Abb. 4.32). Letztendlich erscheinen weitere Interaktionen von CPn0678 mit humanen Proteinen wie IRSp53 oder Cortactin als vielversprechend, sind aber noch nicht hinreichend erforscht (Abb. 4.27).

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen einige bereits vorliegende Daten, stellen diese allerdings in einem völlig neuartigen Kontext dar, da es sich bei CPn0678 nicht um ein Adhäsionsprotein, sondern um ein sekretiertes Effektorprotein handelt (Murra 2009). Darüber hinaus konnten erstmalig neue funktionale Aspekte dieses chlamydialen Effektorproteins beschrieben werden, welche essentiell zum Verständnis der komplexen Vorgänge der frühen chlamydialen Infektion beitragen können.

5.2.1 Aktualisierung der bioinformatischen Einschätzung von CPn0677 und CPn0678

CPn0677 und CPn0678 zeigen zueinander im Bereich ihrer PRR eine starke Identität von etwa 88 % (Abb. 6.5). Die N-Termini beider Proteine weisen etwa 34 % Identität zueinander auf (Abb. 6.5). In CPn0677 befinden sich vor und nach den PRR-Sequenzen Bereiche, die keine homologen Regionen in CPn0678 haben (Abb. 6.5). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass Bereiche, die homolog zwischen CPn0677 und CPn0678 sind, eine ähnliche Funktion in beiden Proteinen einnehmen könnten, CPn0677 aber eigene weitere Funktionen besitzen wird.

Für CPn0677 können zwei Bereiche identifiziert werden, die Homologie zu RTX- und ATG16-Domänen aufweisen (Abb. 5.3 A). ATG16-Domänen sind an Prozessen des autophagischen Zelltods von Eukaryoten beteiligt. RTX-Domänen sind in Toxinen von Gram-negativen Bakterien zu finden, die diese über das Typ-I-Sekretionssystem translozieren. Allerdings sind die Homologien nicht außerordentlich ausgeprägt, sodass verknüpfte Funktionen relativ unwahrscheinlich sein dürften (Abb. 5.3 A).

Bislang wurde davon ausgegangen, dass CPn0677 und CPn0678 keine Homologie zu entsprechenden Proteinen der anderen chlamydialen Spezies besitzen (Hower et al. 2009, Murra 2009). Dies ist allerdings bei genauerer Betrachtung nur eingeschränkt der Fall. Auffällig ist, dass die Proteine zu ihren Orthologen CT664 aus *C. trachomatis* und Cpsi0741 aus *C. psittaci* global keine Homologie aufweisen, aber einige starke regionale Homologien zu erkennen sind (Abb. 5.3 A+B). CPn0677 weist zwei Regionen höherer Homologie auf (43 % Identität / 63 % Homologie bzw. 43 % Identität / 71 % Homologie) (Abb. 5.3 A). CPn0678 besitzt vier homologe Regionen (mindestens 43 % Identität / mindestens 53 % Homologie) (Abb. 5.3 B) Weiterhin besteht für CPn0678 im C-Terminus Homologie zu dem Protein Cpsi2621 aus *C. psittaci*, welches allerdings nicht im Zusammenhang mit dem Operon um Cpsi0741 steht. Interessanterweise zeigt CPn0678 dabei höhere Homologie zu Cpsi0741 und CT694 als es für CPn0677 der Fall ist (Abb. 5.3 B). Bereits an diesen Homologien ist zu erkennen, dass sich die Proteine in anderen Spezies zwar weitestgehend unterscheiden, dennoch sind regionale Ähnlichkeiten erkennbar, die möglicherweise auf ähnliche Funktionen bestimmter Proteinabschnitte schließen lassen könnten. Kleinere homologe Abschnitte müssten allerdings sehr regional begrenzte Funktionen aufweisen. Die Wahrscheinlichkeit einer gemeinsamen Funktion steigt dabei mit zunehmender Größe der homologen Abschnitte. Die Homologien befinden sich in den Proteinen CT694 und Cpsi0741 ebenfalls an ähnlicher Position relativ zum Gesamtprotein.

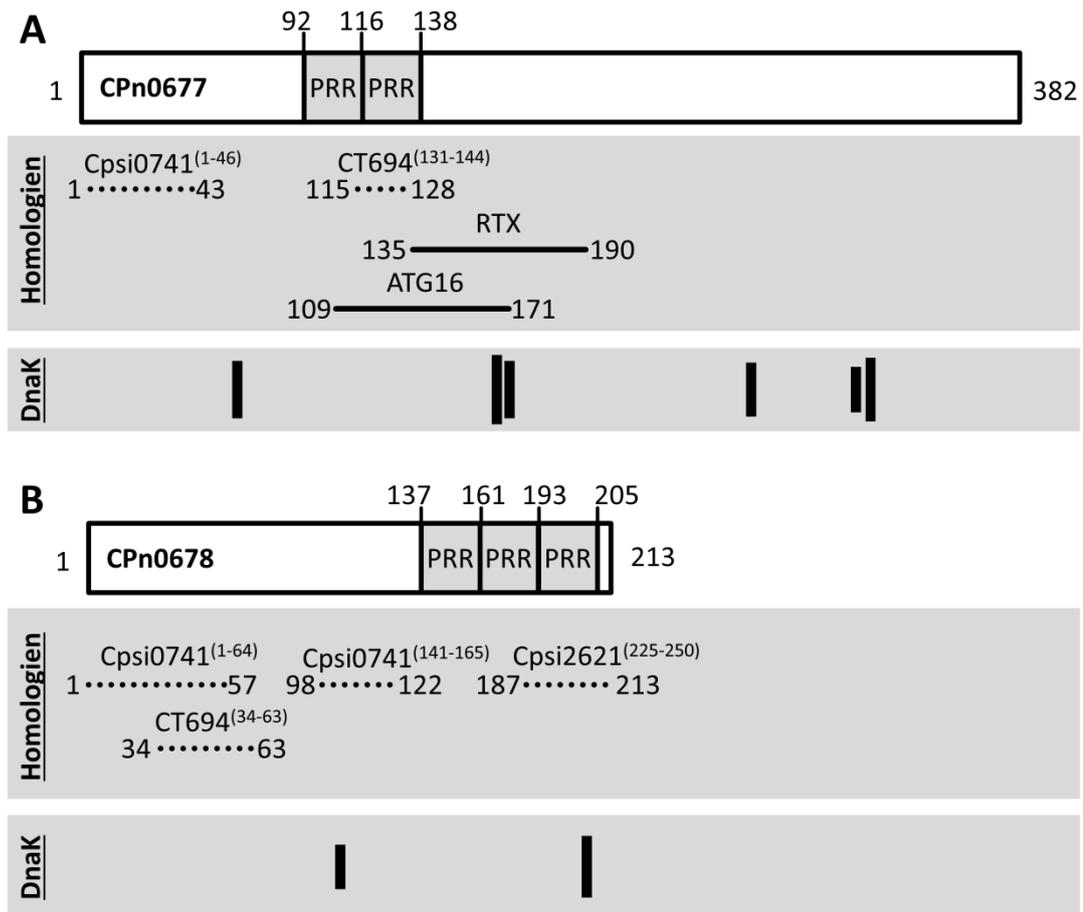


Abb. 5.3: Neue bioinformatische Einschätzung von CPn0677 und CPn0678

(A+B) Schematische Darstellungen der Domänen von CPn0677 **(A)** und CPn0678 **(B)**. Unterhalb sind jeweils homologe Regionen zu Proteinen (gestrichelte Linien) und Domänen-Klassen (durchgezogene Linie) eingezeichnet. Aminosäurepositionen sind mit Nummern angegeben. Proteinhomologie wurde über „NCBI-BLASTp“ bestimmt mit folgenden genauen Einzelwerten (% Identität/ % Homologie/ % Lücken): CPn0677(1-43)-Cpsi0741(1-46) (43/63/6), CPn0677(115-128)-CT694(131-144) (43/71/0), CPn0678(1-57)-Cpsi0741(1-64) (47/70/10), CPn0678(98-122)-Cpsi0741(141-165) (68/80/0), CPn0678(187-213)-Cpsi2621(225-250) (59/70/3), CPn0678(34-63)-CT694(34-63) (43/53/0). Es wurden ausschließlich Bereiche mit einem Mindestschwellenwert von 25 % Identität eingezeichnet. Domänen-Homologie wurde über „Pfam“-Datenbank ausgewertet. E-Werte: RTX 0,0027; ATG16 0,058. RTX, repeat in toxin; ATG, autophagy protein 16; PRR, prolinreiche Region. DnaK-Bindestellen wurden mittels „Limbo“ vorhergesagt, wobei Standard-Parameter 1 % falsch-positive Treffer erlaubten. Höhe der Balken repräsentiert den relativen Wahrscheinlichkeits-Wert (Score). Exakte Positionen und Score-Werte:

CPn0677 (Score min. 12 - max. 18): 63-69, 167-173, 170-176, 271-277, 314-320, 316-322.

CPn0678 (Score min. 11,7 - max. 16,2): 103-109, 204-210.

Zum Vergleich: DnaK-gebundenes OmpC (Score min. 11,3 - max. 13,7): 5 Bindestellen.

Aufgrund der höheren regionalen Homologie zu anderen chlamydialen Spezies ist CPn0678 vermutlich eher in den gemeinsamen genomischen Kontext einzuordnen als CPn0677 (Abb. 5.4). Dies stellt eine neue Einordnung der Gene bzw. Proteine CPn0677 und CPn0678 in den genomischen Kontext von *C. pneumoniae* dar. Auch wenn sich diese Homologien nur über einen begrenzten Bereich erstrecken, sollten diese an besonderen Stellen dennoch nicht vernachlässigt werden, da es sich beispielsweise für CPn0678 durchaus um wichtige Bereiche

erbrachte zwei Regionen bei AS 103-109 und AS 204-210 für CPn0678 und insgesamt 6 Bindestellen für CPn0677 (Abb. 5.3). Die Wahrscheinlichkeiten dieser Vorhersagen waren dabei ähnlich hoch oder höher verglichen zu Vorhersagen für OmpC aus *E. coli*, welches nachweislich von DnaK gebunden wird (Calloni et al. 2012). Eine Bindung von CPn0677 und Cpn0678 durch DnaK ist also durchaus möglich.

Da es sich bei CPn0677 und CPn0678 um sekretierte Effektorproteine handelt, sollten sie allerdings von einem spezifischen T3SS-Chaperon gebunden werden. Die DnaK-Bindestellen könnten dazu dienen die Proteine bei der Faltung während der Synthese zu unterstützen oder um bei Hitzestress fälschlich ungebundenes oder fehlgefaltetes CPn0678 und CPn0677 zu erkennen. Die Unterstützung der Faltung zur Funktionsausübung ist allerdings relativ unwahrscheinlich, da auch nach der Sekretion im entfalteten Zustand eine korrekte Neufaltung ohne Chaperon eintreten muss. Falls die Proteine tatsächlich eine Interaktion mit DnaK eingehen sollten, müsste ein potentieller Einfluss von humanem Hsp70 (**h**eat **s**hock **p**rotein at **70** kDa) geklärt werden. Hsp70 und DnaK besitzen etwa 50 % Identität miteinander. Von anderen sekretierten Effektorproteinen wie HopI1 aus *Pseudomonas* ist beispielsweise bekannt, dass es aktiv humanes Hsp70 rekrutiert, um seine virulente Funktion auszuüben (Jelenska et al. 2010, Jelenska et al. 2007). Die genaue Funktionsweise bleibt allerdings unklar. Bekannt ist weiterhin, dass Hsp70 unter anderem gebundenes Clathrin vom endozytotischen Vesikel entfernt (Barouch et al. 1994, Sousa & Lafer 2015). Dies könnte in den Frühphasen der Infektion von *C. pneumoniae* eine Funktion darstellen, da diese vermutlich ebenfalls Clathrin-unabhängig verlaufen (Korhonen et al. 2012). Ob Cpn0678 und CPn0677 generell mit Hsp70 eine Interaktion eingehen, und ob dies eine Funktion nach dem Sekretionsvorgang im humanen Zytosol haben könnte, ist jedoch Spekulation und müsste in weiteren Analysen geklärt werden.

5.2.2 CPn0677 und CPn0678 sind keine Adhäsionsproteine

CPn0677 und CPn0678 wurden zuvor als Adhäsionsproteine beschrieben, die mit SNX9 interagieren und so die Adhäsion vermitteln sollten (Murra 2009). Die optimierte Technik der differenziellen Permeabilisierung für die subzelluläre Lokalisationsanalyse hatte sich bereits bei den Untersuchungen zu CPn0712 bewährt (Abb. 4.5 C). Hiermit konnte die zuvor postulierte späte Sekretion beider Proteine durch das T3SS auf die Oberfläche von *C. pneumoniae* weitestgehend ausgeschlossen werden, da keines der Proteine zu späten Zeitpunkten auf der Oberfläche nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.12) (Murra 2009). Zwar existieren T3SS-translozierte oberflächlich lokalisierte Faktoren wie YopE aus *Yersinia*, doch diese agieren dennoch hauptträngig als in das Wirtszellzytosol sekretierte Effektorproteine (Krall et al. 2004).

Außerdem würde dies eine aktive Sekretion beider Proteine auf die Außenseite der chlamydialen Partikel im EB-Stadium ohne Wirtszellkontakt anfordern. Das T3SS von Chlamydien ist ohne Wirtszellkontakt inaktiv und über Disulfid-Brücken der Nadelproteine extrem stark vernetzt (Ferrell & Fields 2015). So wird es vermutlich erst nach Wirtszellkontakt aktiviert und ist nur so lang aktiv, wie auch Membrankontakt besteht (Betts-Hampikian & Fields 2010, Clifton et al. 2004). Eine kontaktfreie Sekretion in einer natürlichen Infektion wäre also zum heutigen Stand der Forschung unwahrscheinlich. Ferner spricht die in dieser Arbeit bewiesene intrazelluläre Lokalisation von SNX9 gegen die Theorie einer adhäsiven Interaktion im extrazellulären Raum (Abb. 4.29).

CPn0677 und CPn0678 zeigen adhäsive Eigenschaften an die Außenmembran von Humanzellen (Murra 2009). Interessanterweise konnte zumindest für CPn0678 gezeigt werden, dass diese Adhäsionsfähigkeit auf den kleinen Bereich der N-terminalen APH zurückzuführen ist (Stallmann 2010). Dies lässt den Schluss zu, dass CPn0678 vermutlich durch seine APH von außen an die Humanzellen binden kann. Zwar ist eine Spezifität für PtdSer oder PIPs aufgrund der Ergebnisse naheliegend, diese muss aber nicht zwingend notwendig für eine Membraninsertion von CPn0678 sein (Abb. 4.18). Für anderen membranbindende Proteine mit APHs ist bereits bewiesen, dass sie hohe Affinität zu verschiedenen PIPs besitzen und dennoch binden sie mit reduzierter, aber bemerkbarer, Effizienz an Membranlipide wie Phosphatidylcholin (PC) (Yarar et al. 2008). PC ist ein Phospholipid, welches in außerordentlich hohen Mengen in der äußeren Schicht der PM vorkommt und könnte somit auch eine unspezifische, aber erkennbare Bindung von membranassoziiierenden Proteinen wie CPn0678 an Humanzellen hervorrufen und erklären (Bretsche.Ms 1972).

Zusammengenommen erscheinen früher Ergebnisse zur Adhäsion bezüglich CPn0677 und CPn0678 mit diesen Erklärungen plausibel. Dennoch steht fest, dass CPn0677 und CPn0678 aufgrund der jetzt vorliegenden Daten nicht als Adhäsionsproteine fungieren, sondern dass zumindest CPn0678 (und somit vermutlich auch CPn0677) als sekretiertes Effektorprotein agieren.

5.2.3 CPn0678 wird während der Frühphasen der Infektion sekretiert

Bereits die limitierten Homologien und funktionellen Parallelen zu dem sekretierten Protein EspF aus *EPEC* legten erste Vermutungen nahe, dass möglicherweise eine Funktion als sekretiertes Protein bestehen könnte. Der N-terminale Bereich von CPn0677 und CPn0678 wurde in heterologen Sekretionsassays in *Shigella* sekretiert (Murra 2009). Die dadurch postulierte funktionale T3SS-Signalsequenz ließ eine mögliche Effektorfunktion stark

vermuten. In dieser Arbeit konnten CPn0677 und CPn0678 mikroskopisch als spät im Infektionszyklus exprimiert und intrachlamydial lokalisiert nachgewiesen werden. Beide Proteine zeigten sich dabei nur mit kleinen kondensierten DNA-Signalen innerhalb der Inklusion assoziiert (Abb. 4.10 A & Abb. 4.11). Berücksichtigt man bekannte Daten zur Kondensation des chlamydialen Genoms durch die Histon-ähnlichen Proteine Hc1 und Hc2, so repräsentieren diese DNA-Signale mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit redifferenzierte EBs (Barry et al. 1992, Brickman et al. 1993, Grieshaber et al. 2006). Somit wäre erstmalig eine Technik beschrieben, die eine Unterscheidung von EBs und RBs durch spezielle Fixierung mit anschließender DNA-Färbung ermöglicht. Das Lokisationsmuster von CPn0677 und CPn0678 ähnelt stark dem anderer Effektorproteine wie TARP (Mueller & Fields 2015). Die herrschende Asynchronität der chlamydialen Infektion bewirkt vermutlich, dass immer nur einige der chlamydialen Partikel in der späten Inklusion mit Signalen für frühe Effektorproteine detektiert werden können.

Nachfolgende differentielle Permeabilisierungsstudien belegen die intrachlamydiale Lokalisation dieser Signale. Daher bietet sich als einzig möglicher Zeitpunkt zur Sekretion die frühe Infektion an, da spätestens ab 24 hpi beide Proteine mikroskopisch nicht mehr detektierbar sind (Abb. 4.10). Zu frühen Zeitpunkten der Infektion (20 min pi) zeigen die Kofärbungen mit dem α -EGFR Antikörper Muster an endozytotischen Vesikeln, die auf eine wirtszellzytosolisch zugewandte Lokalisation von CPn0678 schließen lassen (Abb. 4.14 A). Die extrachlamydiale Lokalisation von CPn0678 konnte mit zwei Methoden gezeigt werden. CPn0678 konnte 20 min pi unter Bedingungen gefärbt werden, die Chlamydien nicht permeabilisieren (Abb. 4.13). Eine extrachlamydiale Lokalisation von zumindest CPn0678 ist somit höchst wahrscheinlich. Unterstützt wird diese Beobachtung durch die Detektionsfähigkeit von CPn0678 in der frühen Infektion gerade internalisierter EBs ohne Zugabe von Detergenzien (Abb. 4.14 B, oben). In diesem Experiment sind chlamydiale Antigene auf der Oberfläche und im Bakterienzytosol relativ schwer zugänglich, da der endozytotische Vesikel vermutlich bereits geschlossen ist. CPn0678 kann in diesem Zustand problemlos gefärbt werden, was die Annahme einer Lokalisation von CPn0678 auf der wirtszellzytosolischen Seite des endozytotischen Vesikels und somit die Sekretion unterstützt. Außerdem deuten diese Ergebnisse an, dass CPn0678 nicht nur im Moment des ersten Kontaktes als sekretiertes Protein agieren könnte, sondern auch wenn das Bakterium bereits vollständig aufgenommen wurde. Auch die spezifische Interaktion und Rekrutierung des wirtszellzytosolischen Proteins SNX9 in der Ko-IP macht eine vorausgegangene Sekretion von CPn0678 unumgänglich (Abb. 4.28 B & Abb. 4.29).

Die ringförmige Lokalisation von CPn0677 und CPn0678 auf EBs war in früheren Studien Anlass zur Annahme, dass es sich bei diesen beiden Proteinen um Adhäsionsproteine auf der Bakterienoberfläche handelt (Murra 2009). In der Tat zeigt die superhoch-auflösende Mikroskopie der mittleren bis späten CPn0677- und CPn0678-Signale bakteriell assoziierte ringförmig punktierte Strukturen innerhalb der Inklusion, welche sich aufgrund der differentiellen Permeabilisierungsstudien innerhalb der Chlamydien befinden müssen. Da es sich vermutlich auch bei CPn0677 um ein sekretiertes Protein handelt, müssen beide Proteine zu diesem Zeitpunkt von Chaperonen innerhalb der Chlamydien gebunden sein. Über die Lokalisation von Effektorproteinen bei inaktiver Sekretion ist wenig bekannt. Dagegen sind in anderen Gram-negativen Bakterien wie *EHEC* und *EPEC* Regulatorproteine bekannt, welche die Hierarchie und Sekretionsreihenfolge von Effektor-Chaperon-Komplexen beeinflussen und somit unmittelbar vor der Sekretion eingreifen. Beispielsweise lokalisieren zwei dieser Proteine – SepD und SepL – hauptsächlich an der inneren Membran der *EPEC* und *EHEC* Zellen und im Zytoplasma, nicht aber im Periplasma (Deng et al. 2005). Eine Bindung des CPn0677- oder CPn0678-Chaperon-Komplexes vor der Sekretion an der inneren Membran der Chlamydien ist somit ebenfalls möglich und könnte die ringförmige intrazelluläre Lokalisation von CPn0678 zu späten Zeitpunkten der Infektion erklären. Die Signale des früh sekretierten CPn0678 ließen zuweilen ebenfalls ringartige Strukturen erkennen, aber auch punktförmige Akkumulationen. Die Form und Verteilung dieser Signale wird zu diesem Zeitpunkt höchstwahrscheinlich durch die Fähigkeit des Proteins zur spezifischen Assoziation mit der humanen PM oder dem endozytotischen Vesikel über die N-terminale APH hervorgerufen.

5.2.4 Die amphipathische Helix von CPn0678 – Kein Einzelphänomen der Membranbindung

5.2.4.1 Die APH von CPn0678 in Effektorproteinen anderer Pathogene

CPn0678 bindet spezifisch an die Innenseite der humanen PM. Seine Membranassoziation ging dabei nur vom N-terminalen Teil aus (Abb. 4.15 B). Deletionsvarianten führten letztendlich zur Identifikation einer N-terminalen APH, dessen 50 %ige Deletion zu einem vollständigen Verlust der Membranbindung führte. Als weiterer Beweis, dass die APH essentiell und ausreichend für die Membranbindung ist, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die APH allein Membranbindung an das Endomembransystem der Humanzelle vermittelt (Abb. 4.17 B).

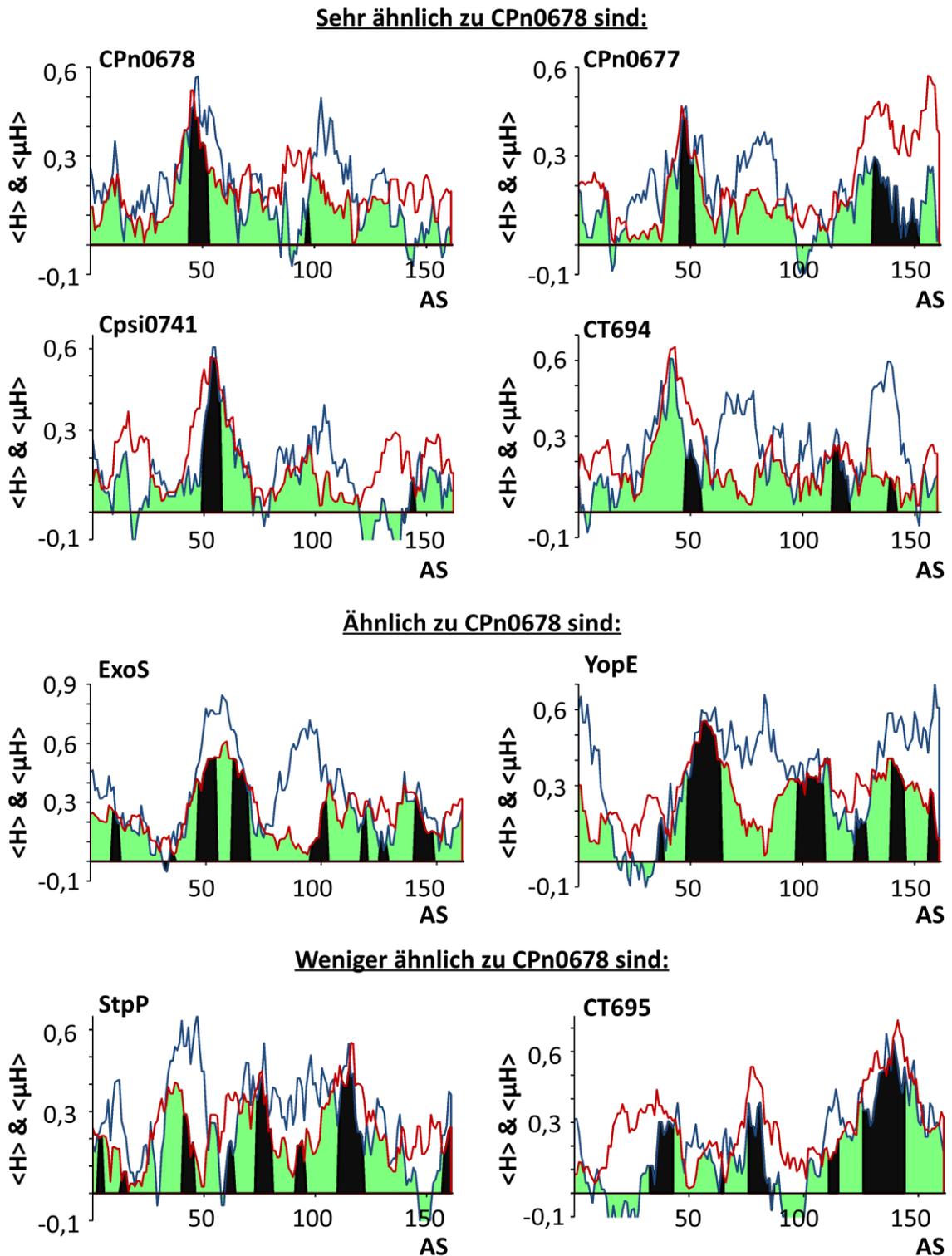


Abb. 5.5: Verteilung der Hydrophobizität und des Moments verschiedener Effektoren im Vergleich
 Simulationen der Gesamthydrophobizität ($\langle H \rangle$) und des hydrophoben Moments ($\langle \mu H \rangle$). Jeweils 18 Aminosäuren wurden für eine Simulation herangezogen und dies für alle Positionen der ersten 180 Aminosäuren eines jeden Proteins mittels „*heliQuest*“ simuliert. Alle Daten wurden entlang der Position der Helices (x-Achse) mit den relativen $\langle H \rangle$ - und $\langle \mu H \rangle$ -Werten (y-Achse) ($\langle H \rangle$ blaue und $\langle \mu H \rangle$ rote Linie) eingetragen. Zur besseren Veranschaulichung von Bereichen, in denen beide Werte erhöht sind, wurde die Fläche unter dem jeweils niedrigeren Wert grün eingefärbt. Schwarze Bereiche stellen durch „*NetsurfP*“ vorhergesagte α -Helices dar. Die Helix-Simulationen umfassen immer 18-Aminosäuren während sich die α -Helix Vorhersage auf absolute Positionen bezieht, weshalb die dargestellten Größen der Helices den Helix-Simulationen angepasst wurden.

Einhergehend mit der Bindung von CPn0678 oder seinem separaten N-Terminus an Membranen konnte Tubulation beobachtet werden, wenn auch mit reduzierter Effizienz für den N-Terminus (Abb. 4.21 B). Für die Deletionsvariante ohne APH konnte neben dem Verlust der Membranbindung auch keine Tubulation mehr beobachtet werden.

Für das orthologe sekretierte Effektorprotein CT694 aus *C. trachomatis* wurde bereits zuvor Membranbindung beobachtet. Auch in diesem Protein vermittelt ein kleiner Bereich (AS 40-80) die Assoziation des Proteins zur humanen Zellmembran (Bullock et al. 2012). Die Autoren vermuteten ebenfalls eine Helix und betonten, dass es auch in Effektoren anderer Gram-negativer Bakterien wie YopE, ExoS und SptP (**S**ecreted effector **p**rotein **P**, *Salmonella*) entsprechende Domänen gibt. Dieser Ansatz wurde allerdings aufgrund fehlender Leucin-Aminosäuren in CT694 von den Autoren nicht weiter verfolgt (Bullock et al. 2012, Dean 2011). Diese Daten und die Identifizierung der APH in CPn0678 erlaubten nun eine gezielte bioinformatische Analyse der entsprechenden Regionen. Dabei wurden $\langle H \rangle$ (Gesamthydrophobizität) und $\langle \mu H \rangle$ (hydrophobisches Moment) analysiert, da Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass sie im typischen Bereich für Membran-assoziiierende APHs liegen. Neben den genannten Proteinen anderer Pathogene wurden CPn0677 und das sekretierte Protein CT695 aus *C. trachomatis* mit in die Analyse eingeschlossen. CT695 befindet sich im gleichen Operon wie CT694 und ist ebenfalls an membranbindenden Prozessen beteiligt, auch wenn diese an der späten Inklusionsmembran stattfinden (Mueller & Fields 2015). Die Analyse identifizierte insbesondere die Proteine CPn0677, CPn0678, Cpsi0741 und CT694, welche alle in ihrem N-Terminus einen Bereich hoher Hydrophobizität mit starkem Moment besitzen (Abb. 5.5, oben). Zusätzlich zeigen sie vorhergesagte α -Helices in diesem Bereich, weshalb sie als besonders ähnlich zu CPn0678 gewertet wurden. CT694 und CPn0677 scheinen davon etwas abzuweichen. Die vorhergesagte α -Helix von CT694 in diesem Bereich wird, wie bei CPn0677, als bedeutend kleiner als 18 Aminosäuren vorhergesagt und wird deshalb gegen Ende des Kapitels genauer betrachtet werden. Diese starke Verkürzung der α -Helix stellt dennoch keine Funktionslosigkeit dar, denn in der Literatur sind andere verkürzte Helices bekannt, die wie beispielsweise in Epsin Membranbindung vermitteln (Drin & Antony 2010).

Die Simulationen verdeutlichen die besondere Ähnlichkeit zwischen den chlamydialen Proteinen, die vermutlich allesamt ihre Membranbindung über APHs vermitteln. Im Gegensatz dazu besitzen ExoS und YopE, als nicht chlamydiale Proteine, zwei oder eine deutlich größere Helix an ähnlicher Position mit sehr ähnlichen Eigenschaften wie CPn0678 (Abb. 5.5, Mitte). Weniger ähnlich zu CPn0678 erscheinen SptP und CT695. Zwar besitzen auch diese Proteine Bereiche mit hoher Hydrophobizität und mit starkem Moment, doch sind

diese zahlreicher, weniger klar zum restlichen Protein abzugrenzen und verstreut (Abb. 5.5, unten). Dies könnte beispielsweise die anderen Bindungseigenschaften von CT695 erklären, denn dieses Protein bindet die wirtszellzytosolische Seite der späten Inklusion und nicht die PM oder endozytotische Vesikel (Mueller & Fields 2015). Somit konnte in sechs der untersuchten acht Effektoren ähnliche Eigenschaften zur APH von CPn0678 identifiziert werden, was die besondere Bedeutung dieses Bereichs unterstreicht.

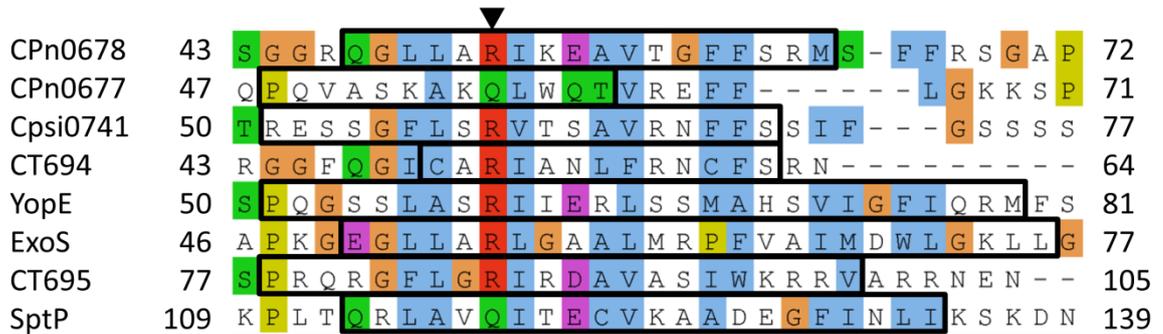


Abb. 5.6: Alignment verschiedener membranbindender Effektorproteine zur APH von CPn0678
 Ausschnitt eines globalen Alignments der dargestellten Effektorproteine. Aminosäurepositionen innerhalb der einzelnen Proteine sind durch Nummern angegeben. Die essentielle AS 56 der Membranbindung von ExoS ist mit schwarzer Pfeilspitze gekennzeichnet (Zhang et al. 2007). Vorhergesagte α -Helices nach „NetsurfP“ (mit > 50 % Wahrscheinlichkeit) sind durch schwarze Boxen markiert. Alignment wurde mittels „ClustalOmega“ durchgeführt und mit „AliView“ visualisiert. Volles Alignment siehe Anhang (Abb. 6.6).

Die geringe regionale Homologie von CPn0677 und CPn0678 mit Cpsi0741 und CT694 wurden bereits zuvor dargestellt (Abb. 5.3). Durch die Identifikation der Parallelen in anderen Effektorproteinen wurde ein globales Alignment mit diesen Proteine durchgeführt (Abb. 5.6). Das gesamte Alignment kann im Anhang eingesehen werden (Abb. 6.6). Interessanterweise bestehen auffallende Ähnlichkeiten zur APH von CPn0678 auch in den anderen Proteinen (Abb. 5.6). Darüber hinaus sind für diese Bereiche in allen Proteinen α -Helices vorhergesagt, wobei auch die verkürzten Helices aus CPn0677 und CT694 wiederzufinden sind (Abb. 5.6, schwarze Boxen). Wie sich bereits durch die vorangegangenen Simulationen vermuten ließ, befinden sich diese Bereiche in den meisten Proteinen an ähnlichen Positionen (\emptyset AS 47 - 74). Interessanterweise können über das Alignment auch die entsprechenden Bereiche in CT695 und SptP identifiziert werden (Abb. 5.6). Dies könnte die Bindung von CT695 an die Inklusionsmembran erklären, die in Studien einer anderen Arbeitsgruppe zwar beobachtet wurde, aber nicht eindeutig erklärt werden konnte (Mueller & Fields 2015). In allen untersuchten Proteinen besitzen also vorhergesagte Helices eine bedeutende Rolle bei der Membranbindung dieser Effektorproteine. Die Membranassoziation ist aber vermutlich nicht ausschließlich auf ein konserviertes Lx₂Rx₄L-Motiv zurückzuführen, wie es in YopE und ExoS postuliert wird (Dean 2011).

Die APH von CPn0678 ist essentiell für die Membranassoziation, dennoch benötigt sie positiv geladene Aminosäuren in direkter Umgebung, um Spezifität zu vermitteln. Dies konnte durch Austausch dreier Arginin-Aminosäuren in oder in direkter Nähe zur APH gezeigt werden (Abb. 4.17 B). Ähnliches ist auch in YopE aus *Yersinia* bekannt. YopE benötigt nur AS 51-66 zur Membranassoziation, aber die weiteren AS 67-72 vermitteln die spezifische Lokalisation zum korrekten Membrantyp (vgl. Abb. 5.6) (Krall et al. 2004). Von ExoS ist dagegen bekannt, dass positiv geladene Arginine an Position 56 und 63 und die negative geladene Asparaginsäure an Position 70 essentiell für die Membranbindung sind. Mutationen dieser Aminosäuren führen zum Verlust der PM-Bindung und des zytotoxischen Effekts von ExoS (Zhang et al. 2007). Besonders interessant ist, dass das Arginin von ExoS an Position 56 in CPn0678 und vier weiteren untersuchten Proteinen erhalten ist (Abb. 5.6, schwarze Pfeilspitze). Dies legt auf eine wichtige Rolle dieser Aminosäure in der APH nahe.

Um einen Vergleich über die Verteilung und Position positiver Aminosäuren in anderen Effektoren zu erhalten, wurden die im Alignment ermittelten Helices anschaulich in einer Helix projiziert (Abb. 5.7). Erneut zeigte sich die besondere Ähnlichkeit zwischen CPn0678, CPn0677, Cpsi0741 und CT694. Die vorhergesagten verkürzten Helices von CPn0677 und CT694 weisen ähnlich zu CPn0678 zwei positiv geladenen Aminosäuren an einer Seite und eine an der gegenüberliegenden Seite auf. CT694 zeigt dabei ein extrem starkes Moment (Abb. 5.7). Die AS-Verteilung in Cpsi0741 ist zwar etwas unterschiedlich zu CPn0678, dennoch stimmt die Nettoladung überein. YopE und ExoS zeigen größere Unterschiede, besitzen aber immer noch eine ähnliche Verteilung positiver Aminosäuren und ein starkes Moment in Richtung hydrophober Aminosäuren. CT695 und SptP weisen die größten Unterschiede zu CPn0678 auf, wobei dennoch in beiden Helices amphipathische Züge ähnlich zu CPn0678 vorhanden sind. Interessanterweise konnte für CT694 gezeigt werden, dass ein funktionaler Austausch der Membranlokalisationsdomäne von CT694 durch die von ExoS möglich ist (Bullock et al. 2012).

Zusammengefasst scheinen in allen untersuchten Effektorproteinen APHs eine äußerst wichtige Rolle für die Membranlokalisation zu spielen, welche die besondere Bedeutung der APH in CPn0678 unterstreicht. Vermutlich vermitteln, ähnlich zu YopE, positive Aminosäuren die Spezifität in der Membranbindung von CPn0677, CPn0678, Cpsi0741 und CT694. Während der natürlichen Infektion von *C. pneumoniae* könnte die N-terminale APH von CPn0678 sicherstellen, dass eine Bindung an die Innenseite der PM erfolgt und so CPn0678 gezielt seine regionale Funktion entfalten kann. Zumindest von YopE und ExoS ist bekannt, dass diese Proteine sowohl in der Transfektion als auch in der Infektion eine ähnliche Lokalisation zeigen (Hauser 2009, Isaksson et al. 2009, Zhang et al. 2007). Dies

wurde auch für CPn0678 gezeigt und unterstützt, dass auch bei CPn0678 die PM das tatsächliche Lokalisationsziel in der natürlichen Infektion darstellt (Abb. 4.15 C). Positiv geladene Aminosäuren könnten spezifische Lokalisation zu PIPs oder PtdSer vermitteln und so die spezifische Bindung der PM oder die Bindung früher endozytotischer Vesikel gewährleisten (vgl. Abb. 4.14 & Abb. 4.31).

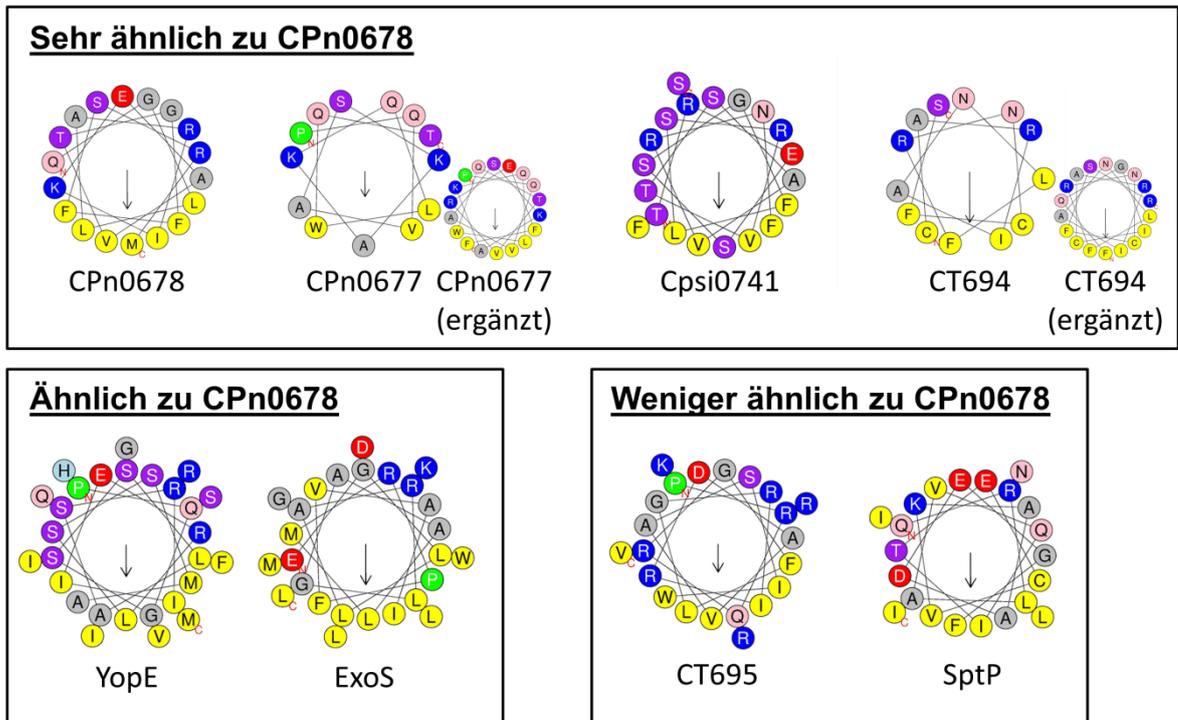


Abb. 5.7: Membranbindende Helices verschiedener Effektorproteine im Vergleich

Helikale Projektion der vorhergesagten α -Helices ähnlich zur APH von CPn0678 (vgl. Abb. 5.6). Zur besseren Veranschaulichung wurden vorhergesagte verkürzte Helices von CPn0677 und CT694 auf 18 Aminosäuren ergänzt (vgl. Abb. 5.6). Die Projektion wurde mit „*heliQuest*“ durchgeführt. Die Richtung des hydrophoben Moments ist als Pfeil dargestellt. Eigenschaften der Aminosäurereste sind farbkodiert: ungeladen amidisch (Rosa), ungeladen hydroxyl (Lila), polar negativ geladen (Rot), polar positiv geladen (Blau), hydrophob (Gelb), Histidin (Hellblau), sonstige (Grau). Aminosäureabfolge ist von N- nach C-terminal angedeutet. Größere Helices mit mehr als einer Windung zeigen doppelt besetzte Aminosäurepositionen in der Projektion. Einzelwerte ($\langle H \rangle / \langle \mu H \rangle / \text{Nettoladung}$) zum Vergleich: CPn0678 (0,456/0,523/2), Cpn0677 (0,315/0,339/2), CPn0677 ergänzt (0,402/0,469/2), Cpsi0741 (0,293/0,481/2), CT694 (0,578/0,683/2), CT694 ergänzt (0,549/0,653/3), YopE (0,471/0,423/2), ExoS (0,729/0,539/1), CT695 (0,229/0,372/6), SptP (0,485/0,466/-1).

5.2.4.2 CPn0678 vermittelt sehr wahrscheinlich Membrankrümmung

Die Identifikation der membranbindenden N-terminalen APH von CPn0678 und die beobachtete Oligomerisierung eröffneten die Möglichkeit, dass CPn0678 Membrankrümmung vermitteln könnte. Durch Interaktion der positiven geladenen Aminosäuren mit den negativ geladenen Kopfgruppen von Membranlipiden würde die Insertion der APH stabilisiert. Durch die Insertion wird eine Seite der Membran gespreizt, die Fluidität der Membran erhöht und eine Krümmung ausgelöst (Drin & Antony 2010). Hinzu kommt, dass CPn0678 mit sich selbst interagieren kann und Tetramere oder höhere Oligomere bildet, was diesen Effekt lokal

erhöhen könnte. CPn0678 bindet primär die humane PM, was eine potentielle Membrankrümmung ebenfalls an dieser Struktur erzeugen würde.

Für das Protein α -Synuclein liegen detaillierte Studien bezüglich einer N-terminalen APH mit 21 AS Länge vor (Jensen et al. 2011). Die grobe Struktur ist dabei sehr ähnlich zur APH aus CPn0678 (hydrophobe Seite, flankiert von positiven Ladungen und negative Ladungen gegenüber), weist allerdings eine weit geringere Hydrophobizität auf (Abb. 5.8) (Jensen et al. 2011). In den Studien konnte gezeigt werden, dass die APH allein nicht in der Lage ist, Membranen zu binden. Eine Erhöhung der Hydrophobizität durch Mutationen zeigt dann aber eine deutliche Membranbindung (Jensen et al. 2011) (Abb. 5.8, Mutation 1). Weitere Mutationen der APH aus α -Synuclein weisen interessanterweise zunehmende Ähnlichkeit zur APH von CPn0678 auf. Die Substitution zweier Aminosäuren zu Phenylalaninen auf der hydrophoben Seite resultierte nun in starker Membranbindung und zur zusätzlichen Fähigkeit, unterschiedliche Membrankrümmungsgrade an Liposomen zu erkennen und differenziert zu binden (Jensen et al. 2011) (Abb. 5.8, Mutation 2). Die Erhöhung der seitlichen positiven Ladungen führte zu einer Steigerung der Membranbindung und ließ darüber hinaus Membrankrümmung erkennen, die so stark war, dass die Liposomen teilweise zerstört wurden (Jensen et al. 2011) (Abb. 5.8, Mutation 3). Da CPn0678 insgesamt keine vier Arginine sondern nur zwei besitzt, wäre eine schwächere membrankrümmende Funktion anzunehmen.

Zusammenfassend zeigt die Studie, dass eine wildtypische APH von α -Synuclein durch Mutation in ihrer Sequenz und ihren Eigenschaften der APH von CPn0678 ähnlicher wurde (Abb. 5.8). Die α -Synuclein Mutationen zeigten Membranbindung und die Fähigkeit Membrankrümmungen zu erkennen und zu stabilisieren. Diese Eigenschaften wären somit ebenfalls für die APH von CPn0678 zu vermuten und würden den beobachteten Phänotyp der $\Delta 6$ -Deletion erklären (Stallmann 2010). Die $\Delta 6$ -Deletion reduziert die Hydrophobizität und die Stärke der positiven Seitenladungen und als Folge dessen war keine Membranbindung an die Außenmembran der Humanzelle zu erkennen. Vergleichende Daten der wildtypischen APH und der $\Delta 6$ -Deletion bezüglich Anordnung, $\langle H \rangle$ und $\langle \mu H \rangle$ sind im Anhang einsehbar (Abb. 6.7).

Die Insertion von APHs in Membranen erfolgt in der Regel dreischrittig (Drin & Antony 2010): Ungefaltetes Protein muss in die Nähe von negativ geladenen Membranen gebracht werden. Anschließend wird der Bereich der APH mit hoher Hydrophobizität in die Membran inseriert. Zuletzt wird die Helix an der Phase zwischen Membran und Zytosol vollständig gefaltet, wobei die Interaktionen der Ladungen zwischen Helix und Lipiden die Helix stabilisieren. All diese Schritte würden ebenfalls während des Sekretionsvorganges von

CPn0678 durchlaufen. T3SS-Effektorproteine werden entfalten sekretiert und mit dem N-Terminus voraus an der PM freigesetzt (Radics et al. 2014). CPn0678 könnte direkt die hydrophobe Sequenz der N-terminalen APH in die PM der Wirtszelle inserieren, welche sich dann vollständig faltet und stabilisiert. Spezifität zur Innenseite der PM könnte dabei durch Interaktion mit PIPs oder PtdSer erfolgen. Dies würde auch die beobachtete vesikelartige Assoziation von CPn0678 in der frühen Infektion erklären (Abb. 4.13, Abb. 4.14 & Abb. 4.31). Die Tetramerisierung oder Bildung von höheren Oligomeren von CPn0678 könnte an der Plasmamembran Membrankrümmung an der Internalisierungsstelle auslösen. Die nachfolgende Rekrutierung von SNX9 könnte einen membrankrümmenden Effekt beider Proteine über große Teile der endozytotischen Invagination oder des abgeschnürten Vesikels verstärken und die Membran stabilisieren.

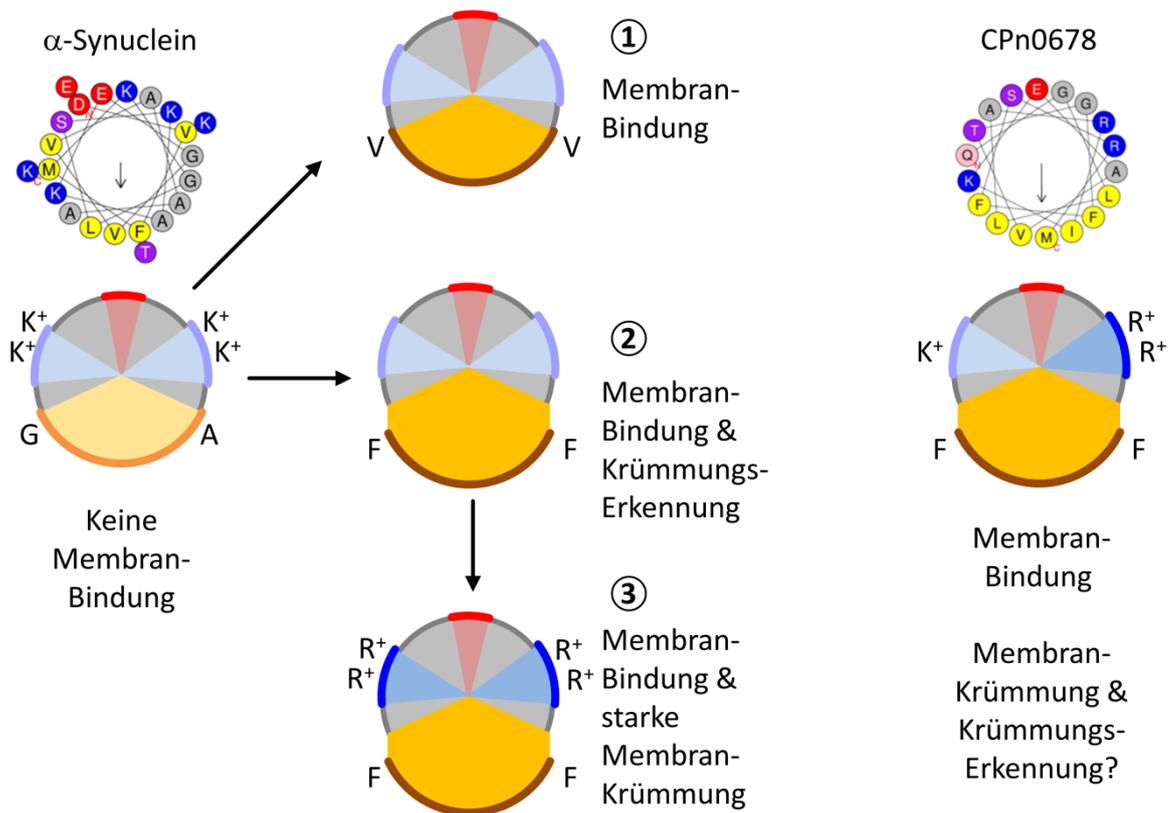


Abb. 5.8: APH von CPn0678 im Vergleich zu Mutationsstudien der APH von α -Synuclein

Dargestellt sind die helikale Projektion der APH von CPn0678 (rechts) und α -Synuclein (links) sowie schematisch die in α -Synuclein eingefügten Mutationen mit den resultierenden Eigenschaften nach Jensen et al. 2011. Mutation 1: G13V & A17V erhöhen die Hydrophobizität der APH. Mutation 2: G13F & A17F erhöhen die Hydrophobizität durch voluminösen Seitengruppen. Mutation 3: G13F, A17F, K9R, K11R, K20R, K22R erhöhen zusätzlich zu Mutation 2 die Stärke der Interaktion der positiven Seitenladungen mit den polaren Kopfgruppen der Lipide. Einzelwerte ($\langle H \rangle / \langle \mu H \rangle$): APH-Synuclein (0,129/0,354), APH-Mut1: (0,226/0,382), APH-Mut2: (0,278/0,408), APH-Mut3 (0,274/0,408), APH-CPn0678 (0,456/0,523).

Für einen endgültigen Beweis der membrankrümmenden Funktion von CPn0678 sind Deformationsstudien an Liposomen und elektronenmikroskopische Analysen, wie sie bereits für SNX9 durchgeführt wurden, unumgänglich (Yarar et al. 2008). Diese könnten zusätzlich mögliche Veränderungen der Membrankrümmung nach Interaktion mit SNX9-Interaktion belegen. Zwar könnten die beobachteten Membrantubuli bei der Transfektion von CPn0678 erste Hinweise auf eine membrankrümmende Funktion von CPn0678 sein. Allein aufgrund der Transfektion kann die Unterscheidung von hohlen Membrantubuli oder planaren Membranfilamenten nicht eindeutig erfolgen. Vergleicht man die Morphologie der CPn0678-induzierten Membranstrukturen mit denen anderer Proteinen (SNX9, GRAF1, Caveolin 1), so ist die Bildung von Membrantubuli allerdings wahrscheinlich (Lundmark et al. 2008, Shin et al. 2008, Verma et al. 2010). Um diese Strukturen eindeutig zu belegen wären abermals Deformationsstudien an Liposomen und anschließende elektronenmikroskopische Analysen unerlässlich.

5.2.5 Der Einfluss des Zytoskeletts auf den CPn0678-Phänotyp

Interessanterweise bildet CPn0678 bei Expression in Humanzellen wahrscheinlich Membrantubuli. Diese Membrantubulation wurde durch Destabilisierung des Aktinzytoskeletts erhöht und durch Destabilisierung des MT-Geflechts zerstört (Abb. 4.21 B). Weiterhin schien die Formation der Membrantubuli von einer funktionellen Dynaminaktivität abhängig zu sein, da eine Inhibierung durch Dynasore im Verlust neuer Membrantubulation resultiert (Abb. 4.21 B). Sicherlich wird die Funktion von CPn0678 in der Infektion allein schon aufgrund des Mengenunterschieds nicht in der Ausbildung dieser komplex verzweigten Membrantubuli liegen. Dennoch lassen diese Membrantubuli Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion von CPn0678 zu. Deshalb sind bei diesem Phänotyp die Membrantubuli weniger als Struktur selbst interessant, sondern als Maß für zugrundeliegende Prozesse. Eine mögliche Erklärung, dass der Phänotyp der Membrantubulation von Zuständen des Wirtszellzytoskeletts abhängig ist, erfolgt dann auf mehreren Ebenen.

Die Destabilisierung des Aktinzytoskeletts könnte zu einer Verstärkung der Membrankrümmung führen, weil der stabilisierende Effekt von Aktin an der PM ausbleibt (van Deurs et al. 1996). Bedenkt man aber, dass sowohl MT als auch Dynamin einen starken Einfluss auf die CPn0678-induzierten Membrantubuli haben, so ist ein endozytotischer Ursprung wahrscheinlicher. Für die endozytotischen Proteine SNX9, GRAF1 (**G**TPase **r**egulator **a**ssociated with **f**ocal adhesion kinase-**1**) und Caveolin-1 konnte gezeigt werden, dass sie bei Überexpression CPn0678-ähnliche Membrantubulationen auslösen (Lundmark et al. 2008, Shin et al. 2008, Verma et al. 2010). Für alle drei Proteine konnte weiterhin eine massive

Steigerung der Tubulation beobachtet werden, wenn Aktin destabilisiert wurde. Letztendlich zeigen zumindest die Daten für SNX9 und GRAF1, dass diese Tubulationssteigerung auf einen direkten Einfluss während der Abschnürung von endozytotischen Einstülpungen zurückzuführen ist. An diesem Prozess ist Aktin maßgeblich beteiligt (vgl. Kap. 1.2.2). Werden diese kraftausübenden Prozesse, die zum Schließen der endozytotischen Invagination benötigt werden, unterbunden, so setzt sich eine endlose Verlängerung dieser endozytotischen Strukturen fort. Begünstigt werden könnte dieser Prozess durch Proteine, die Membranen krümmen und so Membrantubuli stabilisieren. Somit kann erstmals ein direkter Einfluss von CPn0678 auf die Endozytose während der Formation oder der Abschnürung postuliert werden.

Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass CPn0678 die Fähigkeit besitzt, SNX9 zu binden und aktiv zu rekrutieren. Von SNX9 ist bekannt, dass es selbst in der Lage ist über seine APH (13 AS Länge) Membranen zu binden und Membrantubulation auszulösen (Pylypenko et al. 2007). In den oben beschriebenen Experimenten wird somit endogenes SNX9 die CPn0678-induzierte Tubulation unterstützen, denn die IP-Experimente belegen die effiziente Bindung von endogenem SNX9 (Abb. 4.25). Die aktive CPn0678-vermittelte Rekrutierung von SNX9 zur Membran könnte somit allein bereits ausreichen, um eine Membrankrümmung und -tubulation auszulösen. Die Membrantubulation konnte allerdings auch in Varianten beobachtet werden, die keine Interaktion oder Rekrutierung von SNX9 erkennen ließen. So zeigt der N-terminale Teil von CPn0678 Membrantubulation, aber keine Rekrutierung von SNX9 in der Transfektion (Abb. 4.21 B & Abb. 4.24). Das Auftreten der Membrantubulation war für diese Variante zwar signifikant reduziert, aber nach Destabilisierung von Aktin ohne jeden Zweifel zu beobachten (Abb. 4.21 B). Dies lässt den Schluss zu, dass bereits der N-terminale Teil von CPn0678 allein in der Lage ist, die endozytotische Prozesse zu beeinflussen. Da für CPn0678-C^{GFP} in den Arbeiten zu Abb. 4.15 zu keinem Zeitpunkt Membrantubuli erkennbar waren, schien diese Eigenschaft auf den N-terminalen Bereich von CPn0678 beschränkt zu sein. Allerdings kann CPn0678 dies erst in Verbindung mit seinem C-Terminus (und so vermutlich durch Rekrutierung von SNX9) effizient ausführen.

Weiterhin spricht die Dynamin-abhängige Membrantubulation für deren endosomalen Ursprung. Akkumulationen von CPn0678 in Membranbereichen, in denen Dynamin-abhängige Endozytose stattfindet, könnten tubuläre Strukturen auslösen, wenn der Abschnürungsprozess beispielsweise durch große Proteinmengen gestört wird. Von GRAF1 ist bekannt, dass es bei Überexpression in der Transfektion Dynamin-abhängige Membrantubuli bildet, die ihren Ursprung in der CUE haben (Lundmark et al. 2008). Eine

Inhibierung von Dynamin mittels Dynasore zeigte für GRAF1 eine Reduktion der induzierten Membrantubuli (Lundmark et al. 2008). GRAF1 ist ein Mediator zwischen Membrankrümmung und GAP-Funktion (**G**T**P**ase-**a**ctivating **p**rotein) und greift so direkt in die CUE des CLIC- und GEEC-Endozytoseweges (**C**lathrin-**i**ndependent **c**arriers / **G**PI-AP-enriched **e**arly **e**ndosomal **c**ompartments) ein (Doherty & Lundmark 2009). Diese tubulären Strukturen konnten durch Kollokalisierung mit markiertem **c**holera-**t**oxin (CTx) identifiziert werden (Lundmark et al. 2008). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass endozytische, CTx-positive Membrantubuli entlang von MT gebildet und dass diese MT zur Aufrechterhaltung benötigen werden (Lundmark et al. 2008). Die Assoziation und die Abhängigkeit der CPn0678-induzierten Membrantubulation von MT konnte in dieser Arbeit auch beobachtet werden (Abb. 4.21 & Abb. 4.22). Die Autoren postulieren bei den GRAF1-Membrantubuli eine Verbindung zur Endozytose über Caveolae, wobei allerdings ebenfalls CLIC oder GEEC möglich wären (Lundmark et al. 2008). Auch für Cavoelin-1 konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung von Dynamin mittels Dynasore eine starke Reduktion der Caveolin-induzierten Membrantubulation zur Folge hat (Verma et al. 2010). Eine Überexpression von Dynamin reduzierte ebenfalls die Membrantubulationsrate, was demonstriert, dass wildtypisch reguliertes Dynamin für die CUE benötigt wird. Der beobachtete Einfluss des Zytoskeletts ist verblüffend ähnlich zu dem durch transfiziertes CPn0678 induzierten Membrantubulations-Phänotyp (Abb. 4.20 - Abb. 4.22). Allein aufgrund der viel geringeren Proteinmenge induziert endogenes CPn0678 in der natürlichen chlamydialen Infektion sicherlich nicht diese extremen tubulären Strukturen. Dennoch für die CPn0678-induzierten Membrantubuli die Hypothese aufgestellt werden, dass sie ihren Ursprung vermutlich in Regionen der PM haben, die durch CLIC-, GEEC- oder Caveolae-Endozytose geprägt sind.

Für Chlamydien wurde bereits gezeigt, dass die Aufnahme der infektiösen EBs von *C. pneumoniae* und *C. psittaci* vermutlich auf endozytische Prozesse mittels Caveolae zurückzuführen sind (Stuart et al. 2003). Dennoch konnte bisher keine eindeutige Zuordnung für einen der möglichen Clathrin-unabhängigen Endozytosewege erfolgen (vgl. Kap. 1.2.4). Lipid Rafts scheinen eine bedeutende Rolle einzunehmen (Fechtner et al. 2016). Lipid Rafts müssen aber nicht zwangsläufig eine Endozytose über Caveolae bedeuten, denn sie stellen ebenfalls den Ursprung von CLIC und GEEC dar (Kirkham & Parton 2005). Der EGFR, der nachweislich bei der Internalisierung von *C. pneumoniae* aktiv ist, wird dagegen vermutlich nicht über Caveolae internalisiert, was die Klärung zusätzlich erschwert (Molleken et al. 2013, Pike 2005, Wang & Paller 2006). Für CPn0678 bedeuten diese Zusammenhänge, dass es vermutlich nach der Sekretion mit seiner APH an der PM bindet und Spezifität für Bereiche aufweisen

könnte, die eine beginnende Endozytose über CLIC, GEEC oder Caveolae repräsentieren. All diese Prozesse stehen wegen ihrer Abhängigkeit von Lipid Rafts ebenfalls im Verdacht die frühesten Internalisierungsereignisse von *C. pneumoniae* maßgeblich zu beeinflussen. Deshalb kann auch in der natürlichen Infektion eine Affinität von CPn0678 zu Membrandomänen dieser Endozytosewege postuliert werden, die allerdings weiterer experimenteller Überprüfung bedarf.

5.2.6 Die Interaktion von CPn0678 und SNX9

Bereits in früheren Studien gab es Hinweise auf eine Interaktion von CPn0677 und CPn0678 mit SNX9 (Murra 2009). Diese wurde in Experimenten mit rekombinantem Protein nachgewiesen und war in grundlegenden Transfektions-Experimenten zu detektieren. Es konnte aber nicht vollständig geklärt werden, welcher Teil von CPn0678 die Interaktion mit SNX9 vermittelte (Murra 2009). In der hier vorliegenden Arbeit konnte die interagierende Domäne nunmehr genau definiert werden. Die Interaktion von CPn0678 mit SNX9 wird durch die erste der drei PRR im C-terminalen Bereich bedingt (Abb. 4.24 B). Dies deckt sich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen zum sekretierten *E. coli*-Protein EspF, in denen ein RxxPxxP-Motiv ausschlaggebend für die Interaktion mit SNX9 ist (Alto et al. 2007). Das RxxPxxP-Motiv ist ausschließlich im ersten der drei PRR von CPn0678 zu finden. Die Interaktion konnte anhand mehrerer Kontrollen als spezifisch charakterisiert werden und war sowohl *in vitro* wie auch in der Infektion nachweisbar (Abb. 4.25 & Abb. 4.28). In den Experimenten der Ko-IP mit SNX9 und CPn0678 kotransfizierten Zellen konnte ein deutlicheres Signal für interagierendes endogenes SNX9 gegenüber der mCherry fusionierten SNX9-Variante beobachtet werden (Abb. 4.25). Grund dafür könnte eine leichte sterische Behinderung der Interaktion durch das fusionierte mCherry sein. Außerdem konnte eine Doppelbande für exprimiertes SNX9^{mCherry} detektiert werden (Abb. 4.25). Diese Doppelbande könnten eine Destabilisierung oder Degradation des SNX9^{mCherry} anzeigen. Die Interaktion von SNX9^{mCherry} mit CPn0678^{GFP} konnte ausschließlich für die größere Bande der Doppelbande detektiert werden, welche vermutlich das Volllängenprotein SNX9^{mCherry} ohne Degradation repräsentiert.

Interessanterweise wird die Rekrutierung von SNX9 zur Membran in der Transfektion nicht durch die CPn0678-induzierte Membrantubulation ausgelöst (Abb. 4.24 B). Die beobachteten Interaktionen von SNX9 in der Transfektion und den IP-Experimenten basieren also auf einer direkten Interaktion zwischen SNX9 und CPn0678 und werden nicht von den krümmungsdetektierenden Eigenschaften von SNX9 hervorgerufen. Darüber hinaus besitzt CPn0677 ebenfalls ein RxxPxxP-Motiv im ersten seiner beiden PRR (Murra 2009). Dieses

Motiv wird also auch in CPn0677 höchstwahrscheinlich für die Interaktion mit SNX9 verantwortlich sein. Diese Theorie deckt sich mit früheren Ergebnissen, in denen verkürzte Varianten von CPn0677, die diese erste PRR enthielten, immer noch mit SNX9 interagierten (Murra 2009).

Erstmalig konnte zu frühen Zeitpunkten der *C. pneumoniae* Infektion mikroskopisch die Rekrutierung von SNX9 und die Interaktion zwischen endogenem SNX9 und endogenem CPn0678 durch Immunpräzipitation gezeigt werden (Abb. 4.28). Diese wichtigen Erkenntnisse vervollständigen frühere Ergebnisse, in denen SNX9 initial als wichtiger Faktor der chlamydialen Infektion charakterisiert werden konnte (Murra 2009).

Die Lokalisation von transfiziertem SNX9 und CPn0678 zu frühen Infektionszeitpunkten gibt weiteren Aufschluss über die Ereignisse in diesem Stadium (Abb. 4.31). Die PI5K bewirkt die Bildung von PI(4,5)P₂ aus PI(4)P, wobei die direkte Verbindung von PI5K und PI(4,5)P₂ zur Endozytose bzw. Phagozytose bereits gezeigt werden konnte (Botelho et al. 2000, Brown et al. 2001). Die PI3K bewirkt wiederum die Bildung PI(3,4,5)P₃ aus PI(4,5)P₂. PI(3,4,5)P₃ ist ebenfalls als wichtiger Faktor während der Endozytose bzw. Phagozytose bekannt (Czech 2000, Dewitt et al. 2006, Laketa et al. 2014). Die PH-Domäne von BTK markierte in der Transfektion spezifisch PI(3,4,5)P₃ (Laketa et al. 2014). Die Lokalisation von BTK-PH an Chlamydien stellt eines der frühesten Ereignisse dar, bei denen PI(3,4,5)P₃ während der Endozytose gebildet wird (vgl. Kap. 1.2). Sowohl SNX9 als auch CPn0678 konnten kolokalisierend mit BTK-PH in der frühen chlamydialen Infektion detektiert werden (Abb. 4.31, oben). Deshalb können sowohl SNX9 als auch CPn0678 eindeutig frühen Phasen der Infektion zugeordnet werden. Zusätzlich wurden auch Ereignisse detektiert, die sowohl SNX9 als auch CPn0678 an BTK-negativen Chlamydien zeigten (Abb. 4.31, unten). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass sekretiertes CPn0678 auch an bereits vollständig geschlossenen Vesikeln detektierbar war (Abb. 4.14). Zusammen bedeutet dies, dass CPn0678 seine Funktion in der Wirtszelle vermutlich zusammen mit SNX9 über den Erstkontakt *C. pneumoniae* hinaus erfüllt. In der Kotransfektion beobachtete SNX9- und CPn0678-positive tubuläre Strukturen an internalisierten Chlamydien sind ein weiterer Hinweis auf den endozytotischen Ursprung der CPn0678-induzierten Membrantubuli (Abb. 4.31).

Die Fähigkeit zur Tetramerisierung oder der Bildung höherer Oligomere von CPn0678 könnte die Aktivierung von SNX9 durch Oligomerisierung am entstehenden endozytotischen Einschluss bewirken. Oligomeres aktiviertes SNX9 ist in der Lage N-WASP, Dynamin und die PI5K zu aktivieren und mit der PI3K zu interagieren (Badour et al. 2007, Shin et al. 2008, Yarar et al. 2008). N-WASP unterstützt zusammen mit Dynamin das Schließen des endozytotischen Vesikels und könnte darüber hinaus Aktin-abhängige primäre Transporte

unterstützen, wenn es länger am geschlossenen Einschluss verbleibt (vgl. Kap. 1.2.2). Die PI5K bewirkt die Bildung von PI(4,5)P₂ aus PI(4)P und würde, über aktiviertes SNX9, so eine positive Verstärkung der CPn0678- und SNX9-Bindung an der Internalisierungsstelle bewirken (Abb. 5.9 B) (Campa et al. 2015, Shin et al. 2008). Ähnliches gilt für die PI3K. Sie bildet PI(3,4,5)P₃ aus PI(4,5)P₂ und würde ebenfalls die Bindung von weiterem SNX9 und anderen endozytotischen Proteinen begünstigt (Abb. 5.9 B) (Badour et al. 2007, Campa et al. 2015).

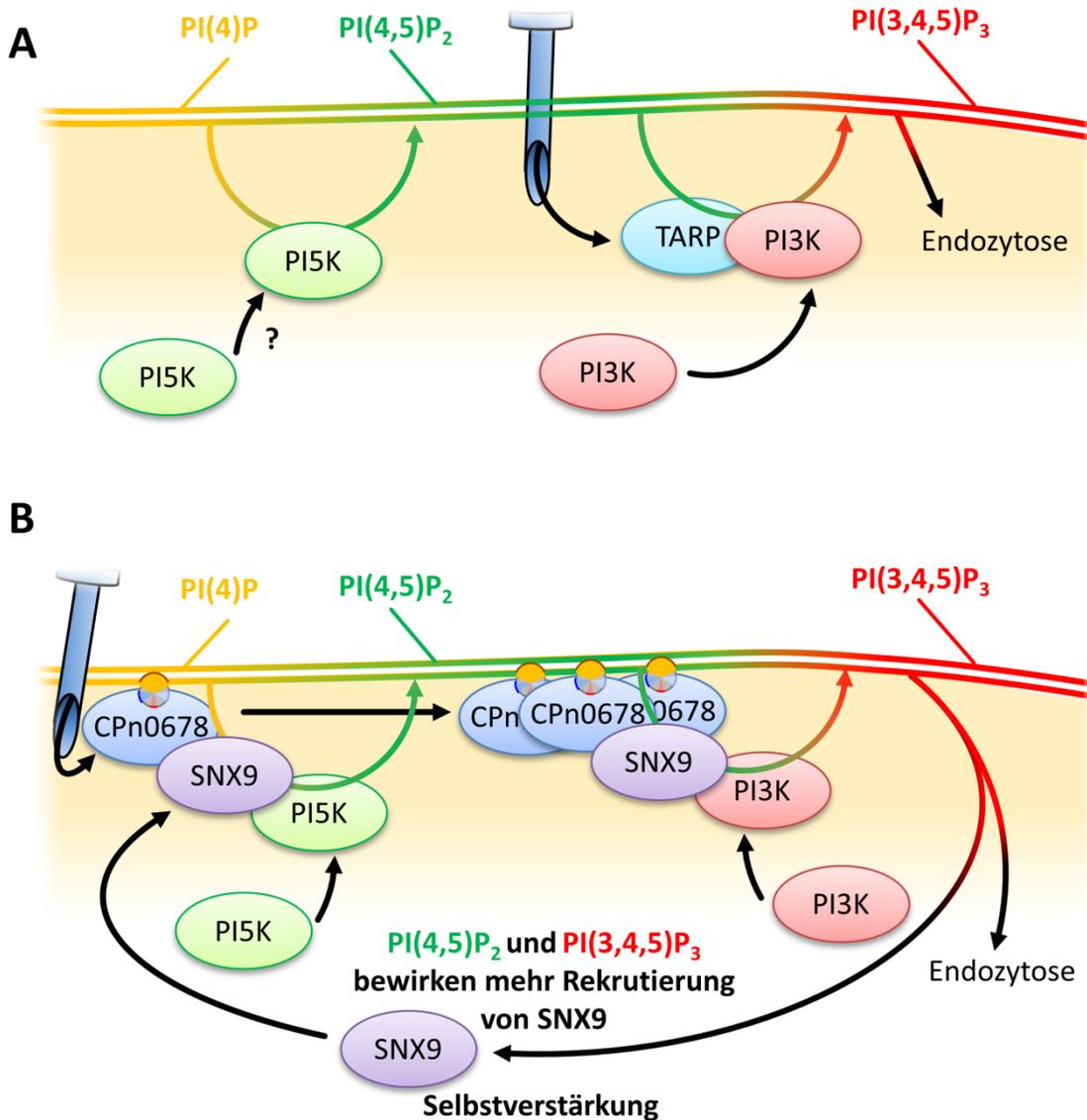


Abb. 5.9: Potentielle Beeinflussung von PIPs durch chlamydiales sekretiertes CPn0678

(A) Vermutliche Generierung von PI(3,4,5)P₃ bei *C. trachomatis* durch TARP-rekrutierte PI3K (Lane et al. 2008). Ob bei *C. trachomatis* eine aktive Beeinflussung der PI5K auftritt, ist unbekannt. PI(3,4,5)P₃ fördert die weitere Endozytose. (B) Modell zur Generierung von PI(3,4,5)P₃ bei *C. pneumoniae* durch CPn0678. CPn0678-induzierte Rekrutierung von SNX9 bewirkt ebenfalls die Rekrutierung von PI3K und PI5K. Ein selbstverstärkender Effekt könnte durch weitere Bindung von SNX9 und CPn0678 an PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃ erfolgen. Gleichzeitig wird die Endozytose durch PI(3,4,5)P₃ eingeleitet. Abkürzungen sind im Fließtext oder der Einleitung erklärt (Kap. 1.2.1).

In *C. trachomatis* konnte gezeigt werden, dass das sekretierte Effektorprotein TARP durch Phosphorylierung an Y₁₇₉ und Y₁₈₉ in der Lage ist die PI3K zu rekrutieren (Lane et al. 2008). Über den PI3K spezifischen Inhibitor Wortmanin wurde weiterhin gezeigt, dass diese vermutlich die Generierung von PI(3,4,5)P₃ an der chlamydialen Internalisierungsstelle bewirkt (Abb. 5.9 A) (Lane et al. 2008, Subtil et al. 2004). Ein Alignment von TARP und dem Homolog aus *C. pneumoniae* (CPn0572) kann im Anhang eingesehen werden und zeigt, dass der Bereich, in denen Y₁₇₉ und Y₁₈₉ liegen, in CPn0572 nicht konserviert ist (Abb. 6.8). CPn0572 wird also vermutlich die PI3K nicht effektiv rekrutieren können. Dennoch ist bereits bekannt, dass die PI3K auch bei *C. pneumoniae* für die Internalisierung, aber nicht für die Adhäsion, eine essentielle Aufgabe übernimmt, wobei das genaue auslösende Signal unbekannt bleibt (Coombes & Mahony 2002). Möglicherweise kann CPn0678 über SNX9 die PI3K rekrutieren und aktivieren, um so eine ähnliche Aktivierung der PI3K wie in Infektionen mit *C. trachomatis* zu erreichen (Abb. 5.9 B). *C. trachomatis* besitzt kein Protein, das homolog zu CPn0678 ist. Dies wäre vermutlich eine Erklärung, weshalb *C. trachomatis* eine Region in TARP aufweist, die eine Rekrutierung und Aktivierung der PI3K bewirkt und so den gleichen Effekt auslöst. SNX9 wird hauptsächlich mit CAE in Verbindung gebracht (Lundmark & Carlsson 2009). Zwar wird auch der Einfluss auf CUE-Prozesse vermutet, konnte aber bisher nicht eindeutig gezeigt werden (Lundmark & Carlsson 2009). Eine aktive Rekrutierung von SNX9 über das sekretierte Effektorprotein CPn0678 würde die Menge an SNX9 lokal stark erhöhen und könnte so die Internalisierung positiv beeinflussen. Die bekannte membrankrümmende Funktion von SNX9 könnte mit der potentiellen Krümmungsfunktion von CPn0678 die Stabilisierung des entstehenden Vesikels unterstützen und so die Aufnahme beschleunigen. Weiterhin gibt es starke Parallelen zwischen SNX9 und einem weiteren SNX-Protein, SNX18 (Haberg et al. 2008). Dieses greift in ähnliche Prozesse wie SNX9 ein und besitzt ebenfalls eine SH3-Domäne weshalb es ein weiterer wichtiger Faktor während der chlamydialen Infektion darstellen könnte (Haberg et al. 2008). Auf diese Weise könnte die spezifische Interaktion und Rekrutierung von SNX9 zu CPn0678 einerseits die Formierung des vergleichsweise großen Vesikels gewährleisten und gleichzeitig die selbstverstärkende Maschinerie der Endozytose anstoßen.

5.2.7 CPn0678 beeinflusst direkt humane endozytotische Prozesse

Da alle Ergebnisse auf eine direkte Beeinflussung der humanen Endozytose hindeuteten, drängte sich eine quantifizierbare Überprüfung der frühen chlamydialen Infektion und der endozytotischen Prozesse auf. Tatsächlich belegen ein dominant-negativer Effekt des transfizierten CPn0678 Vollängen-Proteins auf die chlamydiale Infektion und ein negativer

Effekt auf die EGF-abhängige humane Endozytose diese Hypothese (Abb. 4.30 B & Abb. 4.32 B). Die Tatsache, dass durch transfiziertes CPn0678 negative Einflüsse induziert werden, spricht dabei keinesfalls gegen einen positiven Effekt dieses Proteins in der natürlichen Infektion. Die Endozytose ist ein höchstregulierter Prozess und die Überexpressionen einzelner Komponenten kann schnell zu einer Fehlregulation der Endozytose führen, wie am Beispiel von SNX9 in der CAE gezeigt wurde (Lundmark & Carlsson 2003). Die Überexpression von SNX9 führt zum völligen Verlust der Transferrin-Rezeptor-Aufnahme, die über CAE erfolgt (Shin et al. 2008). Die negativen Einflüsse in den SNX9-Transfektions-Experimenten repräsentieren somit die Fehlregulation eines in der natürlichen Infektion wohlregulierten Prozesses. Die negativen Effekte von transfiziertem CPn0678 auf die Infektion und die Endozytose könnten deshalb auf eine ähnliche Fehlregulation durch Überexpression hervorgerufen werden. Beispielsweise könnte die normale Funktion von SNX9 den internalisierenden Chlamydien lokal nicht zur Verfügung stehen, da es in anderen Bereichen der Zelle durch transfiziertes CPn0678 gebunden wird. Ferner könnte, durch zu viel rekrutiertes SNX9 oder durch membrankrümmende Effekte von CPn0678, eine starke oder zu starre Membrankrümmung ebenfalls die Endozytose behindern oder verlangsamen. Eine genauere Charakterisierung des Effektes in transfizierten Zellen während der frühen Infektion könnte über Realtime-PCR zur Bestimmung der Anzahl internalisierter Chlamydien erfolgen. So wäre eine Quantifizierung in den frühesten Phasen der Infektion möglich und ist bereits ähnlich für andere Proteine von *C. pneumoniae* durchgeführt worden (Fechtner et al. 2016).

Interessanterweise war der dominant-negative Einfluss gleichermaßen vom N-terminalen Teil und von den C-terminalen PRR abhängig (Abb. 4.30 B). Eine Trennung beider Teile ließ reduzierte dominant negative Effekte auf die Infektion erkennen, die allerdings nicht signifikant waren (Abb. 4.30 B). Diese Ergebnisse deuten an, dass beide Teile synergetisch agieren müssen, um die Funktion von CPn0678 zu gewährleisten. Obwohl bereits der N-terminale Teil allein in der Lage ist die PM zu binden und Membrantubuli hervorzurufen, reicht er nicht aus, um die Endozytose effizient zu beeinflussen. Andererseits sind die C-terminalen PRR von CPn0678 essentiell zur Bindung und Rekrutierung von SNX9. Dennoch reicht auch ihre Funktion allein nicht aus, um die endozytotischen Prozesse signifikant zu beeinflussen. Ein synergetisches Zusammenspiel zwischen Membranassoziation und SNX9-Rekrutierung scheint also für die Funktionalität von CPn0678 essentiell zu sein.

Die Tatsache, dass die Überexpression von CPn0678 keinen vollständigen Zusammenbruch der chlamydialen Infektion oder EGF-Endozytose auslösten, spricht für mehrere Möglichkeiten. Entweder unterbricht CPn0678 diese Prozesse nicht vollständig, sondern verlangsamt sie nur. So könnte sich die Infektion verschlechtern, da die Wirtszelle länger Zeit

hat, einer Infektion entgegenzuwirken. Die Endozytoseassays würden aufgrund der Asynchronität einer stark verlangsamten Endozytose eine Reduktion an endozytischer Humanzellen zeigen. Andererseits wäre denkbar, dass transfiziertes CPn0678 nur einen der möglichen Internalisierungswege blockiert. Chlamydien sind dafür bekannt, essentielle Prozesse gleich auf mehrere Weisen zu beeinflussen. Die Reduktion des Einflusses von endogenem CPn0678 durch exprimiertes transfiziertes CPn0678 könnte so die Infektiosität herabsetzen, aber dennoch von anderen chlamydialen Prozessen teilweise übernommen werden. Bei den EGF-Endozytose-Assays muss berücksichtigt werden, dass der EGF-Rezeptor über mehrere Prozesse aufgenommen werden kann. Bei den hier verwendeten Mengen an EGF (20 ng/ml) wird auch die CAE zur Aufnahme verwendet, da die CAE übersättigt ist (Sigismund et al. 2005). Dennoch ist die CAE-Endozytose nicht vollständig inaktiv, da sie weiterhin abläuft. Die Aufteilung beträgt vermutlich etwa 50 % CAE zu 50 % CUE bei 20 ng/ml EGF, auch wenn diese quantitativen Daten umstritten sind (Sigismund et al. 2005). So könnte bei einer Blockierung der CUE durch große CPn0678-Mengen immer noch eine Rest-Endozytoseaktivität detektiert werden. Klärung könnte in weiteren Experimenten die Untersuchung des negativen CPn0678-Effektes in transfizierten Zellen auf Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit des EGF in der Endozytose bringen. In jeden Fall repräsentieren diese Ergebnisse den besonderen Einfluss von CPn0678 auf die chlamydial induzierte Endozytose, welche für die weitere Infektion essentiell ist.

5.2.8 Weiterer Ausblick für CPn0678 und CPn0677

CPn0678 bietet neben den in den vorherigen Kapiteln dargestellten Eigenschaften noch weitere mögliche funktionelle Perspektiven. So konnte die Kollokalisierung von CPn0678 in der Transfektion zu transfiziertem IRSp53 und Cortactin an der humanen PM gezeigt werden (Abb. 4.27). IRSp53 gilt als Mediator zwischen der PM, Membrankrümmung, Aktin und Rho-GTPasen. Interessanterweise ist IRSp53 aktiv bei der Regulierung von Aktin- und Membrandynamiken beteiligt, ebenso wie bei der Ausbildung von Filopodien (Kast et al. 2014). Erste Studien zu einer möglichen Funktion von IRSp53 während der Phagozytose schließen diese unter natürlichen Bedingungen allerdings aus (Abou-Kheir et al. 2008). Etwaige Beziehungen von IRSp53 zur Endozytose über Caveolae, CLIC oder GEEC sind bisher völlig unbekannt. Ein sekretiertes Effektorprotein wie CPn0678 könnte dennoch Einfluss auf IRSp53 nehmen und seine Funktionen zum Vorteil der chlamydialen Endozytose nutzen. So ist beispielsweise bekannt, dass *Salmonella* während der Infektion gleichzeitig die Rekrutierung von IRSp53 bewirkt und Deformationen der PM erzeugt (Shi et al. 2005). Es wird vermutet, dass *Salmonella* über sekretierte Effektorproteine die Interaktion von IRSp53

und dem Aktin-modulierenden Protein WAVE-2 induziert (Shi et al. 2005). Die genaue Funktion dieses Komplexes ist allerdings unbekannt, da IRSp53 keine essentielle Rolle bei der *Salmonella* Internalisierung einnimmt (Shi et al. 2005).

Für Cortactin sind Funktionen in der CUE bekannt, wobei ein direkter Einfluss zumindest auf Caveolae gezeigt wurde, für CLIC und GEEC aber nur vermutet wird (Kirkham & Parton 2005). Cortactin ist in einer großen Zahl von Pathogen-Wirtszell-Interaktionen verwickelt, so bei *EPEC*, *EHEC*, *Staphylococcus*, *Neisseria*, *Rickettsia*, *Shigella*, *Listeria* und *Helicobacter*, die sich der Aktin-modulierenden Funktion von Cortactin bedienen (Selbach & Backert 2005). Selbst für *C. trachomatis* ist die Assoziation von Cortactin mit der sich früh entwickelnden Inklusion beschrieben (> 4 hpi) (Fawaz et al. 1997). Ob Cortactin während der frühen Internalisierung von *C. trachomatis* ebenfalls eine Funktion übernimmt, bleibt allerdings unklar. Auch eine Rekrutierung von Cortactin während der *C. pneumoniae*-Infektion wäre plausibel, da auch hier Aktin-Remodulationen beobachtet wurden und Cortactin ebenfalls ein wichtiger Faktor der Signaltransduktion von aktiviertem EGFR darstellt (Schmidt & Dikic 2005, Timpson et al. 2005, Zrieq 2009). In den hier durchgeführten Transfektions-Experimenten konnte allerdings keine aktive Rekrutierung von IRSp53 oder Cortactin durch CPn0678 zur PM untersucht werden, da beide Proteine auch ohne CPn0678 an der PM lokalisieren (Abb. 4.27). Dies ist entweder zufällig, repräsentiert die Präferenz der Proteine für Membranabschnitte der CUE oder bedeutet, dass IRSp53 und Cortactin die Lokalisation von CPn0678 beeinflussen. In weiteren Experimenten müsste deshalb die direkte Interaktion von IRSp53 und Cortactin beispielsweise über Ko-IP analysiert werden.

Des Weiteren ist die Art der CPn0678-Selbstinteraktion und Tetramerbildung bzw. Bildung höherer Oligomere unbekannt. Die Formation der Tetramere scheint dabei nicht membranabhängig zu sein, da sie in Lösung beobachtet werden konnte (Abb. 4.19). Die Bildung der Oligomere wird vermutlich nach der Sekretion durch die Membranbindung unterstützt. Ein exakter Bereich für die Selbstinteraktion konnte allerdings bisher nicht identifiziert werden. Höchstwahrscheinlich werden für diesen Prozess keine weiteren Faktoren benötigt. Eine genaue Identifikation der essentiellen Domäne für die Selbstinteraktion, könnte beispielsweise über Oligomerisierungsstudien von weiteren Deletionsvarianten in Gelfiltrations- oder Crosslink-Experimenten untersucht werden.

Ebenfalls interessant ist der Bereich AS 98-122 von CPn0678, der einige konservierte Aminosäuren und homologe Aminosäuren zu anderen Effektorproteinen wie YopE, ExoS und SptP erkennen ließ (Abb. 6.6). Der Bereich dieser Aminosäuren ist in YopE bereits bekannt als sog. Arginin-Finger-Motiv (Abb. 6.6, gelb hinterlegt). Mittels des Arginin-Finger-Motivs agiert YopE als GAP-Protein und beeinflusst die Aktivität der Rho-GTPasen RhoA,

Rac und Cdc42 (Von Pawel-Rammingen et al. 2000). Diese Rho-GTPasen stellen unter anderem wichtige Faktoren in Endozytose und Phagozytose dar, beeinflussen aber auch viele weitere Prozesse der Wirtszelle (Etienne-Manneville & Hall 2002). Durch Inhibitorstudien ist bekannt, dass Rho-GTPasen während der frühen Infektionsphasen von *C. pneumoniae* eine essentielle Rolle spielen (Dautry-Varsat et al. 2005). Ein Austausch eines konservierten Arginin, das auch in CPn0678 und Cpsi0741 konserviert ist, führt in YopE zu einem nahezu vollständigen Verlust der GAP-Funktion auf Rho-GTPasen, was den Aktin-remodulierenden Effekt von YopE stark reduzierte (Von Pawel-Rammingen et al. 2000). Das Arginin-Finger-Motiv besitzt also eine wichtige Funktion in YopE. Weiterhin konnten auch für SptP und ExoS an der gleichen Position Arginin-Finger-Motive identifiziert werden, die GAP-Aktivität auf Rac bzw. Cdc42 ausüben (Fu & Galan 1999, Wurtele et al. 2001). Auch wenn einige wichtige Aminosäuren des Arginin-Finger-Motivs mit der Konsensussequenz GxLRx₃T in CPn0678 und Cpsi0741 konserviert erscheinen, benötigen YopE, SptP und ExoS eine nachfolgende Aminosäureschleife mit der Sequenz QWGTxGG etwa 40 AS später (Dean 2011) (Abb. 6.6, gelb hinterlegt). Diese ist in keiner der chlamydialen Vertreter konserviert (Abb. 6.6). Interessanterweise befindet sich in CPn0678 an vergleichbarer Position der zweite PRR. Auch existieren Beispiele anderer Effektoren, die ein funktionales Arginin-Finger-Motiv besitzen, die spätere Schleife allerdings nicht tragen. Das Effektor-Protein Tir aus *EPEC* reguliert über ein solches Motiv Cdc42 (Kenny et al. 2002). Diese Interaktion verhindert unkontrollierte Bildung von Filopodien während der Infektion (Kenny et al. 2002). Ob CPn0678 ebenfalls ein funktionales Arginin-Finger-ähnliches Motiv an der zu Cpsi0741 konservierten Stelle AS 99 – 106 besitzt, bleibt spekulativ (vgl. Abb. 5.3). Sollte sich dies bewahrheiten, könnte CPn0678 ähnlich zum humanen GRAF1 als Mediator zwischen Membrankrümmung und GAP-Funktion in der CUE vermitteln. Tatsache ist, dass dieser Bereich zwischen *C. pneumoniae* und *C. psittaci* konserviert ist und somit wichtige Funktion übernehmen könnte, wie es auch für den Bereich der APH der Fall ist.

CPn0677 besitzt einige homologe Regionen zu CPn0678 (vgl. Abb. 5.3) Interessanterweise sind die Bereiche in CPn0677 auf die N-terminalen Region von CPn0678 mit der APH und den PRR von CPn0678 beschränkt (Abb. 6.5). Eine Membranassoziation über eine N-terminale APH ist ebenfalls für CPn0677 wahrscheinlich, da auch für CPn0677 eine α -Helix vorhergesagt wird (vgl. Abb. 5.6). Auch die Interaktion mit SNX9 über die PRR mit dem in CPn0677 konservierten RxxPxxP-Motiv ist sehr wahrscheinlich (Abb. 6.5). Die Interaktion von SNX9 und CPn0677 konnte in früheren biochemischen Experimenten bereits beobachtet werden und unterstützt diese Hypothese (Murra 2009). Darüber hinaus ist bekannt, dass sich die potentielle T3SS-Signalsequenz in den ersten N-terminalen

Aminosäuren von sekretierten Proteinen befinden muss (Subtil et al. 2001). So kann auch für CPn0677 postuliert werden, dass es ein sekretiertes chlamydiales Effektorprotein darstellt, da auch CPn0677 nicht als Adhäsion auf der Oberfläche der chlamydialen EBs präsentiert wird (Abb. 4.12). Deshalb wird CPn0677 durch eine mögliche Sekretion, APH-vermittelter Membranassoziation und SNX9-Interaktion vermutlich ähnliche Eigenschaften zu CPn0678 besitzen. Dennoch sind große Teile von CPn0677 ohne bekannte Funktion und Homologie, was darauf hinweist, dass Cn0677 und CPn0678 nicht nur reine Genduplikation widerspiegeln. Deshalb kann CPn0677 verglichen mit CPn0678 vermutlich weitere Funktion während der chlamydialen Infektion erfüllen.

5.2.9 CPn0678 ein Schlüsselprotein der frühen chlamydialen Infektion?

Abschließend werden hier die Daten für CPn0678 in einem Modell zusammengefasst dargestellt (Abb. 5.10). Eine Übersicht der postulierten Funktionen wird anschließend aufgezeigt (Abb. 5.11).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CPn0678 spät in der Infektion exprimiert wird und innerhalb chlamydialer EBs lokalisiert (Abb. 5.10, 1). CPn0678 wird dann zu frühen Zeitpunkten über das T3SS in die Wirtszelle sekretiert (2). CPn0678 besitzt eine potentielle N-terminale APH, die spezifische Lokalisation zu humanen PM vermittelt (3). Die APH besitzt eine Kernsequenz, die bereits zur Membranbindung ausreicht, benötigt aber vermutlich positiv geladene Aminosäuren in der nachfolgenden Sequenz, um Spezifität zu vermitteln. Darüber hinaus kann CPn0678 mit sich selbst interagieren und Tetramere oder höhere Oligomere bilden, welche die Funktion von CPn0678 regional stark verstärken können (4). Zu frühen Zeitpunkten der Infektion interagiert endogenes CPn0678 mit endogenem, intrazellulärem SNX9 *in vivo* (5). CPn0678 ist somit vermutlich für die beobachtete Rekrutierung von SNX9 zur Internalisierungsstelle von *C. pneumoniae* verantwortlich. Für die spezifische Interaktion mit SNX9 ist die erste PRR mit seinem spezifischen RxxPxxP-Motiv essentiell. Weiterhin ist CPn0678 nicht nur beim ersten Kontakt des EBs mit der Wirtszelle an der PM detektierbar, sondern ebenfalls bis der endozytische Vesikel vollends geschlossen ist (6). Über transfiziertes CPn0678 konnte gezeigt werden, dass es direkten Einfluss auf die frühen Phasen der Infektion und auf die humane Endozytose nimmt (7). Dafür sind die synergetisch agierenden Funktionen des N-terminalen und C-terminalen Bereichs von CPn0678 gleichermaßen notwendig. Dieser Einfluss wird wahrscheinlich in der CAE über Caveolae, CLIC oder GEEC manifestiert, wie Kollokationen mit dem Zytoskelett und dessen Einflüsse auf Cpn0678-induzierte Membrantubuli vermuten lassen.

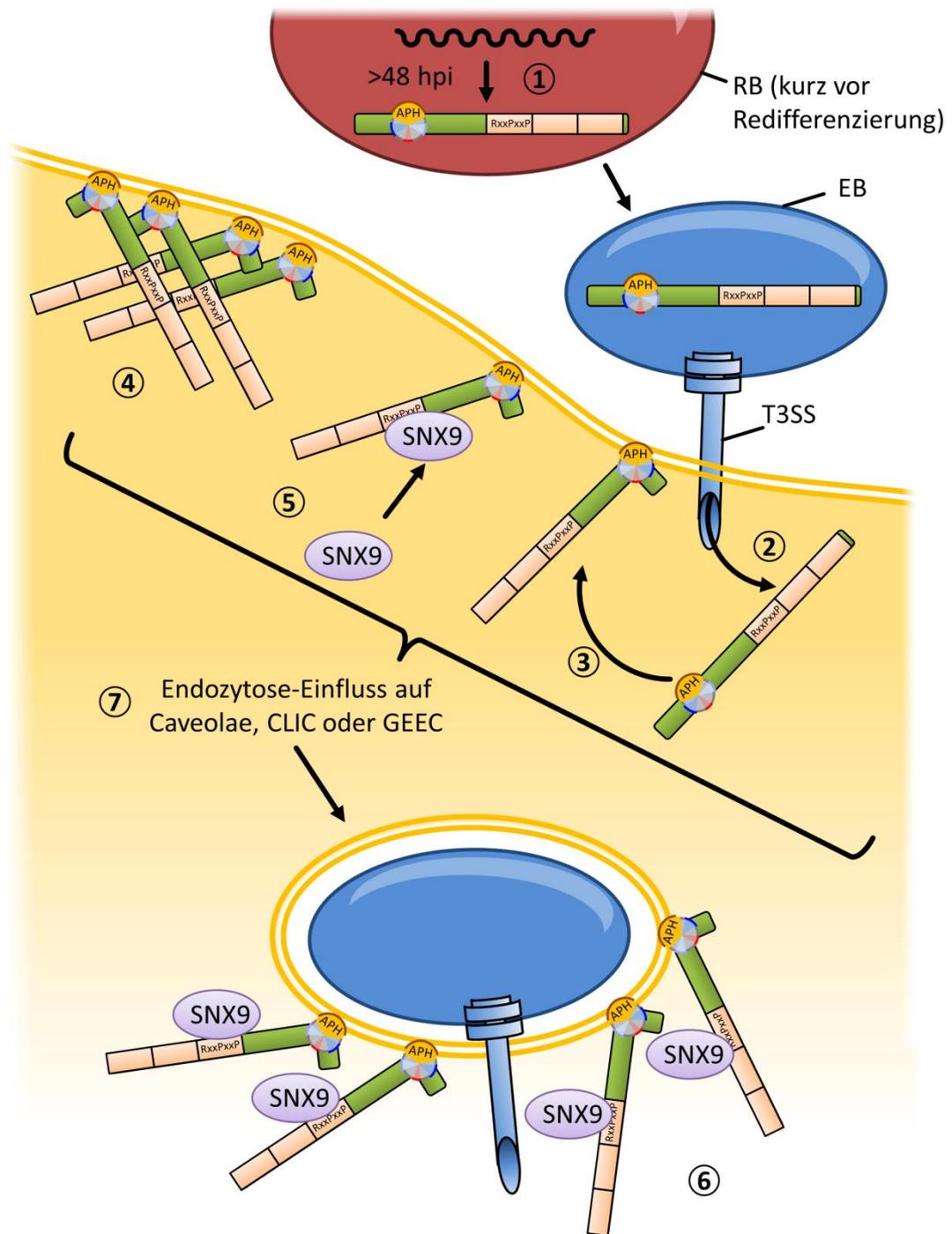


Abb. 5.10: Schematische Zusammenfassung der vorliegenden Beobachtungen zu CPn0678

Die einzelnen Teilaspekte sind in den vorangegangenen Kapiteln ausführlich erklärt. Einzelaspekte entsprechend der Nummerierungen sind im Fließtext zusammenfassend erwähnt.

Aufgrund der erhobenen Daten lassen sich einige Theorien und Funktionsweisen ableiten (Abb. 5.11). So könnte CPn0678 vor Sekretion von spezifischen Chaperonen gebunden werden, da mehrere potentielle Bindestellen für DnaK vorhanden sind (Abb. 5.11, 1). Das zum DnaK homologe Hsp70 könnte von CPn0678 rekrutiert werden und ebenfalls Einfluss auf die frühe Infektion der chlamydialen Partikel nehmen (1). Die N-terminale APH von

CPn0678 ist höchstwahrscheinlich in der Lage Membranen zu krümmen und scheint ein konserviertes Element unter vielen Gram-negativen Pathogenen wie *Yersinia*, *Salmonella*, *Pseudomonas* und *Chlamydiae* zu sein (2). Diese könnte maßgeblich zur Formgebung des früh entstehenden chlamydialen Einschlusses beitragen. Einhergehend damit könnte CPn0678 Spezifität für bestimmte PIPs oder PtdSer während der Internalisierung vermitteln (3). Die Oligomerisierung von CPn0678 könnte in Verbindung mit der SNX9-Interaktion eine Aktivierung von SNX9 auslösen. Die Oligomerisierung könnte dabei mögliche membrankrümmende Effekte von CPn0678 und SNX9 regional verstärken. Die Aktivierung hätte eine Rekrutierung der PI3K und PI5K bzw. der Aktivierung von N-WASP und Dynamin zur Folge. Diese wiederum würden die Synthese von PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃ bewirken welche in einem selbstverstärkenden Effekt auf die Endozytose-Maschinerie in der frühen Infektion resultiert (4).

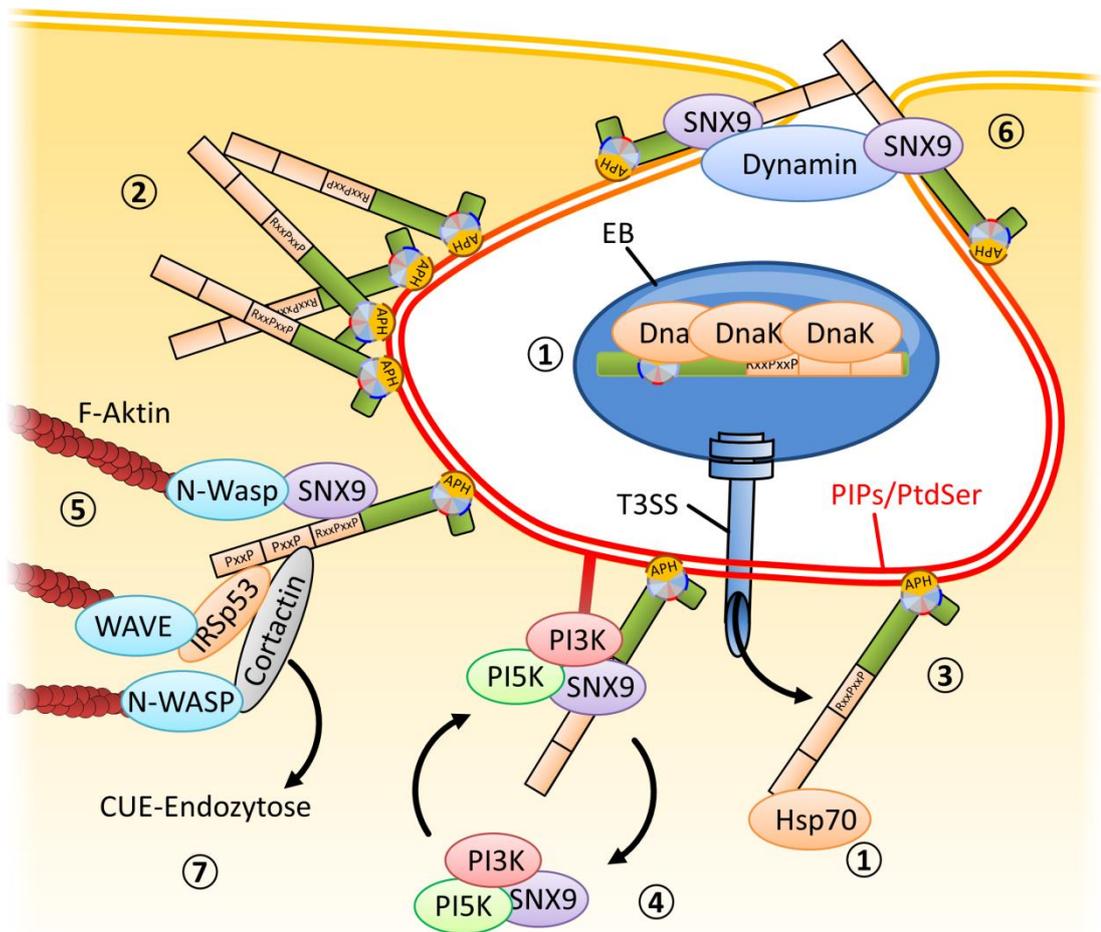


Abb. 5.11: Modell möglicher Funktionen von CPn0678 während der chlamydialen Infektion

Die Abbildung zeigt CPn0678 mit möglichen Funktionen während der Frühphasen der Infektion von *C. pneumoniae*. Die einzelnen Teilaspekte sind in den vorangegangenen Kapiteln ausführlich erklärt. Einzelaspekte entsprechend der Nummerierungen sind zusammenfassend im Fließtext erwähnt.

Die SNX9-induzierte Aktivierung von Dynamin und Aktin-Polymerisation über N-WASP könnten zum erfolgreichen Schließen und zur generellen Stabilisierung des endozytotischen Vesikels beitragen (5, 6). Die Bindung von Cortactin und IRSp53 könnte zuletzt eine Verbindung zwischen Infektion, Rezeptor-vermittelter Endozytose und Aktin-Modulation während der frühen chlamydialen Internalisierung darstellen (7).

Das ursprünglich vermutete Adhäsionsprotein CPn0678 konnte so im Laufe dieser Arbeit erstmals erfolgreich als früh sekretiertes Effektorprotein von *C. pneumoniae* beschrieben werden. CPn0678 beeinflusst maßgeblich die chlamydiale Internalisierung, wobei die Interaktion mit SNX9 vermutlich eine zentrale Rolle einnimmt. Bis jetzt nur unzureichend verstandene Domänen bergen Potential für weitere interessante Funktionen von CPn0678, welche seine besondere Funktion als Schlüsselprotein der chlamydialen Internalisierung noch verstärkend untermauern könnten.

6 Anhang

Abb. 6.1: Makro zu Auswertung der InCA-CPn0712-Kolokalisation

Dokumentation eines selbstgeschriebenen Makros für das Programm „MBF-ImageJ“ um im Hochdurchsatz CPn0712-Signale (grün) zu identifizieren, die mit InCA-Signalen (rot) kolokalisieren. Eine Beispielauswertung ist in Abb. 6.2 dargestellt.

```
// Macro is based on simple intensity correlation analysis between red and green.
// It needs 3 channel picture (C1=green, C2=red, C=users choice) in *.lsm format and
// is intended to be run at MBF-ImageJ V1.43m.
// Correlating regions with minimum size of 10 pixel will be counted.
// Results are returned to the user as a table providing counted objects per
// slice and giving simple statistical feature data of objects for quality control.
run("*.LSM Zeiss confocal", "");
makeRectangle(5, 5, (getWidth()-10), (getWidth()-10));
run("BG Subtraction from ROI", "number=3");
run("Split Channels");
selectWindow("C3-"+File.name);
    close();
selectWindow("C1-"+File.name);
    rename("Green");
selectWindow("C2-"+File.name);
    rename("Red");
run("Intensity Correlation Analysis", "channel_=Green channel_=Red channel_[Red : Green] use=None
    crosshair=3 display");
selectWindow("+vePDM Values - Green and Red");
run("Make Binary", "calculate");
run("Watershed", "stack");
    middle = nSlices/2;
    run("Set Slice...", "slice="+nSlices);
    while (nSlices>(middle))
    {
        run("Delete Slice");
    }
    end = nSlices;
    for (i=1; i<=nSlices;i++)
    {
        setSlice(i);
        setMetadata("Label", "Z="+i);
    }
selectWindow("PDM Values - Green and Red");
    close();
selectWindow("ICA plot -Red: ch2");
    close();
selectWindow("ICA plot -Green: ch1");
    close();
selectWindow("Green and Red Freq. CP");
    close();
selectWindow("Green and Red Freq. CP");
    close();
run("Analyze Particles...", "size=10-5000 pixel circularity=0.00-1.00 show=Outlines display summarize stack");
run("Colour merge", "first=Green first=Green second=Red second=Red keep %=0");
selectWindow("Colour merge");
rename("Merged");
selectWindow("Drawing of +vePDM Values - Green and Red");
rename("Selection");
run("Invert", "stack");
run("RGB Color");
selectWindow("Selection");
imageCalculator("Add stack", "Selection", "Merged");
```

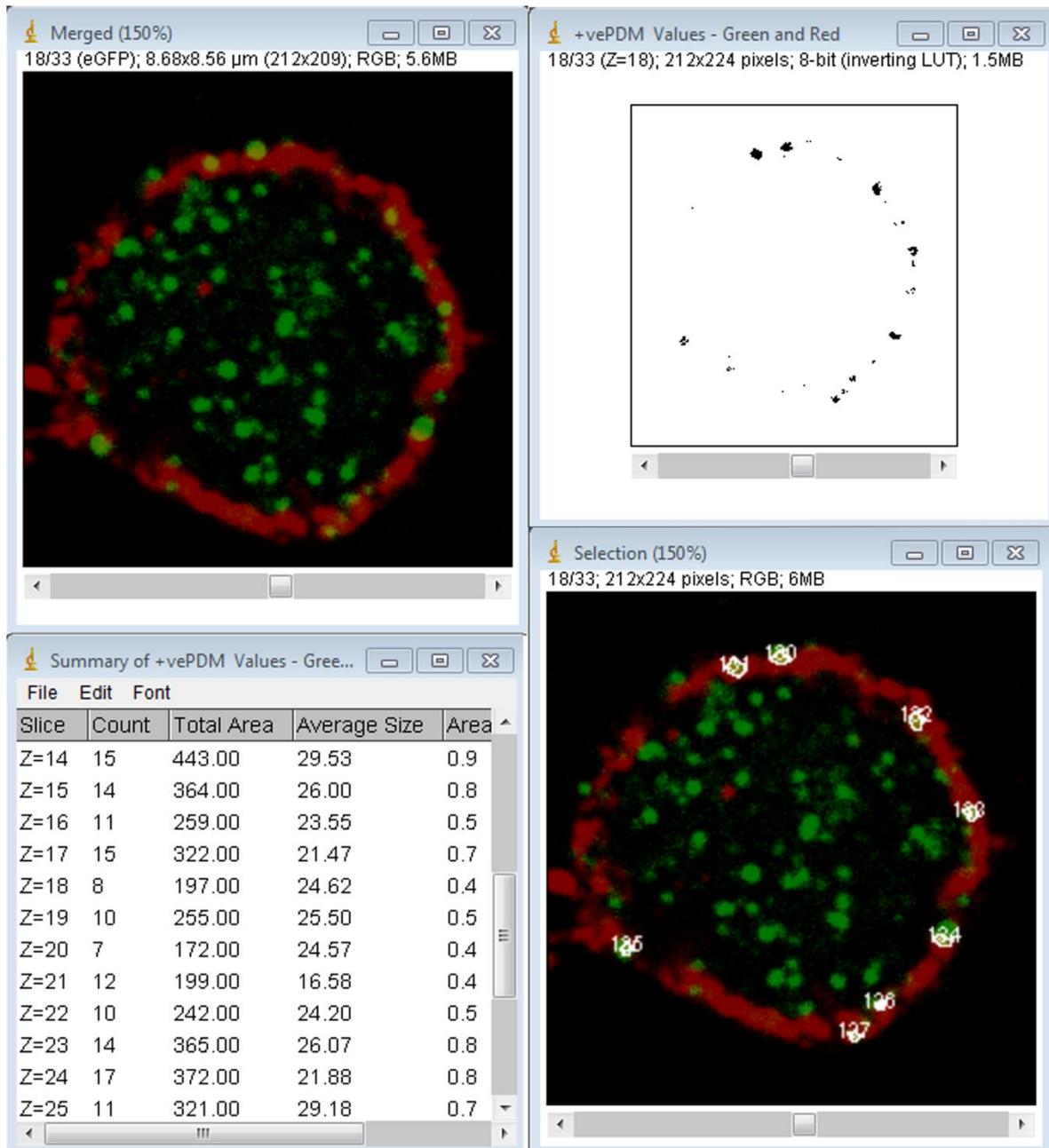


Abb. 6.2: Beispielauswertung durch das Makro zur Analyse der CPn0712-IncA-Kolokalisation

Aufgezeigt ist ein Beispielergebnis über das Auswertungsmakro (Abb. 6.1) für CPn0712 und IncA. Darstellung beider relevanten Kanäle nach einzelner automatisierter Hintergrundkorrektur als Z-Stapel (oben links). Erstellte Maske nach Intensitätskorrelation beider Kanäle, in der alle kolokalisierende Pixel (px) mit signifikanter Intensität in beiden Kanälen als schwarze Bereiche markiert werden (oben rechts). Tabelle der Auszählung aller korrelierten Signale mit einer Mindestgröße von 10 px als Schwellenwert (unten links). Darstellung aller gezählten Signale mit Identifikationsnummer pro Ebene aus der Ergebnistabelle in der überlagerten Ansicht bei der Kanäle (unten rechts).

Abb. 6.3: Proteinsequenz von CPn0678

Aufgeführt ist die Proteinsequenz von CPn0678 mit Annotation der mittels „*NetSurfP*“ vorhergesagten α -Helix (schwarzer Strich). Positiv geladene Aminosäuren sind rot markiert. Nummern geben die Aminosäureposition an. Schwarze Pfeilspitzen markieren positive Aminosäuren, die in CPn0678-RRRA^{GFP} ausgetauscht wurden (vgl. Kap. 4.2.2.2). NCBI-ID ist im elektronischen Anhang hinterlegt.

```

CPn0678  1  MSVNPSGNSKNDLWITGAHDQHPDVKESGVTSANLGSHRVTASGGRQGLL  50
          APH          ▼      ▼      ▼
CPn0678  51  ARIKEAVTGFFSRMSFFRSGAPRGSQQPSAPSADTVRSPLPGGDARATEG  100
CPn0678 101  AGRNLIKKGYQPGMKVTIPQVPGGGAQRSSGSTTLKPTRPAPPPPKTTGGT  150
CPn0678 151  NAKRPATHGKGPAPQPPKTGGTNAKRAATHGKGPAPQPPKGILKQPGQSG  200
CPn0678 201  TSGKKRVSWSDED  213

```

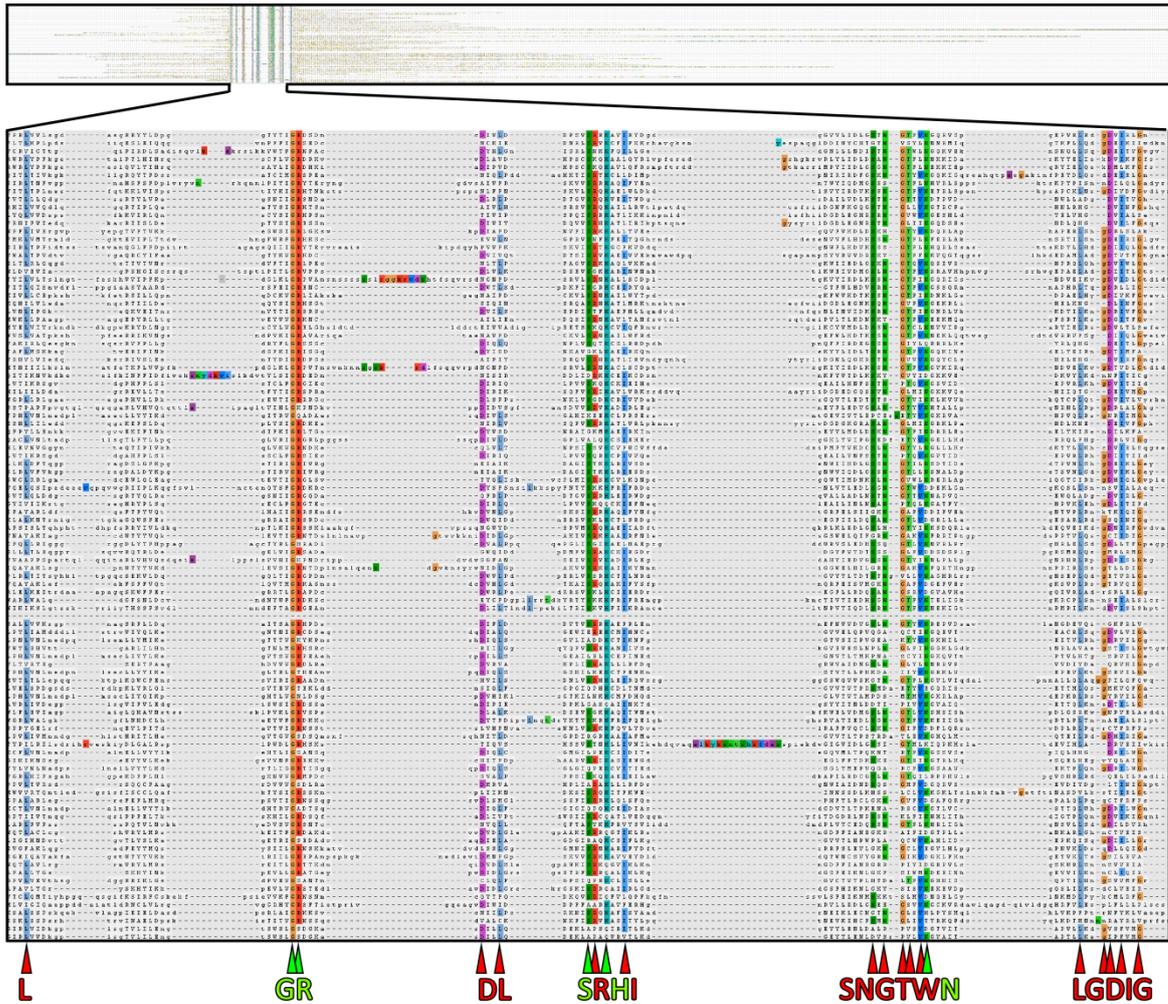


Abb. 6.4: Alignment von 100 Proteinen mit FHA-Domänen

Alignment von 100 phylogenetisch divergenten Proteinen mit FHA-Domänen. Aus diesem Alignment wurde die Konsensussequenz entnommen, die in Abb. 5.2 verwendet wurde (oben). Ein Bereich aus dem vollen Alignment wurde vergrößert dargestellt. Identische Aminosäuren, sind mit roten (> 50 % identisch) respektive grünen (> 75 %) Pfeilspitzen und Beschriftungen markiert (unten). Das volle Alignment kann im elektronischen Anhang eingesehen werden. Verwendete NCBI-IDs sind im elektronischen Anhang hinterlegt.

Abb. 6.5: Alignment von CPn0677 und CPn0678

Schwarz hinterlegt sind Aminosäuren, die in beiden Sequenzen identisch sind. Alignment mittels „ClustalOmega“ erstellt. Nummern geben Aminosäurepositionen in den jeweiligen Proteinen an. NCBI-IDs sind im elektronischen Anhang hinterlegt.

CPn0678	1	MSVNPSGNS-KNDLWITGAHDQHPDVKESGVTSANLGS	HRV	TASGGRQGL	49		
CPn0677	1	MGINPSGNRSPDDVWVRGAQGDSSSTQGTGATNSNLGAHNV	TT	TSTSQPQV	50		
CPn0678	50	LARIKEAVTGFFSRMSFFR-SGAPRGSQ	QPSAPSADTVRSPLPGGDARAT	98			
CPn0677	51	ASKAKQLW---QTVREFFLGKKS	PDSSQ	-----	75		
CPn0678	99	EGAGRNLIKKGYQPGMKVTIPQVPGGAQRSSGSTTLK	PTRPAPPPP	KTG	148		
CPn0677	75	-----	GASGPAMQSPSGPTIR	PTRPAPPPP	ITG	103	
CPn0678	149	GTNAKRPATHGKGPAPQPPKTGGTNAKRAATHGKGPAPQPPKGI	LKQPGQ	198			
CPn0677	104	GANA	KRPATHGKGRAPQPPTAGSSSSGSEQPTAMSSEVAKLV-SELKDAVH	152			
CPn0678	198	-----	SGTSGKKRVS	WSD	ED	-----	213
CPn0677	153	SHAESQKVLKKV	SELQTK	TDWENNRGPDYLLHGYRVIARALQQTYTEQ	202		
CPn0678	213	-----	-----	-----	213		
CPn0677	203	SMLIEGTSSTGPVPQAVTVAKDAVTQTVRGA	IKNLENPKPGNDPDGVLMQ	252			
CPn0678	213	-----	-----	-----	213		
CPn0677	253	VVISLGI	EGPTLDPGESIQNLETRVSDFGDDSDIDYTSDIARLGSALD	302			
CPn0678	213	-----	-----	-----	213		
CPn0677	303	RVRENHPNEMPRIWIALARELGA	AAVHSHATSVRIANAGKNHTRDVVRMAN	352			
CPn0678	213	-----	-----	-----	213		
CPn0677	353	ESSRLLQGMKVL	SVGAWANTMTVLI	GDLFE	382		

Abb. 6.6: Volles Alignment unterschiedlicher sekretierter Effektoren aus Gram-negativen Bakterien

In der Diskussion hervorgehobene Bereiche (APHs / Arg.-Finger) sind gelb markiert. Schwarz hinterlegt sind Aminosäuren, die in > 60 % der Sequenzen konserviert sind. Alignment mittels „ClustalOmega“ erstellt. Nummern geben Aminosäurepositionen in den jeweiligen Proteinen an. NCBI-IDs sind im elektronischen Anhang hinterlegt.

CPn0678	1	-----MSVNPISGN---SKNDLWITGAHDQ-----	21
CPn0677	1	-----MGINPISGNR---SPDDVWVRGAQGD-----	22
Cpsi0741	1	-----MGINPISGHSRN--NNNDLWISGAHNQ-----	24
CT694	1	-----MSIRPTNGSGN--GYSSINPSN-DNQ-----	23
ExoS	1	-----MHIQSLQQS-----PSFAVEL--HQAAS	21
YopE	1	-----MKISSFIS-----TSLPLPA--SVSGS	20
SptP	1	MLKYEERKLNNLTLSSFSKVGVSNDARLYIAKENTDKAYVAPEKFSKVL	50
CT695	1	-----MSSISPIGGN---SGPEGFSSASRGDEIDDPD-----	30
CPn0678	21	-----HPDVKESGVTSAN	34
CPn0677	22	-----SSSTQGTGATNSN	35
Cpsi0741	24	-----HEDVQDAGNSSSG	37
CT694	23	-----DGLVQST--SGPN	34
ExoS	22	GRLGQIE--ARQVA-----TPSEAQ-----Q	40
YopE	21	SSVGEMS--GRSVSQQK-----SDQYAN-----N	42
SptP	51	TWLGKMPLEFKNTEVVQKHTENIRVQDQKILQTFHLALTEKYGETAVNDAL	100
CT695	31	SEEGELE-----ERVSDHAESIITESS-----ETLFRTTSSSGVSEDL	68
CPn0678 amphipathische Helices			
CPn0678	34	-LGSHRVTA---SGGRQGLLARIKEAVTGFFSRMS--FFRSGAPRGSQQPS	79
CPn0677	35	-LGAHNVTTSTSQPQVASKAKQLWQTVREFF-----LGKKSPPDSSQGAS	78
Cpsi0741	38	VVGSHNISTQNNTRESSGFLSRVTSAVRNFFSSIF--GSSSSRANSRAS	84
CT694	34	-YEGHTV---SSRGGFQGCARIANLFRNCFSRN-----	64
ExoS	41	LAQR-----QDAPKGEGLLARLGAALMRPFVAIMDWLGKLLGSHARTGP	84
YopE	43	LAGR-----TESPQSSSLASRIIERLSSMAHSVIGFIQRMFSEGS--HKP	85
SptP	101	LMSR---INMNKPLTQRLAVQITECVKAADEGFINLIKSKDNVGVNRNA	146
CT695	68	-Q-Q--HVSLEESPRQRGFLGRIRDVAVASIWKRRVARNEN--YDVKKA-	111
CPn0678	80	AP-----SAD-----	84
CPn0677	79	GP-----	80
Cpsi0741	85	TPTP--PEVSSRRSSVSS-----FASSMDISDSEAETM	115
CT694	64	-----	64
ExoS	85	QPSQDAQPAMSSAVVFKQMVLOQALPMTLKGLD--KASELATLTPEGLAR	133
YopE	86	VVTPALTPAQMPSPTSFSDSIKQLAAETLP--K-YMQQLSSSLDAETLQK	131
SptP	147	LVIKGGDTKVAEKNNDVGAESKQPLLDIALKGLKRTLPOLEQMDGNSLRE	196
CT695	111	-----EEQQGIVQYLQDSKMPALTRAYRHLR-----	137
pot. Arg-Finger Motif			
CPn0678	84	-----TVRSPLPGGDARATEGAGRNLIKKGYQPGMKVTIPQVP	122
CPn0677	80	-----	80
Cpsi0741	116	SFSSFGLGESKEKSTSSSSLD SARSTEGAAARGLOKKGKYGKQIKVDIPKVP	165
CT694	64	-----	64
ExoS	134	EHSRLA-----SGDGALRSLSTAL--AG---IRAGS	159
YopE	132	NHDQFA-----TSGPLRGSITQC--QG---LMQFC	157
SptP	197	NFQEMA-----SGNGPLRSLMTNL--QN---LNKIP	222
CT695	137	-----	137
zugehörige Arg-Finger-Schleife			
CPn0678	123	GGGAQRSSGSTTLKPTRAPPPPKTGGTNAKRPATHGKGPAPQPPKTGG--	171
CPn0677	80	--AMQSPSGPTIRPTRAPPPPTTGGANAKRPATHGKGRAPQPPTAGSS	127
Cpsi0741	166	DRASG-----PKRPNTPPPPPTSSSVRTT--PRGVNLASVVTSSAS	206
CT694	64	-----RGTTPPSRPVITQANIHHPTISGQGAQPIVSTGDK--	100
ExoS	160	QVEES-----RIQAGRLLEERSIGGIALQQWGTGGGA	190
YopE	158	G-GEL-----QAEASAILNTPVCGGIPFSQWGTVGGGA	187
SptP	223	EAKQL-----NDYVTTLTNIQVGVARFSSQWGTCCGGE	253
CT695	137	-----	137

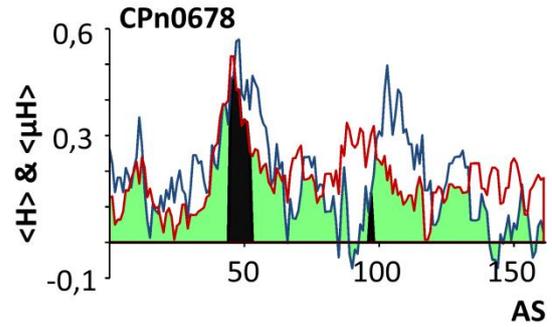
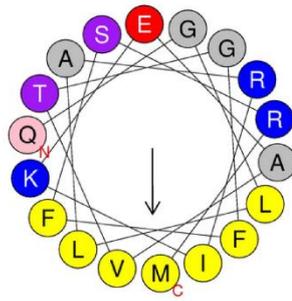
CPn0678	171	-TNAKRAA-----	-----THGKGPAQPPK----	190
CPn0677	128	SGSEQP-----	-----	133
Cpsi0741	207	QAASESSA-----	-----RPLKRRKAPQPPAGGPP	230
CT694	100	-----	-----	100
ExoS	191	ASQLVLDASPEL-----	-----RREITDQLHQVMSEVALLRQA-----	223
YopE	188	ASAYVASGVDLT--QAANEIKGLGQQMQQLLSLM-----	-----	219
SptP	254	VERWVDKASTHELTQAVKKIHVIAKELKNVTAELEKIEAGAMPQTMSSGP	-----	303
CT695	137	-----	-----	137
CPn0678	190	-GILKQPGQSG-----	-----	200
CPn0677	133	-----TAMSSEV-----	-----AKLVSELKDAV-HSHAESQ	158
Cpsi0741	231	KAKLQRQDSSASISSSGSSDSVTSRSSEEVSAAGIADKLKAELEAHHKTKQ	-----	280
CT694	100	-----	-----KLDSAITQADLRAQ-----	114
ExoS	223	-----VESEV-----	-----SRV	231
YopE	219	-----	-----	219
SptP	304	TLGLARFAVSSIP-----	-----INQ	319
CT695	137	-----	-----	137
CPn0678	200	-----TSGKKRVSWSD-----ED-----	-----	213
CPn0677	159	KVLKQVSELOQTKWTD-----WENNRG-----	-----PDYLLHGY-----RV	190
Cpsi0741	281	EQLTRLSDQIRERWTN-----HENEEP-----	-----VAYKLACL-----QT	312
CT694	114	-NKQTLATHIQSKLGS-----MEGQSP-----	-----QDYKAGAY-----SA	145
ExoS	232	SADKALADGLVKRFGADAKEYLGRQPGGIHSDAEVMALGLYTG--IHYAD	-----	279
YopE	219	-----	-----	219
SptP	320	QTQVKLSDGMPVPVN--TLTFDGK-----	-----PVALAGSYPK--NTPD-	355
CT695	137	-----	-----AFNSACLRTIREFFAT	153
CPn0678	213	-----	-----	213
CPn0677	191	IARALQQT-YTEQ-----SMLIEGTSSTGPVPQAV-----	-----TVAKDAVTQT	229
Cpsi0741	313	VTSRLGQA-RLEAQQEMSVLRPGIH-EFPLKTA-----	-----IS	345
CT694	146	LRLM-----LFTPGET-----	-----TV-----SSERERQACV	168
ExoS	280	LNRRALRQGGELDAGQ--KL-IDQGMSA-----	-----AFEKSGQAEQ	313
YopE	219	-----	-----	219
SptP	355	-----ALEAHM--KMLLEKECSCLV--VL-----	-----TSEDQMQAKQ	385
CT695	154	IFRALRDAYRHC-----	-----TRSGINFCGADKDSLEVLVAVGLLLRMATLR	197
CPn0678	213	-----	-----	213
CPn0677	229	-----VRG-----AIKNLENPKPGNDPDGVLN-----	-----QVVISLGI	259
Cpsi0741	345	-----LSR-----SIWDLGEKEQRQDGESVLL-----	-----PLLVRMGL	375
CT694	168	-----TGR-----DLWEQAAGDLATNGNTDGL-----	-----MLMANLSV	198
ExoS	314	VVKTFRGRGGDAFNAVEEGKVGHDDGYLSTSLNPGVARSFGQGTISTVF	-----	363
YopE	219	-----	-----	219
SptP	386	LPPYFRGSY--TFGEVHTNSQ-----KVSS-ASQGEA--IDQYNMQLSC	-----	424
CT695	198	SFEHVGGNYEDRLV-----	-----NNDAP-----VT	218
CPn0678	213	-----	-----	213
CPn0677	259	-EGPTLDP-----	-----GESIQNLETRVSDFGDD-----	285
Cpsi0741	375	-EGPKLGH-----	-----NEDFVNYVDQLIDEYGDLD-----	401
CT694	198	-GGKH-VP-----	-----AGHLREYMDTVKGTFTDEN-----	223
ExoS	363	--GRSGID-----	-----VSGISNYKNEKEILYNKET-----	388
YopE	219	-----	-----	219
SptP	425	GEKRYTIP-----	-----VLHVKNWPDHQPLPSTDQL-----	451
CT695	219	GACRTLVDVDDIESILNTRTNWPDHQVMIQFSRGLVQLCATPYNATSQE	-----	268
CPn0678	213	-----	-----	213
CPn0677	285	-----SDIDYT--SDIARLGSALDRVRENHPNEMPRIWIAL-----	-----	319
Cpsi0741	401	-----ENYDWK--DSLQSLARDLNSLKEVNPNGMKFWSSF-----	-----	435
CT694	223	-----KATDPTVDAILDLAAKIDATEFSSPGS--GOVILNY-----	-----	257
ExoS	388	-----DM-----	-----RVLLSASDEQGVTRRVLEE-----	409
YopE	219	-----	-----	219
SptP	451	-----EY-----	-----LADRVKNSNQNGAPGRSSSDKHL-----	476
CT695	269	CFKSIVRLEKEDSSSDYS--QALLLAGIIDHLEAKAPMAAKYVLDA-----	-----	312

CPn0678	213	-----	213
CPn0677	319	---ARELGAAVHS--HATSVRIANA-----GKNH-----	343
Cpsi0741	435	---AGKGEITVRM--LANRYASANV-----GKYD-----	459
CT694	257	---IGNCGQVVLENEEMNQLILGDQ-----NGQD-----	283
ExoS	409	---AALGEQSGHSQGLLDALDLASK-----PERS---GEVQ	439
YopE	219	-----	219
SptP	477	PMIHCLGG-VGRTGTMAAALVLKDN-----PHSN---LEQV	508
CT695	312	-----LRVRASELIGELIILDLLPPVWKVGRGGVFPPVNEQLVVQIV	354
CPn0678	213	-----	213
CPn0677	344	TRDVVRMANESSRLQ---GMKVLSVGAWANTMTVLIGDLFE---	382
Cpsi0741	460	PSSVQVERRWAGALD---LMKFLSSEAYVKTTSILAYDAFTVSEG--	502
CT694	284	PQHVDNSKELQKLE---NARKTDPELYFQTLTVITSSVFLD---	323
ExoS	440	EQDV-RLR-----MRGLD--LA-----	453
YopE	219	-----	219
SptP	509	RADF-RDSRNNRMLEDASQFVQLKAMQAQLLMTTAS-----	543
CT695	355	NANVERLH-----STFAHEPQAYLRMIEGLVTNFFFLPSEED	391
CPn0678	213	-----	213
CPn0677	382	-----	382
Cpsi0741	502	-----	502
CT694	323	-----	323
ExoS	453	-----	453
YopE	219	-----	219
SptP	543	-----	543
CT695	392	PSSVGNI	398

A

APH-CPn0678
(wildtypisch)

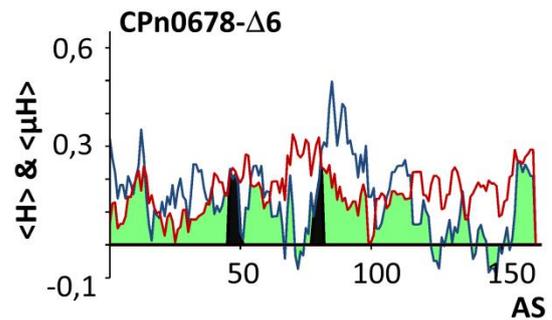
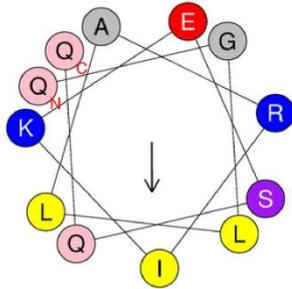
$\langle H \rangle = 0,456$
 $\langle \mu H \rangle = 0,523$



B

APH-CPn0678
($\Delta 6$ -Deletion)

$\langle H \rangle = 0,181$
 $\langle \mu H \rangle = 0,392$



APH-CPn0678
($\Delta 6$ -Deletion)
(ergänzt)

$\langle H \rangle = 0,100$
 $\langle \mu H \rangle = 0,190$

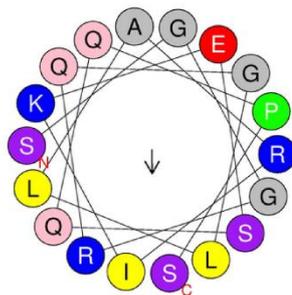


Abb. 6.7: Vergleich der APH von CPn0678 und CPn0678- $\Delta 6$

Dargestellt wurden die jeweiligen vorhergesagten N-terminalen APHs von CPn0678 (A) und CPn0678- $\Delta 6$ (B) in der helikalen Projektion (links) und $\langle H \rangle$ und $\langle \mu H \rangle$ für die ersten 160 Aminosäuren analog zu Abb. 5.5 / Abb. 5.7 (rechts). Aminosäureabfolge ist von N- nach C-terminal angedeutet. Die Richtung des hydrophoben Moments ist als Pfeil dargestellt. Wegen der Verkürzung durch die $\Delta 6$ -Deletion ist ebenfalls die ergänzte Ansicht der APH mit flankierenden AS unterhalb dargestellt.

TARP	738	QEASSGYTPSAWRRGHQVNFGEIFEKPNDFNKINWGTQAGPSSSEDDGISF	787
CPn0572	300	KESSSGYTPSAWRRGAKVETGPIWDDVGGLKGINWKTPAP-----DFSF	344
TARP	788	SNETPGAGPAAAPSPTP----SSIPVINVNVVGGTNVNIIRDITNVNTTNT	833
CPn0572	345	INETPGGGAHSTSHHTGPGTPVGATVVPNVNVNLGGIKVDLGGINLGGITT	394
TARP	834	TPTTQSTDA-----STDTSIDININTNNQTDDIN--TTDKDSDGAGGV	874
CPn0572	395	NVTTEEGGNTITSTKSTSTDDKVSITSTGSQSTIEEDTIQFDDPGQGED	444
TARP	875	NGDISETESSGDDSGSVSSSESDKNASVGN DG PAMKDILSAVRKHLDVV	924
CPn0572	445	DNAIPGTNTPP--PPGPPPNL--SSRLLTISNASLNQVLQNVQRHLNTA	490
TARP	925	YPGDNGGSTEGPLQANQTLGDIVQDMETTGTSTQETVVS PWKGSTSSTG--	972
CPn0572	491	YDSNGNSV----SDLNQDLGQVVKNSENGVNFPTVILPKTTGDTDPGQA	536
TARP	972	---SAGGSGSVQTL LPS-----PPPTPSTTTLRGT--GATTT	1005
CPn0572	537	TGGVTEGGGHIRNIIQRNTQSTGQSE GATPTPQPTIAKIVTSLRKANVSS	586
TARP	1006	SLMMGGPIKADIITTTGGGGRIPGGGTLEKLLPRIRAHLDISFDAQGD LVS	1055
CPn0572	587	SSVLPQPQVA-----TTITPQART-----AS	607
TARP	1056	TEEPQLGSIVNK---FRQETGSGGIVASVESAPGKPGSAQVLTGTGGDKG	1102
CPn0572	608	TSTTSIGTGETESTTSTGTGTGSV-STQSTGVGTPTTTTRSTGTSATTT	656
TARP	1102	-----NLFQA--AAAVTQALGNVAGKVNLAIQGQKL---SSLVN	1136
CPn0572	657	TSSASTQTPQAPLPSGTRHVATISLVRNAAGRSIVLQGGRSQSFPIPPS	706
TARP	1137	DDGKGSVGRDLFQAATQTTQALSSLIDTVG-----	1166
CPn0572	707	GTGTQNMGAQLWAAASQVASTLGQVVNQAATAGSQPSSRRSSPTSPRRK	755

Literaturverzeichnis

- Abdelrahman YM, Belland RJ. 2005. "The chlamydial developmental cycle". FEMS microbiology reviews 29:949-959.
- Abou-Kheir W, Isaac B, Yamaguchi H, Cox D. 2008. "Membrane targeting of WAVE2 is not sufficient for WAVE2-dependent actin polymerization: a role for IRSp53 in mediating the interaction between Rac and WAVE2". Journal of cell science 121:379-390.
- Aeberhard L, Banhart S, Fischer M, Jehmlich N, Rose L, Koch S, Laue M, Renard BY, Schmidt F, Heuer D. 2015. "The Proteome of the Isolated Chlamydia trachomatis Containing Vacuole Reveals a Complex Trafficking Platform Enriched for Retromer Components". PLoS pathogens 11.
- Ahmad FJ, Hughey J, Wittmann T, Hyman A, Greaser M, Baas PW. 2000. "Motor proteins regulate force interactions between microtubules and microfilaments in the axon". Nature Cell Biology 2:276-280.
- Alto NM, Weflen AW, Rardin MJ, Yarar D, Lazar CS, Tonikian R, Koller A, Taylor SS, Boone C, Sidhu SS, Schmid SL, Hecht GA, Dixon JE. 2007. "The type III effector EspF coordinates membrane trafficking by the spatiotemporal activation of two eukaryotic signaling pathways". The Journal of cell biology 178:1265-1278.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. "Basic local alignment search tool". J Mol Biol 215:403-410.
- Alushin GM, Lander GC, Kellogg EH, Zhang R, Baker D, Nogales E. 2014. "High-resolution microtubule structures reveal the structural transitions in alpha-tubulin upon GTP hydrolysis". Cell 157:1117-1129.
- Badour K, McGavin MKH, Zhang JY, Freeman S, Vieira C, Filipp D, Julius M, Mills GB, Siminovitch KA. 2007. "Interaction of the Wiskott-Aldrich syndrome protein with sorting nexin 9 is required for CD28 endocytosis and cosignaling in T cells". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104:1593-1598.
- Banerjee D, Liu AP, Voss NR, Schmid SL, Finn MG. 2010. "Multivalent display and receptor-mediated endocytosis of transferrin on virus-like particles". ChemBiochem 11:1273-1279.
- Barouch W, Prasad K, Greene LE, Eisenberg E. 1994. "ATPase activity associated with the uncoating of clathrin baskets by Hsp70". The Journal of biological chemistry 269:28563-28568.
- Barry CE, Hayes SF, Hackstadt T. 1992. "Nucleoid Condensation in Escherichia-Coli That Express a Chlamydial Histone Homolog". Science 256:377-379.
- BASHH. 2013. "Sexually Transmitted Infections in Primary Care". RCGP Sex, Drugs, HIV and Viral Hepatitis Group 2:56-57.
- Bavoil P, Kaltenboeck B, Greub G. 2013. "In Chlamydia veritas". Pathog Dis 67:89-90.
- Beatty WL, Byrne GI, Morrison RP. 1993. "Morphologic and antigenic characterization of interferon gamma-mediated persistent Chlamydia trachomatis infection in vitro". Proc Natl Acad Sci U S A 90:3998-4002.
- Becker E. 2013. "Charakterisierung der chlamydialen Pmp Adhäsion Familie". Dissertation.
- Becker E, Hegemann JH. 2014. "All subtypes of the Pmp adhesin family are implicated in chlamydial virulence and show species-specific function". Microbiologyopen 3:544-556.
- Benavides M, Chow-Tsang LF, Zhang JS, Zhong HL. 2013. "The novel interaction between microspherule protein Msp58 and ubiquitin E3 ligase EDD regulates cell cycle progression". Bba-Mol Cell Res 1833:21-32.
- Betts-Hampikian HJ, Fields KA. 2010. "The Chlamydial Type III Secretion Mechanism: Revealing Cracks in a Tough Nut". Frontiers in microbiology 1:114.
- Betts-Hampikian HJ, Fields KA. 2011. "Disulfide bonding within components of the Chlamydia type III secretion apparatus correlates with development". Journal of bacteriology 193:6950-6959.

- Betts HJ, Twigg LE, Sal MS, Wyrick PB, Fields KA. 2008. "Bioinformatic and biochemical evidence for the identification of the type III secretion system needle protein of *Chlamydia trachomatis*". Journal of bacteriology 190:1680-1690.
- Blasi F, Tarsia P, Aliberti S. 2009. "*Chlamydomonas reinhardtii*". Clin Microbiol Infect 15:29-35.
- Botelho RJ, Teruel M, Dierckman R, Anderson R, Wells A, York JD, Meyer T, Grinstein S. 2000. "Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis". Journal of Cell Biology 151:1353-1367.
- Brady JP, Claridge JK, Smith PG, Schnell JR. 2015. "A conserved amphipathic helix is required for membrane tubule formation by Yop1p". Proc Natl Acad Sci U S A 112:E639-648.
- Bretsche.Ms. 1972. "Asymmetrical Lipid Bilayer Structure for Biological-Membranes". Nature-New Biol 236:11-&.
- Brickman TJ, Barry CE, Hackstadt T. 1993. "Molecular-Cloning and Expression of Hctb Encoding a Strain-Variant Chlamydial Histone-Like Protein with DNA-Binding Activity". Journal of bacteriology 175:4274-4281.
- Brown FD, Rozelle AL, Yin HL, Balla T, Donaldson JG. 2001. "Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic". The Journal of cell biology 154:1007-1017.
- Bullock HD, Hower S, Fields KA. 2012. "Domain analyses reveal that *Chlamydia trachomatis* CT694 protein belongs to the membrane-localized family of type III effector proteins". The Journal of biological chemistry 287:28078-28086.
- Calloni G, Chen T, Schermann SM, Chang HC, Genevoux P, Agostini F, Tartaglia GG, Hayer-Hartl M, Hartl FU. 2012. "DnaK Functions as a Central Hub in the E. coli Chaperone Network". Cell Rep 1:251-264.
- Campa CC, Franco I, Hirsch E. 2015. "PI3K-C2 alpha: One enzyme for two products coupling vesicle trafficking and signal transduction". Febs Lett 589:1552-1558.
- Campellone KG, Welch MD. 2010. "A nucleator arms race: cellular control of actin assembly". Nature reviews. Molecular cell biology 11:237-251.
- Cantarelli VV, Kodama T, Nijstad N, Abolghait SK, Nada S, Okada M, Iida T, Honda T. 2007. "Tyrosine phosphorylation controls cortactin binding to two enterohaemorrhagic *Escherichia coli* effectors: Tir and EspFu/TccP". Cell Microbiol 9:1782-1795.
- Carlton J, Bujny M, Rutherford A, Cullen P. 2005. "Sorting nexins - Unifying trends and new perspectives". Traffic 6:75-82.
- Carter JD, Hudson AP. 2010. "The evolving story of *Chlamydia*-induced reactive arthritis". Curr Opin Rheumatol 22:424-430.
- Castilla EA, Wadowsky RM. 2000. "Effect of a *Mycoplasma hominis*-like *Mycoplasma* on the infection of HEP-2 cells by the TW-183 strain of *Chlamydia pneumoniae*". Journal of clinical microbiology 38:861-862.
- Chappie JS, Mears JA, Fang S, Leonard M, Schmid SL, Milligan RA, Hinshaw JE, Dyda F. 2011. "A pseudoatomic model of the dynamin polymer identifies a hydrolysis-dependent powerstroke". Cell 147:209-222.
- Chen YS, Bastidas RJ, Saka HA, Carpenter VK, Richards KL, Plano GV, Valdivia RH. 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:e1003954.
- Chi EY, Kuo CC, Grayston JT. 1987. "Unique ultrastructure in the elementary body of *Chlamydia* sp. strain TWAR". Journal of bacteriology 169:3757-3763.
- Chou AM, Sem KP, Wright GD, Sudhakaran T, Ahmed S. 2014. "Dynamin1 Is a Novel Target for IRSp53 Protein and Works with Mammalian Enabled (Mena) Protein and Eps8 to Regulate Filopodial Dynamics". Journal of Biological Chemistry 289:24383-24396.

- Cigliano RA, Sanseverino W, Cremona G, Consiglio FM, Conicella C. 2011. "Evolution of Parallel Spindles Like genes in plants and highlight of unique domain architecture". *Bmc Evol Biol* 11.
- Clifton DR, Fields KA, Grieshaber SS, Dooley CA, Fischer ER, Mead DJ, Carabeo RA, Hackstadt T. 2004. "A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:10166-10171.
- Coles AM, Reynolds DJ, Harper A, Devitt A, Pearce JH. 1993. "Low-nutrient induction of abnormal chlamydial development: a novel component of chlamydial pathogenesis?". *FEMS Microbiol Lett* 106:193-200.
- Coles CH, Bradke F. 2015. "Coordinating neuronal actin-microtubule dynamics". *Curr Biol* 25:R677-691.
- Collins A, Warrington A, Taylor KA, Svitkina T. 2011. "Structural Organization of the Actin Cytoskeleton at Sites of Clathrin-Mediated Endocytosis". *Current Biology* 21:1167-1175.
- Coombes BK, Mahony JB. 2002. "Identification of MEK- and phosphoinositide 3-kinase-dependent signalling as essential events during *Chlamydia pneumoniae* invasion of HEp2 cells". *Cell Microbiol* 4:447-460.
- Costa TR, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, Prevost MS, Redzej A, Trokter M, Waksman G. 2015. "Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights". *Nat Rev Microbiol* 13:343-359.
- Cullen PJ. 2008. "Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins". *Nat Rev Mol Cell Bio* 9:574-582.
- Czech MP. 2000. "PIP2 and PIP3: Complex roles at the cell surface". *Cell* 100:603-606.
- da Cunha M, Milho C, Almeida F, Pais SV, Borges V, Mauricio R, Borrego MJ, Gomes JP, Mota LJ. 2014. "Identification of type III secretion substrates of *Chlamydia trachomatis* using *Yersinia enterocolitica* as a heterologous system". *BMC microbiology* 14.
- Dautry-Varsat A, Subtil A, Hackstadt T. 2005. "Recent insights into the mechanisms of *Chlamydia* entry". *Cellular microbiology* 7:1714-1722.
- Day CA, Baetz NW, Copeland CA, Kraft LJ, Han B, Tiwari A, Drake KR, De Luca H, Chinnapen DJ, Davidson MW, Holmes RK, Jobling MG, Schroer TA, Lencer WI, Kenworthy AK. 2015. "Microtubule motors power plasma membrane tubulation in clathrin-independent endocytosis". *Traffic* 16:572-590.
- de Daruvar A, Collado-Vides J, Valencia A. 2002. "Analysis of the cellular functions of *Escherichia coli* operons and their conservation in *Bacillus subtilis*". *J Mol Evol* 55:211-221.
- Dean P. 2011. "Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection". *FEMS microbiology reviews* 35:1100-1125.
- Deng W, Li Y, Hardwidge PR, Frey EA, Pfuetzner RA, Lee S, Gruenheid S, Strynacka NC, Puente JL, Finlay BB. 2005. "Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens". *Infection and immunity* 73:2135-2146.
- Dersch P, Isberg RR. 1999. "A region of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self-association". *Embo Journal* 18:1199-1213.
- Desvaux M, Hebraud M, Talon R, Henderson IR. 2009. "Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue". *Trends Microbiol* 17:139-145.
- Dewitt S, Tian W, Hallett MB. 2006. "Localised PtdIns(3,4,5)P-3 or PtdIns(3,4)P-2 at the phagocytic cup is required for both phagosome closure and Ca²⁺ signalling in HL60 neutrophils". *Journal of cell science* 119:443-451.
- Disanza A, Bisi S, Winterhoff M, Milanesi F, Ushakov DS, Kast D, Marighetti P, Romet-Lemonne G, Muller HM, Nickel W, Linkner J, Waterschoot D, Ampe C, Cortellino S, Palamidessi A, Dominguez R, Carlier MF, Faix J, Scita G. 2013.

- "CDC42 switches IRSp53 from inhibition of actin growth to elongation by clustering of VASP". *Embo Journal* 32:2735-2750.
- Doherty GJ, Lundmark R. 2009. "GRAF1-dependent endocytosis". *Biochem Soc Trans* 37:1061-1065.
- Dreses-Werringloer U, Bhuiyan M, Zhao Y, Gerard HC, Whittum-Hudson JA, Hudson AP. 2009. "Initial characterization of *Chlamydoiphila (Chlamydia) pneumoniae* cultured from the late-onset Alzheimer brain". *Int J Med Microbiol* 299:187-201.
- Drin G, Antony B. 2010. "Amphipathic helices and membrane curvature". *FEBS Lett* 584:1840-1847.
- Dumoux M, Nans A, Saibil HR, Hayward RD. 2015. "Making connections: snapshots of chlamydial type III secretion systems in contact with host membranes". *Current opinion in microbiology* 23:1-7.
- Durocher D, Jackson SP. 2002. "The FHA domain". *FEBS Lett* 513:58-66.
- Durocher D, Taylor IA, Sarbassova D, Haire LF, Westcott SL, Jackson SP, Smerdon SJ, Yaffe MB. 2000. "The molecular basis of FHA Domain : Phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms". *Molecular Cell* 6:1169-1182.
- Engel AC. 2015. "Funktionelle Charakterisierung der *Chlamydia pneumoniae* Effektorproteine CPn0809 und CPn0147". Dissertation.
- Etienne-Manneville S, Hall A. 2002. "Rho GTPases in cell biology". *Nature* 420:629-635.
- Everett KDE, Andersen AA. 1997. "The ribosomal intergenic spacer and domain I of the 23S rRNA gene are phylogenetic markers for *Chlamydia* spp.". *Int J Syst Bacteriol* 47:461-473.
- Everett KDE, Bush RM, Andersen AA. 1999. "Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms". *Int J Syst Bacteriol* 49:415-440.
- Fairn GD, Schieber NL, Ariotti N, Murphy S, Kuerschner L, Webb RI, Grinstein S, Parton RG. 2011. "High-resolution mapping reveals topologically distinct cellular pools of phosphatidylserine". *Journal of Cell Biology* 194:257-275.
- Fawaz FS, vanOoij C, Homola E, Mutka SC, Engel JN. 1997. "Infection with *Chlamydia trachomatis* alters the tyrosine phosphorylation and/or localization of several host cell proteins including cortactin". *Infection and immunity* 65:5301-5308.
- Fechtner T. 2012. "Charakterisierung der neuen, potentiellen Adhäsiene Yaa1, Yaa2 und Yaa3 von *Chlamydia pneumoniae*". Dissertation.
- Fechtner T, Galle JN, Hegemann JH. 2016. "The novel chlamydial adhesin CPn0473 mediates the Lipid Raft-dependent uptake of *Chlamydia pneumoniae*". *Cell Microbiol*.
- Fechtner T, Stallmann S, Moelleken K, Meyer KL, Hegemann JH. 2013. "Characterization of the Interaction between the Chlamydial Adhesin OmcB and the Human Host Cell". *Journal of bacteriology* 195:5323-5333.
- Fei W, Wang H, Fu X, Bielby C, Yang H. 2009. "Conditions of endoplasmic reticulum stress stimulate lipid droplet formation in *Saccharomyces cerevisiae*". *Biochem J* 424:61-67.
- Ferrell JC, Fields KA. 2015. "A working model for the type III secretion mechanism in *Chlamydia*". *Microbes Infect*.
- Fields IC, King SM, Shteyn E, Kang RS, Folsch H. 2010. "Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate localization in recycling endosomes is necessary for AP-1B-dependent sorting in polarized epithelial cells". *Molecular biology of the cell* 21:95-105.
- Fields KA, Mead DJ, Dooley CA, Hackstadt T. 2003. "*Chlamydia trachomatis* type III secretion: evidence for a functional apparatus during early-cycle development". *Molecular microbiology* 48:671-683.
- Finn RD, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Mistry J, Mitchell AL, Potter SC, Punta M, Qureshi M, Sangrador-Vegas A, Salazar GA, Tate J, Bateman A. 2016. "The Pfam protein families database: towards a more sustainable future". *Nucleic Acids Res* 44:D279-285.

- Flynn NT, C.; Koralegea, R.; Hartsonc , S.; Ranjand, A.; Liud, J.; Poped, C.; Ramseya, J. 2016. "Effect of cationic grafted copolymer structure on the encapsulation of bovine serum albumin.". Materials Science and Engineering: C.
- Ford MG, Jenni S, Nunnari J. 2011. "The crystal structure of dynamin". Nature 477:561-566.
- Ford MG, Mills IG, Peter BJ, Vallis Y, Praefcke GJ, Evans PR, McMahon HT. 2002. "Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin". Nature 419:361-366.
- Franken A. 2012. "Funktionsanalyse von Cpn0712 aus *Chlamydia pneumoniae* in eukaryotischen Zellen". Bachelor-Thesis.
- Fu Y, Galan JE. 1999. "A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion". Nature 401:293-297.
- Furtado AR, Essid M, Perrinet S, Balana ME, Yoder N, Dehoux P, Subtil A. 2013. "The chlamydial OTU domain-containing protein ChlaOTU is an early type III secretion effector targeting ubiquitin and NDP52". Cell Microbiol 15:2064-2079.
- Gamez A, Mukerjea R, Alayyoubi M, Ghassemian M, Ghosh P. 2012. "Structure and interactions of the cytoplasmic domain of the *Yersinia* type III secretion protein YscD". Journal of bacteriology 194:5949-5958.
- Gautier R, Douguet D, Antony B, Drin G. 2008. "HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties". Bioinformatics 24:2101-2102.
- Gerard HC, Mishra MK, Mao G, Wang S, Hali M, Whittum-Hudson JA, Kannan RM, Hudson AP. 2013. "Dendrimer-enabled DNA delivery and transformation of *Chlamydia pneumoniae*". Nanomedicine 9:996-1008.
- Gericke A, Leslie NR, Losche M, Ross AH. 2013. "PtdIns(4,5)P-2-Mediated Cell Signaling: Emerging Principles and PTEN as a Paradigm for Regulatory Mechanism". Adv Exp Med Biol 991:85-104.
- Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA. 1995. "Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure". Yeast 11:355-360.
- Gold ES, Underhill DM, Morrissette NS, Guo J, McNiven MA, Aderem A. 1999. "Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages". J Exp Med 190:1849-1856.
- Goswami D, Kaur J, Surade S, Grell E, Michel H. 2012. "Heterologous production and functional and thermodynamic characterization of cation diffusion facilitator (CDF) transporters of mesophilic and hyperthermophilic origin". Biol Chem 393:617-629.
- Granger E, McNee G, Allan V, Woodman P. 2014. "The role of the cytoskeleton and molecular motors in endosomal dynamics". Seminars in Cell & Developmental Biology 31:20-29.
- Grant BD, Donaldson JG. 2009. "Pathways and mechanisms of endocytic recycling". Nature reviews. Molecular cell biology 10:597-608.
- Greub G. 2010. "International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of the Chlamydiae: minutes of the inaugural closed meeting, 21 March 2009, Little Rock, AR, USA". Int J Syst Evol Microbiol 60:2691-2693.
- Grieshaber NA, Sager JB, Dooley CA, Hayes SF, Hackstadt T. 2006. "Regulation of the *Chlamydia trachomatis* histone H1-like protein Hc2 is IspE dependent and IbtA independent". Journal of bacteriology 188:5289-5292.
- Grieshaber SS, Grieshaber NA, Hackstadt T. 2003. "*Chlamydia trachomatis* uses host cell dynein to traffic to the microtubule-organizing center in a p50 dynamitin-independent process". Journal of cell science 116:3793-3802.
- Haberg K, Lundmark R, Carlsson SR. 2008. "SNX18 is an SNX9 paralog that acts as a membrane tubulator in AP-1-positive endosomal trafficking". Journal of cell science 121:1495-1505.
- Halberstaedter LP, S. 1907. "Über Zelleinschlüsse parasitärer Natur beim Trachom.". Arb. k. Gesundh-Amte 26:44-47.
- Halet G. 2005. "Imaging phosphoinositide dynamics using GFP-tagged protein domains". Biol Cell 97:501-518.

- Hall AT. 1999. "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT", p. 95-98, Nucleic Acids Symposium, vol. 41.
- Hammond K, Reboiras MD, Lyle IG, Jones MN. 1984. "Characterisation of phosphatidylcholine/phosphatidylinositol sonicated vesicles. Effects of phospholipid composition on vesicle size". Biochim Biophys Acta 774:19-25.
- Hänsch S. 2011. "Funktionelle Charakterisierung der Proteine Cpn0712 und Cpn0572 von *Chlamydia pneumoniae*". Diploma.
- Hansen CG, Nichols BJ. 2009. "Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis". Journal of cell science 122:1713-1721.
- Harlow E, Lane D. 1999. "Using antibodies : a laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Harris KP, Tepas U. 2010. "Cdc42 and vesicle trafficking in polarized cells". Traffic 11:1272-1279.
- Hauser AR. 2009. "The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection". Nature Reviews Microbiology 7:654-665.
- Hefty PS, Stephens RS. 2007. "Chlamydial type III secretion system is encoded on ten operons preceded by sigma 70-like promoter elements". Journal of bacteriology 189:198-206.
- Herrmann M, Schuhmacher A, Muhldorfer I, Melchers K, Prothmann C, Dammeier S. 2006. "Identification and characterization of secreted effector proteins of *Chlamydia pneumoniae* TW183". Research in microbiology 157:513-524.
- Hicks JB, Fink, G. R. 1983. "Methods in yeast genetics : laboratory manual", Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory.
- Holmes A, Muhlen S, Roe AJ, Dean P. 2010. "The EspF effector, a bacterial pathogen's Swiss army knife". Infection and immunity 78:4445-4453.
- Hooppaw AJ, Fisher DJ. 2015. "A Coming of Age Story: *Chlamydia* in the Post-Genetic Era". Infection and immunity.
- Hower S, Wolf K, Fields KA. 2009. "Evidence that CT694 is a novel *Chlamydia trachomatis* T3S substrate capable of functioning during invasion or early cycle development". Molecular microbiology 72:1423-1437.
- Hueck CJ. 1998. "Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants". Microbiol Mol Biol Rev 62:379-433.
- Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, O'Shea EK. 2003. "Global analysis of protein localization in budding yeast". Nature 425:686-691.
- Hybiske K, Stephens RS. 2007. "Mechanisms of *Chlamydia trachomatis* entry into nonphagocytic cells". Infection and immunity 75:3925-3934.
- Hybiske K, Stephens RS. 2007. "Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*". Proc Natl Acad Sci U S A 104:11430-11435.
- Isaksson EL, Aili M, Fahlgren A, Carlsson SE, Rosqvist R, Wolf-Watz H. 2009. "The Membrane Localization Domain Is Required for Intracellular Localization and Autoregulation of YopE in *Yersinia pseudotuberculosis*". Infection and immunity 77:4740-4749.
- Jantos CA, Heck S, Roggendorf R, Sen-Gupta M, Hegemann JH. 1997. "Antigenic and molecular analyses of different *Chlamydia pneumoniae* strains". J Clin Microbiol 35:620-623.
- Jelenska J, van Hal JA, Greenberg JT. 2010. "*Pseudomonas syringae* hijacks plant stress chaperone machinery for virulence". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107:13177-13182.
- Jelenska J, Yao N, Vinatzer BA, Wright CM, Brodsky JL, Greenberg JT. 2007. "A J domain virulence effector of *Pseudomonas syringae* remodels host chloroplasts and suppresses defenses". Curr Biol 17:499-508.
- Jensen MB, Bhatia VK, Jao CC, Rasmussen JE, Pedersen SL, Jensen KJ, Langen R, Stamou D. 2011. "Membrane curvature sensing by amphipathic helices: a single liposome study using alpha-synuclein and annexin B12". The Journal of biological chemistry 286:42603-42614.

- Jewett TJ, Fischer ER, Mead DJ, Hackstadt T. 2006. "*Chlamydial TARP is a bacterial nucleator of actin*". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103:15599-15604.
- Jewett TJ, Miller NJ, Dooley CA, Hackstadt T. 2010. "*The Conserved Tarp Actin Binding Domain Is Important for Chlamydial Invasion*". PLoS pathogens 6.
- Johnson DL, Mahony JB. 2007. "*Chlamydomphila pneumoniae PknD exhibits dual amino acid specificity and phosphorylates Cpn0712, a putative type III secretion YscD homolog*". Journal of bacteriology 189:7549-7555.
- Johnson DL, Stone CB, Bulir DC, Coombes BK, Mahony JB. 2009. "*A novel inhibitor of Chlamydomphila pneumoniae protein kinase D (PknD) inhibits phosphorylation of CdsD and suppresses bacterial replication*". BMC microbiology 9:218.
- Johnson DL, Stone CB, Mahony JB. 2008. "*Interactions between CdsD, CdsQ, and CdsL, three putative Chlamydomphila pneumoniae type III secretion proteins*". Journal of bacteriology 190:2972-2980.
- Jones H, Rake G, Stearns B. 1945. "*Studies on Lymphogranuloma Venereum .3. The Action of the Sulfonamides on the Agent of Lymphogranuloma Venereum*". J Infect Dis 76:55-69.
- Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. 2016. "*KEGG as a reference resource for gene and protein annotation*". Nucleic Acids Res 44:D457-462.
- Karavolos MH, Roe AJ, Wilson M, Henderson J, Lee JJ, Gally DL, Khan CM. 2005. "*Type III secretion of the Salmonella effector protein SopE is mediated via an N-terminal amino acid signal and not an mRNA sequence*". Journal of bacteriology 187:1559-1567.
- Kast DJ, Yang CS, Disanza A, Boczkowska M, Madasu Y, Scita G, Svitkina T, Dominguez R. 2014. "*Mechanism of IRSp53 inhibition and combinatorial activation by Cdc42 and downstream effectors*". Nature structural & molecular biology 21:413-U163.
- Kenny B, Ellis S, Leard AD, Warawa J, Mellor H, Jepson MA. 2002. "*Co-ordinate regulation of distinct host cell signalling pathways by multifunctional enteropathogenic Escherichia coli effector molecules*". Molecular microbiology 44:1095-1107.
- Kessels MM, Qualmann B. 2004. "*The syndapin protein family: linking membrane trafficking with the cytoskeleton*". Journal of cell science 117:3077-3086.
- Kirkham M, Parton RG. 2005. "*Clathrin-independent endocytosis: New insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers*". Bba-Mol Cell Res 1745:273-286.
- Kocks C, Marchand JB, Gouin E, Dhauteville H, Sansonetti PJ, Carlier MF, Cossart P. 1995. "*The Unrelated Surface-Proteins Acta of Listeria-Monocytogenes and Icsa of Shigella-Flexneri Are Sufficient to Confer Actin-Based Motility on Listeria-Innocua and Escherichia-Coli Respectively*". Molecular microbiology 18:413-423.
- Korhonen JT, Puolakkainen M, Haveri A, Tammiruusu A, Sarvas M, Lahesmaa R. 2012. "*Chlamydia pneumoniae entry into epithelial cells by clathrin-independent endocytosis*". Microbial pathogenesis 52:157-164.
- Kornak JM, Kuo CC, Campbell LA. 1991. "*Sequence analysis of the gene encoding the Chlamydia pneumoniae DnaK protein homolog*". Infection and immunity 59:721-725.
- Kornilova ES. 2014. "*Receptor-mediated endocytosis and cytoskeleton*". Biochemistry (Mosc) 79:865-878.
- Kowalski JR, Egile C, Gil S, Snapper SB, Li R, Thomas SM. 2005. "*Cortactin regulates cell migration through activation of N-WASP*". Journal of cell science 118:79-87.
- Kozlovsky Y, Kozlov MM. 2003. "*Membrane fission: model for intermediate structures*". Biophys J 85:85-96.
- Krall R, Zhang Y, Barbieri JT. 2004. "*Intracellular membrane localization of pseudomonas ExoS and Yersinia YopE in mammalian cells*". The Journal of biological chemistry 279:2747-2753.
- Kudryashev M, Stenta M, Schmelz S, Amstutz M, Wiesand U, Castano-Diez D, Degiacomi MT, Munnich S, Bleck CK, Kowal J, Diepold A, Heinz DW, Dal Peraro M, Cornelis GR, Stahlberg H. 2013. "*In situ structural analysis of the Yersinia enterocolitica injectisome*". Elife 2:e00792.

- Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT. 1995. "*Chlamydia pneumoniae* (TWAR)". *Clinical microbiology reviews* 8:451-461.
- Lagkouvardos I, Weinmaier T, Lauro FM, Cavicchioli R, Rattei T, Horn M. 2014. "Integrating metagenomic and amplicon databases to resolve the phylogenetic and ecological diversity of the *Chlamydiae*". *ISME J* 8:115-125.
- Laketa V, Zarbakhsh S, Traynor-Kaplan A, MacNamara A, Subramanian D, Putyrski M, Mueller R, Nadler A, Mentel M, Saez-Rodriguez J, Pepperkok R, Schultz C. 2014. "PIP3 Induces the Recycling of Receptor Tyrosine Kinases". *Sci Signal* 7.
- Lamaze C, Dujeancourt A, Baba T, Lo CG, Benmerah A, Dautry-Varsat A. 2001. "Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway". *Mol Cell* 7:661-671.
- Lane BJ, Mutchler C, Al Khodor S, Grieshaber SS, Carabeo RA. 2008. "*Chlamydial* entry involves TARP binding of guanine nucleotide exchange factors". *PLoS Pathog* 4:e1000014.
- Larsson A. 2014. "AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets". *Bioinformatics* 30:3276-3278.
- Lavezzari G, Roche KW. 2007. "Constitutive endocytosis of the metabotropic glutamate receptor *mGluR7* is clathrin-independent". *Neuropharmacology* 52:100-107.
- Lee JS, Mendez R, Heng HH, Yang ZQ, Zhang K. 2012. "Pharmacological ER stress promotes hepatic lipogenesis and lipid droplet formation". *Am J Transl Res* 4:102-113.
- Lemmon SK. 2001. "Clathrin uncoating: Auxilin comes to life". *Curr Biol* 11:R49-52.
- Li SS. 2005. "Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction". *Biochem J* 390:641-653.
- Lim KB, Bu W, Goh WI, Koh E, Ong SH, Pawson T, Sudhaharan T, Ahmed S. 2008. "The *Cdc42* effector *IRSp53* generates filopodia by coupling membrane protrusion with actin dynamics". *The Journal of biological chemistry* 283:20454-20472.
- Lundmark R, Carlsson SR. 2003. "Sorting nexin 9 participates in clathrin-mediated endocytosis through interactions with the core components". *Journal of Biological Chemistry* 278:46772-46781.
- Lundmark R, Carlsson SR. 2009. "SNX9 - a prelude to vesicle release". *Journal of cell science* 122:5-11.
- Lundmark R, Doherty GJ, Howes MT, Cortese K, Vallis Y, Parton RG, McMahon HT. 2008. "The GTPase-activating protein *GRAF1* regulates the *CLIC/GEEC* endocytic pathway". *Curr Biol* 18:1802-1808.
- Luo JH, Liu GC, Zhong YM, Jia TJ, Liu KY, Chen D, Zhong GM. 2007. "Characterization of hypothetical proteins *Cpn0146*, *0147*, *0284* & *0285* that are predicted to be in the *Chlamydia pneumoniae* inclusion membrane". *BMC microbiology* 7.
- Majorek KC, M; Chruszcz, M; Evdokimova, E; Egorova, O; Di Leo, R; Zimmerman, MD; Savchenko, A; Joachimiak, A; Edwards, AM; Minor, W. 2009. "Crystal structure of the *fbA* domain of *ct664* protein from *chlamydia trachomatis*".
- Maldonado-Baez L, Williamson C, Donaldson JG. 2013. "Clathrin-independent endocytosis: a cargo-centric view". *Exp Cell Res* 319:2759-2769.
- Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, Geer RC, He J, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Wang Z, Yamashita RA, Zhang D, Zheng C, Bryant SH. 2015. "CDD: NCBI's conserved domain database". *Nucleic Acids Res* 43:D222-226.
- Martinez-Quiles N, Ho HYH, Kirschner MW, Ramesh N, Geha RS. 2004. "Erk/Src phosphorylation of cortactin acts as a switch on-switch off mechanism that controls its ability to activate N-WASP". *Mol Cell Biol* 24:5269-5280.
- Matsumoto A. 1982. "Electron microscopic observations of surface projections on *Chlamydia psittaci* reticulate bodies". *Journal of bacteriology* 150:358-364.
- Mayor S, Pagano RE. 2007. "Pathways of clathrin-independent endocytosis". *Nature reviews. Molecular cell biology* 8:603-612.

- McDowell MA, Johnson S, Deane JE, Cheung M, Roehrich AD, Blocker AJ, McDonnell JM, Lea SM. 2011. "Structural and functional studies on the N-terminal domain of the *Shigella* type III secretion protein MxiG". *The Journal of biological chemistry* 286:30606-30614.
- McMahon HT, Boucrot E. 2015. "Membrane curvature at a glance". *Journal of cell science* 128:1065-1070.
- McMahon HT, Gallop JL. 2005. "Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling". *Nature* 438:590-596.
- Mehlitz A, Rudel T. 2013. "Modulation of host signaling and cellular responses by *Chlamydia*". *Cell Commun Signal* 11:90.
- Merilainen G, Koski MK, Wierenga RK. 2016. "The extended structure of the periplasmic region of CdsD, a structural protein of the Type III Secretion System of *Chlamydia trachomatis*". *Protein Sci*.
- Mirrashidi KM, Elwell CA, Verschueren E, Johnson JR, Frando A, Von Dollen J, Rosenberg O, Gulbahce N, Jang G, Johnson T, Jager S, Gopalakrishnan AM, Sherry J, Dunn JD, Olive A, Penn B, Shales M, Cox JS, Starnbach MN, Derre I, Valdivia R, Krogan NJ, Engel J. 2015. "Global Mapping of the Inc-Human Interactome Reveals that Retromer Restricts *Chlamydia* Infection". *Cell Host Microbe* 18:109-121.
- MMWR. 1998. "Compendium of measures to control *Chlamydia psittaci* infection among humans (*psittacosis*) and pet birds (*avian chlamydiosis*), 1998. Center for Disease Control and Prevention". *MMWR Recomm Rep* 47:1-14.
- Moelleken K, Hegemann JH. 2008. "The *Chlamydia* outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding". *Molecular microbiology* 67:403-419.
- Mojica SA, Hovis KM, Frieman MB, Tran B, Hsia RC, Ravel J, Jenkins-Houk C, Wilson KL, Bavoil PM. 2015. "SINC, a type III secreted protein of *Chlamydia psittaci*, targets the inner nuclear membrane of infected cells and uninfected neighbors". *Molecular biology of the cell* 26:1918-1934.
- Moldavski O, Amen T, Levin-Zaidman S, Eisenstein M, Rogachev I, Brandis A, Kaganovich D, Schuldiner M. 2015. "Lipid Droplets Are Essential for Efficient Clearance of Cytosolic Inclusion Bodies". *Dev Cell* 33:603-610.
- Molleken K, Becker E, Hegemann JH. 2013. "The *Chlamydia pneumoniae* invasin protein Pmp21 recruits the EGF receptor for host cell entry". *PLoS Pathog* 9:e1003325.
- Morita-Ishihara T, Terajima J, Watanabe H, Izumiya H. 2009. "Interaction between enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 EspFu and IRSp53 induces dynamic membrane remodeling in epithelial cells". *Jpn J Infect Dis* 62:351-355.
- Moulder JW. 1966. "The relation of the psittacosis group (*Chlamydiae*) to bacteria and viruses". *Annual review of microbiology* 20:107-130.
- Mueller KE, Fields KA. 2015. "Application of beta-Lactamase Reporter Fusions as an Indicator of Effector Protein Secretion during Infections with the Obligate Intracellular Pathogen *Chlamydia trachomatis*". *Plos One* 10.
- Mukhopadhyay S, Good D, Miller RD, Graham JE, Mathews SA, Timms P, Summersgill JT. 2006. "Identification of *Chlamydia pneumoniae* proteins in the transition from reticulate to elementary body formation". *Mol Cell Proteomics* 5:2311-2318.
- Muller N, Sattelmacher F, Lugert R, Gross U. 2008. "Characterization and intracellular localization of putative *Chlamydia pneumoniae* effector proteins". *Medical microbiology and immunology* 197:387-396.
- Murra G. 2005. "Untersuchungen zu DNA-Microarray-Studien des genomweiten Genexpressionsprofiles von *Chlamydia pneumoniae*". Diploma.
- Murra G. 2009. "Identifizierung und Charakterisierung von Adhäsionsproteinen des humanpathogenen Erregers *Chlamydia pneumoniae*". Dissertation.

- Muschiol S, Boncompain G, Vromman F, Dehoux P, Normark S, Henriques-Normark B, Subtil A. 2011. "Identification of a Family of Effectors Secreted by the Type III Secretion System That Are Conserved in Pathogenic Chlamydiae". *Infection and immunity* 79:571-580.
- Nans A, Kudryashev M, Saibil HR, Hayward RD. 2015. "Structure of a bacterial type III secretion system in contact with a host membrane in situ". *Nat Commun* 6:10114.
- Nans A, Saibil HR, Hayward RD. 2014. "Pathogen-host reorganization during Chlamydia invasion revealed by cryo-electron tomography". *Cell Microbiol* 16:1457-1472.
- Niehus E, Cheng E, Tan M. 2008. "DNA supercoiling-dependent gene regulation in Chlamydia". *Journal of bacteriology* 190:6419-6427.
- Oelkers JM, Vinzenz M, Nemethova M, Jacob S, Lai FPL, Block J, Szczodrak M, Kerkhoff E, Backert S, Schluter K, Stradal TEB, Small JV, Koestler SA, Rottner K. 2011. "Microtubules as Platforms for Assaying Actin Polymerization In Vivo". *Plos One* 6.
- Page AL, Parsot C. 2002. "Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades". *Molecular microbiology* 46:1-11.
- Page LA. 1966. "Revision of the family Chlamydiaceae Rake (Rickettsiales): unification of the psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma group of organisms in the genus Chlamydia Jones, Rake and Stearns, 1945". *Int J Syst Bacteriol* 16:223-252.
- Pallen M, Chaudhuri R, Khan A. 2002. "Bacterial FHA domains: neglected players in the phosphothreonine signalling game?". *Trends Microbiol* 10:556-563.
- Park GY, Mathew B, Ga XP, Malik A, Christman JW. 2006. "Caveolin-1 regulates macrophage phagocytosis by facilitation of Erk 1/2 and p38". *Faseb J* 20:A1293-A1293.
- Parton RG, Simons K. 2007. "The multiple faces of caveolae". *Nature reviews. Molecular cell biology* 8:185-194.
- Peipert JF. 2003. "Clinical practice. Genital chlamydial infections". *N Engl J Med* 349:2424-2430.
- Peter BJ, Kent HM, Mills IG, Vallis Y, Butler PJG, Evans PR, McMahon HT. 2004. "BAR domains as sensors of membrane curvature: The amphiphysin BAR structure". *Science* 303:495-499.
- Peters J, Wilson DP, Myers G, Timms P, Bavoil PM. 2007. "Type III secretion in Chlamydia". *Trends in Microbiology* 15:241-251.
- Petersen B, Petersen TN, Andersen P, Nielsen M, Lundegaard C. 2009. "A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions". *BMC Struct Biol* 9:51.
- Petterson EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. 2004. "UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis". *J Comput Chem* 25:1605-1612.
- Pike LJ. 2005. "Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: an evolving story". *Biochim Biophys Acta* 1746:260-273.
- Pillonel T, Bertelli C, Salamin N, Greub G. 2015. "Taxogenomics of the order Chlamydiales". *Int J Syst Evol Microbiol* 65:1381-1393.
- Plempner RK, Egner R, Kuchler K, Wolf DH. 1998. "Endoplasmic reticulum degradation of a mutated ATP-binding cassette transporter Pdr5 proceeds in a concerted action of Sec61 and the proteasome". *The Journal of biological chemistry* 273:32848-32856.
- Pol A, Gross SP, Parton RG. 2014. "Review: biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites". *The Journal of cell biology* 204:635-646.
- Praefcke GJ, McMahon HT. 2004. "The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules?". *Nature reviews. Molecular cell biology* 5:133-147.
- Puolakkainen M, Kuo CC, Campbell LA. 2005. "Chlamydia pneumoniae uses the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor for infection of endothelial cells". *Infection and immunity* 73:4620-4625.
- Pylypenko O, Lundmark R, Rasmuson E, Carlsson SR, Rak A. 2007. "The PX-BAR membrane-remodeling unit of sorting nexin 9". *Embo Journal* 26:4788-4800.

- Radics J, Konigsmair L, Marlovits TC. 2014. "Structure of a pathogenic type 3 secretion system in action". *Nature structural & molecular biology* 21:82-+.
- Read TD, Brunham RC, Shen C, Gill SR, Heidelberg JF, White O, Hickey EK, 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 SL, Eisen J, Fraser CM. 2000. "Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39". *Nucleic Acids Res* 28:1397-1406.
- Reisser S, Strandberg E, Steinbrecher T, Ulrich AS. 2014. "3D Hydrophobic Moment Vectors as a Tool to Characterize the Surface Polarity of Amphiphilic Peptides". *Biophysical Journal* 106:2385-2394.
- Rogozin IB, Makarova KS, Murvai J, Czabarka E, Wolf YI, Tatusov RL, Szekely LA, Koonin EV. 2002. "Connected gene neighborhoods in prokaryotic genomes". *Nucleic Acids Research* 30:2212-2223.
- Ross JA, Plano GV. 2011. "A C-terminal region of *Yersinia pestis* YscD binds the outer membrane secretin YscC". *Journal of bacteriology* 193:2276-2289.
- Safari F, Suetsugu S. 2012. "The BAR Domain Superfamily Proteins from Subcellular Structures to Human Diseases". *Membranes (Basel)* 2:91-117.
- Sahay G, Alakhova DY, Kabanov AV. 2010. "Endocytosis of nanomedicines". *J Control Release* 145:182-195.
- Sakharkar KR, Dhar PK, Chow VT. 2004. "Genome reduction in prokaryotic obligatory intracellular parasites of humans: a comparative analysis". *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1937-1941.
- Salomon D, Sessa G. 2010. "Identification of growth inhibition phenotypes induced by expression of bacterial type III effectors in yeast". *J Vis Exp*.
- Sambrook JF, E.F.; Maniatis, T. 1989. "Molecular cloning : a laboratory manual", vol. 2, New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmidt MH, Dikic I. 2005. "The Cbl interactome and its functions". *Nature reviews. Molecular cell biology* 6:907-918.
- Scita G, Confalonieri S, Lappalainen P, Suetsugu S. 2008. "IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions". *Trends Cell Biol* 18:52-60.
- Selbach M, Backert S. 2005. "Cortactin: an Achilles' heel of the actin cytoskeleton targeted by pathogens". *Trends Microbiol* 13:181-189.
- Shen L, Macnaughtan MA, Frohlich KM, Cong YG, Goodwin OY, Chou CW, LeCour L, Krup K, Luo M, Worthylake DK. 2015. "Multipart Chaperone-Effector Recognition in the Type III Secretion System of *Chlamydia trachomatis*". *Journal of Biological Chemistry* 290:28141-28155.
- Shi J, Scita G, Casanova JE. 2005. "WAVE2 signaling mediates invasion of polarized epithelial cells by *Salmonella typhimurium*". *The Journal of biological chemistry* 280:29849-29855.
- Shin N, Ahn N, Chang-Ileto B, Park J, Takei K, Ahn SG, Kim SA, Di Paolo G, Chang S. 2008. "SNX9 regulates tubular invagination of the plasma membrane through interaction with actin cytoskeleton and dynamin 2". *Journal of cell science* 121:1252-1263.
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li WZ, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Soding J, Thompson JD, Higgins DG. 2011. "Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega". *Mol Syst Biol* 7.
- Sigismund S, Argenzio E, Tosoni D, Cavallaro E, Polo S, Di Fiore PP. 2008. "Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation". *Dev Cell* 15:209-219.
- Sigismund S, Woelk T, Puri C, Maspero E, Tacchetti C, Transidico P, Di Fiore PP, Polo S. 2005. "Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:2760-2765.

- Silva-Herzog E, Joseph SS, Avery AK, Coba JA, Wolf K, Fields KA, Plano GV. 2011. "*Scc1* (CP0432) and *Scc4* (CP0033) Function as a Type III Secretion Chaperone for CopN of *Chlamydia pneumoniae*". *Journal of bacteriology* 193:3490-3496.
- Sisko JL, Spaeth K, Kumar Y, Valdivia RH. 2006. "Multifunctional analysis of *Chlamydia*-specific genes in a yeast expression system". *Mol Microbiol* 60:51-66.
- Smythe E, Ayscough KR. 2006. "Actin regulation in endocytosis". *Journal of cell science* 119:4589-4598.
- Soldati T, Schliwa M. 2006. "Powering membrane traffic in endocytosis and recycling". *Nature reviews. Molecular cell biology* 7:897-908.
- Soulet F, Yarar D, Leonard M, Schmid SL. 2005. "SNX9 regulates dynamin assembly and is required for efficient clathrin-mediated endocytosis". *Molecular biology of the cell* 16:2058-2067.
- Sousa R, Lafer EM. 2015. "The role of molecular chaperones in clathrin mediated vesicular trafficking". *Front Mol Biosci* 2:26.
- Spaeth KE, Chen YS, Valdivia RH. 2009. "The *Chlamydia* type III secretion system C-ring engages a chaperone-effector protein complex". *PLoS Pathog* 5:e1000579.
- Stallmann S. 2010. "Funktionsanalyse chlamydialer Adhäsionsproteine". Diploma.
- Stallmann S, Hegemann JH. 2015. "The *Chlamydia trachomatis* *Ctd1* invasin exploits the human integrin beta1 receptor for host cell entry". *Cell Microbiol*.
- Stephens RS, Myers G, Eppinger M, Bavoil PM. 2009. "Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of *Chlamydia* resolved". *FEMS Immunol Med Microbiol* 55:115-119.
- Stone CB, Bulir DC, Emdin CA, Pirie RM, Porfilio EA, Slootstra JW, Mahony JB. 2011. "*Chlamydia pneumoniae* CdsL Regulates CdsN ATPase Activity, and Disruption with a Peptide Mimetic Prevents Bacterial Invasion". *Frontiers in microbiology* 2:21.
- Stone CB, Johnson DL, Bulir DC, Gilchrist JD, Mahony JB. 2008. "Characterization of the putative type III secretion ATPase CdsN (*Cpn0707*) of *Chlamydomphila pneumoniae*". *Journal of bacteriology* 190:6580-6588.
- Stoner BP, Cohen SE. 2015. "Lymphogranuloma Venereum 2015: Clinical Presentation, Diagnosis, and Treatment". *Clin Infect Dis* 61 Suppl 8:S865-873.
- Stuart ES, Webley WC, Norkin LC. 2003. "Lipid rafts, caveolae, caveolin-1, and entry by *Chlamydiae* into host cells". *Experimental Cell Research* 287:67-78.
- Subtil A, Delevoeye C, Balana ME, Tastevin L, Perrinet S, 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* 56:1636-1647.
- Subtil A, Parsot C, Dautry-Varsat A. 2001. "Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery". *Mol Microbiol* 39:792-800.
- Subtil A, Wyplosz B, Balana ME, Dautry-Varsat A. 2004. "Analysis of *Chlamydia caviae* entry sites and involvement of Cdc42 and Rac activity". *Journal of cell science* 117:3923-3933.
- Suetsugu S, Toyooka K, Senju Y. 2010. "Subcellular membrane curvature mediated by the BAR domain superfamily proteins". *Semin Cell Dev Biol* 21:340-349.
- Takagi S, Tominaga A, Sato C, Tomita T, Iwatsubo T. 2010. "Participation of transmembrane domain 1 of presenilin 1 in the catalytic pore structure of the gamma-secretase". *J Neurosci* 30:15943-15950.
- Tanzer RJ, Hatch TP. 2001. "Characterization of outer membrane proteins in *Chlamydia trachomatis* LGV serovar L2". *Journal of bacteriology* 183:2686-2690.
- Taylor HR, Burton MJ, Haddad D, West S, Wright H. 2014. "Trachoma". *Lancet* 384:2142-2152.
- Teasdale RD, Collins BM. 2012. "Insights into the PX (phox-homology) domain and SNX (sorting nexin) protein families: structures, functions and roles in disease". *Biochemical Journal* 441:39-59.

- Timpson P, Lynch DK, Schramek D, Walker F, Daly RJ. 2005.** "*Cortactin overexpression inhibits ligand-induced down-regulation of the epidermal growth factor receptor*". *Cancer Res* 65:3273-3280.
- Tse SML, Furuya W, Gold E, Schreiber AD, Sandvig K, Inman RD, Grinstein S. 2003.** "*Differential role of actin, clathrin, and dynamin in Fc gamma receptor-mediated endocytosis and phagocytosis*". *Journal of Biological Chemistry* 278:3331-3338.
- Tseng TT, Tyler BM, Setubal JC. 2009.** "*Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology*". *BMC microbiology* 9 Suppl 1:S2.
- Unemo M, Clarke IN. 2011.** "*The Swedish new variant of Chlamydia trachomatis*". *Curr Opin Infect Dis* 24:62-69.
- Unwin N. 2005.** "*Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution*". *J Mol Biol* 346:967-989.
- Valdivia RH. 2008.** "*Chlamydia effector proteins and new insights into chlamydial cellular microbiology*". *Current opinion in microbiology* 11:53-59.
- van Deurs B, von Bulow F, Vilhardt F, Holm PK, Sandvig K. 1996.** "*Destabilization of plasma membrane structure by prevention of actin polymerization. Microtubule-dependent tubulation of the plasma membrane*". *Journal of cell science* 109 (Pt 7):1655-1665.
- Van Durme J, Maurer-Stroh S, Gallardo R, Wilkinson H, Rousseau F, Schymkowitz J. 2009.** "*Accurate prediction of DnaK-peptide binding via homology modelling and experimental data*". *PLoS Comput Biol* 5:e1000475.
- Van Ooij C, Homola E, Kincaid E, Engel J. 1998.** "*Fusion of Chlamydia trachomatis-containing inclusions is inhibited at low temperatures and requires bacterial protein synthesis*". *Infection and immunity* 66:5364-5371.
- Verma P, Ostermeyer-Fay AG, Brown DA. 2010.** "*Caveolin-1 Induces Formation of Membrane Tubules That Sense Actomyosin Tension and Are Inhibited by Polymerase I and Transcript Release Factor/Cavin-1*". *Molecular biology of the cell* 21:2226-2240.
- Von Pawel-Rammingen U, Telepnev MV, Schmidt G, Aktories K, Wolf-Watz H, Rosqvist R. 2000.** "*GAP activity of the Yersinia YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure*". *Mol Microbiol* 36:737-748.
- Wang C, Gao D, Kaltenboeck B. 2009.** "*Acute Chlamydia pneumoniae reinfection accelerates the development of insulin resistance and diabetes in obese C57BL/6 mice*". *J Infect Dis* 200:279-287.
- Wang XQ, Paller AS. 2006.** "*Lipid rafts: membrane triage centers*". *J Invest Dermatol* 126:951-953.
- Wang ZX, Moran MF. 1996.** "*Requirement for the adapter protein GRB2 in EGF receptor endocytosis*". *Science* 272:1935-1939.
- Watson C, Alp NJ. 2008.** "*Role of Chlamydia pneumoniae in atherosclerosis*". *Clin Sci (Lond)* 114:509-531.
- Weflen AW, Alto NM, Viswanathan VK, Hecht G. 2010.** "*E. coli secreted protein F promotes EPEC invasion of intestinal epithelial cells via an SNX9-dependent mechanism*". *Cell Microbiol* 12:919-929.
- Weiss SM, Ladwein M, Schmidt D, Ehinger J, Lommel S, Stading K, Beutling U, Disanza A, Frank R, Jansch L, Scita G, Gunzer F, Rottner K, Stradal TE. 2009.** "*IRSp53 links the enterohemorrhagic E. coli effectors Tir and EspFU for actin pedestal formation*". *Cell Host Microbe* 5:244-258.
- Wendler P, Lehmann A, Janek K, Baumgart S, Enenkel C. 2004.** "*The bipartite nuclear localization sequence of Rpn2 is required for nuclear import of proteasomal base complexes via karyopherin alpha beta and proteasome functions*". *Journal of Biological Chemistry* 279:37751-37762.
- WHO. 2012.** "*Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections: 2008*". *Reprod Health Matter* 20:207-209.

- Wilson DP, Timms P, McElwain DL, Bavoil PM. 2006.** "Type III secretion, contact-dependent model for the intracellular development of chlamydia". *Bull Math Biol* 68:161-178.
- Wolf K, Fischer E, Hackstadt T. 2000.** "Ultrastructural analysis of developmental events in *Chlamydia pneumoniae*-infected cells". *Infection and immunity* 68:2379-2385.
- Wurtele M, Wolf E, Pederson KJ, Buchwald G, Ahmadian MR, Barbieri JT, Wittinghofer A. 2001.** "How the *Pseudomonas aeruginosa* ExoS toxin downregulates Rac". *Nature Structural Biology* 8:23-26.
- Yarar D, Surka MC, Leonard MC, Schmid SL. 2008.** "SNX9 activities are regulated by multiple phosphoinositides through both PX and BAR domains". *Traffic* 9:133-146.
- Yarar D, Waterman-Storer CM, Schmid SL. 2007.** "SNX9 couples actin assembly to Phosphoinositide signals and is required for membrane remodeling during endocytosis". *Developmental Cell* 13:43-56.
- Yeats C, Bateman A. 2003.** "The BON domain: a putative membrane-binding domain". *Trends Biochem Sci* 28:352-355.
- Yeow-Fong L, Lim L, Manser E. 2005.** "SNX9 as an adaptor for linking synaptojanin-1 to the Cdc42 effector ACK1". *Febs Lett* 579:5040-5048.
- Yin L, Kalmar ID, Boden J, Vanrompay D. 2015.** "*Chlamydia psittaci* infections in Chinese poultry: a literature review". *World Poultry Sci J* 71:473-482.
- Yin Y, Arkhipov A, Schulten K. 2009.** "Simulations of Membrane Tubulation by Lattices of Amphiphysin N-BAR Domains". *Structure* 17:882-892.
- Zhan P, Suo LJ, Qian Q, Shen XK, Qiu LX, Yu LK, Song Y. 2011.** "*Chlamydia pneumoniae* infection and lung cancer risk: a meta-analysis". *Eur J Cancer* 47:742-747.
- Zhang Y, Deng Q, Porath JA, Williams CL, Pederson-Gulrud KJ, Barbieri JT. 2007.** "Plasma membrane localization affects the RhoGAP specificity of *Pseudomonas* ExoS". *Cell Microbiol* 9:2192-2201.
- Zimmerberg J, Kozlov MM. 2006.** "How proteins produce cellular membrane curvature". *Nat Rev Mol Cell Bio* 7:9-19.
- Zrieq R. 2009.** "The Dual Function of the *Chlamydia pneumoniae* Cpn0572 Protein in Modulating the Host Actin Cytoskeleton". Dissertation.
- Zucconi A, Dente L, Santonico E, Castagnoli L, Cesareni G. 2001.** "Selection of ligands by panning of domain libraries displayed on phage lambda reveals new potential partners of synaptojanin 1". *Journal of Molecular Biology* 307:1329-1339.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Taxonomie und empfohlene Klassifizierung der Ordnung <i>Chlamydiales</i> (Stand 2015)	14
Abb. 1.2: Der biphasische Infektionszyklus von <i>Chlamydia pneumoniae</i>	17
Abb. 1.3: Verschiedene Endozytosewege der humanen Zelle	20
Abb. 1.4: Membran- und Zytoskeletteinflüsse während der humanen Endozytose	23
Abb. 1.5: Domänenübersicht von SNX9 mit entsprechender Funktionszuordnung	27
Abb. 1.6: Funktionen von SNX9 während der humanen Endozytose	28
Abb. 1.7: Prozesse während der Frühphasen der Infektion von <i>C. pneumoniae</i>	30
Abb. 1.8: Postulierter Aufbau und Funktionsweise des chlamydialen Typ-III Sekretionssystems	33
Abb. 1.9: Domänen von CPn0712 mit Interaktions- und Homologie-Übersicht	36
Abb. 1.10: Genetischer Kontext von <i>cpn0677</i> und <i>cpn0678</i> in chlamydialen Spezies	39
Abb. 1.11: Übersicht über Domänen, Funktionen und Interaktionen von CPn0677 und CPn0678	41
Abb. 3.1: Gradientenreinigung von chlamydialen Partikeln	73
Abb. 3.2: Verwendete Einstellungen der durchgeführten kLSM	94
Abb. 4.1: Überprüfung der Spezifität des α -CPn0712 Antikörpers durch Präabsorptionstest	96
Abb. 4.2: Expression und Lokalisation von CPn0712 während des Infektionszyklus	98
Abb. 4.3: Lokalisationsanalyse der CPn0712-Signale bezüglich der Inklusionsmembran	101
Abb. 4.4: Antikörpertransfektion von α -CPn0712 während der chlamydialen Infektion	102
Abb. 4.5: Zugänglichkeitsanalyse von CPn0712 mittels differenzieller Permeabilisierung in der Infektion	104
Abb. 4.6: Lokalisationsanalyse von CPn0712 und IncA mittels superhoch-auflösender Mikroskopie	106
Abb. 4.7: Analyse des Wachstumsphänotyps von CPn0712 in <i>S. cerevisiae</i>	109
Abb. 4.8: Lokalisation von CPn0712 ^{GFP} und CPn0712- Δ TMD ^{GFP} in <i>S. cerevisiae</i>	111
Abb. 4.9: Präabsorptionstest zur Überprüfung der Spezifität der α -CPn0677 und α -CPn0678 Antikörper	114
Abb. 4.10: Lokalisation von CPn0677 und CPn0678 im Infektionsverlauf von <i>C. pneumoniae</i>	116
Abb. 4.11: Detaillokalisation von CPn0677 und CPn0678 in EBs in infizierten HEp-2 Zellen	117
Abb. 4.12: Zugänglichkeitsanalysen von CPn0677 und CPn0678 mittels differentieller Permeabilisierung	119
Abb. 4.13: Zugänglichkeitsanalyse von CPn0678 während der frühen Infektion	120
Abb. 4.14: Kolokalisationsstudien von CPn0678 mit Wirts- und Chlamydien-spezifischen Antikörpern	121
Abb. 4.15: Ektopische Expression GFP-fusionierter CPn0678-Varianten in HEp-2 Zellen	124
Abb. 4.16: Simulation der amphipathischen Helix im N-terminalen Bereich von CPn0678	125
Abb. 4.17: Charakterisierung der APH-abhängigen Membranbindung von CPn0678	127
Abb. 4.18: Kolokalisation von CPn0678 mit Marker-Proteinen für negativ geladene Phospholipide	128
Abb. 4.19: Crosslink-Experiment von rCPn0678 _{6xHis} zur Analyse oligomerer Formen	130

Abb. 4.20: Untersuchung der Kolokalisation von CPn0678 ^{GFP} mit F-Aktin und Mikrotubuli	132
Abb. 4.21: Veränderung des Membrantubulationsverhaltens von CPn0678 ^{GFP} bei Inhibitor- Behandlung.....	134
Abb. 4.22: Detailaufnahmen der CPn0678 ^{GFP} Lokalisation nach Inhibitor-Behandlung	136
Abb. 4.23: Separate Lokalisationsbetrachtung von CPn0678 und SNX9 in Transfektion.....	138
Abb. 4.24: Kolokalisationsanalysen von CPn0678 und SNX9 in der Transfektion	139
Abb. 4.25: Ko-IP-Analysen mit CPn0678 ^{GFP} und SNX9 ^{mCherry} transfizierten Zellen	140
Abb. 4.26: Spezifitätstests der CPn0678-SNX9 Kolokalisation über GRB2 und CIN85 in der Transfektion	142
Abb. 4.27: Lokalisationsanalyse von IRSp53 ^{mCherry} oder Cortactin ^{mCherry} bei CPn0678 ^{GFP} Kotransfektion	144
Abb. 4.28: Lokalisation von SNX9 in der frühen Infektion und Interaktion mit CPn0678 ...	146
Abb. 4.29: Zugänglichkeitsanalyse für SNX9 in uninfizierten HEp-2 Zellen	147
Abb. 4.30: Einfluss von transfizierten CPn0678 ^{GFP} -Varianten auf die Infektionsrate von <i>C. pneumoniae</i>	149
Abb. 4.31: Lokalisation von transfiziertem CPn0678 und SNX9 während der frühen Infektion	152
Abb. 4.32: Einfluss von transfiziertem CPn0678 ^{GFP} auf die Endozytose von Humanzellen..	154
Abb. 5.1: Simulation der CPn0712-IncA Assoziation in der Mikroskopie	161
Abb. 5.2: Vergleich der FHA-Domänen von CPn0712 und CT664	164
Abb. 5.3: Neue bioinformatische Einschätzung von CPn0677 und CPn0678	167
Abb. 5.4: Neue Einordnung von CPn0677 und CPn0678 im Vergleich zu anderen Spezies.	168
Abb. 5.5: Verteilung der Hydrophobizität und des Moments verschiedener Effektoren im Vergleich	173
Abb. 5.6: Alignment verschiedener membranbindender Effektorproteine zur APH von CPn0678.....	175
Abb. 5.7: Membranbindende Helices verschiedener Effektorproteine im Vergleich	177
Abb. 5.8: APH von CPn0678 im Vergleich zu Mutationsstudien der APH von α -Synuclein	179
Abb. 5.9: Potentielle Beeinflussung von PIPs durch chlamydiales sekretiertes CPn0678.....	185
Abb. 5.10: Schematische Zusammenfassung der vorliegenden Beobachtungen zu CPn0678	192
Abb. 5.11: Modell möglicher Funktionen von CPn0678 während der chlamydialen Infektion	193
Abb. 6.1: Makro zur Auswertung der IncA-CPn0712-Kolokalisation.....	195
Abb. 6.2: Beispielauswertung durch das Makro zur Analyse der CPn0712-IncA-Kolokalisation	196
Abb. 6.3: Proteinsequenz von CPn0678	197
Abb. 6.4: Alignment von 100 Proteinen mit FHA-Domänen	198
Abb. 6.5: Alignment von CPn0677 und CPn0678	199
Abb. 6.6: Volles Alignment unterschiedlicher sekretierter Effektoren aus Gram-negativen Bakterien	200
Abb. 6.7: Vergleich der APH von CPn0678 und CPn0678- Δ 6.....	203
Abb. 6.8: Volles Alignment von TARP und CPn0572	204

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Verwendete Gebrauchsartikel	46
Tab. 2.2: Verwendete Geräte und Maschinen	46
Tab. 2.3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	47
Tab. 2.4: Verwendete Lösungen und Puffer.....	49
Tab. 2.5: Weitere verwendete Enzyme.....	52
Tab. 2.6: Verwendete Primärantikörper.....	52
Tab. 2.7: Verwendete Sekundärantikörper.....	53
Tab. 2.8: Verwendete Kits.....	53
Tab. 2.9: Verwendete Größenstandards für Gelelektrophoresen	53
Tab. 2.10: Zu Klonierungen verwendete Oligonukleotide.....	54
Tab. 2.11: Zu Sequenzierungen verwendete Oligonukleotide	54
Tab. 2.12: Verwendete und neu erstellte Plasmide	55
Tab. 2.13: Verwendete <i>S. cerevisiae</i> -Stämme.....	57
Tab. 2.14: Zusammensetzung des LB-Mediums.....	57
Tab. 2.15: Zusammensetzung des YPD ⁺ -Mediums	58
Tab. 2.16: Zusammensetzung des SD-Mediums	58
Tab. 2.17: Zusammensetzung des Aminosäuremixes	58
Tab. 2.18: Zusammensetzung des Zellkulturmediums	59
Tab. 3.1: Verwendete bioinformatische Programme.....	93

Danksagung

An dieser Stelle will ich meinen Dank allen aussprechen, die mich während der Zeit dieser Arbeit begleitet haben.

Zuerst danke ich Herrn Prof. Dr. J. H. Hegemann für Möglichkeit an seinem Lehrstuhl zu promovieren und für die Überlassung der interessanten Themen. Darüber hinaus möchte ich mich für die Freiheit bedanken, die er mir während der Forschungsprojekte gewährte, welche zum Formen dieser Arbeit beitrug.

Außerdem danke ich Prof. Dr. H. Aberle für die bereitwillige Übernahme des Koreferats. Prof. Dr. U. N. Fleig danke ich für die Ratschläge die mir halfen meine wissenschaftlichen Präsentationen zu verbessern.

Weiterhin bedanke ich mich bei meinen Laborkollegen Katja, Alison, Jan, Sören, Irina, Corinna, Phillip, Visnja, Anand, Natascha, Marina, Eva, Inge, Gabi und natürlich unserer Sekretariatsfee Susanne für die gute Atmosphäre, die einem so manche schwere Zeiten im Labor erleichterte, aber auch in guten Zeiten für viel Spaß sorgte.

Nicht zu vergessen sind natürlich die vielen Ehemaligen des Instituts Frauke, Boris T., Pascal, Stephanie, Elli, Markus, Ben, Rafat, Jens, André, Sandra und Gido, die ebenfalls wichtige Menschen während dieser Zeit waren und für viele schöne Momente sorgten. Besonders dankbar bin ich dabei Tim und Astrid für so manche lustige Spieleabende und Boris H. für die vielen Retro-Sessions, die uns beiden immer wieder an gute alte Zeiten erinnerten.

Immer noch aus dem Feld der Biologie möchte ich dem „wöchentlichen Biologen-Stammtisch“ danken. Vor Allem Frank, der von den Anfängen bis heute dabei ist, aber natürlich auch Cindy, Kim, Thomas und den anderen, für lustige Dienstag-Abende, seit nunmehr etwa zehn Jahren.

Auch außerhalb des Labors verdienen natürlich auch einige Leute gebührenden Dank. Meinen drei Freunden aus der Kindheit Marvin, Sven und Christoph will ich dafür danken, dass wir über die lange Zeit beste Freunde geblieben sind und noch immer unseren ganz eigenen Humor teilen können. Gleichzeitig danke ich auch den anderen alten Werlern, mit denen ich seit all der Zeit Kontakt halten konnte.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie. Meinen Eltern für die Unterstützung und den Beistand seit Anbeginn des Studiums, ohne die mein Studium und diese Arbeit niemals möglich gewesen wären. Gleichzeitig bedanke ich mich bei meinem Bruder Stefan, Christina und natürlich meinen beiden Nichten Luisa und Sophia, die mir sehr viel bedeuten.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Freundin Sonja für ihre Hilfe, liebevolle Art und auch für das Aushalten in schwierigen Zeiten. Du gibst dieser Arbeit ihre Daseinsberechtigung!

Eidesstattliche Erklärung

Düsseldorf, 15 April 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.

Alle Stellen, die aus anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn entsprechend übernommen wurden, habe ich mit Quellenangaben kenntlich gemacht.

Sebastian Hänsch