

**Biochemische und Biophysikalische Charakterisierung
des Adhäsins und Invasins
Pmp21 von *Chlamydia pneumoniae***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Sören E.T. Luczak
aus Hannover

Düsseldorf, Dezember 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 H. Hegemann

Korreferent: Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	11
Zusammenfassung.....	15
Abstract.....	17
1 Einleitung.....	19
1.1 Taxonomie der Chlamydien.....	19
1.2 Pathogenität von Chlamydien.....	20
1.2.1 <i>C. trachomatis</i>	21
1.2.2 <i>C. pneumoniae</i>	22
1.3 Die Biologie des Entwicklungszyklus von Chlamydien.....	23
1.3.1 Adhäsion und Internalisierung von Chlamydien.....	24
1.3.2 Differenzierung von EBs zu RBs.....	26
1.3.3 Replikation von RBs.....	26
1.3.4 Redifferenzierung von RBs zu EBs und Freisetzung der Chlamydien.....	27
1.4 Der chlamydiale Außenmembrankomplex (<i>chlamydial outer membrane complex</i> ; COMC).....	28
1.4.1 Major outer membrane protein (MOMP).....	29
1.4.2 Lokalisation und Funktion von OmcA und OmcB.....	30
1.4.3 Polymorphe Membranproteine (<i>Polymorphic membrane proteins</i> ; Pmps).....	31
1.4.3.1 Pmps während der Infektion.....	32
1.4.3.2 Sequenzcharakteristika der Pmps.....	33
1.4.3.3 Prozessierung von Pmp21 aus <i>C. pneumoniae</i>	36
1.4.3.4 Struktur von Pmps.....	37
1.4.3.5 Oligomerisierung von Pmps.....	40
1.5 Amyloide.....	43
1.5.1 Sequenz- und strukturebiologische Merkmale von Amyloidfibrillen.....	45
1.5.2 Toxische Amyloide.....	46

Inhaltsverzeichnis

1.5.3	Funktionelle Amyloide.....	47
1.5.3.1	Adhäsive Amyloide.....	49
1.6	Sekretionssysteme Gram-negativer Bakterien.....	50
1.6.1	Das Typ-V Sekretionssystem	51
1.7	Zielsetzung.....	53
2	Material und Methoden	54
2.1	Material	54
2.1.1	Gebrauchsartikel	54
2.1.2	Geräte und Maschinen.....	55
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	56
2.1.4	Software	59
2.1.5	Lösungen und Puffer	60
2.1.6	Enzyme	62
2.1.6.1	Restriktionsenzyme.....	62
2.1.6.2	Weitere Enzyme	62
2.1.7	Antikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz	63
2.1.7.1	Primäre Antikörper	63
2.1.7.2	Sekundäre Antikörper	63
2.1.8	Kits.....	63
2.1.9	Größenstandards.....	63
2.1.10	Oligonukleotide	64
2.1.10.1	Oligonukleotide zur Klonierung	64
2.1.10.2	Oligonukleotide zur Sequenzierung.....	65
2.1.11	Verwendete und neu klonierte Plasmide.....	66
2.1.12	Zellen und Zelllinien	67
2.1.12.1	Prokaryotische Zellen und Zelllinien.....	67

2.1.12.2	Eukaryotische Zellen und Zelllinien	68
2.1.13	Medien und Medienzusätze.....	68
2.1.13.1	Medien für <i>E. coli</i>	68
2.1.13.2	Medien für <i>S. cerevisiae</i>	68
2.1.13.3	Zell- und Chlamydienkulturmedium	70
2.2	Methoden	70
2.2.1	Passagieren adhärenter humaner Zellen durch Trypsin Behandlung.....	70
2.2.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	71
2.2.3	Kultivierung von <i>E. coli</i>	71
2.2.3.1	Herstellung von elektrokompenten <i>E. coli</i> -Zellen	71
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	72
2.2.4.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	72
2.2.4.2	Auftrennung von DNA-Molekülen durch Agarose-Gelelektrophorese	74
2.2.4.3	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	74
2.2.4.4	Transformation von und homologe Rekombination in <i>S. cerevisiae</i>	74
2.2.4.5	Isolation von DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	75
2.2.4.6	Transformation von <i>E. coli</i>	76
2.2.4.7	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	77
2.2.4.8	Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen	77
2.2.4.9	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung	78
2.2.4.10	Sequenzierung von DNA	78
2.2.5	Biochemische Methoden	78
2.2.5.1	Induktion der Genexpression in <i>E. coli</i>	78
2.2.5.2	Nachweis von <i>E. coli</i> -Oberflächenproteinen durch Proteinase-Verdau und anschließender Western Blot Detektion.....	79
2.2.5.3	Zellaufschluß von heterolog exprimierten Proteinen.....	79

Inhaltsverzeichnis

2.2.5.4	Isolierung von Membranen durch differentielle Zentrifugation	80
2.2.5.5	Solubilisierung von Membranproteinen durch Detergenzien	81
2.2.5.6	Affinitätschromatographische Aufreinigung von heterolog exprimierten Proteinen.....	82
2.2.5.7	Größenausschlusschromatographie (SEC) von heterolog exprimierten Proteinen.....	86
2.2.5.8	Dialyse von rekombinanten Proteinen	89
2.2.5.9	Proteinmengenbestimmung mittels Bradford-Reagenz.....	89
2.2.5.10	SDS-PAGE	89
2.2.5.11	Western Blot und Immundetektion.....	92
2.2.5.12	Proteinbeschichtung von Latexkugeln und Überprüfung der Beschichtungsqualität	93
2.2.5.13	Kristallisationsexperimente mit rekombinanten Membranproteinen	94
2.2.5.14	Detektion amyloider Strukturen mittels Fluoreszenz und Absorption.....	95
2.2.6	Zellbiologische Experimente	97
2.2.6.1	Adhäsionstest von proteinbeschichteten Latexkugeln an eukaryotischen Zellen	97
2.2.6.2	Rezeptor- <i>pull-down</i> Experimente mit rekombinanten Proteinen.....	97
2.2.6.3	Inhibierung der Infektion mit löslichem rekombinantem Protein.....	98
2.2.6.4	Antikörperfärbung von chlamydialen Einschlüssen	99
2.2.7	Biophysikalische Methoden	99
2.2.7.1	Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie mit rekombinanten Proteinen ...	99
2.2.7.2	Analyse der Sedimentationsgeschwindigkeit mittels Analytischer Ultrazentrifugation (AUZ) mit rekombinanten Proteinen	100
2.2.7.3	Beschichtung von Netzen zur Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) mit rekombinanten Proteinen.....	103
3	Ergebnisse	105

3.1	Pmp21 aus <i>C. pneumoniae</i> enthält repetitive Aminosäuremotive, die amylogene Regionen darstellen.....	105
3.1.1	Nachweis der Selbstinteraktion von Pmp21 als erster Hinweis auf Oligomerisierung.....	108
3.1.1.1	Rekombinantes N-M-Pmp21 bildet Proteinspezies unterschiedlicher Größe aus.....	108
3.1.1.2	Rekombinantes M-Pmp21 bildet Proteinspezies unterschiedlicher Größe aus.....	112
3.1.1.3	Rekombinantes D-Wt bildet Proteinspezies unterschiedlicher Größe aus	114
3.1.1.4	Mutiertes Rekombinantes Pmp21-D (D-Mt) bildet Proteinspezies mit geringerer Größe aus.....	116
3.1.1.5	Rekombinantes A-Wt bildet Proteinspezies unterschiedlicher Größe aus	119
3.1.1.6	Mutiertes Rekombinantes A-Mt bildet größere Proteinspezies aus.....	121
3.1.2	Rekombinantes D-Wt und D-Mt zeigten in der AUZ Oligomere mit den Anzeichen länglicher Form.....	124
3.1.2.1	Rekombinantes D-Wt hat Anzeichen einer länglichen Form und zeigte in der AUZ eine umfassendere Auflösung großer Oligomere als in der SEC	125
3.1.2.2	Rekombinantes D-Mt hat Anzeichen einer länglichen Form und zeigte in der AUZ eine ähnlich geringe Ausbildung von Oligomeren wie in der SEC....	127
3.1.3	Darstellung rekombinanter Pmps mittels TEM.....	129
3.1.3.1	Rekombinantes Pmp21 bildet überwiegend längliche Protofibrillen aber auch globuläre Oligomere aus.....	130
3.1.4	Nachweis amyloider Pmp21 Protofibrillen mittels spezifischer Farbstoffe.....	135
3.1.4.1	Pmp21 Protofibrillen haben eine Amyloid-spezifische Thioflavin T Fluoreszenz.....	136

3.1.4.2	Pmp21 Protofibrillen können Amyloid-spezifisch mit CR gefärbt werden.....	138
3.1.5	Das Pmp-charakteristische FxxN Motiv führt zu einer erhöhten Ausbildung von Oligomeren.....	140
3.1.6	Die aufgrund des FxxN Motivs verstärkt gebildeten Oligomere unterscheiden sich durch eine β - <i>sheet</i> -reichere Sekundärstruktur von den Monomeren	141
3.1.7	Der Erhalt der oligomeren Struktur beruht zu geringem Anteil auf Disulfidbrücken und nicht auf ionischen Wechselwirkungen.....	144
3.1.8	D-Wt-O ₁ besitzt eine hohe Temperaturstabilität, die von Disulfidbrücken unterstützt wird.....	145
3.1.9	Das FxxN Motiv und die dadurch vermittelte Oligomerisierung sind essentiell für die Adhäsion an Humanzellen	147
3.1.10	Das FxxN Motiv und die dadurch vermittelte Oligomerisierung sind essentiell für die Adhäsion an den EGFR der Wirtszelle	149
3.1.11	Das FxxN Motiv und die dadurch vermittelte Oligomerisierung sind essentiell für eine Inhibierung der Infektion.....	150
3.2	Analyse des potentiellen β - <i>barrel</i> von Pmp21 aus <i>C. pneumoniae</i> als rekombinant exprimiertes Protein in <i>E. coli</i>	152
3.2.1	Identifizierung eines Bakterienstammes der zur Expression von rekombinatem C-Pmp21 geeignet ist	155
3.2.2	Die unterschiedlichen Expressionsstämme führen zu einer unterschiedlichen Temperaturstabilität von C-Pmp21.....	159
3.2.3	C-Pmp21 konnte auf der Oberfläche von BL21 nachgewiesen werden	162
3.2.4	Isolation von <i>E. coli</i> Membranen mit C-Pmp21.....	163
3.2.5	Detergenzscreening.....	164
3.2.5.1	Detergenzscreening zur Solubilisierung von C-Pmp21.....	165
3.2.5.2	Detergenzscreen zur Auswahl des für C-Pmp21 selektivsten Detergenz..	166

3.2.5.3	Bestimmung der Membranproteinkonzentration, die zur vollständigen Solubilisierung führt.....	167
3.2.6	Selektion einer homogenen C-Pmp21 Proteinspezies mittels Aufreinigung durch immobilisierte Metall-Ionen-Affinitätschromatographie (IMAC) und SEC	168
3.2.6.1	Aufreinigung von C-Pmp21 mittels IMAC	168
3.2.6.2	Selektion einer homogenen C-Pmp21 Proteinspezies durch SEC	170
3.2.6.3	Aufkonzentrierung von C-Pmp21 führte zu Aggregation	172
3.2.6.4	Finale Aufreinigung im Maßstab für Kristallisationsexperimente	174
3.2.7	Pmp21 ähnelt mit seiner β -sheet-reichen Sekundärstruktur der eines β -barrel... ..	176
3.2.8	Kristallisationsversuche mit C-Pmp21.....	177
3.2.9	Analyse der Selbstinteraktion und autarken Faltung des pAC in Pmp21	179
4	Diskussion	183
4.1.1	Homooligomerisierung von Pmp21 Domänen.....	185
4.1.1.1	Das Dimer als universelle Voraussetzung für die Homooligomerisierung.....	186
4.1.1.2	Die Oligomere scheinen einen zielgerichteten Aufbau aus kleineren Modulen zu besitzen.....	187
4.1.2	Die Protofibrilläre Struktur der Oligomere ähnelt der amyloider Proteine.....	190
4.1.2.1	Protofibrilläre Strukturen werden von Pmps aus <i>C. trachomatis</i> ausgebildet	193
4.1.2.2	Die Oligomere auf der EB-Oberfläche unterscheiden sich möglicherweise von den beobachteten Protofibrillen	193
4.1.3	Pmp21 Subdomänen bilden amyloide Protofibrillen.....	194
4.1.4	Das FxxN Motiv in D-Wt induziert die Ausbildung von Oligomeren	195
4.1.4.1	Die Oligomere besitzen Amyloid-ähnliche Sekundärstrukturen	196
4.1.4.2	Die β -sheet-reichen Oligomere zeigen Parallelen zu bekannten β -Helices... ..	198

4.1.5	Einfluss von ionischer Wechselwirkungen und Disulfidbrücken auf die Stabilität von D-Wt-O ₁	198
4.1.6	Auswirkung der protofibrillären Pmps von <i>C. pneumoniae</i> und <i>C. trachomatis</i> auf die Adhäsion.....	200
4.1.7	Ausblick: Wann kommt es während des chlamydialen Entwicklungszyklus zur Ausbildung von Amyloid-ähnlichen Pmp-Strukturen?.....	204
4.2	Experimenteller Nachweis, dass Pmps entsprechend des Typ-V AT Sekretionsweg einen β -barrel ausbilden.....	204
4.2.1	Heterologe Expression von C-Pmp21.....	205
4.2.2	C-Pmp21 zeigt Charakteristika anderer β -barrel-Proteine	206
4.2.3	C-Pmp21 wird auf die Oberfläche von <i>E.coli</i> transportiert.....	207
4.2.4	Membranisolation und Solubilisierung von C-Pmp21	208
4.2.5	Aufreinigung einer homogenen C-Pmp21 Proteinspezies mittels IMAC und SEC.	209
4.2.6	Die experimentell analysierte Sekundärstruktur gibt Hinweise auf den vorhergesagten β -barrel.....	209
4.2.7	Kristallisationstests mit C-Pmp21.....	211
4.2.8	Eine Autochaperon-Domäne lässt sich in C-Pmp21 nicht nachweisen.....	212
4.3	Ausblick: Die Aufgabe der Pmp-charakteristischen Motive FxxN und GGA (I, L, V) während der Faltung der Passagierdomäne	213
5	Anhang.....	215
6	Literaturverzeichnis	216
7	Abbildungsverzeichnis	241
8	Tabellenverzeichnis.....	244
9	Publikationen	245
10	Danksagung.....	246
11	Eidesstattliche Erklärung	248

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	der Chemikalien,	siehe Chemikalienliste	(Kapitel 2.1.3).
∅	Durchschnitt		entzündung (<i>community-acquired pneumonia</i>)
%	Prozent		
(c/m/μ//n)	(zenti/milli/mikro/nano-)	CD-Spektroskopie	Zirkulardichroismus Spektroskopie (<i>circular dichroism spectroscopy</i>)
m	Meter	CL	klarer Tropfen (<i>clear drop</i>)
(k)Da	(kilo)Dalton	cmc	kritische mizellare Konzentration (<i>critical micellar concentration</i>)
(m)A	(milli) Ampere	COMC	chlamydialer Außenmembrankomplex (<i>chlamydial outer membrane complex</i>)
(m)V	(milli) Volt	conc.	Konzentration (<i>concentration</i>)
(m)W	(milli) Watt	CR	Kongorot (<i>congo red</i>)
(m/μ/n)g	(milli/mikro/nano) Gramm	DNA	deoxyribonucleic acid
(m/μ/n)l	(milli/mikro/nano) Liter	dNTP	Deoxynukleotide
(m/μ/n)M	(milli/mikro/nano) Mol	D-Mt	Mutante Pmp-21-D
°C	Grad Celsius	D-Mt-M	Mutante Pmp21-D-Monomere
∞	unendlich	D-Mt-O ₁₋₃	Mutante Pmp21-D-Oligomere ₁₋₃
A	Amper	DTT	Dithiothreitol
aa	Aminosäure (<i>amino acid</i>)	D-Wt	Pmp-21-D
Aβ _(40/42)	Amyloid β _(1-40/1-42)	D-Wt-M	Pmp21-D-Monomere
AB	Abberantenkörperchen (<i>abberant bodies</i>)	D-Wt-O ₁₋₃	Pmp21-D-Oligomere ₁₋₃
Abb.	Abbildung	<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
AC	Autochaperon	EB	Elementarkörperchen (<i>elementary body</i>)
AP	Alkalische Phosphatase	EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
APS	Ammoniumpersulfat	<i>et al.</i>	und andere (<i>et alia</i>)
Arp2/3	aktinähnliche Proteine 2 und 3 (<i>actin related protein 2/3</i>)	EspP	<i>E. coli</i> Serin Protease P
AS	Aminosäure	<i>f/f₀</i>	Reibungsverhältnis (<i>frictional ratio</i>)
AT	Autotransporter	FACS	Durchflusszytometrie
ATP	Adenosintriphosphat		
AUZ	Analytische Ultrazentrifugation		
bamA	Außenmembranassemblierungsfaktor BamA (<i>outer membrane protein assembly factor BamA</i>)		
bp	Basenpaar		
BSA	bovines Serumalbumin		
bzw.	beziehungsweise		
<i>C.</i>	<i>Chlamydia</i>		
CAP	ambulant erworbene Lung-		

Abkürzungsverzeichnis

	(<i>Fluorescent-activated cell sorting</i>)		
Festkörper-NMR	Festkörper-Kernspinresonanz (<i>solid state nuclear magnetic resonance</i>)		
FHA	Filamentöses Hämagglutinin (<i>filamentous haemagglutinin</i>)		
FKS	Fetales Kälberserum		
FT	Durchflußfraktion (<i>flow through</i>)		
frac.	Fraktion (<i>fraction</i>)		
GAG	Glykosaminoglykan		
GTPase	Guanisintriphosphatase		
HP	schweres Präzipitat (<i>heavy precipitate</i>)		
h	Stunde (<i>hour</i>)		
HBSS	<i>Hanks buffered salt solution</i>		
HeLa-Zellen	Henrietta Lacks-Zellen		
His-Tag	Histidin-Tag		
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)		
IMAC	immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie		
IM	innere Membran (<i>inner membrane</i>)		
incl.	inklusive (<i>inclusive</i>)		
Inc-Proteine	Inklusionsmembranproteine (<i>inclusion membrane proteins</i>)		
kbar	kilobar		
kC-Pmp21	Konstitutiv exprimierender Vektor mit C-Pmp21		
L	Liter		
LD	Lipidtröpfchen (<i>lipid droplets</i>)		
LP	leichtes Präzipitat (<i>light precipitate</i>)		
LPS	Lipopolysaccharid		
min	Minute		
MALS	Mehrfachwinkellichtstreuung (<i>multi angle light scattering</i>)		
MBP	Maltosebindeprotein		
Me	Membranfraktion		
MPa	Mega Pascal		
MVB	endosomale multivesikuläre Körperchen (<i>multivesicular bodies</i>)		
moi	<i>molecules of infection</i>		
MOMP	<i>major outer membrane protein</i>		
M-Pmp21-O _{1/3}	M-Pmp21-Oligomere _{1/3}		
NFκB	Kappa-leichte-Kette-Verstärker Kernfaktor für aktivierte B-Zellen (<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>)		
Ni-NTA-Säule	Nickel-NTA-Säule		
n.s.	Nicht signifikant		
NP	unprozessiert		
nt	Nukleotid		
OCR	säulenbasierte Rückfaltung (<i>on column refolding</i>)		
OD	optische Dichte		
OM	Außenmembran (<i>outer membrane</i>)		
OmCA	Außenmembrankomplex Protein A (<i>outer membrane complex protein A</i>)		
OmCB	Außenmembrankomplex Protein B (<i>outer membrane complex protein B</i>)		
OmpA	Außenmembranprotein A (<i>outer membrane protein A</i>)		
OprB	Außenmembranprotein B		

Abkürzungsverzeichnis

	<i>(outer membrane protein B</i>		
ORF	offene Leserahmen (<i>open reading frame</i>)		
pAC	potentielles Autochaperon		
P	prozessiert		
PAGE	<i>polyacrylamid</i>	<i>gel</i>	
	<i>electrophoresis</i>		
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffer saline</i>)		
Pe	Pelletfraktion		
PD	Passagierdomäne (<i>passenger domain</i>)		
PDK	Protein-Detergenz-Komplex		
PelB	Signalsequenz	der	
	Pektatlyase B		
PelC	Pektatlyase C		
PFA	Para-Formaldehyd		
pH	<i>pondus hydrogenii</i>		
Pmp	Polymorphes Membranprotein (<i>polymorphic membrane protein</i>)		
PorB	Porin B		
PVDF	Polyvinylidenfluorid		
Rab	Ras-ähnliches Hirn- (<i>Ras-related in brain-</i>)		
Rac1	Ras-ähnliches C3 Botulinumtoxin Substrat 1 (<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>)		
Ras	Ratten Sarkom (<i>rat sarcoma</i>)		
RB	Retikularkörperchen (<i>reticulate body</i>)		
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten (<i>relative fluorescent units</i>)		
RNA	<i>ribonucleic acid</i>		
rRNA	ribosomale RNA		
RT	Raumtemperatur		
s	Sekunde		
s	Sedimentationskoeffizient		
S	Svedberg (Maßeinheit des Sedimentationskoeffizienten)		
S1	Überstand 1 (<i>supernatant 1</i>)		
S2	Überstand 2 (<i>supernatant 2</i>)		
SEC	Größenausschlusschromatographie (<i>size exclusion chromatography</i>)		
siRNA	<i>short interfering RNA</i>		
SNARE	N-ethylmaleinimid Sensitivitätsfaktorbinderezeptor (<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>)		
SOS1	<i>Son of sevenless homolog 1</i>		
SS	Signalsequenz		
T	Trypsin		
T:0/2/4/10/16/22	0/2/4/10/16/22h	nach	
	Induktion der Expression		
TARP	<i>translocated actin -recruiting phosphoprotein</i>		
TCA	Trichloressigsäure (<i>trichloroacetic acid</i>)		
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie		
ThT	Thioflavin-T		
TpsA	<i>two partner secretion system</i>		
ü/N	über Nacht		
Upm	Umdrehungen pro Minute		
UV	ultraviolett		
V	Volt		
V ₀	Totvolumen		
V _e	Elutionsvolumen		
WB	Western blot		
WHO	<i>World Health Organization</i>		

Abkürzungsverzeichnis

z.B.	zum Beispiel
------	--------------

Zusammenfassung

Chlamydien sind obligat intrazelluläre Pathogene und lösen in Menschen vielfältige Krankheiten aus. Die Adhäsion des infektiösen Elementarkörperchens an die Wirtszelle ist ein entscheidender Schritt in der chlamydialen Pathogenese. Wichtig für die Adhäsion sind die Mitglieder der Polymorphen Membranproteine (*polymorphic membrane proteins*; Pmp), die in *Chlamydia pneumoniae* (*C.pn.*) 21 Mitglieder und in *Chlamydia trachomatis* 9 Mitglieder umfassen. Pmp21 aus *C. pn.* bindet an den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (*epidermal growth factor receptor*; EGFR). Pmps zeichnen sich in ihrer zentralen Passagierdomäne (PD) durch zahlreiche FxxN und GGA (I, L, V) Tetrapeptidmotive aus. Für bestimmte Pmp21 Domänen ist bekannt, dass die Anwesenheit mindestens zwei dieser Motive entscheidend für die Adhäsion ist.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mehrere Abschnitte der Pmp21 PD, sowie PmpA und PmpC aus *Chlamydia trachomatis*, längliche Oligomere mit einer protofibrillären Form ausbilden. Des Weiteren konnte für das FxxN Motiv in Pmp21-D (D-Wt), eine Domäne von Pmp21, beschrieben werden, dass es die Selbstinteraktion, Faltung und adhäsiven Eigenschaften beeinflusst. Renaturiertes D-Wt bildet neben Monomeren (1,6 S) Oligomere (D-Wt-O) mit großen Sedimentationskoeffizienten (8-85 S) aus. Die Oligomere besitzen die Form von länglichen amyloiden Protofibrillen.

Mittels der Amyloid-spezifischen Farbstoffe Thioflavin-T (ThT) und Kongorot (CR) konnte für die Oligomere von D-Wt eine ThT-Fluoreszenz und eine CR-Absorption vergleichbar mit der des humanen amyloiden Proteins β_{42} nachgewiesen werden. Außerdem besitzen die Oligomere eine mit amyloiden Proteinen vergleichbare hohe Temperaturstabilität. Eine mutierte Version von Pmp21-D (D-Mt), bei dem die FxxN Motive durch SxxV ersetzt wurden, zeigte eine deutliche Reduzierung der Oligomerbildung (D-Mt-O). Sekundärstrukturanalysen zeigten, dass die Monomere von D-Wt und D-Mt überwiegend als zufällig gewunden (*random coils*) vorliegen, während die Oligomere überwiegend β -Faltblätter (β -*sheets*) ausbilden. In Adhäsionsstudien wurde gezeigt, dass die Oligomere von D-Wt eine signifikant erhöhte Bindung an humane Epithelzellen im Vergleich zu D-Mt-O und monomeren Proteinspezies besitzen. Mit Hilfe eines Rezeptor-*pull-downs* konnte gezeigt werden, dass der EGFR von D-Wt-O ca. doppelt so effektiv gebunden werden konnte wie von D-Wt-M. Bedeutenderweise kann durch eine Vorbehandlung der Humanzellen mit D-Wt-O, im Gegensatz zu allen anderen Proteinspezies, die Infektion einer *C. pneumoniae* Infektion

signifikant verringert werden. Folglich induziert das FxxN Motiv in D-Wt die Ausbildung von β -sheet-reichen, oligomeren Protofibrillen, die wichtig für die Adhäsion und Infektion der humanen Zelle sind.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die C-Pmp21 genannte C-terminale Region von Pmp21 untersucht. Pmps werden aufgrund bioinformatischer Analysen häufig als Typ V Autotransporter bezeichnet. Jedoch fehlt hierfür der experimentelle Nachweis. Durch die Expression von rekombinantem C-Pmp21 in *Escherichia coli* konnte gezeigt werden, dass C-Pmp21 in die äußere Membran eingebaut und selbständig auf der Zelloberfläche präsentiert wird. Zusätzlich konnte ein Detergenz identifiziert werden, mit dem C-Pmp21 aus der Membran solubilisiert werden konnte. Anhand der durch die Solubilisierung ermöglichten Sekundärstrukturanalyse wurde festgestellt, dass das Protein reich an β -sheets ist. Des Weiteren wurden initiale Kristallisationsscreens gestartet, um den Grundstein für die Analyse der Tertiärstruktur mittels Röntgenkristallographie zu legen.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob der N-terminale Bereich von C-Pmp21 ein sogenanntes Autochaperon enthält. Einige Typ Va Autotransporter besitzen Autochaperone, die die Faltung der PD sozusagen durch Ausbildung einer Schablone, anhand derer die restliche PD gefaltet wird, initiieren. In dieser Arbeit konnte jedoch kein Hinweis darauf gefunden werden, dass Pmp21 ein Autochaperon enthält. Da die FxxN Motive im ersten Teil dieser Arbeit als Ursprung für die Selbstfaltung und -assemblierung von M-Pmp21 und D-Wt identifiziert werden konnten, deutet somit alles darauf hin, dass zumindest für Pmp21 kein Autochaperon benötigt wird. Gleichzeitig weist es auf die besondere Bedeutung der FxxN Motive für die Funktion und Faltung der Pmps hin.

Abstract

Chlamydiae sp. are obligate intracellular pathogens that cause a variety of diseases in humans. Adhesion of *Chlamydiae* to the eukaryotic host cell is a pivotal step in pathogenesis. The adhesin family of polymorphic membrane proteins (Pmp) in *Chlamydia pneumoniae* consists of 21 and in *Chlamydia trachomatis* of 9 members. Pmp21 binds to the epidermal growth factor receptor (EGFR). Pmps contain large numbers of FxxN and GGA (I, L, V) motifs. At least two of these motifs are crucial for adhesion by certain Pmp21 fragments.

In the first part of this thesis it was found that several domains of the Pmp21 passenger domain (PD) as well as PmpA and PmpC from *Chlamydia trachomatis* serovar E can form elongated oligomers with a protofibrillar shape. Furthermore we describe how the two FxxN motifs in Pmp21-D (D-Wt), a domain of Pmp21, influence its self-interaction, folding and adhesive capacities. Refolded D-Wt molecules form monomers (D-Wt-M) with 1.6 S as well as oligomers (D-Wt-O) with high sedimentation values (8 to 85 S). These oligomers form elongated protofibrils.

Analysis of D-Wt-O with the amyloid specific dyes Thioflavin-T (ThT) and Congo red (CR) showed a ThT-fluorescence as well as a CR absorption comparable to the human amyloid protein fragment β_{42} . Furthermore the oligomers have a high temperature stability comparable to other amyloidic proteins. A mutant version of Pmp21-D (D-Mt), with FxxN motifs replaced by SxxV, shows a markedly reduced capacity to form oligomers (D-Mt-O). Secondary-structure assays revealed that monomers of both variants exist predominantly as random coils, whereas the oligomers form predominantly β -sheets. Adhesion studies revealed that oligomers of D-Wt mediated significantly enhanced binding to human epithelial cells relative to D-Mt-O and monomeric protein species. Additionally, receptor pulldown revealed that the EGFR was bound as twice as effective by the oligomers as by D-Wt-M. Importantly, pre-treatment of human cells with D-Wt-O reduces infectivity upon subsequent challenge with *C. pneumoniae* more effectively than all other protein species. Hence, the FxxN motif in D-Wt induces the formation of β -sheet-rich oligomeric protofibrils which are important for adhesion to, and subsequent infection of, human cells.

In the second part of this thesis the C-terminal region of Pmp21 termed C-Pmp21 was analyzed. Pmps are often referred to the Type Va autotransporters because of bioinformatical predictions. However, experimental evidence is missing. By expression of C-Pmp21 in *Escherichia coli* we found C-Pmp21 incorporated into the outer membrane as well

Abstract

as a cell surface presented. Additionally we found a detergent sufficient for solubilization of C-Pmp21 out of the *E. coli* membrane. With the solubilized protein we performed secondary structure analysis and found it rich in β -sheets. This protein was used in initial crystallization screens with the aim to elucidate the tertiary structure by X-ray.

In the third part of this thesis it was analyzed if the N-terminal region of C-Pmp21 harbors an autochaperone. Autochaperones are present in some Type Va autotransporters and induce the folding of the PD by formation of the initial folding of the PD. However, the experiments revealed no evidence for an autochaperone function. Because in the first part of this thesis the FxxN motives in M-Pmp21 and D-Wt were identified as being relevant for folding and assembly of Pmp oligomers, it seems that no autochaperone is needed in Pmp21. Simultaneously these findings show the overwhelming importance of the FxxN Motives in terms of function and folding of the Pmps.

1 Einleitung

1.1 Taxonomie der Chlamydien

Chlamydien sind Gram-negative, obligat intrazelluläre Bakterien. Sie wurden bereits 1880 und 1907 beschrieben und später als *Chlamydia psittaci* beziehungsweise *Chlamydia trachomatis* bekannt (1-3). Sie wurden zuerst fälschlicherweise den Viren zugeordnet, und die Korrektur in Form der Einordnung in die Domäne *Bacteria* erfolgte erst in den 1960er Jahren. Alle bekannten Vertreter des Phylums *Chlamydiae* replizieren sich obligat in einer eukaryotischen Wirtszelle (4). Aufgrund unterschiedlicher Schwierigkeiten, die auch mit der Kultivierung zusammenhängen, nahm man lange an, dass das Phylum *Chlamydiae* nur aus einer Familie (*Chlamydiaceae*) mit einer Gattung (*Chlamydia*; *C.*) und zwei Spezies (*C. trachomatis* und *C. psittaci*) besteht (5). Als dritte eigenständige Spezies wurde 1989 *C. pneumoniae* eingeführt, gefolgt von *C. pecorum* (5). Die Entwicklung serologischer und molekularer Analyseverfahren und die Untersuchung der 16 S und 23 S rRNA ermöglichte die Zuordnung weiterer Spezies zur Gattung *Chlamydia*, sowie die Eingliederung der Familien *Parachlamydiaceae*, *Waddliaceae* und *Simkaniaceae* in das Phylum *Chlamydiales* (6-8). Aufgrund von Sequenzvergleichen ausgewählter 16 S rRNAs und Proteingenen wurde die Vermutung aufgestellt, dass es sich mit voraussichtlich mehr als 180 Familien bei den *Chlamydiae* um ein nahezu omnipräsentes Phylum von Bakterien handelt, die weit voneinander entfernte Wirte besiedeln können (9). Die 10 bis heute bekannten Familien sind in Abbildung 1.1 dargestellt.

1.2.1 *C. trachomatis*

C. trachomatis wird in 19 Serovare unterteilt, die zwei verschiedene Bereiche (Augen- und Urogenitaltrakt) infizieren (27). Die Serovare A - C führen zu einer Infektion der Augen und lösen dort das sogenannte Trachom aus. Die Serovare D - K führen zu einer Infektion des Urogenitaltrakts. Die Serovare LGV infizieren ebenfalls den Urogenitaltrakt, allerdings führen sie zu deutlich invasiveren systemischen Infektionen.

Das durch die Serovare A - C ausgelöste Trachom resultiert aus der Konjunktivitis, einer entzündlichen Erkrankung der Innenseite des Augenlides. Bei Nichtbehandlung bzw. häufiger Wiederkehr kommt es zu der als Trachom bezeichneten Vernarbung des Augenlides (28). Die Vernarbung wiederum resultiert in der Trichiasis, einem Scheuern der Wimpern auf der Hornhaut. Die Hornhaut wird dadurch zerkratzt, was zu einer eingeschränkten Sicht, bis hin zur Erblindung führt. Das Trachom stellt ein besonders großes Problem in Entwicklungsländern dar, und *C. trachomatis* gilt als der Hauptgrund für infektionsbedingte Erblindung (29-31).

Die Serovare D - K gelten als die häufigste Ursache sexuell übertragbarer, bakterieller Erkrankungen. Die WHO schätzte die Neuinfektion bei Erwachsenen (15 - 49 Jahre) für das Jahr 2008 auf 107 Millionen (32). Die Erkrankung verläuft bei Männern zu 50% und bei Frauen zu 70% asymptomatisch. Die Dunkelziffer wird daher als deutlich höher eingeschätzt (33). Durch eine unbehandelte Infektion können chronische Unterleibserkrankungen auftreten. Bei Männern kann eine entzündliche Infektion der Harnröhre (Urethritis) auftreten, was zu einer Entzündung der Nebenhoden und der Prostata führen kann (27). Bei Frauen hingegen kann die durch Entzündungen hervorgerufene Vernarbung des Gewebes zu Bauchhöhlen- und Eileiterschwangerschaften führen. Im schlimmsten Fall resultiert daraus eine Infertilität. Zwei Drittel aller tubaren Sterilitäten werden auf eine Infektion mit *C. trachomatis* zurückgeführt (27).

Im Gegensatz zu den im infizierten Gewebe verbleibenden Serovaren D - K, gelten die Serovare L1 - L3 (*Lymphogranuloma venereum*; LGV) als deutlich invasiver. Sie nutzen das Epithelgewebe des Urogenitaltrakts lediglich als Eintrittspforte. Anschließend dringen sie in tiefer liegende Gewebeschichten vor. Sie rufen durch den Transport in Makrophagen eine Infektion der Lymphknoten und Erkrankungen des lymphatischen Systems hervor (*Lymphadenopathie*) (27). In Industriestaaten ist das Vorkommen von LGV gering.

1 Einleitung

Urogenitale Infektionen werden dort hauptsächlich durch die nah verwandten Serovare D - K verursacht (27,34-37).

1.2.2 *C. pneumoniae*

Die zweite und weiter verbreitete humanpathogene Chlamydien-Spezies ist *C. pneumoniae*. *C. pneumoniae* wurde 1989 durch Analyse der Ultrastruktur, der DNA, sowie der Serologie als eigene Spezies der Gattung *Chlamydia* klassifiziert (7). Trotz der weiten Verbreitung und intensiver Erforschung ist die klinische Relevanz der *C. pneumoniae*-Infektion nicht vollkommen geklärt (38,39). Durch die Infektion entstehen verschiedene Erkrankungen des Respirationstraktes, wie ambulant erworbene Lungenentzündung (Pneumonie) (engl. *community-acquired pneumonia*, CAP), Bronchitis, Entzündungen der Nasennebenhöhlen (*Sinusitis*) und Rachenentzündung (*Pharyngitis*) (40). Zur Mensch zu Mensch Übertragung der Infektion des respiratorischen Trakts kommt es durch Tröpfcheninfektion (41,42). Obwohl 70% der Erkrankungen einen milden oder zeitlich begrenzten asymptomatischen Verlauf aufweisen, kommt es bei den verbliebenen 30% zur Ausbildung von schwerwiegenden, behandlungsbedürftigen Erkrankungen in Form von Bronchitis, Pneumonie oder Entzündungen der oberen Atemwege (41,43). Serologische Studien identifizierten eine 50%ige Durchseuchung bei Erwachsenen im Alter von 20 Jahren. Mit zunehmendem Alter steigt sie auf bis zu 70 - 80% an (42,44).

Des Weiteren konnte eine Verbindung zwischen *C. pneumoniae*-Infektionen und chronischen neurodegenerativen Erkrankungen, wie Multiple-Sklerose (45) und Alzheimer (46) gefunden werden. Im Fall von Alzheimer konnten aus Gehirngewebeproben lebende Bakterien isoliert und kultiviert werden (47).

Von humanpathogenen *C. pneumoniae*-Isolaten sind bisher 22 Genomsequenzen veröffentlicht worden. In Bezug auf Gengehalt und Genreihenfolge sind diese zu 93,7 - 99,9% identisch (48-50). Von den 1074 annotierten Protein-codierenden Genen haben jedoch 214 keine Homologen in *C. trachomatis* (51-53). Die bisherigen Erkenntnisse zur chlamydialen Biologie beschränken sich jedoch überwiegend auf *C. trachomatis*. Dieser Umstand verdeutlicht bereits die Notwendigkeit der Analyse der Interaktion von *C. pneumoniae* mit der Wirtszelle.

1.3 Die Biologie des Entwicklungszyklus von Chlamydien

C. pneumoniae hat wie alle Chlamydien einen biphasischen Lebenszyklus (Abbildung 1.2). Der chlamydiale Entwicklungszyklus ist gekennzeichnet durch zwei funktional und morphologisch unterschiedliche Formen. Das extrazelluläre und infektiöse aber metabolisch weitgehend inaktive Stadium stellt das ca. 0,2 - 0,4 μM große Elementarkörperchen (*elementary body*; EB) dar. Das intrazelluläre, metabolisch aktive Stadium stellt das ca. 0,4 - 1,5 μM große Retikularkörperchen (*reticulate body*; RB) dar (54-56).

Während der Anpassung an die intrazelluläre Lebensweise wurde das Genom stark reduziert (10). Das Genom von *C. trachomatis* Serovar D weist daher lediglich $1,04 \times 10^6$ bp auf und umfasst 894 offene Leserahmen (*open reading frames*; ORFs). Das Genom von *C. pneumoniae* ist ca. 20% (ca. 209.000 bp) größer und besitzt im Gegensatz zu *C. trachomatis* 214 zusätzliche proteinkodierende Sequenzen (51,57). Durch die Bindung bakterieller histonähnlicher Proteine liegt das Genom im EB stark kondensiert vor.

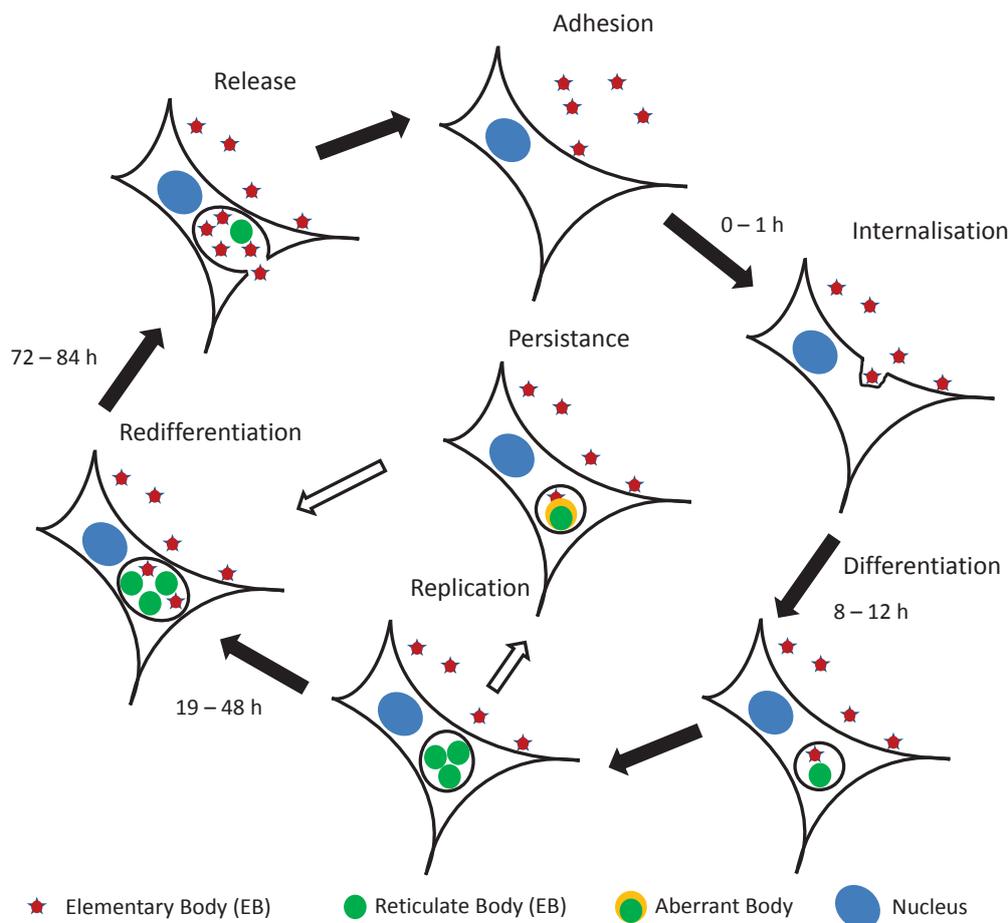


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von *C. pneumoniae*.

Dargestellt sind die entscheidenden Phasen während der Wirtszellinfektion durch *C. pneumoniae* (verändert nach: (58,59)); *Adhesion*: Adhäsion, *Internalisation*: Internalisierung, *Differentiation*: Differenzierung, *Replication*: Replikation, *Persistence*: Persistenz, *Redifferentiation*: Redifferenzierung, *Release*: Freisetzung.

1.3.1 Adhäsion und Internalisierung von Chlamydien

Der Entwicklungszyklus von *C. pneumoniae* beginnt mit der Adhäsion der EBs an eine eukaryotische Wirtszelle (Abbildung 1.2). Dieser zweistufige Prozess beginnt mit der vermutlich reversiblen elektrostatischen Wechselwirkung des EBs mit Glykosaminoglykanen (GAGs) (60). Die GAG-determinierte Adhäsion erfolgt vermutlich durch einen trimolekularen Mechanismus. Exponierte GAG-Moleküle stellen dabei überbrückende Strukturen zwischen chlamydialer und eukaryotischer Oberfläche dar (61). Durch eine Entfernung der GAGs von EB- oder Wirtszelloberfläche, wie auch durch eine präinfektiöse Inkubation mit Heparansulfat oder seinem Analogon Heparin, konnte eine signifikante Reduktion der Infektion erreicht werden. Dies deutet auf eine entscheidende Aufgabe der GAGs während der chlamydialen Infektion hin (62-64). Für das *C. trachomatis* Serovar E wurde allerdings eine Heparin-unabhängige Bindung festgestellt. Somit ist die GAG-abhängige Infektion offenbar Spezies-spezifisch (65,66). Bereits 1996 wurde aufgrund einer Adhäsion von Heparin an EBs vermutet, dass auf den Oberflächen von *C. trachomatis* Serovar B und L2 ein GAG-Rezeptor existiert (67). Ein Interaktionspartner von Wirtszellanalogen Heparin-ähnlichen GAGs wurde in Form des chlamydialen Außenmembrankomplex Protein B (*outer membrane complex protein B*; OmcB) identifiziert und charakterisiert (65,68-70).

Der GAG-determinierten Adhäsion folgt eine irreversible Bindung an Rezeptoren der Wirtszelle (71). Eine bedeutende Proteinfamilie des chlamydialen Außenmembrankomplexes (*chlamydial outer membrane complex*; omc; siehe 1.4), die Adhäsion vermittelt, stellen dabei die Polymorphen Membranproteine (*Polymorphic membrane proteins*; Pmps) dar. Für *C. trachomatis* wurde gezeigt, dass alle neun Pmps Adhäsion vermitteln und Absättigung der Wirtszelloberfläche mit löslichen Pmps die Infektion neutralisiert (72). Des Weiteren wurde für *C. pneumoniae* in verschiedenen Studien gezeigt, dass Pmp2, 6, 14, 16, 19, 20 und 21 Adhäsion vermitteln und Absättigung der Wirtszelloberfläche mit löslichen Pmps die Infektion ebenfalls inhibiert (73,74). Zusätzlich wurde festgestellt, dass Pmp21 an den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (*epidermal growth factor receptor*; EGFR) adhärert. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung des EGFR, welche zu einer Internalisierung infektiöser EBs führt (75). Somit wurde mit der direkten Bindung von Pmp21 an den EGFR erstmals eine Adhäsion-Invasin-Rezeptor-Interaktion bei Chlamydien identifiziert.

1 Einleitung

Weitere mögliche chlamydiale Adhäsine sind Oberflächenproteine wie beispielsweise das *major outer membrane protein* (MOMP), die Lipopolysaccharide (LPS), GroEL1 und das Arginin-Bindeprotein ArtJ (69,76-79).

Drei weitere Wirtszell-Rezeptoren, die durch Bindung eine Internalisierung der Chlamydien zur Folge haben, sind der Mannose-Rezeptor, der Mannose-6-phosphat-Rezeptor, sowie die Protein-Disulfid-Isomerase (80-82).

Es wurden weitere Hinweise auf Internalisierungsmechanismen gefunden, wie die rezeptorvermittelte clathrinabhängige Endozytose oder clathrinunabhängige Internalisierung der EBs an Lipidflößen (*Lipid rafts*) welche cholesterolreiche Mikrodomänen darstellen (83-87). Kurz nach der Adhäsion an die Plasmamembran der Wirtszelle erfolgt die Rekrutierung von Aktin an der Bindestelle. Infolgedessen werden sockelartige Strukturen gebildet und die Aufnahme der EBs wird erleichtert (88,89). Die Reorganisation des Aktins erfolgt durch das translozierte, Aktin-rekrutierende Phosphoprotein (*translocated actin-recruiting phosphoprotein*; TARP), welches durch Typ III Sekretion in die Wirtszelle transportiert wird (90,91). Für *C. trachomatis* konnte gezeigt werden, dass TARP von Kinasen der Wirtszelle phosphoryliert wird. Dies hat eine Bindung des Austauschfaktors *Son of sevenless homolog 1* (SOS1) und des „onc F“ Protoonkogen (*'onc F' proto-oncogene*; VAV2) zur Folge. Über eine Signalkaskade aktivieren diese zwei Rac Guanosinnukleotid-Austauschfaktoren den Komplex der aktinähnlichen Proteine 2 und 3 (*actin related protein 2/3*; Arp2/3), welches eine Anreicherung von Aktin an der Bindestelle der Chlamydien zur Folge hat (92,93). siRNA-Experimente zeigten, dass SOS1 und VAV2 vermutlich durch verschiedene Faktoren angesprochen werden und zur Aktivierung des Ratten Sarkom (*rat sarcoma*; Ras)-ähnlichen C3 Botulinumtoxin Substrat 1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*; Rac1)-Proteins führen. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass TARP die Aktin-Zytoskelett Maschinerie anspricht, um eine Invasion von *C. trachomatis* bei nicht phagozytierenden Zellen zu ermöglichen. (93).

Die effiziente Internalisierung der EBs, sowie die Maskierung der Inklusion, die Akquisition von Nährstoffen für das intrazelluläre Überleben der Chlamydien erfolgt insgesamt betrachtet durch Modulation von Wirtszellprozessen. Dies erfolgt unter anderem durch Sekretion von Effektorproteinen über das Typ III Sekretionssystem in das Zytoplasma der Wirtszelle, die Einschlußmembran oder ins Lumen des Einschlusses (94,95).

1.3.2 Differenzierung von EBs zu RBs

Die EBs liegen nach erfolgreicher Internalisierung im Zytosol als Membran-umhülltes Einschlusskörperchen (Inklusion) vor. Während des gesamten Replikationszyklus verbleiben die Chlamydien in diesem aus Wirtszellmembran bestehenden Kompartiment. 8 - 12 h nach der Infektion differenzieren die EBs zu den metabolisch aktiven RBs. Da die Außenmembranproteine der Chlamydien (MOMP, Außenmembrankomplex Protein A (*outer membrane complex protein A*; OmcA) und OmcB) sehr cysteinreich und miteinander darüber vernetzt sind, erfolgt zuerst eine Reduktion der Disulfidbrücken. Nach Auflockerung der ehemals rigiden Außenmembran erfolgt die Dekondensierung der DNA, um eine Genexpression zu ermöglichen (96-98). Um die Infektion zu etablieren, erfolgt zu Beginn die Expression von Inklusionsmembranproteinen (*inclusion membrane proteins*; Inc-Proteine), die unter anderem für die Versorgung der Einschlüsse mit Nährstoffen und der weiteren Modifikation der Inklusionsmembran verantwortlich sind (99). Während dieser Etablierung migriert die Inklusion entlang der Mikrotubuli in Richtung Zellkern (100,101).

1.3.3 Replikation von RBs

Die Expansion der Inklusionsmembran mit anschließender Zweiteilung der RBs erfolgt 11 - 20 h nach der Infektion während der replikativen Phase. Die Chlamydien akquirieren hierfür Nährstoffe wie Aminosäuren (AS), ATP, Eisenionen, Lipide und Nukleotide aus der Wirtszelle (102). Der Golgi-Apparat der Wirtszelle wird fragmentiert, und die Inklusion wird anschließend mit den entstandenen Golgi-Ministapeln umgeben, um für die Lipidversorgung zur Verfügung zu stehen (103). Exozytische Vesikel können dadurch leichter von der Inklusion rekrutiert werden und die Versorgung mit Sphingolipiden und Cholesterin gewährleisten (104,105). Durch Fusion mit der Inklusionsmembran werden die Lipide aufgenommen und können anschließend in die Einschlußmembran und die chlamydiale Zellwand eingebaut werden (106). Außerdem wurde die Nährstoff- und Lipidversorgung der Inklusion durch Lipidtröpfchen (*lipid droplets*; LDs) (94,107) und endosomalen multivesikulären Körperchen (*multivesicular bodies*; MVBs) (108) beschrieben. Bei der Vesikelrekrutierung vermutet man eine Beteiligung der Inc-Proteine und weiterer membranintegrierter Proteine der Inklusion. Die Rekrutierung wird in diesem Fall durch die Interaktion zu Ras-ähnlichen Hirn (*Ras-related in brain*; Rab) GTPasen und löslichen N-

1 Einleitung

Ethylmaleinimid Sensitivitätsfaktorbinderezeptor (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*; SNARE) Proteinen vermittelt (102).

Zur Inhibierung des Immunsystems und apoptotischer Signale, mit dem Ziel für eine Etablierung der replikativen Nische zu sorgen, sekretieren Chlamydien Effektorproteine. Beispielsweise wird die Aktivierung des Kappa-leichte-Kette-Verstärker Kernfaktors für aktivierte B-Zellen (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*; NF κ B) durch verschiedene chlamydiale Proteine beeinträchtigt und führt damit zu einer Reduzierung der Entzündungsreaktion (109,110).

Falls es während der Infektion zu Nährstoffmangel oder Antibiotika Einfluss kommt, können die RBs ihre Morphologie zu Aberrantenkörperchen (*aberrant bodies*; ABs) verändern. ABs haben die Fähigkeit zur Teilung und Redifferenzierung nicht. Sie stellen allerdings eine Art der Überdauerungsform dar und werden mit chronischen Infektionen in Verbindung gebracht (111).

1.3.4 Redifferenzierung von RBs zu EBs und Freisetzung der Chlamydien

Die Replikation beginnt nach der ersten Hälfte des Entwicklungszyklus asynchron zu verlaufen. Vereinzelt beginnen RBs sich zu EBs zu redifferenzieren. Es werden Gene exprimiert, die für den Aufbau der EBs-Außenmembran benötigt werden. Die metabolische Aktivität beginnt zu erliegen, und es kommt durch Expression entsprechender Gene zur Kondensation des Chromatins. Unklar bleibt jedoch, durch welche Signale es zur Auslösung dieser Prozesse kommt (112).

Zum Abschluss des Entwicklungszyklus erfolgt die Freisetzung der EBs durch Protease-vermittelte Zelllyse oder Extrusion. Die Abschnürung der Inklusion während der Extrusion erfolgt unter Beteiligung von Aktin und Myosin. Hierbei wird die Integrität der Zelle nicht beeinflusst (85).

Dieser grundlegend gleiche Entwicklungszyklus wird von allen chlamydialen Spezies durchlaufen. Die benötigte Zeit bis zur Vollendung des Entwicklungszyklus variiert jedoch. Die Extrusion der EBs von *C. pneumoniae* erfolgt erst nach 84 h (59). Die okularen Serovare von *C. trachomatis* beginnen mit der Freisetzung jedoch bereits nach 48 h und schließen sie nach 60 h ab. Die Freisetzung der genitalen Serovare von *C. trachomatis* erfolgt bereits nach 30 h und ist nach 48 h abgeschlossen (113).

1.4 Der chlamydiale Außenmembrankomplex (*chlamydial outer membrane complex; COMC*)

Entsprechend ihrer Klassifizierung als Gram-negative Bakterien besitzen Chlamydien eine innere und eine äußere Membran (114). Üblicherweise sorgt in Gram-negativen Bakterien eine dünne Peptidoglykanschicht für eine Stabilität der Bakterienhülle. Allerdings konnte in EBs von Chlamydien lange Zeit kein Peptidoglykan detektiert werden (115,116), obwohl Enzyme für die Mureinbiosynthese (115,117) von RBs während der Replikation und Persistenz exprimiert werden (118). Erst kürzlich wurde geklärt, dass Chlamydien Zellwandsacculi mit Peptidoglykan besitzen (119).

Jedoch unterscheiden sich Chlamydien mit ihrem einzigartigen COMC von anderen obligat intrazellulären Bakterien (120). Um die Unterrepräsentation von Peptidoglykan zu kompensieren, besitzen Chlamydien eine proteingekoppelte Peptidoglykanschicht, die Rigidität vermittelt (121). Der COMC setzt sich aus vielen cysteinreichen Proteinen zusammen, die dem EB durch Quervernetzung über Disulfidbrücken Stabilität vermitteln (96,122). Teilweise vermitteln diese Proteine gleichzeitig Adhäsivität gegenüber der Wirtszelle (65,68). Diese Rigidität wird vermutlich hauptsächlich durch Homooligomerisierung des Cystein-reichen MOMP (96,97,123) und Heterooligomerisierung mit dem cysteinreichen OmcB sowie mit OmcA durch Ausbildung einer supramolekularen Struktur vermittelt (68,114). Der COMC ist infolge dessen hauptsächlich ein durch Disulfidbrücken geformtes Netzwerk zwischen dem Porin MOMP, OmcA und OmcB mit einem Verhältnis von 5:2:1 zueinander (124). Neben MOMP konnte mit PorB ein weiteres Porin mit anderer Porenaktivität und geringer Sequenzidentität zwischen *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* nachgewiesen werden (125).

Es wurde gezeigt, dass weitere häufig vertretene Proteine der äußeren Membran nicht durch Disulfidbrücken mit dem COMC verbunden sind. Beispielsweise wurde PmpD von *C. trachomatis* zwar auf der EB-Oberfläche gefunden, jedoch konnte es mit milden Detergenzien und ohne reduzierende Agenzien von intakten EBs gewaschen werden (126,127). Serovarspezifische Unterschiede bezüglich der Quervernetzung von Pmps scheinen allerdings nicht auszuschließen zu sein. So musste bei der Solubilisierung des PmpD Homologs Pmp21 aus *C. pneumoniae* zur Analyse der Fragmentierung zum Reduzieren der Disulfidbrücken Dithiothreitol (DTT) verwendet (73).

1 Einleitung

Des Weiteren befindet sich auf der Außenmembran das LPS. Wie andere bakterielle LPS-Strukturen besitzt es endotoxische Aktivität (128,129). Es wurde ebenfalls diskutiert, ob das chlamydiale LPS adhäsive Eigenschaften hat (69). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass eine Absättigung des LPS mit dem synthetischen Alkylpolyamin DS-96 zu einer Inhibierung der Infektion führt (130). Durch Immun-Colokalisations- und Coimmunpräzipitations-Analysen konnte schließlich eine direkte Interaktion von dem *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) mit dem chlamydialen LPS gezeigt werden (131). Abbildung 1.3 zeigt eine Übersicht des COMC.

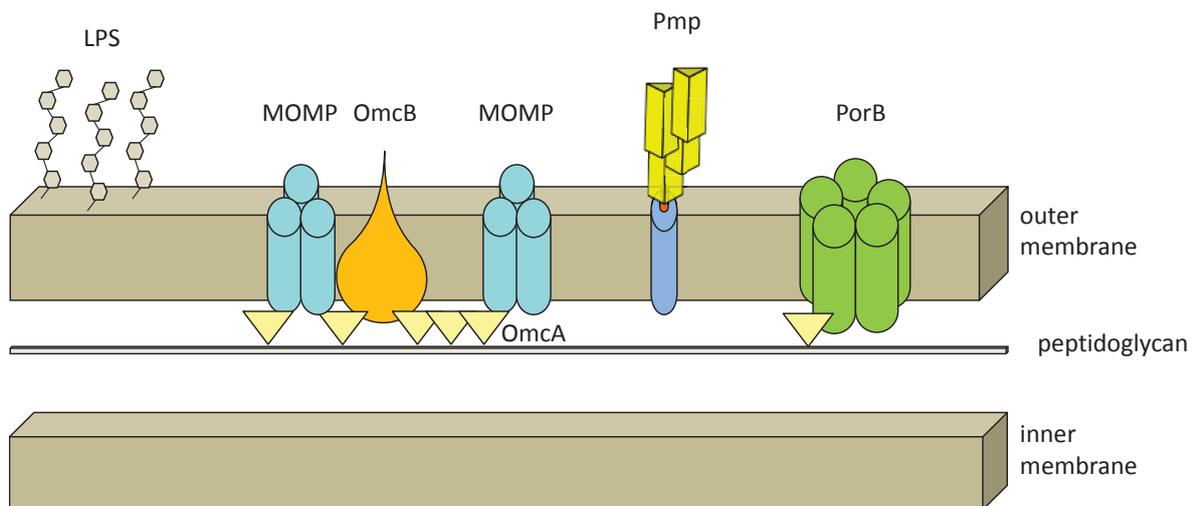


Abbildung 1.3: Die chlamydialen Membranen mit wichtigen Vertretern des COMC.

Auf der Außenseite der Außenmembran befindet sich das LPS. OmcA ist mit der Innenseite der Außenmembran assoziiert und vermutlich auch mit einer sehr dünnen Peptidoglykanschicht. OmcA und OmcB sind im Periplasma über Disulfidbrücken miteinander vernetzt. Möglicherweise besteht diese Vernetzung ebenfalls für weitere Proteine, wie Porin B (PorB) und auch einige Pmps (verändert nach (132)).

1.4.1 Major outer membrane protein (MOMP)

MOMP macht ca. 60% des Proteinanteils im COMC von *C. trachomatis* aus und ist damit das am stärksten vertretene Protein der äußeren Membran (133). MOMP-Orthologe sind in allen Chlamydienspezies vertreten und dort ebenfalls am stärksten in der äußeren Membran vertreten (123,134).

Eine Infektion kann mit Antikörpern, die gegen aufgereinigtes MOMP gerichtet sind, inhibiert werden. Daher geht man davon aus, dass MOMP zumindest teilweise auf der EB-Oberfläche liegt (135). Allerdings konnten diese Antikörper nicht die Infektion mit nahe verwandten Stämmen verhindern, weshalb von einer starken interserovar- und interspezies-Heterogenität ausgegangen wird (135,136).

1 Einleitung

Das ca. 40 kDa große MOMP Molekül ist ein Porin (133). In der Membran bildet es Homotrimere aus 16-strängigen β -Fässern (β -barrels) aus (137). Für MOMP wurde eine elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkung mit der Wirtszelle vermutet (138). Für das MOMP von *C. muridarum* konnte eine Inhibierung der Infektion durch Heparansulfat nachgewiesen werden, was eine elektrostatische Wechselwirkung nahelegt (78). Für MOMP von *C. pneumoniae* konnte dies jedoch nicht gefunden werden (73). Die Inhibierung der *C. muridarum* Infektion wurde später allerdings als unspezifisch eingestuft (70,78). Eine Beteiligung am Adhäsionsprozess wurde aber nicht grundlegend ausgeschlossen. Für andere Chlamydienpezies wurde gezeigt, dass MOMP N-glykosyliert vorliegt. Es besteht daher die Möglichkeit, dass MOMP über diese Zuckerketten mit Mannoserezeptoren der Wirtszellen interagiert und so zumindest die Adhäsion fördert (82,139). Aufgrund von Inhibierungsexperimenten mit *C. trachomatis* Serovar E wurde als möglicher Interaktionspartner der Mannose-Rezeptor genannt. Für *C. pneumoniae* wurde entsprechend der Mannose-6-Phosphat/Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (*Mannose-6-Phosphat/insulin-like growth factor*) genannt (82,140).

1.4.2 Lokalisation und Funktion von OmcA und OmcB

OmcA und OmcB sind jeweils ca. 12 und 60 kDa groß und wie andere Proteine der chlamydialen Außenmembran und des COMC reich an Cysteinen (14,8% und 4,4%) (97,123,141). Es wurde gezeigt, dass es sich bei OmcA um ein Lipoprotein handelt, das zusammen mit OmcB exprimiert wird (124,142,143). Es wurde vermutet, dass OmcA vollständig und OmcB teilweise im Periplasma vorliegt (114). Dort bilden sie durch Disulfidbrücken ein Heteropolymer aus, welches auch andere Cystein-haltige Außenmembranproteine wie MOMP, PorB, Außenmembranprotein B (*outer membrane protein B*; OprB), das Typ 3 Sekretionssystem und Pmps einschließen kann (132). Im Gegensatz zu MOMP sind die Sequenzen von OmcA und OmcB in den verschiedenen Chlamydienpezies weitestgehend konserviert (142,144,145).

Bioinformatische Analysen haben ergeben, dass OmcB aus einem hydrophilen, vermutlich oberflächenpräsentierten N-Terminus und einem hydrophoben membranassoziierten C-Terminus besteht. Der N-Terminus zeichnet sich zusätzlich durch eine Abwesenheit von Cysteinen und eine hohe serovarspezifische Variabilität aus (146,147). Aufgrund der Oberflächenlokalisierung und der hohen Anzahl von Arginin und Lysin wurde eine Interaktion

1 Einleitung

mit negativ geladenen GAGs vorhergesagt (148). Zuerst konnte nur die Adhäsion von OmcB an HeLa-Zellen gezeigt und somit seine Funktion als Adhäsine bewiesen werden (149). Im Folgenden wurde auch die spezifische Bindung an GAGs gezeigt (70). Wobei auch die N-terminale Heparinbindedomäne identifiziert werden konnte, die sich aus basischen (B) und hydrophoben (X) AS in dem Motiv XBBXBX zusammensetzt (70). In folgenden Studien wurden durch Verwendung von rekombinantem Protein, spezifischen Antikörpern und Hefe-Oberflächenpräsentationssystemen das OmcB von *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* L1 und E und *C. caviae* als Adhäsine identifiziert (65,68).

Die essentielle Funktion von Heparin bei der Adhäsion des OmcB von *C. pneumoniae* konnte durch Inhibierungsexperimente mit verschiedenen GAGs gezeigt werden (65). Die OmcB Proteine von *C. pneumoniae*, *C. psittaci* und *C. trachomatis* Serovar L2 weisen eine Heparin-abhängige Adhäsion auf. Dies trifft jedoch nicht für OmcB von *C. trachomatis* E zu (62,63,65,66). Durch vergleichende Bindungsanalysen von OmcBs verschiedener Spezies konnten spezifische Aminosäuren innerhalb der Bindedomäne identifiziert werden, welche zu einer Heparin-abhängigen oder Heparin-unabhängigen Bindung von OmcB führen (65,69,150).

1.4.3 Polymorphe Membranproteine (*Polymorphic membrane proteins; Pmps*)

C. trachomatis codiert und exprimiert neun Pmps (A - I), die sechs Subtypen zugeordnet werden können (PmpA, PmpB/C, PmpD, PmpE/F, PmpG und PmpH) (57,117). *C. pneumoniae* beherbergt hingegen 21 Pmp-Gene (1 - 21), die den gleichen sechs Gruppen zugeordnet werden können (Pmp19, Pmp20, Pmp21, Pmp15 - 18, Pmp1 -13, Pmp14) (57,117,151-153) und von denen jede eine orthologe Gruppe von Pmps in *C. trachomatis* besitzt. Alle Pmp Gene von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* werden transkribiert (154-157). Allerdings enthalten die Pmp Gene *pmp3*, *4*, *5*, *10*, *12* und *17* Leseraster Verschiebungen (*Frameshift-Mutationen*) oder frühzeitige Stopcodons, weshalb sie nicht translatiert werden (151).

Die Wichtigkeit der Pmp-Familie wird durch die Tatsache hervorgehoben, dass intrazelluläre Bakterien die Größe ihres Genoms für gewöhnlich im Laufe der Evolution reduzieren. Trotzdem machen Pmp-Gene zwischen 3% - 5% der Kodierungskapazität aus (51,57,158).

Darüber hinaus wurden alle neun Pmps von *C. trachomatis* L2 in der äußeren Membran gefunden und alle Pmps von *C. trachomatis* E auf der Oberfläche von EBs (156,159-162). Von

1 Einleitung

C. pneumoniae CWL029 werden 16 Pmps exprimiert, und es gibt Nachweise zur Oberflächenlokalisierung von Pmp6, Pmp8, Pmp10, Pmp11, Pmp20 und Pmp21 (151,157,163).

1.4.3.1 Pmps während der Infektion

Viele Hinweise, dass Pmps eine entscheidende Rolle während der Infektion haben und möglicherweise Adhäsine darstellen, konnten seit ihrer Entdeckung gesammelt werden. Man fand in Patienten Antikörpertiter gegen Pmps entsprechend ihrer Oberflächenlokalisierung (164,165). Parallel dazu wurde gezeigt, dass durch rekombinantes Pmp20 und Pmp21 von *C. pneumoniae* die Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen in humanen Endothelzellen und Monozyten erhöht wurde (166,167). Die frühesten Arbeiten zur Reduzierung einer chlamydialen Infektion stammt von Antikörperexperimenten mit *C. abortus*. Durch monoklonale Antikörper gegen eins der Pmps konnte die Infektion reduziert werden (168).

Später konnte gezeigt werden, dass spezifische Antikörper gegen PmpD von *C. trachomatis* und Pmp21 von *C. pneumoniae* zu einer Reduzierung der Infektion in *in vitro* Experimenten führten (126,167). All diese Hinweise führten zu der Annahme, dass es sich bei PmpD und Pmp21 um Oberflächenproteine handelt, die an der Interaktion zwischen EB und Wirtszelle beteiligt sind und möglicherweise Adhäsine darstellen.

Daraufhin konnten Pmp6, Pmp20 und Pmp21 von *C. pneumoniae* durch Bindungsanalysen mit proteinbeschichteten Latexkügelchen und Bindungsanalysen mit Pmp-präsentierenden Hefezellen als Adhäsine identifiziert werden. Die Adhäsivität konnte ebenfalls durch eine signifikante Reduzierung der Infektion durch eine Präinkubation mit den löslichen rekombinanten Pmps oder Pmp-spezifische Antikörpern vor der Infektion gezeigt werden (73). Zur Identifizierung der Bindedomäne von Pmp21 wurde die Passagierdomäne (*passenger domain*; PD) so unterteilt, dass jedes Viertel mindestens zwei der charakteristischen Motive (GGA (I, L, V) oder FxxN) enthielt. Es wurde festgestellt, dass jeder Teil der Pmp21 PD adhäreren und die Infektion signifikant reduzieren konnte. Im Folgenden wurde durch Mutationsexperimente festgestellt, dass mindestens zwei der genannten Motive in den Pmp21 PD-Fragmenten enthalten sein müssen, um eine Adhäsion zu bewirken. Das Ausmaß des Einflusses auf die Adhäsion wurde zudem durch die Entdeckung unterstrichen, dass ein 32 Aminosäuren langer, sequenzdurchmischter (*scrambled*) Abschnitt von Pmp21 (Aminosäureposition 745 - 776) der mit je einem GGA(I, L, V)- und einem FxxN-

1 Einleitung

Motiv ausgestattet war, die Infektion ebenso deutlich reduzieren konnte, wie die natürlich vorkommende Domäne M-Pmp21 (Abbildung 1.5) (73).

Letztlich wurde durch eine Präinkubation mit einem Gemisch der beiden Pmps6 und 21 eine additive Inhibierung der Infektion erzielt. Das war mit Pmp6 alleine nicht möglich (73). Dies legt nahe, dass Pmp6 und Pmp21 eine Überlappung, bei dem Binden ihres spezifischen Rezeptors auf der Wirtszelle haben. Für das Pmp21 wurde der Wirtszellrezeptor in Form des EGFR identifiziert. Diese Bindung führt gleichzeitig zur Internalisierung, weshalb Pmp21 ein Adhäsion und gleichzeitig ein Invasin darstellt (75). Zusätzlich wurde durch eine *C. trachomatis* PmpD Nullmutante gezeigt, dass eine Abwesenheit von PmpD zu einer reduzierten Infektion durch geringere Adhäsion führt (169).

Eine Möglichkeit für einen evolutionären Vorteil durch Pmps könnte die unterschiedliche Expression entsprechend der jeweiligen Wirtsumstände und damit erhöhte Antigenvariation sein. Durch die erhöhte Antigenvariation können sie möglicherweise die EBs während der Infektion dabei unterstützen, das Immunsystem zu unterwandern und einer Immunantwort zu entkommen (155,170-173).

1.4.3.2 Sequenzcharakteristika der Pmps

Die chlamydialen Pmps gelten aufgrund von bioinformatischen Vorhersagen als Mitglieder der Familie von Typ Va sekretierten Autotransportern (AT) (siehe Kapitel 1.6.1) (174). Pmps zeichnen sich durch eine Dreidomänenstruktur aus. Der N-terminale Teil enthält zumeist eine Signalsequenz für den Transport über die innere Membran. Die PD enthält zahlreiche für Pmps charakteristischen FxxN und GGA (I, L, V) Motive, welche Adhäsion an die Wirtszelle vermittelt. Manche Pmps enthalten zusätzlich Prozessierungsstellen, wodurch die PD *in vivo* in kleinere Fragmente prozessiert wird (73,167). Die C-terminale Domäne enthält einen konservierten Phenylalanin-Rest und Sequenzcharakteristika eines β -barrel, der für den Transport über die äußere Membran und die Präsentation auf dem EB oder die Sekretion entscheidend ist (152,153,175,176). Obwohl die Pmps eine Adhäsion-Funktion haben, besitzen die Pmps aus *C. pneumoniae* untereinander eine stark schwankende Sequenzidentität von 17% - 44% und die Pmps von *C. trachomatis* eine von 15% - 43% (74). Allgemein spricht erst eine Aminosäureidentität von über 25% für eine strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit (152). Andere Quellen geben an, dass eine gute Konservierung der Funktion sogar erst ab 40% gegeben ist (177). Im Falle der Pmps führt die geringe

1 Einleitung

Sequenzidentität möglicherweise zu einer erschwerten Immunantwort der Wirtszelle aufgrund der hohen Antigenvarianz (178).

Alle Pmps codieren für eine auffällig hohe Anzahl der Tetrapeptidmotive GGA (I, L, V) und FxxN in der PD. Die Pmps von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* haben eine durchschnittliche Anzahl von 6,5 und 5 Kopien des GGA (I, L, V) Motivs und eine durchschnittliche Anzahl von 13,6 und 11,3 Kopien des FxxN Motivs. Das x kann an erster Position von jeder beliebigen AS außer Prolin eingenommen werden. An Position zwei sind alle AS außer Cystein, Methionin oder Tryptophan möglich. In allen anderen Proteinen von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* kommt das GGA (I, L, V) Motive nur mit 0,06 bzw. 0,1 Kopien und das FxxN Motiv nur mit 0,73 bzw. 0,84 Kopien vor (152). Interessanterweise treten die beiden Motive häufig alternierend auf. Außerdem wird durch die Abbildung 1.4 ersichtlich, dass die Motive in hoher Zahl erst nach einem gewissen, innerhalb der Pmp-Familie von *C. pneumoniae* konservierten Abstand (ca. 300 AS) zum β -barrel auftreten.

Durch Experimente, bei denen Pmp21 schrittweise gekürzt wurde, konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion entscheidend von der Präsenz dieser Motive abhängig ist. Ebenso konnte durch gezielte Mutagenese gezeigt werden, dass für die Adhäsion an HEp-2 Zellen mindestens ein GGA (I, L, V) und ein FxxN Motiv (siehe Pmp21-A Abbildung 3.1) oder zwei FxxN Motive (siehe Pmp21-D Abbildung 3.1) vorhanden sein müssen (73,179).

Es gibt einige Proteine außerhalb der Gattung Chlamydia, die mehrere dieser Kopien tragen. Bei diesen wird vermutet, dass sie zu der Adhäsion an Humanzellen beitragen (167). Eine besondere Bedeutung der Motive geht von der Tatsache aus, dass wenige Proteine bekannt sind, in denen das GGA (I, L, V)-Motiv und das FxxN Motiv häufiger gemeinsam vertreten sind. Dabei handelt es sich um das Außenmembranprotein A (*outer membrane protein A*; OmpA) von *Rickettsia rickettsii* (10x GGA (V) und 13x FxxN), Mucin 5B von *Homo sapiens* (4x GGA und 12x FxxN), YfaL von *E. coli* (6x GGA (I, V) und 7x FxxN), OmpA von *Rickettsia conorii* (7x GGA (I, V) und 7x FxxN), OmpA von *Rickettsia akari* (10x GGA und 2x FxxN), filamentöses Hämagglutinin (*filamentous haemagglutinin*; FHA) von *Bordetella pertussis* (9x GGA (L, V) und 1x FxxN), und Zonadhäsin (*Zonadhesin*) von *Mus musculus* (1x GGA und 5x FxxN), (152).

Das *Rickettsia* Außenmembranprotein OmpA konnte durch Inhibierung der Bindung mittels Gabe von rekombinantem Protein, monoklonaler Antikörper oder enzymatischer Entfernung von der Rickettsien-Oberfläche als Adhäsion identifiziert werden (180,181). Mucin 5B wird von der Humanzelle sekretiert. Es bildet durch inter- und intramolekulare Wechselwirkungen

1 Einleitung

(z.B. Disulfidbrücken) Fibrillen aus, die als Schleim bei der Abwehr gegen bakterielle Erkrankungen der Atemwege wirksam sind (182,183). Für den Typ-V Autoporter (AT) YfaL wurde eine Beteiligung an der bakteriellen Biofilmbildung postuliert (184,185). Das FHA wurde als Virulenzfaktor von *Bordetella pertussis* bei der Besiedelung des humanen respiratorischen Traktes identifiziert (186). Von Zonadhesin ist bekannt, dass es für eine speziesspezifische Adhäsion von Mäusen verantwortlich ist. Beim Verlust von Zonadhesin konnte ein Verlust der Bindung an die *Zona pellucida* der Eizellen von Schweinen, Kühen und Kaninchen beobachtet werden (187). Der Einfluss der Pmp-typischen Tetrapeptidmotive auf die Funktion dieser Proteine wurde jedoch nicht analysiert.

Alle Pmps von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* haben außerdem einen Cysteingehalt zwischen 0,6% - 2,1%. Die meisten sind in der Passagierdomäne lokalisiert, bei manchen Pmps allerdings auch einige in dem vorhergesagten β -barrel. Die im β -barrel lokalisierten Cysteine könnten durch Disulfidbrücken zur Stabilisierung des COMC beitragen. Dies legt die Tatsache nahe, dass bei der Solubilisierung des Volllängen Pmp21 von *C. pneumoniae* DTT zur Reduktion verwendet wurde (73).

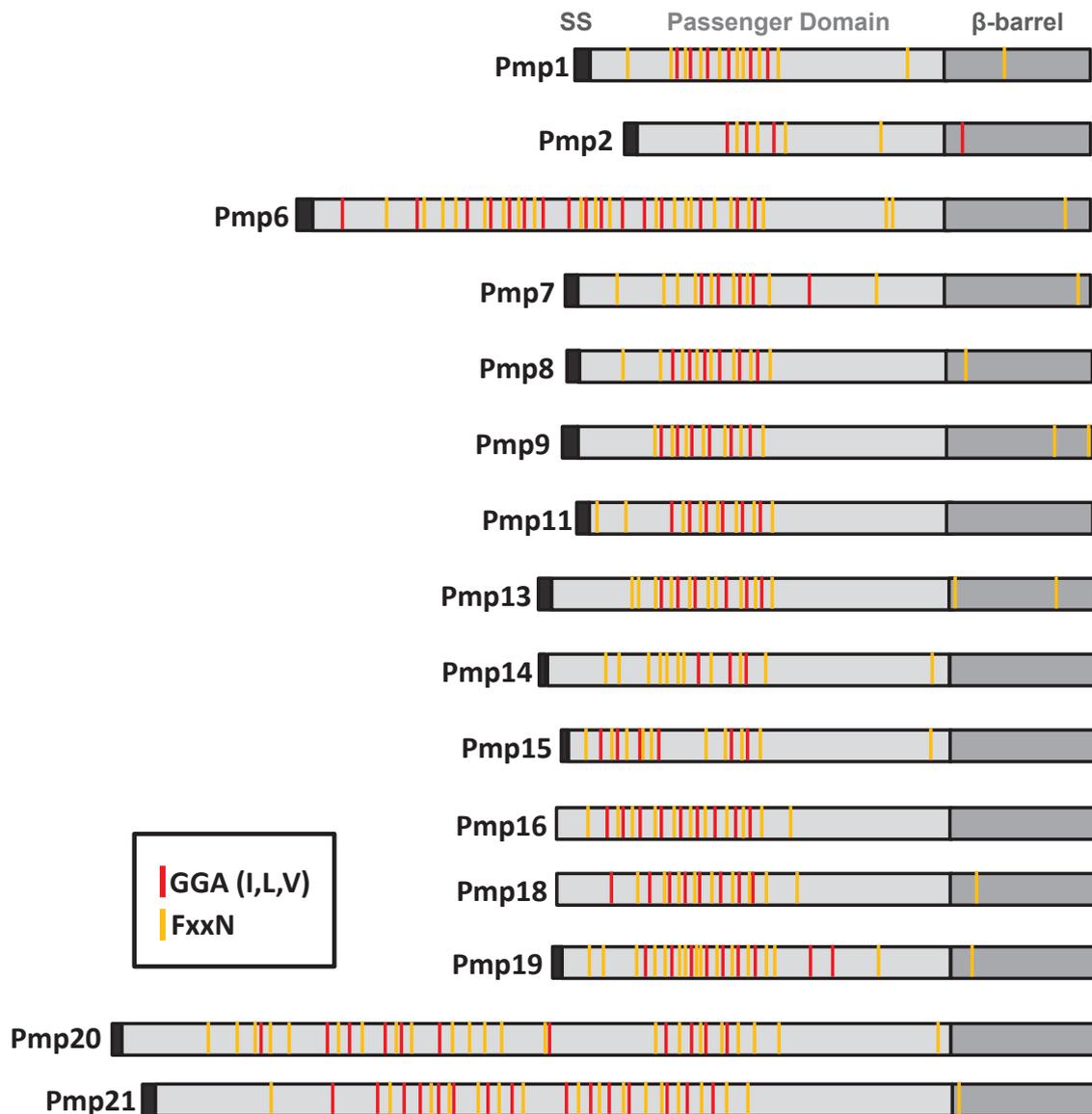


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der translatierten *C. pneumoniae* GiD Pmps.

Abgebildet sind die repräsentativen Pmp-Kandidaten Pmp21 aus *C. pneumoniae*. Die charakteristische Drei-Domänen-Struktur der Pmps mit N-terminaler Signalsequenz (SS), der PD (Passenger domain) und der C-terminalen β -barrel-Domäne ist durch Rechtecke in verschiedenen Grautönen angezeigt. Die Position der Tetrapeptidmotive GGA (I, L, V) und FxxN ist durch rote und orange Linien markiert.

1.4.3.3 Prozessierung von Pmp21 aus *C. pneumoniae*

Pmp21 aus *C. pneumoniae* ist das bisher am besten erforschte Pmp. Es bildet eine eigene Gruppe innerhalb der Pmps und sein Ortholog wird in *C. trachomatis* durch PmpD dargestellt. PmpD hat innerhalb der Pmp-Familie die geringste Nukleotid- und Aminosäure-Variabilität zwischen den Serovaren. Dies lässt darauf schließen, dass dieses Gen eine essentielle Funktion besitzt.

Mit 1609 Aminosäuren ist Pmp21 nach Pmp20 (1723 Aminosäuren) das zweitlängste Pmp innerhalb der Pmp Familie aus *C. pneumoniae*. Es konnte vielfach mittels 2D-PAGE oder

1 Einleitung

Western Blot und polyklonaler Antikörper gezeigt werden, dass Pmp21 an bestimmten Stellen prozessiert wird (73,157,167). Die Prozessierungsstellen liegen dabei direkt hinter der Signalsequenz, vor dem C-terminalen Bereich, der den β -barrel darstellt (157) und sowie in der Mitte der PD (73,167). Pmp21 wird so in die Domänen N-, M-, und C-Pmp21 unterteilt, wobei N-Pmp21 und M-Pmp21 die PD repräsentieren. Die Prozessierung muss nicht immer vollständig sein, jedoch liegt Pmp21 auf EBs überwiegend prozessiert vor (Abbildung 1.5) (73). Für das Pmp21 Ortholog PmpD und sechs weitere Pmps (B, E, F, G, H, I) aus *C. trachomatis* sowie das Pmp21 Ortholog Pmp18D aus *C. abortus* konnten ebenfalls prozessierte Varianten gefunden werden (127,188-190).

Eine Autoproteolyseaktivität von Pmp21 innerhalb der PD findet vermutlich nicht statt, da ein Fusionskonstrukt von N-M-Pmp21 und dem AT von AIDA-I nach heterologer Expression in *E. coli* nicht zu einer Fragmentierung der PD führt (191). Jedoch blieb bei diesen Experimenten unerforscht, ob C-Pmp21 den proteolytisch aktiven Bereich enthält und welches separate chlamydiale Enzym sonst die Prozessierung vermitteln könnte.

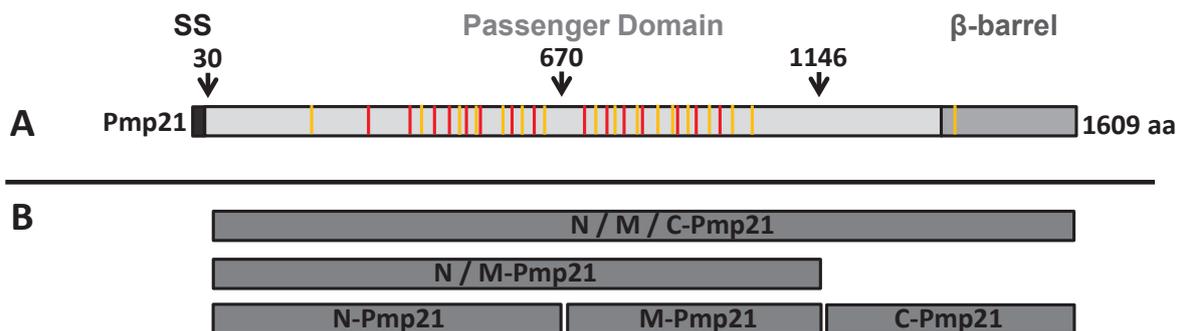


Abbildung 1.5: Pmp21 und seine prozessierten Formen.

A: Die typische Drei-Domänen-Struktur der Pmps, bestehend aus Signalsequenz (SS), PD (*Passanger domain*), und β -Barrel ist dargestellt. Die identifizierten Prozessierungsstellen sind mit Pfeilen über der Sequenz dargestellt (167). Die charakteristischen Motive FxxN und GGA (I, L, V) sind in jeweils gelb und rot dargestellt. Pmp21 ist mit 1609 AS (*aa*) das zweitlängste Pmp aus *C. pneumoniae*. **B:** Prozessierte und unprozessierte Fragmente, wie sie auf der Oberfläche von infektiösen EBs gefunden werden können (73).

1.4.3.4 Struktur von Pmps

Bezüglich der Struktur von Pmps gibt es bisher lediglich Strukturvorhersagen, die auf eine β -Helix hindeuten (74,157,192). Allerdings wurden im Laufe der Zeit immer ähnliche Strukturen für die Familie der Pmps vorhergesagt. Die erste Strukturvorhersage erfolgte im Rahmen der Entwicklung der Software BETAWRAP. Ziel dieser Software war es, durch ein Training mit β -helikalen Proteinstrukturen, die sich außerhalb der sieben bekannten β -

1 Einleitung

helikalen Proteinfamilien befanden, weitere, unbekannte β -helikale Proteine zu identifizieren.

Es stellte sich heraus, dass für lediglich 0,4% von den ca. 600.000 getesteten, unbekannt Proteinen, β -helikale Strukturen vorhergesagt wurden. Die als β -Helices identifizierten Proteine stellten dabei hauptsächlich bakterielle oder pilzliche Proteine dar, die mit einer Humaninfektion in Verbindung gebracht werden. So wurden Toxine, Virulenzfaktoren, Oberflächenproteine und Adhäsine von Bakterien der Gattungen *Chlamydia*, *Helicobacteria*, *Bordetella*, *Leishmania*, *Borrelia*, *Rickettsia*, *Neisseria* und *Bacillus anthracis* identifiziert. In der Gattung *Chlamydia* wurden rechtsgewundene β -helikale Proteine in den drei Spezies *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* und *C. abortus* entdeckt. Alle entdeckten Proteine gehören der Familie der Pmps an: PmpA, B, C, D, F, G, H von *C. trachomatis*, Pmp3 und 5 von *C. pneumoniae* sowie ein Pmp von *C. abortus* (192,193). Für einen Großteil der PD von Pmp6 wurde ebenfalls eine β -helikale Struktur vorhergesagt (157). Ebenso ergaben spätere Analysen von Pmps unterschiedlicher Serovare, wie beispielsweise Pmp21 aus *C. pneumoniae*, dass ein Großteil der PD eine rechtsgewundene β -Helix bildet (74,194).

Eine β -Helix zeichnet sich durch dreieckig angeordnete β -Faltblätter (β -sheets) aus, die parallel um eine imaginäre Achse gewunden sind. Jede der Windungen besteht aus zwei bis drei β -sheets, die durch sogenannte Loops voneinander getrennt sind (195-197). Durch das parallele Stapeln der dreieckig angeordneten β -sheets wird die β -Helix gebildet (198) (Abbildung 1.6). Das Innere der β -Helix ist meist hydrophob und kann durch eine deckelgleiche Struktur an N- und C-Terminus von seiner Umgebung abgeschirmt sein (199).

Viele β -Helices besitzen durch ihren Aufbau aus einer einzigen, teilweise sehr langen Domäne eine einzigartige Struktur. Die erste β -Helix, deren Struktur aufgeklärt wurde war die Pektatlyase C (PelC) (197). Seither wurde die Struktur zahlreicher weiterer β -helikaler Proteine aufgeklärt (200-205). Diese gehören zwei Familien von sekretierten Proteinen an. Den *two-partner secretion system A* (TpsA) Proteinen und den ATs (206,207). Für über 97% aller ATs wurde eine β -helikale Struktur der Passagierdomäne vorhergesagt (192,193).

β -Helices besitzen durch ihre längliche Form eine große Oberfläche. Außerdem können durch die als Loops bezeichneten Ecken entlang der β -Helix definierte Aminosäuremotive oder Domänen präsentiert werden. Für das Antigen 43 (*antigen 43*; AG43) aus *E. coli* sind Dimere bekannt, die durch eine klettverschlussartige Interaktion der AS im Bereich der Loops entstehen (208).

1 Einleitung

Eine β -helikale Faltung kommt gehäuft bei extrazellulären mikrobiellen Proteinen vor. Dort vermitteln sie eine Vielzahl von Interaktionen mit der Umgebung. Insbesondere stellen β -Helices häufig Adhäsine von Bakterien, Pilzen und Phagen dar (192). Bei AG43 dienen sie außerdem zur Ausbildung von Biofilmen (208). Außerdem findet man sie als Polysaccharid-abbauende Enzyme (192,198,207). Während der Bindung an die Zielstruktur der Wirtszelle oder an bestimmte Substrate im Milieu sind β -Helices den Flüssigkeitsströmen und anderen Arten von mechanischem Stress ausgesetzt. Es wurde am Beispiel des FHA gezeigt, dass der repetitive Aufbau von β -helikalen Proteinen durch eine hohe Flexibilität und Stabilität sehr gut an solche Bedingungen angepasst ist (209).

Sehr gut erforschte β -helikale Proteine sind außerdem der trimere P22 Tailspike und die monomere Chondroitinase B. Beide Proteine können ohne Chaperone oder andere Hilfsmittel rückgefaltet werden, was ihre Erforschung stark erleichtert (210).

Im Laufe der Evolution wurden die β -Helix und verwandte solenoidartige Faltungen wie β -Rollen (*β -Rolls*), Leucin-reiche Wiederholungen (*leucine-rich repeat folds*) und Spiralfaltungen (*spiral folds*) in Proteinen aus Bakterien und Phagen von höheren Eukaryoten und anderen in Form von Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktorrezeptoren (*insulin-like growth factor receptors*) übernommen (207).

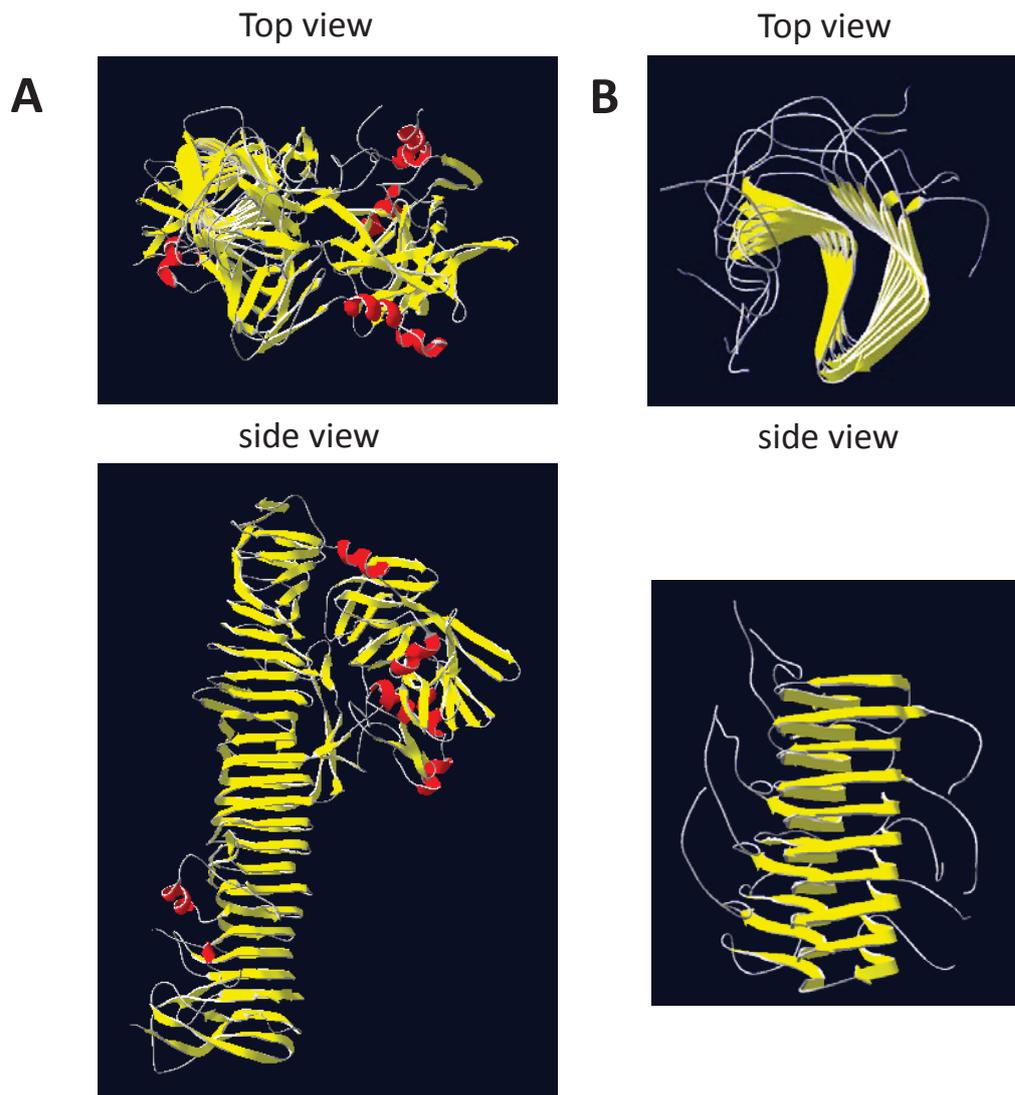


Abbildung 1.6: Zwei Beispiele für β -helikale Proteine mit unterschiedlichem Aufbau.

A: Die Struktur der PD des ATs *E. coli* Serin Protease P (EspP) (pdb: 3sze) zeigt eine rechtshändige β -Helix die aus einer Aminosäuresequenz gebildet wird. Die globuläre Domäne am N-Terminus stellt das katalytische Zentrum dieser Serinprotease dar (211). EspP diente als bioinformatisch ausgewähltes Template, um ein Modell von Pmp21 zu generieren (siehe Kapitel 3.1) **B:** Die Struktur des Prionenproteins HET-s (218 - 289) (pdb: 2rnm) zeigt eine linkshändige β -Helix. Jedes HET-s (218 – 289) Molekül bildet dabei zwei Windungen der β -Helix aus (212).

1.4.3.5 Oligomerisierung von Pmps

Experimentelle Daten deuten auf eine mögliche Oligomerisierung von PmpD aus *C. trachomatis* und dem Ortholog Pmp21 aus *C. pneumoniae* hin (74,127). Natives PmpD, welches mittels Immunitätschromatographie von EBs gereinigt wurde, lag in zwei grob unterteilbaren Komplexgrößen vor: Ein Komplex von ca. 850 kDa und ein Komplex von ca. 530 kDa. Durch 2D-PAGE wurde ersichtlich, dass diese Komplexe aus prozessierten Fragmenten (p155, p82, p73) von PmpD bestehen (Abbildung 1.7). Die affinitätsgereinigten Komplexe wurden mittels Elektronenmikroskopie untersucht, und man entdeckte vereinzelt

symmetrische blumenähnliche Strukturen (127). Diese blumenähnlichen Strukturen besitzen Ähnlichkeit zum vakuolierenden Zytotoxin A (*Vacuolating cytotoxin A*; VacA) von *Helicobacter pylori* (213). In früheren elektronenmikroskopischen Untersuchungen von EBs der Spezies *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* und *C. psittaci* wurden ähnlich geformte Strukturen entdeckt (214-216). Allerdings ist unklar, ob es sich bei diesen Oligomeren-Strukturen um PmpD handelte. Da auf den gezielt zur Analyse von Pmps durchgeführten elektronenmikroskopischen Aufnahmen allerdings überwiegend längliche Strukturen zu sehen sind, werden diese Ergebnisse kontrovers diskutiert (127).

Die Ergebnisse einer 2D-PAGE von affinitätsgereinigtem PmpD zeigten jedoch eine deutliche Komplexbildung. Es wurde daher spekuliert, ob diese über die Seitenflächen der vorhergesagten dreieckigen β -Helix stattfinden könnte. Diese würden optimale Interaktionsmöglichkeiten bieten (194).

Für *C. pneumoniae* konnte mittels Far Western Blot eine Bindung des Fragments M-Pmp21 an Pmp2, 6, 14, 16, 19 und 20 gezeigt werden. Für Pmp21 konnte darüberhinaus durch *in vitro* Experimente mit rekombinantem Protein ebenfalls mindestens eine Dimerisierung gezeigt werden. Dies deutet ebenfalls sehr stark auf eine Oligomerisierung hin (74).

Da die Pmps eine ausgeprägte Rolle bei der Adhäsion an die Wirtszelle und teilweise bei der Internalisierung in die Wirtszelle spielen, könnte die Fragmentierung und Oligomerisierung zusammen mit einer differentiellen Expression zu einer hohen Diversifikation der präsentierten Antigene führen und eine Besiedlung neuer Nischen ermöglichen (194).

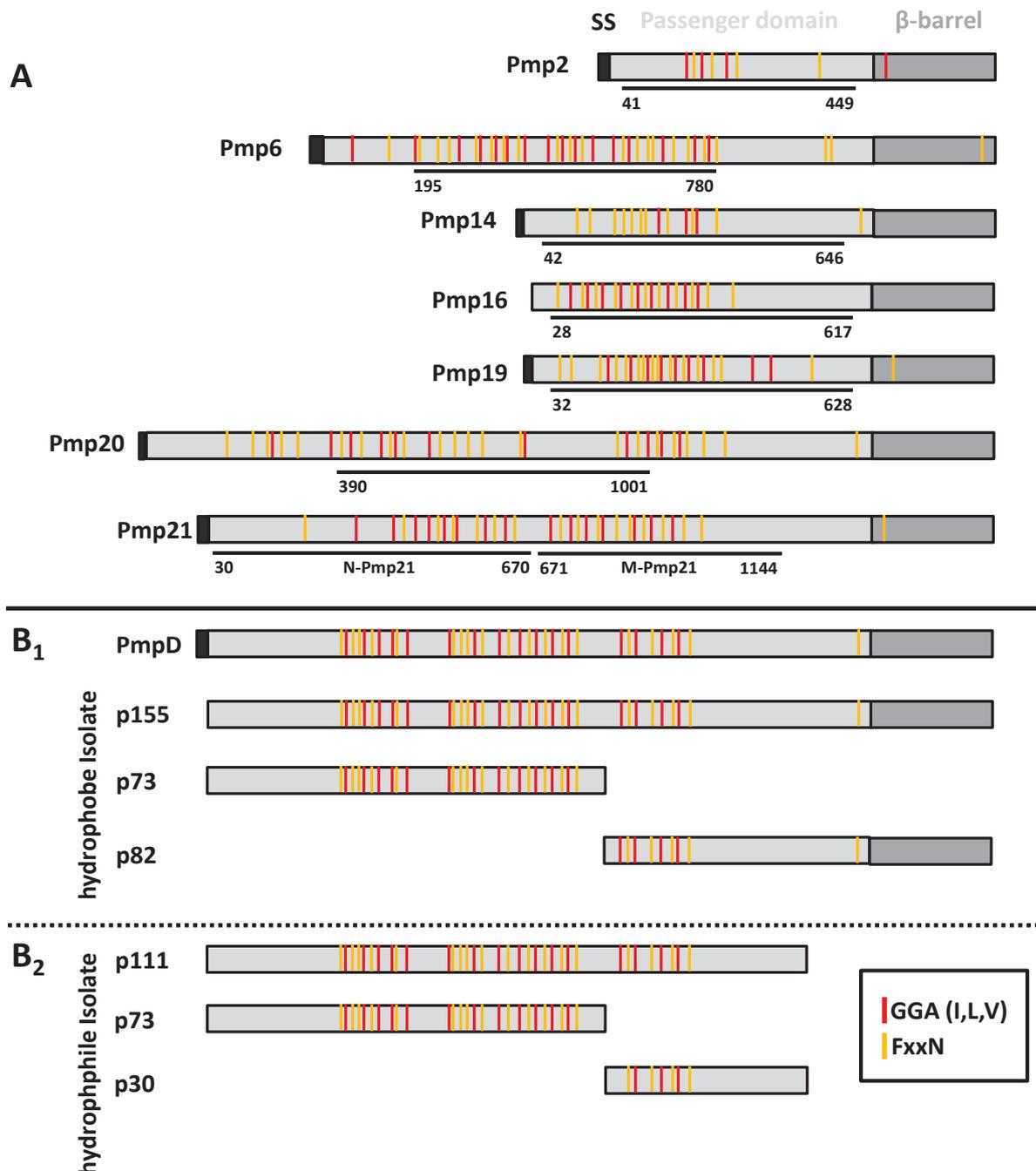


Abbildung 1.7: Pmp-Fragmente können miteinander interagieren.

A: Für Pmp21 aus *C. pneumoniae* wurde mittels Far-Western-Blot gezeigt, dass die Domäne M-Pmp21 mit den dargestellten Abschnitten von Pmp2, 6, 14, 16, 19, 20, nicht jedoch mit der Domäne N-Pmp21 interagieren kann (74). **B₁₊₂:** PmpD aus *C. trachomatis* wird während der Infektion prozessiert und die Fragmente konnten als Komplex mittels BN-PAGE nachgewiesen werden. Die Zusammensetzung der Fragmente in den Komplexen unterscheidet sich jedoch, abhängig vom Zeitpunkt in der Infektion. **B₁:** 24 h nach der Infektion beinhalten die affinitätschromatographisch aufgereinigten Komplexe hydrophobe Proteinfragmente. Das ist darauf zurückzuführen, dass die gemeinsam isolierten Fragmente noch den membranständigen β-barrel besitzen. **B₂:** 30-36 h nach der Infektion konnten verkürzte Fragmente ohne den β-barrel aus den hydrophilen Fraktionen isoliert werden (127).

1.5 Amyloide

Das Kunstwort Amyloid bedeutet stärkeähnlich und wurde erstmals 1838 von dem Botaniker Matthias Schleiden verwendet, um Hemizellulose in Pflanzenstängeln zu beschreiben (217). 1854 wurde der Begriff dann von Rudolf Virchow in die medizinische Terminologie übernommen (218). Der Begriff stammt von der früheren Vermutung, dass es sich bei Amyloiden um stärkeähnliche oder zelluloseartige Verbindungen handelt. Bei Untersuchungen der *Corpora amylacea* des menschlichen Gehirns fand er eine Substanz, die er mit Jod und Schwefelsäure (Lugol-Probe) anfärben konnte. Das war der Indiz für eine pflanzliche, Zellulose-ähnliche Substanz (218). Allerdings zeigte die *Corpora amylacea* weder alle Eigenschaften der Stärke, noch der Zellulose. Daher wurde die Bezeichnung Amyloid gewählt (219).

Durch chemische Analysen konnte 1859 der Beweis erbracht werden, dass es sich bei Amyloiden um aggregierende Proteine handelt (220). Es konnte schließlich gezeigt werden, dass Amyloide durch Kongorot (CR) selektiv anfärbbar sind (221). Ungefärbte Amyloidablagerungen können durch polarisiertes Licht beeinflusst werden können, wodurch sie im Polarisationsmikroskop ohne Färbung selektiv betrachtet werden können. Die Fibrillenstruktur von Amyloiden konnte so erstmals ungefärbt gezeigt werden (222). Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen während der Aggregation konnte die Fibrillenstruktur der Amyloide bestätigt werden. Amyloide erschienen im Elektronenmikroskop als starre, unverzweigte Fibrillen mit einem Durchmesser von 7 - 14 nm unbestimmter Länge (Abbildung 1.8 A - C) (223). Schließlich fand man mittels Röntgenbeugungsanalyse heraus, dass Amyloidfibrillen aus Polypeptidketten bestehen, die überwiegend aus antiparallelen β -sheet Strukturen (*cross- β* Strukturen) oder β -Helices bestehen und senkrecht zur Filamentachse angeordnet sind (Abbildung 1.8 D - I) (224,225). Allerdings ist die Strukturaufklärung auf atomarer Ebene aufgrund der Größe der Strukturen schwierig und unvollständig. Es ist daher nicht auszuschließen, dass andere als die erwähnten Anordnungen möglich sind. So wurde erst kürzlich entdeckt, dass das Amyloid HET-s des Pilzes *Podospora anserina* eine linkshändige β -Helix bildet (Abbildung 1.8 I) (226) (218 - 289).

Entgegen der ursprünglichen Annahme bestehen Amyloide demnach nicht aus Stärke, sondern aus Proteinen, die aggregieren und sich in Form von ausgedehnten β -sheets neu strukturieren. Die Lokalisierung dieser Proteine ist überwiegend extrazellulär, wie im Fall

1 Einleitung

des mit Alzheimer assoziierten Amyloid β ($A\beta$). Allerdings kommen amyloide Proteine wie das mikrotubulibindende Protein Gelsolin ebenfalls intrazellulär vor (227).

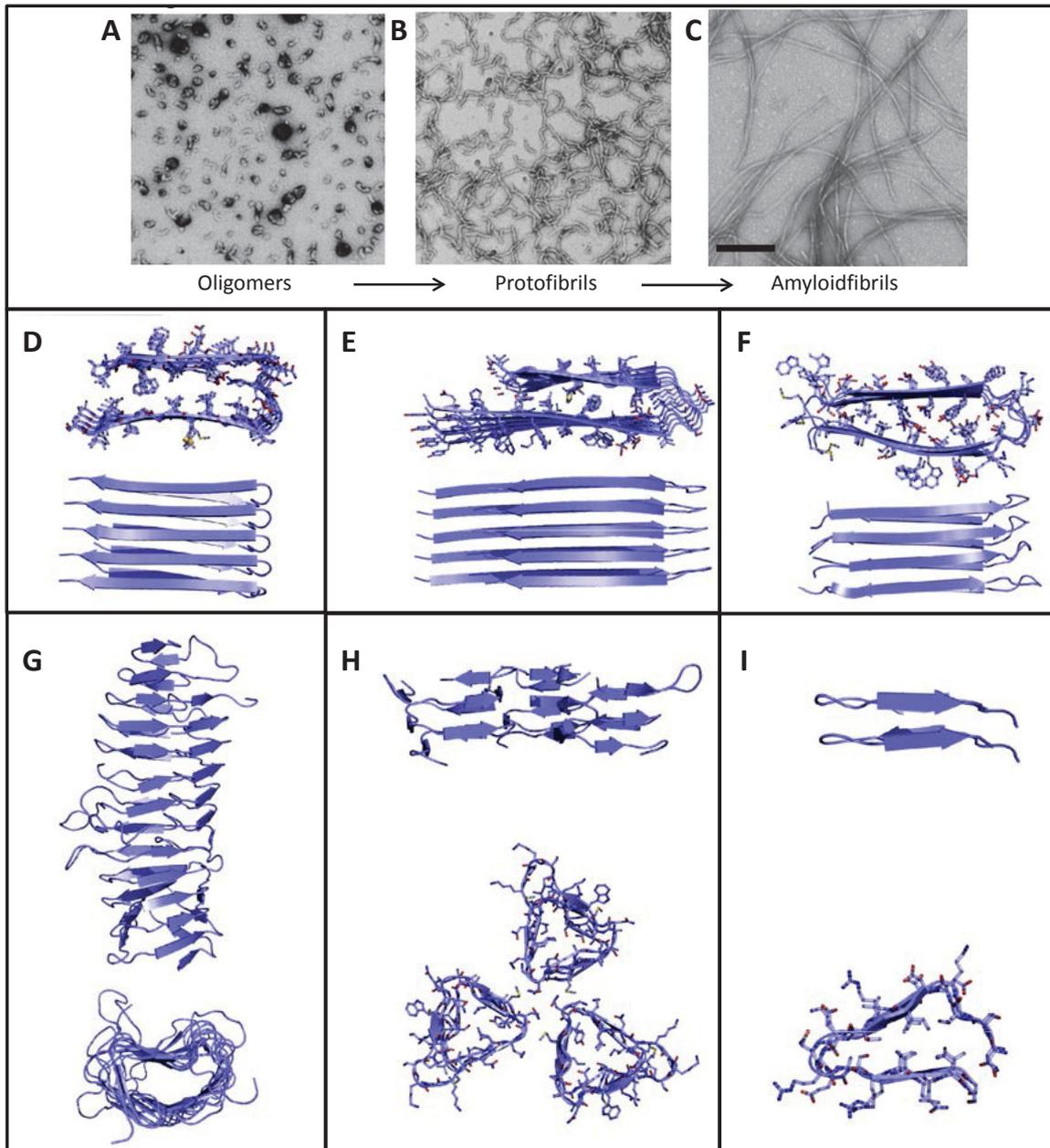


Abbildung 1.8: Elektronenmikroskopische Aufnahme der β -Amyloidmorphologie und Strukturmodelle von $\text{cross-}\beta$ und α -helicalen Amyloiden.

Elektronenmikroskopische Aufnahme der β Amyloidmorphologie nach Negativkontrastierung von Amyloid β_{1-40} ($A\beta_{40}$) während der Aggregation. **A:** Oligomere (*Oligomers*), **B:** Protofibrillen (*Protofibrils*), **C:** Amyloidfibrillen (*Amyloidfibrils*) des Proteins $A\beta_{40}$. Der Maßstab entspricht 200 nm (verändert nach: (228)). Strukturmodelle von $\text{cross-}\beta$ und α -helicalen Amyloiden: **D:** $A\beta(1-42)$, **E:** $A\beta(1-40)$, **F:** WW Domäne des humanen Transkriptionsaktivators CA150, **G:** P22 Tailspike Protein, **H:** Die Kernstruktur des Prionenproteins und **I:** Die Kernstruktur von HET-s (verändert nach: (225)).

1.5.1 Sequenz- und strukturbiochemische Merkmale von Amyloidfibrillen

Amyloidfibrillen sind höchst organisierte und stabile Strukturen aus mehreren Untereinheiten. Die Sequenzen von Peptiden und Proteinen, die amyloidähnliche Fibrillen ausbilden, können sehr unterschiedlich sein. Aufgrund dessen wurden die Sequenzdeterminanten, die zu einer Selbstassemblierung führen, intensiv erforscht. Mit Hilfe von Algorithmen wie WALTZ und TANGO wurden Aminosäuresequenzen analysiert, um ihre Neigung Amyloide auszubilden vorherzusagen (229,230). Dabei wurden Eigenschaften wie die Neigung β -sheets auszubilden ebenso berücksichtigt, wie die Hydrophobizität (231,232). Es wurden ebenfalls komplexere Methoden angewandt, bei der die Aminosäuresequenz und die finale Anordnung in der *cross*- β Struktur berücksichtigt wurden (230,233). Durch diese Studien wurde deutlich, dass viele kurze Peptide eine starke Neigung haben Amyloidfibrillen auszubilden. Bisher wurden über 50 solcher Peptide identifiziert, und es werden fortwährend weitere entdeckt (230).

Der Zusammenbau der Amyloidfibrillen beginnt mit der Selbstassemblierung sogenannter Oligomere (Abbildung 1.8 A). Diese sind noch nicht fibrillär, bilden aber den Kern der Amyloidfibrillen in Form einer *cross*- β Struktur aus. Die Bezeichnung *cross*- β rührt von der senkrechten Ausrichtung der β -sheets zueinander her, die entlang der Faserachse der entstehenden Filamente stattfindet und deren Wasserstoffbrückenbindungen parallel zur Fibrillenachse angeordnet sind (234). Die so gebildeten Filamente werden als Protofibrillen bezeichnet (Abbildung 1.8 B).

Die Charakterisierung der *cross*- β Struktur auf atomarer Ebene wird zunehmend detaillierter. Durch Röntgenkristallographie wurde ersichtlich, dass kleine amyloidbildende Peptide sterische, reißverschlußartige Strukturen (*steric zipper*) ausbilden, in denen Seitenketten miteinander wechselwirken und zwischen den β -sheets ineinandergreifen (235). Röntgenkristallographie (236,237) und Festkörper-Kernspinresonanz (*solid state nuclear magnetic resonance*; Festkörper-NMR) (226,238,239) wurden verwendet, um die Struktur der Amyloidfibrillen an sich zu untersuchen, und diese zeigen Komplementarität zwischen den Seitenketten nebeneinander liegender Protofibrillen. Die Protofibrillen können mit weiteren Protofibrillen assoziieren und Amyloidfibrillen ausbilden (Abbildung 1.8 C) (237).

Eine Amyloidfibrille kann aus einem oder mehreren Protofilamenten bestehen. Protofilamente sind Weiterentwicklungen der Protofibrillen und filamentöse Bausteine einer Amyloidfibrille (240). Amyloidfibrillen stellen das Endprodukt der Amyloidbildung dar. Mit

1 Einleitung

einer Dicke von 10 - 20 nm sind sie häufig etwas breiter als Protofibrillen, deren Dicke ca. 10 nm beträgt (241-243). Amyloidfibrillen können bis zu einigen Mikrometern lang werden und sind damit länger als Protofibrillen. Des Weiteren sind sie geradliniger als die gebogenen, wurmartigen Protofibrillen (243). Amyloidfibrillen sind häufig helikal gewunden. In der transmissionselektronenmikroskopischen (TEM) Aufnahme ist die Helizität durch das Auftreten von scheinbaren Verjüngungen der Fibrillendicke in regelmäßigen Abständen sichtbar. Die Verjüngungen werden auch als *Crossover* bezeichnet. Häufig sind die helikalen Amyloidfibrillen linksdrehend gewunden (240). Amyloidfibrillen können jedoch eine große strukturelle Heterogenität innerhalb derselben Probe haben. Dabei kann es vorkommen, dass Form, Breite sowie die Abstände zwischen den *Crossovers* variiert. Für das Amyloid β_{1-40} ($A\beta_{40}$) wurde gezeigt, dass es innerhalb der gleichen Probe Längen zwischen 10 - 30 μm ausbilden und sowohl rechteckige, elliptische als auch S-förmige Querschnittsformen aufweisen kann (244). Solche Polymorphismen wurden ebenfalls bei Insulin und dem Tau Protein gefunden (240,245). Die Strukturpolymorphismen werden dabei durch die physikochemischen Eigenschaften der Umgebung, wie pH-Wert, Temperatur, Schütteln, Salze und anderen gelösten Stoffen bestimmt (246-251).

Aufgrund ihrer markanten, repetitiven Kernstruktur können die β -*sheets* in Amyloidfibrillen von konformationssensitiven Antikörpern erkannt werden. Die Interaktion dieser Antikörper mit globulären Proteinen, die β -*sheets* enthalten, ist hingegen nur schwach ausgeprägt. Außerdem besitzen Amyloidfibrillen eine starke Affinität für bestimmte heteroaromatische Farbstoffe wie Thioflavin-T (ThT) oder CR (252).

1.5.2 Toxische Amyloide

Man unterscheidet heute zwischen toxischen und funktionellen Amyloiden. In mit Amyloiden assoziierten Krankheiten lagern sich die Amyloidfibrillen in Geweben ab und bilden unlösliche Strukturen. Solche Amyloidfibrillen kommen gehäuft in Missfaltungskrankheiten (*misfolding diseases*) wie Alzheimer, Typ 2 Diabetes mellitus und übertragbarer spongiöser Enzephalopathie vor (253).

Das mit Alzheimer in Verbindung stehende Protein $A\beta$ wird durch proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins (*amyloid precursor protein*; APP) gebildet. APP ist ein transmembranes Glycoprotein, welches meistens in den peripheren Zellen exprimiert wird. Die Abspaltung des extrazellulären APP-Bereichs kann durch verschiedene Sekretasen

1 Einleitung

erfolgen. Eine Spaltung von APP durch die β - und γ -Sekretase führt zur Bildung von A β . Die Fragmentlänge von A β kann zwischen 38 und 43 AS variieren. Der größte Anteil wird jedoch von A β_{40} ausgemacht. Das Fragment mit der höchsten Neigung zur Amyloidfibrillenbildung, die auch als Aggregation bezeichnet wird, und Zelltoxizität ist hingegen das A β_{42} . Der Aggregationsablauf ist komplex und wird durch viele Faktoren beeinflusst. Es sind verschiedene Aggregate beschrieben, und im Detail kein einheitlicher Ablauf für den Mechanismus der Aggregation. Ausgehend von monomeren bilden sich über die Zeit kleinere, löslichere Oligomere. Diese aggregieren unter Ausprägung von β -sheets zu Protofibrillen und Amyloidfibrillen weiter. Die im, von Alzheimer betroffenen, Gehirn nachweisbaren Plaques bestehen unter anderem aus Fibrillenbündeln von A β . Im Zuge dessen treten die nachweisbaren Schädigungen an den Neuronen auf. Während ursprünglich noch die Ablagerung in Form der Plaques als Ursache für die Schäden an den Neuronen angesehen wurde, deuten die Untersuchungsergebnisse der letzten Jahre vermehrt auf die Toxizität der löslichen Oligomere von A β hin. Eine Definition für das toxische Oligomer fehlt allerdings bis heute (254).

Teilweise kommt es bei Amyloid-bedingten Erkrankungen vor, dass Zellen ersetzt werden. Beispielsweise wird in der Lysozym-Amyloidose ein großer Teil der Niere durch Amyloidablagerungen ersetzt (255). Allerdings geht die Toxizität nicht von den Amyloidablagerungen selber aus, sondern von deren oligomeren Intermediaten, die während der Selbstassemblierung vorliegen. Diese Proteine oder Peptide haben ein toxisches Potential und führen zum Zelltod während dieser missfaltungs- und neurodegenerativen Erkrankungen (256). Allerdings besitzen nicht alle oligomeren Intermediate Toxizität. Die N-terminale Domäne des Hydrogenase-reifungsfaktors (*hydrogenase maturation factor*) HypF kann sowohl toxische als auch nicht-toxische oligomere Spezies ausbilden (257). Entsprechend wurde entdeckt, dass kleine fibrilläre Oligomere oder Fibrillen-Fragmente ebenfalls ein toxisches Potential besitzen (258-260). So führte die heterologe Expression eines β -sheet Proteins, das zur Ausbildung von amyloidähnlichen Oligomeren entworfen wurde, zu einer Kaskade von toxischen Ereignissen in humanen Zellen (258).

1.5.3 Funktionelle Amyloide

Der Begriff „funktionelles Amyloid“ findet seit kurzem immer häufiger Verwendung. Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass es sich bei amyloiden Proteinen fast

1 Einleitung

ausschließlich um missgefaltete Proteine handelt, die im schlimmsten Fall toxisch für den Wirtsorganismus sein können (siehe Kapitel 1.5.2). Es stellte sich jedoch heraus, dass amyloide Strukturen sehr zahlreich in natürlichen Systemen vorkommen. Zusätzlich mehren sich die Berichte von funktionalen amyloiden Strukturen, die aufgrund ihrer Stabilität eine Art strukturgebendes Gerüst bilden oder schützende Funktionen übernehmen können. Es gibt Berichte über entscheidende funktionale Rollen im humanen und murinen Stoffwechsel, oder bei der Entwicklung des Seidenraupenkokons (261-264). Es stellt sich deshalb die Frage, warum manche Amyloid-Assemblierungsprozesse trotz der gleichen finalen Struktur toxisch sind, während andere vom jeweiligen Organismus toleriert oder sogar aktiv genutzt werden. Die Aggregation zu Amyloiden kann ebenfalls einen Schutz vor toxischen Zwischenprodukten darstellen. In Melanozyten wird das humane Pigment Melanin produziert. Melanin dient dem Schutz vor UV-Strahlung und vor oxidativem Stress. Zur Synthese wird das transmembrane Glykoprotein pmel17 in post-Golgi-Vesikeln mit saurem pH, dem sogenannten Melanosom, proteolytisch gespalten (265). Nach der Proteolyse liegt pmel17 in Form des transmembranen Fragments M β (28 kDa) und in Form des lumenalen Fragments M α (80 kDa) vor (265,266). M β wird im weiteren Verlauf abgebaut. M α Untereinheiten sind jedoch toxisch für die Zellen. Daher kommt es direkt nach deren Entstehen zu einer raschen Autoaggregation mit der Ausbildung von Amyloidfibrillen (262). Diese Amyloidfibrillen sind nicht toxisch und bilden den Kern des Melanins, welches im Melanosom gespeichert wird (265,266).

Außerdem können Amyloide eine Speicherform von humanen Hormonen in sekretierbaren Granula des endokrinen Systems darstellen. Die Aggregation zu Amyloiden des adrenocorticotropen Hormon, β -Endorphin, Prolaktin und Wachstumshormon konnte *in vitro* durch Zugabe von Heparin in einem sauren Milieu induziert werden. Der Nachweis erfolgte durch eine Vielfalt von Methoden, wie Elektronenmikroskopie, Fluoreszenz von ThT, Färbung mit CR, *circular dichroism*- (CD-) Spektroskopie, Bindung spezifischer Antikörper und Röntgenstreuung. Außerdem wurde die Amyloidisierung von den entsprechenden orthologen Hormonen *in vivo* bei Mäusen durch ThT-Fluoreszenz und amyloidspezifischen Antikörpern nachgewiesen. Es wurde zwar gezeigt, dass eine geringe Toxizität der Amyloide besteht, jedoch wurde diese als vernachlässigbar eingestuft, da die Amyloide in separaten Granula vorlagen. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die

1 Einleitung

Amyloide bei Bedarf des Hormons zu entsprechenden Monomeren gespalten und damit die monomere Form zur Verfügung gestellt werden kann (267).

Funktionelle Amyloide werden ebenfalls in *Sacchaomyces (S.) cerevisiae* und auch in *Candida* gebildet (268). In Form des Ure2 Prions dienen sie in *S. cerevisiae* zur Aufnahme von Stickstoff (269).

Als Beispiel für prokaryotische funktionelle Amyloide sind die Chapline des filamentösen Bakteriums *Streptomyces coelicolor* zu nennen. Chapline stellen amyloide Hyphen dar, die eine effiziente Ausbringung von Sporen ermöglichen (270). In Bakterien sind Amyloide an der Ausbildung von Biofilmen, Zell-Zelladhäsion, sowie Zell-Substratadhäsion beteiligt. Amyloide von *E. coli* und *Salmonella*, die aus Curli-Proteinen bestehen, sind häufig beschriebene und gut untersuchte Beispiele (271,272). Ebenso wie bei amyloidbedingten Krankheiten liegen diese Proteinfibrillen extrazellulär vor. Dabei läuft die Ausbildung funktioneller Curli Amyloide als hochregulierter Prozess ab, der aus intrazellulärem Transport, zellulärem Export, Fibrillenkeimbildung und anschließender schneller Polymerisierung besteht. Hierfür sind komplexe Interaktionen zwischen verschiedenen Curli Untereinheiten (CsgA - G) nötig. Die CsgA Untereinheiten werden dabei mit Hilfe eines speziellen Sekretionssystems durch die äußere Membran transportiert um anschließend extrazellulär zu Amyloidfibrillen zu polymerisieren (271).

1.5.3.1 Adhäsive Amyloide

Curli aus *E.coli* ist das momentan wohl am besten analysierte adhäsive Amyloid. Trotz komplexer Transportmechanismen auf das Äußere der Zelle besitzen sie die gleichen Merkmale wie andere Amyloidstrukturen. Dazu zählt ein Fibrillendurchmesser von 6 - 12 nm und überwiegende β -sheet Faltung, analysiert durch Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie und Bindung der Farbstoffe CR und ThT (273). Außerdem wird angenommen, dass die aus 5 Wiederholungen von 19 - 23 Aminosäuren bestehende Kerndomäne eine parallele β -Helix ausbildet (274,275). Die Aminosäurekomposition jeder Wiederholung enthält Glutamin, Asparagin, Serin sowie aromatische Aminosäuren welche vermutlich dazu dienen, die β -Helix zu stabilisieren (276,277). Des Weiteren zeichnet sie eine Resistenz gegen Proteaseverdau, Harnstoff, Hitze und 1%ige Natriumlaurylsulfat (SDS)-Lösungen aus (278).

1 Einleitung

Von einigen Pilzen werden ebenfalls adhäsive Amyloide ausgebildet. Diese werden als Hydrophobine bezeichnet und dienen der Modulation von Oberflächenspannung und Adhäsion (279-283).

Von dem Oberflächenprotein Agglutinin-ähnliche Sequenz 5 (*agglutinin-like sequence 5*; Als5) aus *Candida albicans* ist bekannt, dass es eine konservierte Amyloiddomäne enthält, die *in vitro* Amyloidfibrillen von mehreren μM Länge ausbilden kann (284). *In vivo* ist eine ausgeprägte Amyloidfibrillenbildung nicht zu beobachten. Allerdings bildet Als5 *in vivo* sogenannte Nandomänen (*amyloid-patches/adhesin nanodomains*) aus (285). Diese *amyloid-patches/adhesin nanodomains* entstehen, nach der Adhäsion der Bindedomäne. In Folge der Adhäsion wird Als5 auseinander gezogen und präsentiert dadurch die Amyloidbildende Sequenz. Dadurch interagieren mehrere ALS5 Moleküle miteinander und ermöglichen eine stabilere Adhäsion bzw. Zellaggregation, was zur Biofilmbildung führt. Durch eine Mutation dieser Amyloiddomäne kann die Zellaggregation und Biofilmbildung inhibiert werden (286).

Adhäsive Amyloide sind nicht nur auf Mikroorganismen beschränkt. So wurden in der Alge *Prasiola linearis* mit Hilfe von Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*; AFM) sowie CR-Färbung und ThT-Fluoreszenz Amyloide entdeckt. Diese dienen vermutlich der Verankerung der Pflanze auf ihrem Substrat (287). Ähnliche Mechanismen wurden bereits bei Muscheln entdeckt (288,289).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass 20 verschiedene Säugetierpeptide und -proteine Amyloide bilden können und unabhängig von der Sequenz und Anwesenheit einer erwarteten Integrinbindung zu einer Zelladhäsion führen. Die Adhäsion dieser Amyloide wird auf eine Interaktion mit der Lipidmembran, oder auch durch eine Aktivierung des Adhäsionsmechanismus der Zelle ausgelöst. Es wird spekuliert, dass die Adhäsion an Membranen sogar eine generelle Funktion von Amyloiden darstellen könnte (290).

1.6 Sekretionssysteme Gram-negativer Bakterien

Gram-negative Bakterien haben eine beachtliche Anzahl von Oberflächenstrukturen entwickelt, um verschiedene Virulenzfaktoren über die bakterielle Außenmembran zu transportieren. Dazu zählen die sechs Sekretionssysteme (Type I - VI) Gram-negativer Bakterien, das einzigartige mykobakterielle Typ VII, das „Chaperon-Usher“ Sekretionssystem und das Curli Sekretionssystem. Die Sekretionssysteme können in zwei Gruppen

1 Einleitung

unterschieden werden: (i) Mithilfe eines zweistufigen Prozesses werden ungefaltete (*SEC*-Transportsystem) oder gefaltete (*Tat*-System) Proteine in das Periplasma transportiert. Anschließend erfolgt der Transport über die äußere Membran durch weitere Mechanismen. (ii) Durch eine einstufige Translokation können Proteine auch direkt über beide Membranen in den extrazellulären Raum oder direkt in die Wirtszelle transportiert werden.

Zu den zweistufigen Sekretionssystemen werden das Typ-II-, das Typ-IV-, das Typ-V- sowie das „Chaperone-Usher“-Sekretionssystem gezählt. Bei diesen Systemen besitzen die Proteine eine N-terminale Signalsequenz, die bei Sec-abhängigem Transport überwiegend aus hydrophoben Aminosäuren besteht. Bei Tat-abhängigem Transport besitzen die Proteine eine C-terminale Signalsequenz die zwei Arginine enthält.

Zu den einstufigen Sekretionssystemen gehören das Typ-I-, das Typ-III- und das Typ-VI-Sekretionssystem. Eine umfassende und aktuelle Übersicht bietet (291). Das Typ-V-Sekretionssystem wird für Pmps postuliert und wird im Folgenden detaillierter beschrieben.

1.6.1 Das Typ-V Sekretionssystem

Für alle Pmps wird ein Typ-V-Sekretionssystem vorhergesagt, aufgrund dessen sie in eine Familie zusammengefasst wurden (152,292). Ein Typ-V-Sekretionssystem ermöglicht die Translokation von Virulenzfaktoren direkt auf die Oberfläche Gram-negativer Bakterien (293-295). Alle Typ-V-Sekretionssysteme sind modular aufgebaut und bestehen aus vier Domänen: (i) der Signalsequenz für den Sec-abhängigen Transport über die innere Membran, (ii) der Passagierdomäne für die virulente Aktivität außerhalb der Zelle, (iii) sowie einer Linker-Domäne, die Passagierdomäne, und die (iiii) β -barrel-Domäne, welche eine hydrophile Pore in der äußeren Membran ausbildet. Nach dem Sec-abhängigen Transport wird das periplasmatische Intermediat der Passagierdomäne durch die zuvor gebildete β -barrel-Pore transportiert (Abbildung 1.9). Allerdings ist der exakte Translokationsprozess über die äußere Membran nicht vollständig geklärt.

Bisher unterscheidet man fünf Typ-V Untergruppen. Die Untergruppe Typ-Va stellt die ATs dar. Diese enthalten alle für die Translokation nötigen Informationen in einer einzigen AS-Sequenz (296). Bei dem Transport über die äußere Membran wird das Haarnadel-Modell favorisiert. Hierbei findet die Initiation der Insertion des β -barrel in die Lipiddoppelschicht über mehrere C-terminale, konservierte AS statt (297). Im Fall des AT AIDA-I handelt es sich bei der letzten C-terminalen AS um ein Phenylalanin (298). Anschließend wird die

1 Einleitung

ungefaltete PD durch die hydrophile Pore gezogen, in der sich der α -helikale Linker befindet (294,299). Auf der bakteriellen Oberfläche findet die Faltung bei Typ-V sekretierten PD bei machen ATs über ein Autochaperon (AC) statt. Dies ist eine stabile Kernstruktur, die sich am C-terminalen Ende der Passagierdomäne befindet (196,300,301). So konnte für den AT Isca von *Shigella flexneri* mittels CD-Spektroskopie gezeigt werden, dass sich dieses C-terminale AC als einziger Teil der PD autark in die native Form faltet. Auch nach Hitzedenaturierung renaturiert sich das AC autark (302). Für den Typ-V AT BrkA von *Bordetella pertussis* konnte gezeigt werden, dass die Translokation über die Außenmembran zwar ohne AC stattfinden kann, die native Faltung auf der Zelloberfläche in diesem Fall jedoch ausbleibt (303)

Die Untergruppe Typ-Vb stellt das zwei-Partner-Sekretionssystem dar und enthält Proteine, deren Passagier- und Translokationseinheit auf unterschiedlichen Aminosäuresequenzen angesiedelt ist. Es besteht ebenfalls die Variante, dass drei identische Untereinheiten zur Translokation beitragen. Diese bezeichnet man als Trimere ATs (Vc). Ebenfalls ist die Variante des fusionierten zwei-Partner-Sekretionssystems möglich (Vd). Dieses enthält Eigenschaften der monomeren ATs (Va) und Eigenschaften des zwei-Partner-Sekretionssystems (Vb), gebündelt in einer Aminosäuresequenz. Die Untergruppe Typ-Ve besteht aus Proteinen, die die gleichen funktionalen Domänen der Untergruppe Typ-Va enthält, allerdings in umgekehrter Reihenfolge (von C- zu N-Terminus).

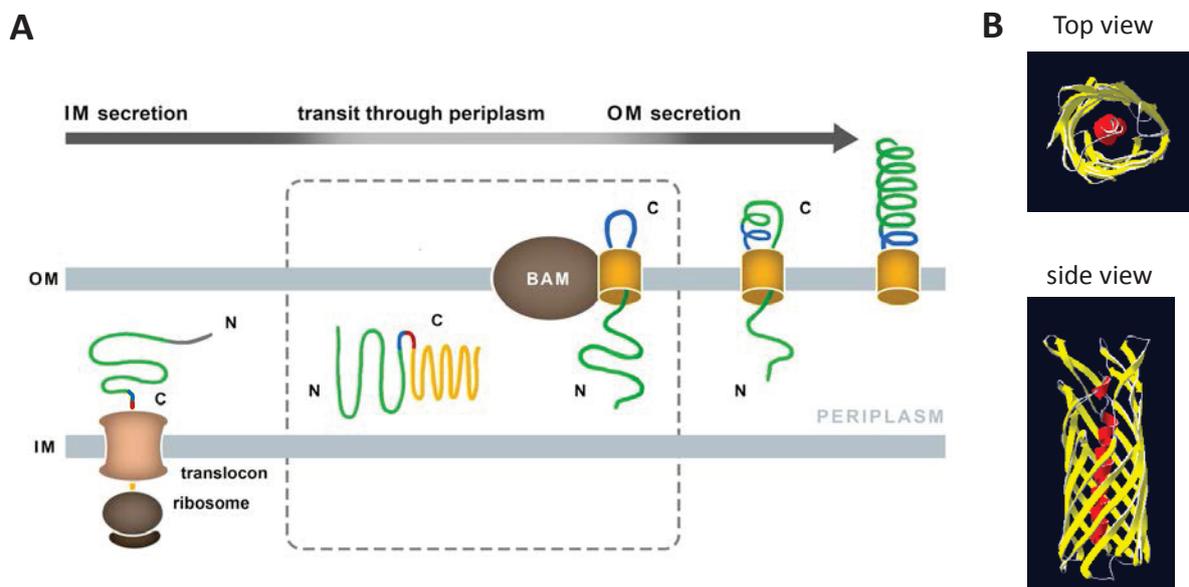


Abbildung 1.9: Übersicht des Typ-V Mechanismus und der AT Struktur.

A: ATs besitzen eine Signalsequenz (grau) zum Transport über das Sec-Translocon (*translocon*) in der inneren Membran (*inner membrane*; IM) in das Periplasma (*periplasm*) (*IM secretion*). Anschließend erfolgt der Transport der PD (grün), des AC (blau), des α -helikalen Linkers (rot) und des C-terminalen β -barrel (gelb) zur Außenmembran (*outer membrane*, OM) (*transit through periplasm*). In der OM bildet der β -barrel eine Pore, durch die die Passagierdomäne über die OM transportiert wird. Der Transport erfolgt dabei vom C- zum N-

1 Einleitung

Terminus (*OM secretion*) (299). Der grau umstrichelte Bereich stellt frühe Schritte im Sekretionsmechanismus dar, die unklar bleiben. Hinzu gehören die Konformation des ATs im Periplasma, der Transport durch das Periplasma zur äußeren Membran, der Einfluss periplasmatischer Chaperone, der exakte Einbau des β -barrel in die OM und der Transport des ersten β -Strands der Passagierdomäne über die äußere Membran. Die sogenannte *β -barrel assembly machinery* (BAM) spielt eine bisher unbekannt Rolle in einigen frühen Transportschritten, einschließlich dem des β -barrel-Einbaus in die OM (304-307) (verändert nach (296)). **B:** Struktur des ATs der Esterase EstA (PDB: c3kvnA) aus *Pseudomonas aeruginosa*. EstA diente als bioinformatisch ausgewählte Vorlage (*template*) um ein Modell von C-Pmp21 zu generieren (siehe Kapitel 3.2). Der α -helikale Linker ist rot, die β -sheets des β -barrel gelb dargestellt.

1.7 Zielsetzung

Zur Adhäsion der Passagierdomänen von Pmps an Humanzellen wurden bereits umfangreiche Analysen durchgeführt (Kapitel 1.3.1, 1.4, 1.4.2, 1.4.3). Auch gibt es erste Hinweise, dass Pmps prozessiert werden und Homo- und Heterooligomere mit anderen Pmps bilden (Kapitel 1.4.3.5).

Strukturbiologische Vorhersagen für Pmps postulieren ausschließlich Typ-V Autotransporter mit β -helikaler Passagierdomäne. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Analysen durchgeführt werden, die es ermöglichen, einen experimentellen Einblick in den strukturbiologischen Aufbau von Pmp21, exemplarisch für die Familie der Pmps, zu erhalten. Des Weiteren sollten Experimente durchgeführt werden, um die adhäsions- und infektionsinhibierende Funktion von renaturierten Pmp-Domänen und deren biochemische Eigenschaften genauer zu untersuchen.

Für die Pmps wurde bisher experimentell nicht nachgewiesen, dass die Pmps über den Typ-Va Autotransporter (Typ V AT)-Sekretionsweg, transportiert werden. Typ V AT zeichnen sich immer durch eine C-terminale β -barrel-Domäne und manche durch ein zusätzliches Autochaperon im N-terminalen Bereich der β -barrel-Domäne aus (Kapitel 1.6). Außerdem enthalten Typ V AT in ihrer Aminosäuresequenz alle nötigen Signalsequenzen und Strukturen, um sich selbst in die äußere Membran zu inserieren und ihre Passagierdomäne auf der äußeren Membran zu präsentieren (Kapitel 1.6).

Daher sollte untersucht werden, ob die postulierte β -barrel-Domäne im C-terminalen Bereich von Pmp21 (C-Pmp21) einen Histidin Tag als exemplarische Passagierdomäne auf die äußere *Escherichia coli* Membran transportieren kann. Anhand einer Strukturanalyse sollte geklärt werden, ob die Sekundärstruktur der eines β -barrel entspricht. Des weiteren sollte daher untersucht werden, ob C-Pmp21 Sekundärstrukturelemente enthält, die auf die Existenz eines Autochaperons hindeuten.

2 Material und Methoden

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Gebrauchsartikel

Tabelle 2.1: Verwendete Gebrauchsartikel

Gebrauchsartikel	Hersteller
Deckgläschen für die Mikroskopie (Ø 12 mm)	Roth
Dialyseklammern	Pierce
Dialyseschlauch	Sarstedt
Einwegspritzen (1 ml, 5 ml)	Omnifix
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad
FACS-Röhrchen	Sarstedt
Falcon Tubes (15/50 ml)	Sarstedt
Formvar-Kohlenstoff beschichtete Kupfer Netzchen (S162)	Plano
Glaskolben (50 ml, 500 ml, 1000 ml, 5000 ml)	Schott
Glasperlen (Ø 0,5 mm)	Braun
HiLoad 16/600 Superdex 200 pg column	GE Healthcare
HiTrap™ 5 ml Chelating HP	GE Healthcare
Kanülen	Braun
Küvetten	Sarstedt
Kristallisationsplatte MbClass I (96 Puffer)	Qiagen
Kristallisationsplatte MbClass II (96 Puffer)	Qiagen
Kristallisationsplatte Mem Gold I (96 Puffer)	Molecular Dimensions
Kristallisationsplatte Mem Gold II (96 Puffer)	Molecular Dimensions
Kristallisationsplatte Mem Plus (48 Puffer)	Molecular Dimensions
Kristallisationsplatte Mem Sys (48 Puffer)	Molecular Dimensions
Kryo-Röhrchen (1,8 ml)	Nunc
Latexkügelchen (Ø 1 µm)	Polyscience
Objektträger	Diagonal
Petrishalen	Sarstedt
Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Proteinkristallisationsplatten (Sitting drop) #3553	Corning
PVDF-Membran für Western Blots	Millipore
Reaktionsgefäße (1,5 ml / 2 ml)	Eppendorf
Schwarze 96-Well Platten für die Immunologie	Nunc
Superdex 200 10/300 GL column	GE Healthcare
Superdex 200 HR 10/300	GE Healthcare
Ultrazentrifugationsröhrchen	Beckman Coulter
Whatman Paper für Western Blot	VWR
Zellkulturflaschen (Polystyrol 25 cm ²)	Nunc

2 Material und Methoden

Zellkulturflaschen (Polystyrol 75 cm ²)	Nunc
Zellkulturplatten (24-Well, 96-Well)	Nunc
Zellkultur-Zentrifugationsröhrchen (12 ml)	Greiner
Zellschaber (23 cm)	Nunc
Zentrifugalkonzentrator Vivaspin 2 (30.000 MWCO, PES Membran)	Sartorius
Zentrifugalkonzentrator Vivaspin 500 (100.000 MWCO, PES Membran)	Sartorius
Zentrifugationsröhrchen, Glas	Korex

2.1.2 Geräte und Maschinen

Tabelle 2.2: Verwendete Geräte und Maschinen

Geräte oder Maschinen	Hersteller
ÄKTA Prime plus	GE Healthcare
Analytische Ultrazentrifuge Optima XL-A	Beckman Coulter
Biophotomer Plus	Eppendorf
C2 konfokales Laserscan Mikroskop	Nikon
CD-Spektrophotometer J-815	Jasco
Dokumentationssystem für Chemielumineszenz Chemie Genius ²	Syngene
Elektronenmikroskop E902	Zeiss
Elektroporationssystem Gene Pulser	Bio-Rad
Feinwaage H110	Sartorius
Geldokumentationssystem	Bio-Rad
Homogenisator Precellys 24	Bertin Technologies
HPLC Serie 1200	Agilent Technologies
Infinite 200 pro-Plattenlesegerät	Tecan
Inkubator Multitron	Infors
Kristallisationsinkubator Rock Imager 1000	Formulatrix
Kristallisationsroboter NT8	Formulatrix
Magnetrührer	IKA
Messzellen für Analytische Ultrazentrifuge Aluminium mit 12-mm-Mittelstücken	Beckman Coulter
Mikrowelle	Bosch
miniDAWN TREOS Multi-Angle Light Scattering Detector	Wyatt Technology
Nano-Drop 2000C	Peqlab
Optilab T-rEX Universal Detection for Chromatography and FFF Separations	Wyatt Technology
PCR-Thermocycler C1000	Bio-Rad

2 Material und Methoden

pH-Meter WTW Series pH 720	inoLab
Plasma Cleaner Femto	Electronic diener
Quarzglas-Präzisionsküvette (1 cm)	Hellma
Rotor für Analytische Ultrazentrifuge An Ti50 (4-Loch)	Beckman Coulter
Rotor für Analytische Ultrazentrifuge An Ti60 (4-Loch)	Beckman Coulter
Rotor für Ultrazentrifuge Ti45	Beckman Coulter
Rotor für Ultrazentrifuge MLS50	Beckman Coulter
Rotor für Zentrifuge JA25.50	Beckman Coulter
Rotor für Zentrifuge JLA 10.500	Beckman Coulter
Schüttler Unitron	Infors
SDS-Elektrophoreseapparat SE-260	Hoefer
Serie 702 Microliter®-Spritze	Hamilton
Spektralphotometer V-650	Jasco
Suprasil Quarz Küvette (1 mm)	Hellma
Thermoblock	Labnet
Ultraschallwasserbad Sonoplus HD2200	Bandelin
Ultrazentrifuge TL-100	Beckman Coulter
Ultrazentrifuge Optima™ L-90K	Beckman Coulter
UV-Licht-Tisch TFL 20M	Biometra
Vakuum-Konzentrator SC110	Savant
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waage TE3102S	Sartorius
Westernblotapparat (PierceG2 Fast Blotter)	Thermo Fischer
Zellaufschließer Benchtop	Constant systems
Zentrifuge Avanti J-25	Beckman Coulter
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus
Zentrifuge Biofuge Pico	Heraeus
Zentrifuge Biofuge Primo R	Heraeus
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalien oder Reagenzien	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma
5'-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)	Sigma
5'-Cyclohexyl-1-Pentyl-β-D-Maltoside (Cymal5)	Anatrace
Acrylamid (Rotiphorese 35)	Roth
Adenin	Roth
Agar	Difco/Gibco
Agarose	Biozym

2 Material und Methoden

Alanin	Merck
Ammoniumchlorid	Merck
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Ammoniumsulfat	Roth
Amphotericin	Life technologies
Ampicillin	Sigma
Amyloid β_{42} ($A\beta_{42}$)	Bachem
Arginin	Fluka
Asparagin	Merck
Asparaginsäure	Merck
β -Mercaptoethanol (β -ME)	Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
Bromphenolblau	Fluka
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Grüssing
Casein Pepton	Difco
Coomassie Brilliant Blau G250 (CBB G250)	Serva
Cycloheximid	Sigma
Cystein	Merck
D(+)-Galaktose	Roth
D(+)-Glucose	Roth
D(+)-Raffinose	Sigma
Desoxynucleosid-5`-Triphosphate (dNTPs)	MBI Fermentas
Dimethylformamid (DMF)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2PO_4)	Fluka
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
DMEM Zellkulturmedium	Life technologies
Dodecylphospho- <i>N</i> -Methylethanolamine (Fos-Mea-12)	Anatrace
Essigsäure	Roth
Ethanol (96%)	J.T. Baker
Ethidiumbromidlösung (10 mg ml^{-1})	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
Ethylenglycol-bis(aminoethylether) <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure	Sigma
Ficoll	Serva
Fos-Choline 16 (FC-16)	Anatrace
Gentamycin	Life technologies
Glucose Monohydrat	Roth
Glutamin	Merck
Glutaminsäure	Sigma
Glutaraldehyd (50% EM-Qualität)	Serva

2 Material und Methoden

Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Guanidin HCl	Serva
Hanks buffered salt solution (HBSS)	Life technologies
Harnstoff	J.T.Baker
Hefe Stickstoff Basis (<i>yeast nitrogen base</i> ; YNB)	Difco
Hefextrakt	Difco
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma
Histidin	Roth
Imidazol	Sigma
Immersionsöl TypA Nikon C2 (nd= 1,515)	Nikon
Isoleucin	Roth
Isopropanol	Roth
Isopropyl- β -D-Thiogalctopyranosid (IPTG)	Peqlab
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Kalbsthymus-DNA (Carrier-DNA)	Sigma
Kongorot (<i>congo red</i> ; CR)	Sigma
Lauryldimethylamine-N-Oxide (LDAO)	Anatrace
Leucin	Roth
Lithiumacetat	Roth
Lysin	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth
Methanol	Riedel-deHaën
Methionin	Merck
Milchpulver ($\leq 1\%$ Fett)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Fluka
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
N-Decyl- β -D-Maltopyranosid (DM)	Anatrace
N-Dodecyl- β -D-Maltopyranoside (DDM)	Anatrace
Neopentyl Glycol (NG)	Anatrace
Nickel(II)-sulfat	Sigma
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma
N-Octyl- β -D-Glucoside (OG)	Anatrace
Nonident P-40 (NP-40)	Anatrace
Para-Formaldehyd (PFA)	Fluka
Phenylalanin	Acros

2 Material und Methoden

Plasmocin	InvivoGen
Polyethylenglycol 3350 (PEG)	Roth
Poly-L-Lysin	Sigma
Prolin	Merck
Proteinkristallisationspuffer Mb class I	Qiagen
Proteinkristallisationspuffer Mb class II	Qiagen
Proteinkristallisationspuffer Mem Gold I	Molecular Dimensions
Proteinkristallisationspuffer Mem Gold II	Molecular Dimensions
Proteinkristallisationspuffer Mem Plus	Molecular Dimensions
Proteinkristallisationspuffer Mem Sys	Molecular Dimensions
Salzsäure (HCl)	Roth
Serin	Merck
Sucrose	Roth
TEMED	Serva
Thioflavin T (ThT)	Sigma
Threonin	Merck
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth
Tris(2-Carboxyethyl)-Phosphine HCl (TCEP HCl)	Hampton Research
Triton X-100	Merck
Trypton Pepton	Difco
Tryptophan	Roth
Tween 20	Merck
Tyrosin	Merck
Uracil	Roth
Uranylacetat	Zur Verfügung gestellt durch das CAi: Universität Düsseldorf (Frau Nissen)
Valin	Merck
Vectashield (Anti-fade, Einbettmedium)	Linaris
Xylen-Cyanol FF	Serva
Zell-Dissoziations-Lösung (<i>cell dissociation solution</i> , Enzym frei, basierend auf <i>Hank's</i>)	Millipore

2.1.4 Software

Tabelle 2.4: Verwendete Software

Software	Hersteller
Clone Manager 9 Professional Edition	Sci-Ed Software
CONTINLL	Dichroweb http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml

2 Material und Methoden

	(308,309)
Gussi Version 10.8e	http://biophysics.swmed.edu/MBR/software.html
I-Tasser Version 5.0	http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/
Sedfit Version 14.4d	http://www.analyticalultracentrifugation.com/default.htm
Sednterp Version 20111201BETA	http://bitcwiki.sr.unh.edu/index.php/Main_Page
Phyre2 Version 2.0	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index

2.1.5 Lösungen und Puffer

Tabelle 2.5: Verwendete Lösungen und Puffer

Lösung / Puffer	Zusammensetzung
1x phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffer saline</i> ; PBS)	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)
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl 0,4% SDS pH 6,8 (HCl/NaOH)
4x SDS-Blaumarker	272 mM Tris-HCl 8-32% SDS (w/v) 0,08 % Bromphenolblau (w/v) 40% Glycerin (v/v) pH 6,8 (HCl/NaOH)
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl 0,4% SDS (w/v) pH 8,8 (HCl/NaOH)
Circulardichroismus (CD)-Spektroskopiepuffer	77,4 mM Na ₂ HPO ₄ 22,6 mM NaH ₂ PO ₄ 75 mM NaI ± 1 mM TCEP pH 7,4 (HCl/NaOH)
Coomassie-Färbelösung	0,02% CBB-G250 (w/v) 35 mM (HCl/NaOH)
Detektionspuffer	0,1 M Tris-HCl 0,1 M NaCl 50 mM MgCl ₂ pH 9,5 (HCl/NaOH)
DNA-Blaumarker	0,1% Bromphenolblau (w/v) 0,1% Xylen-Cyanol FF (w/v)

2 Material und Methoden

	15% Ficoll (w/v)
	10 mM Tris
	10 mM EDTA
IMAC Laufpuffer (Membranproteinaufreinigung)	200 mM Tris-HCl 200 mM NaCl 0,1% FC-16 (w/v) pH 8 (HCl/NaOH)
IMAC Elutionspuffer (Membranproteinaufreinigung)	200 mM Tris-HCl 200 mM NaCl 200 mM Imidazol 0,1% FC-16 (w/v) pH 8 (HCl/NaOH)
Kopplungspuffer	0,2 M NaHCO ₃ 0,5 M NaCl pH 8,6
Lysispuffer (Membranproteinaufreinigung)	200 mM Tris-HCl 200 NaCl 0,1 mg ml ⁻¹ DNase pH 8 (HCl/NaOH)
Puffer A1 (On Column Refolding; OCR)	20 mM Tris-HCl 6 M Guanidin HCl 0,5 M NaCl 5 mM Imidazol 1 mM β-Mercaptoethanol (β-ME) pH 8 (HCl/NaOH)
Puffer A2 (OCR)	20 mM Tris-HCl 6 M Harnstoff 0,5 M NaCl 5 mM Imidazol 1 mM β-ME pH 8 (HCl/NaOH)
Puffer A3 (OCR)	20 mM Tris-HCl 0,5 M NaCl 0,5 M Imidazol 1 mM β-ME pH 8 (HCl/NaOH)
Puffer B (OCR)	20 mM Tris-HCl 0,5 M NaCl 5 mM Imidazol 1 mM β-ME pH 8 (HCl/NaOH)
Solubilisierungspuffer	200 mM Tris-HCl

2 Material und Methoden

(Membranproteinaufreinigung)	±200 NaCl 10% Glycerin ±1-2% (w/v) Detergenz entsprechend Screen pH 8 (HCl/NaOH)
SEC-Laufpuffer	20 mM HEPES
(Membranproteinaufreinigung)	200 mM NaCl 0,01 – 0,1% FC-16 (w/v) ± 4 mM β-ME pH 8 (HCl/NaOH)
SDS-PAGE Laufpuffer	0,5 M Tris-HCl 0,2 M Glycin 0,1% SDS (w/v) pH 8,3 (HCl/NaOH)
Transferpuffer	48 mM Tris-HCl 39 mM Glycin 0,037% SDS (w/v) 20% Methanol
Western Blot	3% Milchpulver (w/v)
Blockierungslösung	0,05% Tween 20 (v/v) In 1x PBS

2.1.6 Enzyme

2.1.6.1 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme wurden nach Herstellerangaben (Thermo Fischer) zur Plasmidöffnung vor der homologen Rekombination oder für Kontrollverdaue nach der homologen Rekombination verwendet. Verwendet wurden: *Adel*, *BamHI*, *Bsp119I*, *Bsu15I*, *Eco81I*, *EcoRV*, *HindIII*, *Mlsl*, *NcoI*, *PstI*, *Psyl*, *Pvul*, *Sacl*, *Smil*, *XbaI*

2.1.6.2 Weitere Enzyme

Tabelle 2.6: Weitere verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
DNase I (grade II)	Roche
RNase A	Qiagen
Taq-Polymerase	Eigene Herstellung (Fr. Volfson)
Trypsin/EDTA	Thermo Fischer

2 Material und Methoden

2.1.7 Antikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz

2.1.7.1 Primäre Antikörper

Tabelle 2.7: Verwendete Primärantikörper

Name	gerichtet gegen	Ursprung	Verdünnung	Hersteller
Anti-His	Penta Histidin (His)-Tag	Maus	WB 1:2500	Qiagen
Anti-His-HRP	His-Tag	Maus	WB 1:2500	Miltenyi
Anti-MBP	Maltose-Binde-Protein (MBP)	Kaninchen	WB: 1:2500	New England Biolabs
Pathfinder	chlamydiales LPS	Maus	IF 1:6 <i>C.pn.</i>	BioRad

2.1.7.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 2.8: Verwendete Sekundärantikörper

Name	gerichtet gegen	Ursprung	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus-AP	Maus	Ziege	WB 1:7500	Promega

2.1.8 Kits

Tabelle 2.9: Verwendete Kits

Name	Hersteller
Qiagen Plasmid-Midi-Kit	Qiagen
Qiagen Gel-Extraction-Kit	Qiagen

2.1.9 Größenstandards

Tabelle 2.10: Verwendete Größenstandards für Gelelektrophoresen.

Name	Fragmente	Hersteller
1 kb DNA-Ladder Mix	10.000, 8.000, 6.000, 4.000, 3.500, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 [bp]	Thermo Fischer
PageRuler™ Prestained	170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17, 11 [kDa]	Thermo Fischer
MWGF70, Gel Filtration Markers Kit for Protein Molecular Weights 6,500 - 66,000	Cytochrome c, horse heart, 12,4 kDa	Sigma

2 Material und Methoden

MWGF1000, Gel Filtration Markers Kit for Protein Molecular Weights 29,000 - 700,000	Carbonic Anhydrase, bovine erythrocytes, 29 kDa; Albumin, bovine serum, 60 kDa Alcohol Dehydrogenase, yeast, 150 kDa; β -Amylase, sweet potato, 200 kDa; Apo ferritin, horse spleen, 443 kDa; Blue dextran, 2.000 kDa	Sigma
--	---	-------

2.1.10 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers.net synthetisiert, lyophilisiert geliefert und durch Lösen in entsprechenden Volumina an ddH₂O auf eine Konzentration von 50 pmol μl^{-1} eingestellt. Die C-Nummern der Oligonukleotide beziehen sich auf die laborinterne Sammlung. Bei Oligonukleotiden, die mit GATC gekennzeichnet sind, handelt es sich um Standardsequenzierungsprimer der Firma GATC.

2.1.10.1 Oligonukleotide zur Klonierung

Tabelle 2.11: Verwendete Oligonukleotide zur Klonierung

Nr.	Name	Verwendung	Sequenz (5'→3')
C-1033	CEN/ARSH-URA for	Amplifikation CEN-ARS- URA3 aus pKM32 für pSL3	CTCGACCCCAAAAACTTGATTAG GGTGATGGTTCACGTAGGTCCTT TTCATCACGTGCT
C-1034	CEN/ARSH-URA rev	Amplifikation CEN-ARS- URA3 aus pKM32 für pSL3	GTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTA TCAGGGCGATGGCCCACTTAGTT TTGCTGGCCGCATC
C-2284	pET-22b_10X His for.	Dimer-PCR 10 x His-Tag für pSL4	TCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGC ACTCGAGCACCATCACCACCATCA TCACCATCACCAT
C-2285	pET-22b_10X His rev.	Dimer-PCR 10 x His-Tag für pSL4	CTTTCGGGCTTTGTTAGCAGCCG GATCTCAATGGTGATGGTGATGA TGGTGATGGTG
C-2621	pSL12 fwd	Amplifikation von C- <i>Pmp21</i> für pSL12	TGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGC CCAGCCGCGATGGCCACCATC ACCACCATCATCACCATCACCATA GCTCTCCTACACCCAATAA
C-2622	pSL12 rev	Amplifikation von C- <i>Pmp21</i> für pSL12	ACTCAGCTTCTTTTCGGGCTTTGT TAGCAGCCGATCTCAGAAAATA ATACGGATACCAC

2 Material und Methoden

C-2784	Passenger C-Pmp21 fwd	Amplifikation des potentiellen Autochaperon (pAC) aus <i>C-Pmp21</i> für pCN2	AAATAATTTTGTTTAACTTTAAGA AGGAGATATACATATGAGCTCTC CTACACCCAATAA
C-2785	Passenger C-Pmp21 rev	Amplifikation des potentiellen Autochaperon (pAC) aus <i>C-Pmp21</i> für pCN2	CCGGATCTCAATGGTGATGGTGA TGATGGTGGTGATGGTGAGAGC CCCTTGCTTCTCAG
C-2625	pIG501 promotor fwd	Amplifikation des konstitutiven Cholera toxin B Promotors aus pIG501 für pSL13	GCGTCCGGCGTAGAGGATCGAG ATCTCGATCCCGCGAAATGAATTC TCATGTTTGACAGC
C-2626	pIG501 promotor rev	Amplifikation des konstitutiven Cholera toxin B Promotors aus pIG501 für pSL13	GCAGCAGACCAGCAGCAGCGGTC GGCAGCAGGTATTTTCATAATTCAT CCTTAATTCTATT
C-2800	REVPmpAC2-Term	Amplifikation des Volllängen <i>PmpA</i> aus <i>C. tr.</i> E für pSL15	CTTTGTTAGCAGCCGGATCTCAGTGG TGGTGGTGGTGGTGCCCTAAGTTAT GAGAGGCTG
C-2801	FwdPmpA N-Term	Amplifikation des Volllängen <i>PmpA</i> aus <i>C. tr.</i> E für pSL15	ATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGA GATATACATATGGAATGGAATTAG CTATTTCTG

2.1.10.2 Oligonukleotide zur Sequenzierung

Tabelle 2.12: Verwendete Oligonukleotide zur Sequenzierung.

Nr.	Name	Verwendung	Sequenz (5'→3')
C-2240	T7 promotor primer #69348-3 (T _A : 46°C)	Sequenzierung pET22, pSL3/4/12 und pCN2 vom 5'-Ende	TAATACGACTCACTATAGGG
C-2215	pET20 b+ rev. (44°C)	Sequenzierung von pET22b, pSL3/4 und 12 vom 5'-Ende bindet innerhalb der <i>PeI</i> B-Sequenz	AGCCGGCGATGGCCATG
C-2098	Seq_pET28b_Fwd	Sequenzierung von pET22b, pSL3/4/12/13 und pCN2 vom 5'-Ende	GGATAACAATTCCCCTCTAG

2 Material und Methoden

C-2097	Seq_ pET28b_Rev	Sequenzierung von pET22b, pSL3/4/12/13 und pCN2 vom 3`-Ende	CCAACTCAGCTTCCTTTC
	pET24a	GATC-Primer zur Sequenzierung pET22b, pSL3/4/12/13 und pCN2 vom 3`-Ende	GGGTTATGCTAGTTATTGCTCAG

2.1.11 Verwendete und neu klonierte Plasmide

Tabelle 2.13: Verwendete und neu klonierte Plasmide.

Nr.	Name	Konstruktbeschreibung
1337	pEG23	pKM32 geschnitten mit <i>Sma</i> I, Integration des <i>pmp21-D</i> -Fragments, generiert mit den Oligonukleotiden C-643/ C-640 auf GiD <i>C. pn.</i> DNA (179).
1611	pEG40	pKM32 geschnitten mit <i>Sma</i> I, Integration des <i>pmp21-Dmut4</i> -Fragments, generiert mit den Oligonukleotiden C-640/ C-643 auf pEG37 DNA (179).
1341	pEG27	pKM32 geschnitten mit <i>Sma</i> I, Integration des <i>pmp21-E</i> -Fragments, generiert mit den Oligonukleotiden C-641/C-640 auf GiD <i>C. pn.</i> DNA (179).
1342	pEG28	pKM32 geschnitten mit <i>Sma</i> I, Integration des <i>pmp21-N</i> -Fragments, generiert mit den Oligonukleotiden C-639/ C-640 auf GiD <i>C. pn.</i> DNA (179).
1603	pEG32	pKM32 geschnitten mit <i>Sma</i> I, Integration des <i>pmp21-Amut</i> -Fragments, generiert mit den Oligonukleotiden C-639/ C-1092 auf pEG5 DNA (179).
1604	pEG33	pKM32 geschnitten mit <i>Sma</i> I, Integration des <i>pmp21-A</i> -Fragments, generiert über Ligation, geschnitten aus pEG5 mit <i>Bam</i> HI/ <i>xho</i> I (179).
2393	pET22b(+)	Geschenk der AG Schmitt, Biochemie I, HHU (Frau Dr. Kleinschrodt). Vektor der Firma Novagen mit <i>pelB</i> -Sequenz für periplasmatische Expression von heterologen Proteinen.
2196	pSL3	pET22b(+) geschnitten mit <i>Adel</i> . Integration der CEN-ARS-URA3 Kasette, generiert mit den Oligonukleotiden C-1033 & C-1034 aus pKM32
2197	pSL4	pSL3 geschnitten mit <i>Hind</i> III. Integration des C-terminalen 10x His-Tags generiert mit den Dimer bildenden Oligonukleotiden C-2284/C-2285.

2 Material und Methoden

2442	pSL12	pSL4 geschnitten mit <i>Hind</i> III. Integration von C-Pmp21 generiert mit den Oligonukleotiden C-2621/C-2622.
2443	pSL13	pSL12 geschnitten mit <i>Xba</i> I. Integration des konstitutiven Promotors aus pIG501 generiert mit den Oligonukleotiden C-2625/C-2626
2525	pSL15	pET24a geschnitten mit <i>Hind</i> III. Integration der Sequenz, kodierend für die gesamte Passagier Domäne von <i>C. tr.</i> E <i>PmpA</i> generiert mit den Oligonukleotiden C-2801/C-2801
2500	pCN2	pSL4 geschnitten mit <i>Hind</i> III. Integration der potentiellen Autochaperon-Domäne aus pSL12, generiert mit den Oligonukleotiden C-2784/C-2785 (310).
2733	pIG101	Induzierbare Expression von AIDA-I aus <i>E. coli</i> (N-terminaler 6x His-Tag). Geschenk der AG Schmitt, Biochemie I, HHU (Frau Dr. Gawarzewski) (298).
2734	pIG501	Konstitutive Expression von AIDA-I aus <i>E. coli</i> (N-terminaler 6x His-Tag) durch Promotor von Cholera Toxin B. Geschenk der AG Schmitt, Biochemie I, HHU (Frau Dr. Gawarzewski) (298).
2063	pET24a	pET24 Expressionsvektor mit 6x His-Tag und integrierter CEN-ARS-URA3 Kasette zur Klonierung in <i>S. cerevisiae</i> (311).
2177	pEB68	pKM32 geschnitten mit <i>Sma</i> I, Integration eines <i>PmpC</i> -Fragments, generiert mit den Oligonukleotiden C-2041/C-2042 (74).
2731	pKM100	Pmp21 5' Ende amplifiziert mit C- 2565/ 2566 auf <i>C. pn.</i> DNA; Pmp21 3' Ende amplifiziert mit C- 2567/ 2568 auf <i>C. pn.</i> DNA, zur Generierung von <i>Pmp21</i> Volllänge im Backbone pKM46.
1941	pKM32	CEN-ARS-URA3 generiert mit den Oligonukleotiden C-613/C-614 auf pAC2 DNA (65).

2.1.12 Zellen und Zelllinien

2.1.12.1 Prokaryotische Zellen und Zelllinien

Chlamydia pneumoniae

GiD: Herkunft: Gießener Isolat eines Patienten mit akuter Bronchitis (312) (kultiviert und bereitgestellt von M.Sc. Jan Galle)

Escherichia coli

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

2 Material und Methoden

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

ArcticExpress RIL: *E. coli* B F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*₊ Tet_r *gal* λ(DE3) *endA Hte* [*cpn10cpn60* Gent_r] [*argU ileY leuW* Str_r] (Agilent)

2.1.12.2 Eukaryotische Zellen und Zelllinien

Adhärente Zelllinien

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

Saccharomyces cerevisiae

CEN.PK 2-1C: MATa *leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^sSUC2* (313)

2.1.13 Medien und Medienzusätze

2.1.13.1 Medien für *E. coli*

LB-Medium:

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

In 1 L ddH₂O lösen und autoklavieren. Zugabe von Ampicillin (50 mg L⁻¹) oder Kanamycin (10 mg L⁻¹) flüssig bzw. (15 mg L⁻¹) fest.

2.1.13.2 Medien für *S. cerevisiae*

YDP⁺-Medium:

20 g	Glucose
10 g	Hefeextrakt
20 g	Casein Hydrolysat (Pepton)
13,5 g	Agar (nur bei Platten)
2 ml	Adeninstocklösung (2 mg ml ⁻¹)
4 ml	Tryptophanstocklösung (5 mg ml ⁻¹)

In 1 L ddH₂O lösen und autoklavieren.

2 Material und Methoden

SD-Minimalmedium (Platten):

20 g	Glucose
20 g	Agar
1,7 g	Hefe
	Nitrogen Base (NYB)
5 g	Ammoniumsulfat
2 g	Aminosäure mix +24

SD-Minimalmedium (flüssig)

20 g	Glucose
1,7 g	Hefe Nitrogen Base (YNB)
5 g	Ammoniumsulfat
2 g	Amminosäuremix +24

Für Agarplatten die Komponenten in 1 l ddH₂O lösen und vor dem Autoklavieren mit 1 M NaOH auf pH 6 einstellen. Zur Selektion wird die entsprechende Aminosäure oder Nukleobase nicht mit in den Aminosäuremix gegeben.

Aminosäuremix +24:

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

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

2 Material und Methoden

2.1.13.3 Zell- und Chlamydienkulturmedium

Zellkulturmedium (+5):

500 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

50 ml FKS (hitzeinaktiviert 1 h bei 56°C)	Endkonzentration: 10%
5 ml MEM nicht essentielle Aminosäuren (100x)	Endkonzentration: 1x
5 ml MEM Vitamine (100x)	Endkonzentration: 1x
5 ml Fungizone (250 µg ml ⁻¹)	Endkonzentration: 2,5 µg ml ⁻¹
0,5 ml Gentamycin (50 mg ml ⁻¹)	Endkonzentration: 50 µg ml ⁻¹

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

2.2 Methoden

2.2.1 Passagieren adhärenter humaner Zellen durch Trypsin Behandlung

- Aus einer konfluent mit Zellen bewachsenen Zellkulturflasche (75 cm²) wird das Zellkulturmedium abgenommen und der Zellrasen einmal mit 10 ml HBSS gewaschen.
- Anschließend werden die Zellen mit 5 ml Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung überschichtet und bis zum Ablösen der Zellen inkubiert. Durch leichtes Schwenken der Flasche wird das Ablösen erleichtert.
- Durch Zugabe von 5 ml Zellkulturmedium und vorsichtiges Mischen der Suspension wird die Trypsin-Aktivität gestoppt.
- Die Suspension wird in ein 12 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und 10 min bei 500 Upm, (Hettich Rotanta 460R) zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen, und das Sediment in 5 ml Zellkulturmedium vorsichtig resuspendiert.
- Zur Passage in 75 cm² Zellkulturflaschen werden 15 ml Zellkulturmedium vorgelegt und 1 ml der Zellsuspension hinzugefügt und die Zellen 2 Tage bei 37 °C und 6% CO₂ inkubiert.
- Zur Passage in 25 cm² Zellkulturflaschen werden 5 ml Medium vorgelegt und 0,2 µl - 0,5 µl der Zellsuspension hinzugegeben. Die Zellen werden im Anschluss 2 Tage inkubiert, bis sie einen konfluenten Zellrasen bilden.
- Zur Passage in 24-Well Platten wird jeweils ein steriles Deckgläschen in jede Vertiefung gelegt und die Zellen je nach Bedarf 1:10 bis 1:40 in Zellkulturmedium

2 Material und Methoden

verdünnt und je 1 ml Zellsuspension pro Vertiefung ausgebracht. Die Zellen werden 1-2 Tage bis zu Erlangung des gewünschten Dichtegrads inkubiert.

- Alternativ kann die Zellzahl der Suspension mit einer Thoma Zahlkammer bestimmt werden. Hierfür werden 5 μl der unverdünnten Zellsuspension in die Zahlkammer eingefüllt. Die Anzahl der Zellen wird unter dem Binokular bestimmt und unter Berücksichtigung des Zählkammer-spezifischen Verdünnungsfaktors die Zellzahl pro ml errechnet.

2.2.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die verwendeten *S. cerevisiae* Stämme werden bei 30°C in unter Kapitel 2.1.13.2 beschriebenen Fest- und Flüssigmedien kultiviert. Die Anzucht von Flüssigkulturen erfolgt bei rotierendem Schütteln. Die Selektion auf plasmidhaltige Zellen erfolgt durch das Weglassen der entsprechenden Marker-Aminosäure oder Nukleo-Base.

2.2.3 Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht der verwendeten *E. coli* Stämme erfolgte in LB-Medium in aeroben Schüttelkulturen (140 - 180 Upm) bei 10 - 37 °C. Auf Plasmid-Transformanten wird über die Zugabe von 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Ampicillin oder 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin zum Medium selektioniert.

2.2.3.1 Herstellung von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen

- Zellen aus der Stammsammlung werden auf einer LB-Platte mit Selektionsmarker entsprechend den Herstellerangaben ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert.
- Zwei 5 ml Kulturen werden angesetzt und u/N bei 37 °C inkubiert.
- Mit jeder ü/N-Kultur wird 1 L LB-Medium angeimpft und bei 37 °C schüttelnd inkubiert, bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,6 - 0,7.
- Die 1 L Kulturen werden 30 min auf Eis abgekühlt und 15 min bei 4000 Upm (Beckmann J2-21, JLA10.500) und 4 °C abzentrifugiert.
- Die pelletierten Zellen jeder Kultur werden zweimal mit 1000 ml eiskaltem, sterilem ddH₂O gewaschen.
- Die Pellets werden in je 20 ml eiskaltem, sterilem 10 %igem Glycerin resuspendiert und erneut 15 min bei 4000 Upm und 4 °C zentrifugiert.

2 Material und Methoden

- 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, die Transformationseffizienz wird durch eine Testtransformation mit 0,01 ng pBIISK+ in 1 µl Volumen bestimmt.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion werden spezifische synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die komplementär zu den Randbereichen der zu amplifizierenden Zielsequenz sind, genutzt, um den dazwischen liegenden Abschnitt zu vervielfältigen. Die Amplifikation verläuft in einem dreiphasigen Zyklus, der in Denaturierung des DNA-Doppelstrangs, Anlagerung (Annealing) der Oligonukleotide und DNA-Synthese (Elongation), durch eine thermostabile DNA-Polymerase, eingeteilt wird. Durch Wiederholung dieser Zyklen wird eine exponentielle Vermehrung der Zielsequenz erreicht, da jeder neu gebildete Strang als Matrize für die weitere Synthese verwendet wird.

2.2.4.1.1 Amplifikation von Gensequenzen

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

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

Wobei **A** für die Anzahl der Guanin- und Cytosin-Basen innerhalb der Oligonukleotidsequenz bzw. **B** für die Adenin- und Thymin-Basen steht. Die optimale Elongationstemperatur liegt für die verwendete *Taq*-Polymerase bei 72°C. Die Elongationszeit ist abhängig von der Größe des zu amplifizierenden Fragments und wird mit 1 min pro 1000 Nukleotide (nt) angesetzt. Die PCR-Reaktion wird im Thermocycler (BioRad) durchgeführt. Die PCR-Proben werden anschließend mittels Restriktionsanalyse und Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

PCR-Ansatz

2 Material und Methoden

PCR-Ansatz:

X μl	10-100 ng DNA
1 μl	Oligonukleotid 1 (50 pmol)
1 μl	Oligonukleotid 2 (50 pmol)
5 μl	dNTP (4 mM)
5 μl	Puffer (10x)
4 μl	Mg ₂ Cl ₂ (25 mM)
1 μl	<i>Taq</i> -Polymerase (1 U μl^{-1})
add 50 μl	H ₂ O

PCR-Bedingungen:

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

2.2.4.1.2 PCR auf Hefekoloniezellen

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

PCR-Ansatz:

10 μl	ddH ₂ O + Hefezellen
0,3 μl	Oligonukleotid 1 (50 pmol)
0,3 μl	Oligonukleotid 2 (50 pmol)
0,24 μl	dNTPs (25 mM)
3 μl	Puffer (10x)
1,8 μl	MgCl ₂ (25 mM)
0,3 μl	<i>Taq</i> -Polymerase (1 U μl^{-1})
1 μl	DMSO
1 μl	Tween 20
add 30 μl	ddH ₂ O

Die PCR-Bedingungen werden wie unter **Kapitel 2.2.5.1.2** beschrieben gewählt.

2 Material und Methoden

2.2.4.2 Auftrennung von DNA-Molekülen durch Agarose-Gelelektrophorese

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

2.2.4.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

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

2.2.4.4 Transformation von und homologe Rekombination in *S. cerevisiae*

Um Plasmide in Hefe zu transformieren, wird ein Transformationsprotokoll basierend auf der Lithiumacetat-Methode angewandt (314). Ein gewünschtes DNA-Fragment kann über homologe *in vivo* Rekombination in einen zuvor linearisierten Zielvektor integriert werden. Um den Vorgang zu ermöglichen werden dem gewünschten Gen über die Oligonukleotide bei der Amplifikation im 5'-Bereich 40 nt Homologie zum Zielvektor angefügt.

- Eine 50 ml YDP⁺-Hauptkultur wird mit einer ü/N-Kultur des zu transformierenden Hefestammes auf eine OD₆₀₀ 0,1 angeimpft und erneut schüttelnd (140 Upm) bei 30 °C inkubiert bis zu einer Konzentration von 2×10^7 Zellen ml⁻¹.
- Die Kultur wird 5 min bei 3500 Upm (Heraeus Megafuge 1.0R) sedimentiert.
- Der Überstand wird verworfen und die Zellen in 25 ml ddH₂O gewaschen.
- Das erhaltene Zellpellet wird in 1 ml 100 mM LiAc resuspendiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und 5 s bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert.
- Die Zellen werden in 100 mM LiAc (pH 8,4 - 8,9) resuspendiert, sodass die Zellzahl bei etwa 2×10^9 Zellen ml⁻¹ liegt.
- Für die Transformationen werden 50 µl Aliquots in Reaktionsgefäße überführt, die Zellen erneut 5 s bei 13.000 Upm sedimentiert und der Überstand abgenommen.

2 Material und Methoden

- Die Carrier-DNA (2 mg ml^{-1}) wird zum Denaturieren für 10 min auf $100 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt und auf Eis abgekühlt.
- Zu den kompetenten Hefezellen wird der folgende „Transformationsmix“ in der vorgegebenen Reihenfolge hinzugefügt:

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

- Die Ansätze werden gut gemischt und 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock für 30 min bei 42°C im Thermoblock.
- Die Transformationsansätze werden bei 13.000 Upm für 5 s zentrifugiert (Heraeus Biofuge pico) und in 200 μl ddH₂O resuspendiert.
- Die Zellsuspension wird zu je 90 % und 10 % auf Selektionsplatten ausgestrichen und bei 30°C für 2-3 Tage inkubiert.

2.2.4.5 Isolation von DNA aus *S. cerevisiae*

Die Isolation der DNA erfolgt über Aufschluss der Hefezellen mittels Glasperlen und unter Verwendung des Prinzips der alkalischen Lyse (315).

- 4 ml einer ü/N-Kultur werden in ein Kryo-Röhrchen überführt und für 5 s bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge pico) pelletiert.
- Das Pellet wird einmal mit 1 ml ddH₂O gewaschen.
- Die Zellen werden in 500 μl Puffer P1 mit RNase A ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) resuspendiert, 500 μl Puffer P2 hinzugefügt und vorsichtig gemischt.
- Zur Zellsuspension werden ca. 2/3 des Volumens Glasperlen zugesetzt.
- Der Zellaufschluss erfolgt für 2 x 20 s mit 5 s Pause bei 5500 Upm im Zellhomogenisator (Homogenisator Precelly s24).
- Die Glasperlen werden für 2 min bei 2000 Upm sedimentiert und 1 ml des Überstands wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt.
- 500 μl Puffer P3 werden zu pipettiert, gemischt und die Probe wird 10 min auf Eis inkubiert bevor sie 15 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert wird.

2 Material und Methoden

- 750 µl des Überstandes werden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 750 µl Isopropanol aufgefüllt und gut gemischt.
- Durch Zentrifugation für 30 min bei 13.000 Upm wird die DNA gefällt. Das DNA-Präzipitat wird mit 70 %igem Ethanol gewaschen.
- Das DNA Pellet wird im Vakuum-Konzentrator getrocknet und in 20 µl ddH₂O aufgenommen.

2.2.4.6 Transformation von *E. coli*

2.2.4.6.1 Ein-Minuten Transformation

Bei der Ein-Minuten Transformation handelt es sich um ein schnelles Verfahren mit niedriger Effizienz. Daher ist sie nur für die Transformation von Plasmid-DNA geeignet.

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

2.2.4.6.2 Transformation durch Elektroporation

Für gering konzentrierte Plasmid-DNA, die aus *S. cerevisiae* isoliert wurde, wird die sehr effiziente *E. coli* Transformation durch Elektroporation genutzt.

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

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

Das Verfahren beruht auf einer von der Firma Qiagen modifizierten Methode der alkalischen Lyse nach Maniatis (316).

2.2.4.7.1 Plasmid-Minipräparation

- 1,5 ml einer ü/N-Kultur wird in ein Reaktionsgefäß überführt, 5 s bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge pico) pelletiert und der Überstand verworfen.
- Die Zellen werden in 100 µl Puffer P1 + RNaseA (100 µg ml⁻¹) resuspendiert.
- Der Suspension werden 100 µl Puffer P2 hinzugefügt und durch Invertieren gemischt.
- Anschließend werden 100 µl P3 zugegeben und durch Schütteln gemischt.
- Der Ansatz wird 10 min bei 13.000 Upm zentrifugiert.
- Der Überstand wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 700 µl Isopropanol versetzt, gut gemischt und 30 min bei 13.000 Upm zentrifugiert.
- Das DNA-Präzipitat wird mit 500 µl 70 % EtOH überschichtet und erneut 10 min bei 13.000 Upm zentrifugiert.
- Die DNA wird im Vakuum-Konzentrator getrocknet und in 50 µl sterilem ddH₂O aufgenommen.

2.2.4.7.2 Plasmid-Midipräparation

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

2.2.4.8 Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen

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

2 Material und Methoden

2.2.4.9 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

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

2.2.4.10 Sequenzierung von DNA

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

2.2.5 Biochemische Methoden

2.2.5.1 Induktion der Genexpression in *E. coli*

Zur Expression von heterologen Proteinen unter Kontrolle des induzierbaren *lac*-Promotors (XL₁-Blue, BL21 und ArcticExpress) wird der *E. coli* Kultur bei einer OD₆₀₀ von 0,6 IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt. Der Erfolg der Genexpression wird durch die Aufarbeitung von Proteinproben und deren Analyse mittels SDS-PAGE kontrolliert. Die *E. coli*-Kulturen werden für die SDS-PAGE auf eine OD₆₀₀ von 1 in 1 ml Probe eingestellt, pelletiert und jeweils 10 µl in der SDS-PAGE eingesetzt (Kapitel 2.2.5.10.2).

- Von einer ü/N-Kultur wird eine 1 – 2 L-Induktionskultur auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,1 überimpft und schüttelnd bei 10 – 37°C inkubiert.
- Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 wird die Genexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kultur für 4 h unter Schütteln bei 37°C weiter inkubiert.
- Im Anschluss werden die *E. coli* Zellen für 10 min bei 5000 Upm (Beckman Avanti J-25; JLA 10.500) pelletiert.
- Das Pellet wird mit 40 – 80 ml PBS Puffer gewaschen und 15 min bei 4600 Upm (Heraeus Megafuge1.0R) zentrifugiert.
- Das Zellpellet wird in 1 ml PBS resuspendiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

2 Material und Methoden

2.2.5.2 Nachweis von *E. coli*-Oberflächenproteinen durch Proteinase-Verdau und anschließender Western Blot Detektion

Nach erfolgreicher Expression der Pmp-proteine wurde die Oberflächenpräsentation durch einen Trypsin-Verdau der *E. coli*-Zellen überprüft. Der Vergleich von Trypsin-verdauten und nicht verdauten *E. coli*-Zellen im Western Blot mit Anti-His Antikörpern diente dabei als Nachweis der erfolgreichen Oberflächenpräsentation. Zur Überprüfung der Zellintegrität während des Verdau erfolgte zusätzlich der Nachweis des periplasmatischen Maltosebindeproteins (MBP) im Western Blot.

- Das Zellpellet einer frischen Expressionskultur wird in Lysispuffer ohne DNase gelöst und auf eine OD₆₀₀ von 4 eingestellt.
- 5 ml der *E. coli* Suspension werden ±50 µl Trypsin (5 mg ml⁻¹) für 60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert.
- Die Zellen werden bei 4.600 Upm für 10 min pelletiert.
- Lösen der Zellpellets in 20 ml PBS (finale OD₆₀₀ von 1).
- Die Proben werden für die SDS-PAGE vorbereitet und im Western Blot mittels Anti-His und Anti-MBP Antikörper analysiert.

2.2.5.3 Zellaufschluß von heterolog exprimierten Proteinen

2.2.5.3.1 Denaturierende Lyse von *E. coli*-Zellen

Die Zellpellets der vorigen Expression werden aufgetaut und mit 30 ml Puffer A1 lysiert, wobei die Probe so lange gevortext wird, bis eine homogene Suspension entsteht. Die Suspension wird anschließend 1 h unter Schütteln bei RT inkubiert. Anschließend werden die lysierten Zellen in Zentrifugenröhrchen überführt und für 1 h bei 24000 Upm und 4°C (Beckman Avanti J-25; JA 25.50) zentrifugiert. Der Überstand enthält die denaturierten Proteine und wird in ein neues Falcon-Reaktionsgefäß überführt.

2.2.5.3.2 Nativer Zellaufschluss zur Isolierung von Membranen

Zum Zellaufschluss unter nativen Bedingungen wurde der Zellaufschließer Benchtop (constant systems) in der AG Schmitt (Biochemie I; HHU) verwendet. Es handelt sich dabei um einen mechanischen Aufschließungsprozess. Die Zellen werden dabei mittels hohen Drucks durch ein Diaphragma gepresst. Die Zellen werden zum einen durch die entstehenden Scherkräfte aufgeschlossen, zum anderen dadurch, dass die Zellen nach dem

2 Material und Methoden

Passieren des Diaphragmas auf die Wand des Zellaufschließers aufschlagen. Das führt zu einer Kompression der Zellen wodurch sie platzen. Vor dem Zellaufschluss wurde das Gerät für 30 min auf 4°C heruntergekühlt.

- Das Zellpellet wird aufgetaut und in Lysispuffer (1 g Pellet in 10 ml Lysispuffer) vollständig resuspendiert.
- Der Zellaufschließer wird 2x mit ddH₂O bei 0,6 kbar gespült.
- Anschließend wird das System mit 1x mit Lysispuffer equilibriert, wobei ein Rest im Ladebehälter verbleibt.
- Die Zellresuspension wird bei 2,7 kbar aufgeschlossen, wobei der Durchfluss mit den aufgeschlossenen Zellen aufgefangen wird. Dieser Vorgang wird 2x wiederholt.
- Danach wird das System 3x mit ddH₂O und 1x mit 0,1 M NaOH gespült.

2.2.5.4 Isolierung von Membranen durch differentielle Zentrifugation

Die differentielle Zentrifugation ist ein Trennverfahren, durch das zelluläre Bestandteile aufgrund mehrerer serieller Zentrifugationen bei immer höheren Geschwindigkeiten aufgetrennt werden. Dabei macht man sich zunutze, dass durch Zentrifugation Zellkomponenten auf der Basis ihrer Größe und Dichte aufgetrennt werden. Große und dichte Komponenten wandern dabei am schnellsten. Sie setzen sich demnach schon bei verhältnismäßig niedrigen Geschwindigkeiten ab und bilden ein Pellet. Jeder Zentrifugationsschritt wird in der SDS-PAGE und im Western Blot kontrolliert. Dabei ist zu berücksichtigen, dass pelletiertes Material vor der SDS-PAGE-Probenaufbereitung in seinem Ursprungsvolumen resuspendiert wird. Nur so ist ein Vergleich stöchiometrisch korrekter Mengen gewährleistet.

- Die Zellresuspension aus Kapitel 2.2.5.3.2 wird bei 12500 Upm (Beckman Avanti J-25; JA 25.50) für 45 min zentrifugiert. Dadurch werden größere Zelldebris und gegebenenfalls *inclusion bodies* pelletiert.
- Die im Überstand enthaltenen löslichen Proteine werden von den Membranen durch eine Hochgeschwindigkeitszentrifugation (in der AG Schmitt (Biochemie I; HHU)) bei 41.500 Upm (Beckman Ultrazentrifuge Optima™ L-90K; Type 45 Ti) für 60 min getrennt.
- Die pelletierten Membranen werden in Solubilisierungspuffer ± 200 mM NaCl ohne Detergenz gelöst und auf eine Konzentration von 5 mg ml⁻¹ eingestellt. Die

2 Material und Methoden

Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt hierbei nur näherungsweise mittels Nanondrop bei einer Absorption von 280 nm (1 Abs = 1 mg ml⁻¹).

2.2.5.5 Solubilisierung von Membranproteinen durch Detergenzien

2.2.5.5.1 Identifizierung geeigneter Detergenzien

Das heterologe Membranprotein C-Pmp21 befindet sich in den isolierten *E. coli*-Membranen. Um die integralen Membranproteine zu solubilisieren, wurde ein Test mit 12 verschiedenen Detergenzien bei verschiedenen Temperaturen und Salzkonzentrationen durchgeführt um ihre Fähigkeit zur Solubilisierung der Proteine zu untersuchen. SDS fungierte als Positiv-Kontrolle. Die verwendeten Detergenzien, sowie deren Stock-Konzentration und Endkonzentration, sind in Tabelle 2.14 dargestellt.

Tabelle 2.14: Verwendete Detergenzien, sowie deren Stock- und Endkonzentration.

Detergenz	Stock-Konzentration %[w/v]	Endkonzentration % [w/v]
DM	10	1
DDM	10	1
LDAO	10	1
FC-16	10	1
MEGA 10	10	1
Fos Mea 12	10	1
NP-40	10	1
OG	20	2
NG	20	2
Cymal-5	20	2
Triton X-100	20	2
SDS	20	2

- Je 180 µl der 5 mg ml⁻¹ Membranlösung werden in zwölf 1,5ml Reaktionsgefäße überführt.
- 20 µl eines der oben aufgeführten Detergenzien werden dazu gegeben.
- Die Ansätze werden für 1 h bei 8°C, 18°C und 30°C unter Schütteln inkubiert.
- Anschließend werden 150 µl abgenommen und bei 50.000 Upm (Ultrazentrifuge Optima XL-A; MLS50) (in der AG Schmitt (Biochemie I; HHU)) für 60 min zentrifugiert.
- Vom erhaltenen Überstand werden 130 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2 Material und Methoden

- 3 µl jedes Überstandes werden auf eine Nitrocellulose-Membran getropft (Dot Blot). Die Membran wird ü/N getrocknet.
- Die Detektion der Proteine erfolgt durch Chemilumineszenz über den N-terminalen His-Tag durch Anti-His-HRP Antikörper mit dem Syngene Chemie Genius² (in der AG Schmitt (Biochemie I; HHU)). Dadurch wurden die beiden am besten solubilisierenden Detergenzien identifiziert.

2.2.5.5.2 Identifizierung der besten Membrankonzentration für die Solubilisierung

Im Folgenden wird die für die Proteinisolation am besten geeignete Membrankonzentration ermittelt.

- Die zuvor isolierten Membranen werden auf Konzentrationen von 5 mg ml⁻¹ - 2 mg ml⁻¹ verdünnt.
- Die am besten solubilisierenden Bedingungen werden entsprechend Kapitel 2.2.5.5.1 wiederholt.
- Das Membranpellet wird in 200 µl MilliQ H₂O gelöst und von dem erhaltenen Überstand bzw. Pellet werden jeweils 32,5 µl als Probe in der SDS-PAGE und im Western Blot analysiert.

2.2.5.6 Affinitätschromatographische Aufreinigung von heterolog exprimierten Proteinen

2.2.5.6.1 Säulenbasierte Rückfaltung (*On Column Refolding*; OCR) von löslichen Proteinen

- Eine 5 ml „HiTrap-Chelating“ Nickel-NTA-Säule (Ni-NTA-Säule) wird in den ÄKTAprime plus eingespannt.
- Das System wird mit 10 ml Puffer A1 gespült, wodurch es gleichzeitig zu einer Equilibrierung der Ni-NTA-Säule mit dem Puffer A1 kommt.
- Nach der Equilibrierung erfolgt die Beladung der Ni-NTA-Säule über das Ventil 8 mit dem Lysat aus der Ultrazentrifugation. Hierbei bindet das His-Tag der heterologen Proteine an das Nickel in der Ni-NTA-Säule. Proteine ohne His-Tag werden eluiert.
- Nach Erreichen der maximalen Absorption bei 280 nm werden regelmäßig Proben für die SDS-PAGE genommen, um festzustellen, ob die His-getagten Proteine an das Nickel binden.

2 Material und Methoden

- Nach der Beladung der Ni-NTA-Säule mit dem Lysat wird die Säule mit Puffer A1 gespült, bis die Absorption bei 280 nm eine stabile Nulllinie darstellt.
- In der folgenden Tabelle 2.15 ist das Programm zum anschließenden OCR im Detail aufgeführt.

Tabelle 2.15: Programm zum OCR von löslichen Proteinen.

Säulenbasierte Rückfaltung (<i>On column refolding</i> ; OCR)							
basic parameters:	sample volume (S):	0 ml					
	max. pressure:	0.5 Mpa					
	column:	5 ml HiTrap Chelating					
	Vol. [ml]	Conc. %B	Flow [ml min ⁻¹]	Fraction [ml]	Buffer valve	Inject valve	special hints
Priming B	0	100	40	0	3	waste	
Equilibration	25	100	40	0	3	waste	
Priming A3	25.1	0	40	0	3	waste	
Priming A1	50	0	40	0	1	waste	
Equilibration	85	0	1	0	1	load	
Autozero	95						
Sample application	95	0	1	0	1	inject	
Buffer wash 1	95+S	0	1	0	1	load	
Priming A2	115+S	0	40	0	2	waste	
Buffer wash 2	150+S	0	1	0	2	load	
Refolding	160+S	0	0.5	0	2	load	
End refolding	190+S	100	0.5	0	2	load	
Priming A3	200+S	100	40	0	3	waste	
Buffer wash 3	200.1+S	0	40	0	3	waste	
Priming B	205+S	0	40	0	3	waste	
Buffer wash B	205.1+S	100	40	0	3	waste	
Elution	220+S	100	1	1	3	load	
Re-equilibration	240+S	0	1	1	3	load	
End method	257+S						

- Während der Elution werden 1 ml Fraktionen gesammelt und direkt im Anschluss mittels Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*; SEC) analysiert.

2.2.5.6.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung (*Affinity purification*) von heterolog exprimierten denaturierten löslichen Proteinen

- Eine 5 ml „HiTrap-Chelating“ Nickel-NTA-Säule (Ni-NTA) wird in den ÄKTaprime plus eingespannt.

2 Material und Methoden

- Das System wird mit 10 ml Puffer A1 gespült, wodurch es gleichzeitig zu einer Equilibrierung der Ni-NTA-Säule mit dem Puffer A1 kommt.
- Nach der Equilibrierung erfolgt die Beladung der Ni-NTA-Säule über das Ventil 8 mit dem Lysat aus der Ultrazentrifugation. Hierbei bindet das His-Tag der heterologen Proteine an das elementare Nickel in der Ni-NTA-Säule. Proteine ohne His-Tag werden eluiert.
- Nach Erreichen der maximalen Absorption bei 280 nm werden regelmäßig Proben für die SDS-PAGE genommen, um festzustellen, ob die His-getagten Proteine an das elementare Nickel binden.
- Nach der Beladung der Ni-NTA-Säule mit dem Lysat wird die Säule mit Puffer A1 gespült, bis die Absorption bei 280 nm eine stabile Nulllinie darstellt.
- In der folgenden Tabelle 2.16 ist das Programm zum anschließenden OCR im Detail aufgeführt.

Tabelle 2.16: Programm zur denaturierten Aufreinigung von löslichen Proteinen.

Affinitätschromatographische Aufreinigung (<i>Affinity purification</i>)							
basic parameters:	sample volume (S):	0 ml					
	max. pressure:	0.5 Mpa					
	column:	5 ml HiTrap Chelating					
	Vol. [ml]	Conc. %B	Flow [ml min ⁻¹]	Fraction [ml]	Buffer valve	Inject valve	special hints
Priming A1	0	0	40	0	1	waste	
Equilibration	35	0	1	0	1	load	
Autozero	45						
Sample application	45	0	1	1	1	inject	
Wash (incl. frac.)	45+S	0	1	1	1	load	
Wash (excl. frac.)	52+S	0	1	0	1	load	
End wash	65+S	0	1	0	1	load	
Priming B	65+0.1+S	100	40	0	1	waste	
Elution	100+S	100	1	1	1	load	
End elution	110+S	100	1	0	1	load	
Priming A1	110+0.1+S	0	40	0	1	waste	
Re-equilibration	125+S	0	1	0	1	load	
End method	130+S						

- Während der Elution werden 1 ml Fraktionen gesammelt und für die Rückfaltung per Dialyse verwendet.

2 Material und Methoden

2.2.5.6.3 Immobilisierte Metall-Ionen-Affinitätschromatographie (IMAC) von heterolog exprimierten Membranproteinen

- Eine 5 ml „HiTrap-Chelating“ Nickel-NTA-Säule (Ni-NTA) wird in den ÄKTaprime plus eingespannt.
- Das System wird mit 10 ml Solubilisierungspuffer +Detergenz gespült, wodurch es gleichzeitig zu einer Equilibrierung der Ni-NTA-Säule kommt.
- In der folgenden Tabelle 2.17 ist das Programm im Detail aufgeführt.

Tabelle 2.17: Programm zur Affinitätschromatographischen Aufreinigung von Membranproteinen.

Stepwise Affinity purification (15 % Buffer B +100% Buffer B Elution) with collecting wash fractions							
basic parameters:	sample volume:	24 ml					
	max. pressure:	0.5 Mpa					
	column:	5 ml HiTrap Chelating					
	Vol. [ml]	Conc. %B	Flow [ml min ⁻¹]	Fraction [ml]	Buffer valve	Inject valve	special hints
Priming A1	0	0	40	0	1	waste	
Equilibration	25	0	2	0	1	load	
Sample application	35	0	2	1	8	load	IMPORTANT, order: "autozero"
Wash	59	0	2	1	1	load	
End wash	99	0	2	1	1	load	
Priming B 15 %	99.1	15	40	0	1	waste	
15 % Elution	124	15	2	1	1	load	
End 15 % Elution	199	15	2	1	1	load	
Priming B 100%	199.1	100	40	0	1	waste	
100 % Elution	224	100	2	1	1	load	
End elution	264	100	2	1	1	load	
Priming A1			40	0	1	waste	
Re-equilibration			1	0	1	load	
End method			1	0	1	load	

- Anschließend werden alle Elutionsfraktionen in der SDS-PAGE analysiert.
- Alle Elutionsfraktionen mit rekombinantem Protein werden gepoolt und mit einem Zentrifugalkonzentrator (Vivaspin 2, Sartorius) für die SEC aufkonzentriert.

2.2.5.7 Größenausschlusschromatographie (SEC) von heterolog exprimierten Proteinen

Die Trennung während der SEC erfolgt über eine Chromatographiesäule, die mit einer porösen stationären Phase gepackt ist und von einer wässrigen mobilen Phase (Laufpuffer) durchströmt wird. Als Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Trennung darf der Analyt (rekombinantes Protein) nicht mit der Oberfläche der stationären Phase interagieren. Die Trennung selbst erfolgt durch das Eindringen des Analyten in die Poren des Säulenmaterials und die dadurch bedingte Elutionsverzögerung in Relation zur Flussgeschwindigkeit der mobilen Phase. Aufgrund ihrer geringeren Größe können kleinere Analyten einfacher in die Poren des Säulenmaterials eindringen und ihre Elution wird somit stärker verzögert als die größerer Moleküle. Hierbei ist zu beachten, dass die Retentionszeit bis auf Ausnahmen nicht auf Basis der absoluten Molekülmasse erfolgt. Dadurch, dass sich Proteine in ihrer Form unterscheiden (z.B. globulär, stabförmig oder flexible Ketten ausbilden) entspricht ihr hydrodynamischer Radius nicht exakt ihrem Molekulargewicht. Die Schwierigkeit der Molekulargewichtsbestimmung anhand von Kalibriergeraden wurde von mehreren Stellen berichtet (317-319). Daher kann bei Analyten mit unbekanntem hydrodynamischem Radius nicht das absolute, sondern nur das apparente Molekulargewicht bestimmt werden.

2.2.5.7.1 Präparative Größenausschlusschromatographie (SEC) von heterolog exprimierten löslichen Proteinen

- Eine 120 ml HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade (pg) Säule wird bei einer Flussrate von 0,5 ml/min in den ÄKTAprime plus eingespannt.
- Jeweils zwei Elutionsfraktionen des OCR werden gepoolt.
- Die Proteinkonzentration wird mittels Bradford bestimmt.
- Anschließend erfolgt die Analyse mittels SEC. In der folgenden Tabelle 2.18 ist das Programm im Detail aufgeführt.

2 Material und Methoden

Tabelle 2.18: Programm zur präparativen SEC von rekombinanten löslichen Proteinen.

Preparative SEC (wash column before and after run; to wash EtOH from column, "wash column 1" Flow have to be reduced to 0.2)							
basic parameters:	sample volume: 2 ml						
	max. pressure: 0.5 Mpa						
	Column:	(120 ml HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade)					
	Vol. [ml]	Conc. %B	Flow [ml min ⁻¹]	Fraction [ml]	Buffer valve	Inject valve	special hints
Wash A1	0	0	50	0	1	waste	
Wash column 1	25	0	1	0	1	load	
Sample application	205	0	0.5	0	1	inject	IMPORTANT, order: "autozero"
Elution	210	0	0.5	1.2	1	load	
Wash loop	321.6	0	0.5	0	1	inject	
Wash column 2	325.6	100	1	0	2	load	
Wash fraction tube	505.6	100	0.5	2	2	load	
End method	507.6	100	0.5	0	2	load	

- Die Elutionsfraktionen werden nicht aufkonzentriert für Folgeexperimente verwendet.

2.2.5.7.2 Semipräparative Größenausschlusschromatographie (*semipreparative size exclusion chromatography*; semipräparative SEC) von heterolog exprimierten Membranproteinen und zur Analyse löslicher Proteine

- Eine 25 ml Superdex 200 HR 10/300 FPLC Säule wird bei einer Flussrate von 0,3 ml min⁻¹ in den ÄKTAprime plus eingespannt.
- Die aufkonzentrierten Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie werden 10 min bei 10.000 xg zentrifugiert (Heraeus, Biofuge Primo R).
- Die Proteinkonzentration wird mittels Bradford bestimmt.
- Anschließend erfolgt die Analyse mittels semipräparativer SEC. In der folgenden Tabelle 2.18 ist das Programm im Detail aufgeführt.

2 Material und Methoden

Tabelle 2.19: Programm zur semipräparativen SEC von rekombinanten Membran- und löslichen Proteinen.

Semipreparative SEC (wash column before and after run; to wash EtOH from column, "wash column 1" Flow have to be reduced on 0.2)							
basic parameters:	sample volume:	0.5 ml					
	max. pressure:	1 Mpa					
	Column:	1 Mpa (25 ml Superdex 200 HR 10/300 FPLC)					
	Vol. [ml]	Conc. %B	Flow [ml min ⁻¹]	Fraction [ml]	Buffer valve	Inject valve	special hints
Wash A1	0	0	50	0	1	waste	
Wash column 1	25	0	0.4	0	1	load	
Sample application	62.5	0	0.3	0	1	inject	IMPORTANT, order: "autozero"
Elution	63	0	0.3	0.3	1	load	
Wash loop	87.5	0	0.3	0	1	inject	
Wash column 2	88.5	100	50	0	1	waste	
Wash fraction tube	113.5	100	0.4	0	1	load	
End method	151	100	0.3	0.3	1	load	

- Die Elutionsfraktionen werden entsprechend der weiteren Verwendung weiter in einem Zentrifugalkonzentrator (Vivaspin 500, Sartorius) aufkonzentriert oder direkt für Folgeexperimente verwendet.

2.2.5.7.3 Analytische Größenausschlusschromatographie (analytische SEC) gekoppelt mit *Multi Angle Light Scattering* (MALS) zur Massenbestimmung von heterolog exprimierten löslichen Proteinen

Die Masse von löslichen heterolog exprimierten Proteinen wurde mittels SEC und anschließender MALS in der AG Schmitt (Biochemie I; HHU) bestimmt. Die analytische SEC wurde mit einer HiLoad 10/300 Superdex 200 GL Säule (GE Healthcare) in einem *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)- System (Agilent) durchgeführt. Die Säule wurde vor dem Probenlauf an einen drei Winkel Lichtstreuungsdetektor (miniDAWN TREOS, Wyatt Technology) gefolgt von einem differentiellen refraktorischen Index Detektor (PTILab T-rEX, Wyatt Technology) angeschlossen und mit PBS bei einer Flußrate von 0,3 ml min⁻¹ äquilibriert. Typischerweise wurden 500 µl einer Proteinlösung mit einer Konzentration von mindestens 0,5 mg ml⁻¹ auf die analytische SEC-Säule geladen. Die Daten wurden mit dem ASTRA Softwarepaket (Wyatt Technology) ausgewertet.

2 Material und Methoden

2.2.5.8 Dialyse von rekombinanten Proteinen

Um denaturiert eluiertes Protein zu renaturieren, oder um eine Umpufferung in PBS durchzuführen, werden die Elutionsfraktion gegen PBS \pm 200 mM Arginin bei 4°C dialysiert. Die Argininkonzentration von 200 mM wurde von M.Sc. Philipp Hanisch in der AG Hegemann als geeignetste für die Renaturierung von Pmp-Proteinen identifiziert (Daten nicht gezeigt).

- Ein 5 cm langer Abschnitt eines Dialyseschlauchs (12 - 15 kDa Ausschluss) wird 20 min in ddH₂O bei 100°C gekocht und anschließend auf Eis abgekühlt.
- Das rekombinante Protein wird mit einer sterilen Pipette in einen mit einer Klammer an einem Ende verschlossenen Dialyseschlauch pipettiert.
- Die Dialyse erfolgt unter leichtem Rühren für 36 h gegen 2 l kaltes PBS bei 4°C. Das PBS \pm 200 mM Arginin wird jeweils nach 12 h erneuert.
- Die dialysierten Proteine werden danach in Reaktionsgefäße überführt und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

2.2.5.9 Proteinmengenbestimmung mittels Bradford-Reagenz

Die Proteinmengenbestimmung nach Bradford basiert auf einer spezifischen Farbreaktion, bei der Coomassie Brilliantblau G250 verwendet wird. Die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe erfolgt nach Herstellerangaben. Die Proteinkonzentration im Rohextrakt wird anhand der Adsorptionswerte einer erstellten Standardkurve bekannten Proteingehaltes (0 μ g - 10 μ g, in 2 μ g Schritten) mit Rinderserumalbumin (BSA) ermittelt. Es werden 790 μ l ddH₂O mit 200 μ l Bradford-Reagenz und 10 μ l Proteinlösung gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Die Absorption wird bei 595 nm mit dem BioPhotometer plus (Eppendorf) bestimmt. Für die Proteinkonzentration in der Probe gilt:

$$\text{Proteinkonz. } [\mu\text{g/ml}] = \frac{\text{Abs. } 595 \times 1000}{0,06 \times x \mu\text{l}}$$

2.2.5.10 SDS-PAGE

2.2.5.10.1 Entfernung von Guanidin zur Analyse der Proben mittels SDS-PAGE

Da die hohe ionische Stärke von Guanidin zur Präzipitation von SDS führt, wird Guanidin vor der SDS-PAGE mittels Trichloressigsäure (TCA)-Fällung entfernt.

2 Material und Methoden

- 130 µl des Lysats der denaturierten Proteine oder des aufgefangenen Durchfluss werden mit 14 µl 100% TCA 15 min auf Eis inkubiert.
- Die Proben werden 5 min bei 13000 Upm (Heraeus Zentrifuge Pico 17) zentrifugiert.
- Dann wird das Pellet 2 Mal mit 500 µl eiskaltem Aceton gewaschen und ca. 15 min im Vakuum-Konzentrator bei mittlerer Temperatur getrocknet.
- Anschließend wird das Pellet in 130 µl 1x PBS-Puffer gelöst.
- Von der entstandenen Suspension werden 32,5 µl für die SDS-PAGE-Probenvorbereitung verwendet.
- Die Analyse der Proben erfolgt zusammen mit den Elutionsfraktionen des OCR in einer SDS-PAGE mit folgendem Western Blot und Immundetektion.

2.2.5.10.2 **Aufbereitung von Proben für die SDS-PAGE**

Proteinextrakte aus *E. coli* Kulturen:

- Eine OD₆₀₀ von 1 wird 1 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge Pico) pelletiert, in 32,5 µl ddH₂O resuspendiert und mit 12,5 µl Protein-Ladepuffer (8 - 32% SDS) und 5 µl DTT [1 M] versetzt.
- Die Probe wird 20 min bei 100 °C denaturiert und anschließend für 5 s bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge Pico) abzentrifugiert, um Kondenswassertropfen am Deckel zurück in die Proben zu bringen.
- 10 µl der aufbereiteten Probe werden in der SDS-PAGE geladen.

Lösliche Proteinproben:

- 32,5 µl einer Proteinprobe werden mit 12,5 µl Protein-Ladepuffer (8 - 32% SDS) und 5 µl DTT [1 M] versetzt.
- Die Probe wird 20 min bei 100 °C denaturiert und anschließend für 5 s bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge Pico) abzentrifugiert, um Kondenswassertropfen am Deckel zurück in die Proben zu bringen.
- 10 µl der aufbereiteten Probe werden in der SDS-PAGE geladen.

2.2.5.10.3 **Herstellung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE**

Die Komponenten des Trenngels werden vermischt und als letztes TEMED hinzugefügt.

2 Material und Methoden

- Die Lösung wird zügig, luftblasenfrei zwischen die 7 x 9 cm große Glas- und Aluminiumplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet.
- Nach dem Auspolymerisieren des Gels wird das Isopropanol abgegossen und die Gelfront wiederholt mit ddH₂O gespült.
- Die Komponenten des Sammelgels werden vermischt und luftblasenfrei auf das Trenngel gegossen. Zuletzt wird ein Kamm eingesteckt, der die Probentaschen formt.

Tabelle 2.20: Komponenten für Trenn- und Sammelgel.

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

2.2.5.10.4 SDS-Gelelektrophorese

Das auspolymerisierte Gel wird in die Elektrophoresekammer (Hoefer SE 260) eingespannt und die Kammern mit Laufpuffer gefüllt. Maximal 25 µl Probe/Ladetasche werden aufgetragen. Als Größenstandard werden 5 µl PageRuler™ Prestained Protein Ladder aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt bei einer maximalen Stromspannung von 200 V (etwa 20 mA) für ca. 75 min.

2.2.5.10.5 Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie-Brilliant-Blau

Das SDS-Gel wird in ddH₂O überführt und 30 s bei 600 W in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wird es für 10 min auf dem Schüttler gewaschen. Das ddH₂O wird durch die Färbelösung ersetzt und ebenfalls für 30 s bei 600 W erhitzt. Die Färbung erfolgt bei 40 Upm und RT bis deutliche Proteinbanden sichtbar sind. Die Coomassie-Lösung wird abgenommen und das Gel in ddH₂O gewaschen.

2 Material und Methoden

2.2.5.11 Western Blot und Immundetektion

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

2.2.5.11.1 Proteintransfer auf eine PVDF-Membran

- Zwei Whatman-Paper und eine PVDF-Membran werden in der Größe des zu blottenden Gels vorbereitet.
- Die Filterpapiere werden in Transferpuffer inkubiert, die PVDF-Membran in Methanol aktiviert.
- Der Blot wird in der Reihenfolge: Whatman-Paper, PVDF-Membran, SDS-Gel, Whatman-Paper, auf die Metallplatte des Fast-Blotter gestapelt und verschlossen. Dabei ist auf Luftblasenfreiheit zu achten.
- Der Proteintransfer erfolgt bei 25 V 1 A für 25 min.
- Im Anschluss wird die PVDF-Membran für 10 min bei RT oder ü/N bei 4°C in Blockierlösung inkubiert.

2.2.5.11.2 Immundetektion von Proteinen

Um spezifische Proteine auf einer PVDF-Membran zu detektieren werden Antikörper eingesetzt. Der primäre Antikörper richtet sich spezifisch gegen ein Protein oder einen Tag des Proteins. Der sekundäre Antikörper verstärkt das Signal und ist mit alkalischer Phosphatase (AP) oder Meerrettichperoxidase (*Horseradish peroxidase*; HRP) konjugiert, welche die Farbentwicklung bzw. die Fluoreszenz katalysiert.

- Die PVDF-Membran wird mit in Blockierlösung verdünntem primärem Antikörper für 1 h bei RT oder ü/N bei 4°C schüttelnd inkubiert.
- Die Membran wird 3 x 10 min mit PBS schüttelnd gewaschen.
- Im Anschluss folgt die Inkubation mit in Blockierlösung verdünntem sekundärem Antikörper für 1 h bei RT oder ü/N bei 4°C schüttelnd.
- Die Membran wird 3 x 10 min mit PBS schüttelnd gewaschen.
- Für die Farbentwicklung mit AP-konjugierten Antikörpern wird die Membran in 20 ml Farbsubstrat-Lösung (20 ml Detektionspuffer + 33 µl BCIP-Lösung [0,5 g BCIP in 10 ml

2 Material und Methoden

DMF] +33 μ l NBT-Lösung [0,5 g NBT in 10 ml 70 %igem DMF]) inkubiert, bis die gewünschte Bandenintensität erreicht ist.

- Die Farbreaktion wird durch waschen mit ddH₂O gestoppt.
- HRP-konjugierte Antikörper werden mit „Pierce™ ECL Western Blotting Substrate“ nach Angaben des Herstellers inkubiert und direkt mittels Geldokumentationssystem (Chemie Genius², Syngene) analysiert. Die Detektion erfolgt so lange, bis die Banden gut sichtbar sind.

2.2.5.12 Proteinbeschichtung von Latexkugeln und Überprüfung der Beschichtungsqualität

Die Analyse des Adhäsionsverhaltens von Proteinen wird mit beschichteten Latexkugeln analysiert. Verwendet wurden grün fluoreszierende 1 μ m carboxylierte Latexkugeln. Die Beschichtung mit Proteinen erfolgt durch Absorption (320).

2.2.5.12.1 Proteinbeschichtung von Latexkugeln

- $1 \cdot 10^9$ Latexkugeln werden zu 1 ml PBS pipettiert und 5 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge Pico) pelletiert.
- Anschließend werden die Latexkugeln 2 Mal mit PBS gewaschen.
- Das Pellet wird in 1 ml Kopplungspuffer resuspendiert und erneut 5 min bei 13.000 Upm pelletiert.
- Die Latexkugeln werden in 100 μ l Kopplungspuffer resuspendiert.
- Eine definierte Proteinkonzentration wird zu den Latexkugeln gegeben, so dass 200 μ l Totalvolumen nicht überschritten werden.
- Es folgt eine Inkubation von 1 h bei 37°C.
- Es werden 500 μ l Kopplungspuffer zugegeben und für 3 min im Ultraschallbad sonifiziert.
- Zu der Suspension werden 500 μ l BSA (40 mg ml⁻¹ in Kopplungspuffer) gegeben, gemischt und erneut für 1 h bei 37°C inkubiert.
- Die Latexkugeln werden anschließend wieder bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge Pico) pelletiert.

2 Material und Methoden

- Die proteinbeschichteten Latexkugeln werden einmal mit 1 ml BSA (1 mg ml^{-1}) in PBS gewaschen und danach in 1 ml BSA ($0,2 \text{ mg ml}^{-1}$) in PBS bei 4°C für maximal 1 Woche gelagert.

2.2.5.12.2 Überprüfung der Beschichtungsqualität

Zur Bestimmung der Beschichtungsqualität wird ein Aliquot der beschichteten Latexkugeln mittels Western Blot analysiert.

- $1 \cdot 10^8$ proteinbeschichtete Latexkugeln werden 5 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge pico) pelletiert, in $32,5 \mu\text{l}$ ddH₂O resuspendiert und mit $12,5 \mu\text{l}$ Protein-Ladepuffer (8% SDS) und $5 \mu\text{l}$ DTT [1 M] für 20 min bei 100°C erhitzt.
- Es werden $25 \mu\text{l}$ ($5 \cdot 10^7$ Latexkugeln) mittels Western Blot analysiert.

2.2.5.13 Kristallisationsexperimente mit rekombinanten Membranproteinen

Die Proteinkristallisation erfolgte im sogenannten *Sitting drop*-Verfahren in der Crystal and X-Ray Facility der Heinrich-Heine-Universität. Die Auswahl der für Membranproteinkristallisation geeigneten Puffer und Einarbeitung in die Analyse der Proben erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Astrid Höppner. Bei der Proteinkristallisation wird die Proteinlösung am Rand eines Reservoirs mit Puffer positioniert. Zusätzlich wird die Proteinlösung 1:1 mit dem Puffer verdünnt. Der Puffer entzieht der Proteinlösung die Flüssigkeit. Daraufhin kommt es im Folgenden zu einer Kristallisation der Proteine oder zu einer Präzipitatbildung. In Abbildung 2.1 ist der schematische Aufbau einer *Sitting drop*-Platte dargestellt.

- Mit Hilfe des Pipettierroboters (NT8, Formulatrix) werden 100 nl Tropfen der rekombinanten Membranproteine auf verschiedene *Sitting drop*-Platten (MbClass I, MbClass II (Qiagen); MemGold I, MemGold II, MemPlus, MemSys (Molecular Dimensions)) mit insgesamt 480 Pufferkombinationen gesetzt.
- Anschließend erfolgt die Inkubation bei 20°C (Rock Imager, Formulatrix) für mindestens 30 Tage.
- Im Verlauf der 30 Tage wird die Veränderung des Tropfens mittels Fotografie dokumentiert.

2 Material und Methoden

- A β_{42} wird 48 h vor dem ThT-Assay aufgetaut und bei 37°C die Möglichkeit zur vollständigen Aggregation gelassen.
- Die Proteine werden in eine Schwarze 96-Well Platten für die Immunologie (Nunc) gegeben.
- Alle ThT-Assays werden mit einer finalen Konzentration von 10 μ M ThT, welches ursprünglich in H₂O gelöst und durch eine 0,2 μ M Sterilfilter filtriert wird durchgeführt.
- Das finale Volumen der Reaktionen betrug 100 μ l.
- Die Fluoreszenz wird bei 442 nm angeregt und die Emission bei 484 nm in einem Infinite 200 pro-Plattenlesegerät (Tecan) gemessen.
- Die Blendeweite beträgt 10nm.
- Die Fluoreszenz wird über 22 h aufgezeichnet.

2.2.5.14.2 Kongo-Rot (CR) Absorption von rekombinanten Proteinen

Kongorot (CR) ist ein Azofarbstoff und bindet spezifisch amyloide Proteine (323) Die Bindung hängt von der Sekundär- und Tertiärstruktur dieser Proteine ab. Die planare längliche Form von CR ist gut geeignet, um mit seiner Längsachse die Längsachse der β -sheet-reichen Amyloide zu binden (324). CR bindet keine Proteine ohne oder mit nur einem geringen Anteil β -sheets (325). Um die Proteine näher charakterisieren zu können, werden CR-Absorptionsmessungen in Form eines sogenannten *Spectral Shift Assays* (in Zusammenarbeit mit Dr. Luitgard Nagel-Steger in der AG Willbold (Biophysik; HHU)) durchgeführt (326,327). Hierbei wird im Fall von Proteinen mit amyloiden Eigenschaften, die Absorption gesteigert und in den länger welligen Bereich, mit einem Maximum bei 541 nm verschoben.

- Einige mg CR-Pulver werden in Ethanol gelöst.
- Anschließend wird der Farbstoff mit H₂O so verdünnt, dass nach der finalen 1:10 Verdünnung während des Assays die Absorption zwischen 0,5 und 0,6 liegt.
- Die Konzentration der zu testenden Proteine wird auf 10 μ M eingestellt.
- Zu Beginn wird die Basislinie von CR zwischen 400 – 700 nm bestimmt. Dazu wird 10 μ l CR zu 90 μ l PBS in einer Quarzglas-Präzisionsküvette (Hellma) gemessen.
- Die Positivkontrolle A β_{42} wird entsprechend Kapitel 2.2.5.14.1 vorbereitet.
- Anschließend werden 90 μ l der rekombinanten Proteine mit 10 μ l CR gemischt und in der Quarzglas-Präzisionsküvette gemessen.

2 Material und Methoden

- Die Auswertung erfolgt dahingehend, ob eine Erhöhung der Absorption (Hyperchromer Effekt) und/oder eine Verschiebung des Maximums (bathochromer Effekt) in Richtung 541 nm beobachtet werden kann.

2.2.6 Zellbiologische Experimente

2.2.6.1 Adhäsionstest von proteinbeschichteten Latexkügelchen an eukaryotischen Zellen

- In einer 24 Well-Platte werden $1 \cdot 10^6$ HEp-2 Zellen pro Well ausgesät.
- Nach 24 - 48 h wird der konfluente Zellrasen mit HBSS gewaschen.
- $1 \cdot 10^7$ proteinbeschichtete, grün fluoreszierende Latexkügelchen werden in Zellkulturmedium aufgenommen und auf die HBSS-gewaschenen HEp-2-Zellen gegeben.
- Durch sorgfältiges Schwenken wird eine homogen Verteilung erreicht
- Zentrifugation zur Sedimentation der Latexkügelchen für 5 min bei 700 Upm (Rotanta 460R).
- Inkubation für 1 h bei 37°C und 6% CO₂ im Brutschrank zur Adhäsion.
- Nicht gebundene Latexkügelchen werden anschließend durch Waschen mit HBSS entfernt.
- Die Humanzellen mit adhärenierten Latexkügelchen werden mit 150 µl Zell-Dissoziations-Lösung (*Cell Dissociation Solution*) 10 min bei 37°C inkubiert und dadurch vom Well abgelöst.
- Anschließend werden die gelösten Zellen in FACS-Röhrchen überführt und mit 150 µl 3%igem PFA zur Fixierung überschichtet.
- Die quantitative Analyse erfolgt durch Bestimmung der Anzahl HEp-2-Zellen mit grün-fluoreszierender Latexkügelchen im FACS Aria.

2.2.6.2 Rezeptor-pulldown Experimente mit rekombinanten Proteinen

Für Interaktionsanalysen werden rekombinante Proteine mit adhärenierten HEp-2-Zellen inkubiert und gebundenes Protein auf der Oberfläche der Zellen mit dem membranunlöslichen und spaltbaren Crosslinker DTSSP vernetzt. Anschließend wird mittels Phospho-Lysis-Puffer und Sonifikation ein Zelllysat generiert, welches in einem Pulldown-Experiment eingesetzt wird.

2 Material und Methoden

- Zwei konfluente 25 cm² Flaschen mit HEp-2-Zellen werden mit je 4 ml rekombinantem Protein (100 µg ml⁻¹) pro Flasche für 1 h bei 37 °C inkubiert.
- Die Lösung wird abgenommen und die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen.
- Es folgt eine Inkubation mit je 4 ml 2 mM DTSSP in PBS pro Flasche für 30 min bei RT.
- Der Crosslinker wird abgenommen und die Zellen werden anschließend zweimal mit je 4 ml 50 mM Tris pH 7,5 pro Flasche gewaschen.
- Die Zellen werden in je 4 ml 50 mM Tris pH 7,5 pro Flasche mit einem Zellschaber abgelöst und die Zellsuspension beider Flaschen in einem 50 ml Falcon vereinigt.
- Die Zellsuspension wird für 10 min bei 2800 Upm und 4 °C sedimentiert und das Pellet in 500 µl Phospho-Lysis-Puffer mit Proteaseinhibitor (1:100 Verdünnung) resuspendiert und für 10 s mit dem Ultraschallstab (10 % Leistung) auf Eis sonifiziert.
- Das Lyse erfolgt für 30 min auf Eis.
- 50 µl Protein-G-Agarose werden zweimal mit 1 ml PBS gewaschen.
- Das Zelllysat wird mit 2 µg Antikörper für 1 h bei 4 °C am Rad vorinkubiert und anschließend wird die gewaschene Protein-G-Agarose hinzugefügt.
- Nach einer Inkubation über Nacht bei 4 °C am Rad, wird das Lysat/Agarose Gemisch in eine Mini-Zentrifugationssäule pipettiert und dreimal mit 500 µl PBS gewaschen.
- Der Antikörper-Antigen Komplex wird zweimal mit 50 µl Glycin pH 2,5 für 5 min eluieren und die beiden Elutionsfraktionen werden vereinigt.
- Das Eluat wird mit 10 µl 1 M Tris pH 9 zur Neutralisation, sowie 38,75 µl Protein-Ladepuffer und 15,5 µl 1 M DTT gemischt, für 10 min gekochen und im Westernblot untersucht.

2.2.6.3 Inhibierung der Infektion mit löslichem rekombinantem Protein

- In einer 24 Well-Platte mit Deckgläschen werden 1*10⁶ HEp-2 Zellen pro Well ausgesät.
- Nach 24 – 48 h wird der konfluente Zellrasen mit HBSS gewaschen.
- 100 µg ml⁻¹ des rekombinanten Proteins, 1,25 µg ml⁻¹ Heparin und 100 µg/ml BSA in 250 µl Zellkulturmedium werden separat auf die HEp-2 Zellen gegeben.
- Inkubation für 1 h bei 37°C und 6% CO².

2 Material und Methoden

- Gradientengereinigte Chlamydien (*C. pneumoniae*) werden schonend aufgetaut, gevortext und kurz im Wasserbad sonifiziert.
- 5 µl Chlamydien (MOI=20) werden in die Protein-Medium Suspension in die Wells gegeben und unter leichtem Schwenken gleichmäßig im Well verteilt.
- Das Zellkulturmedium wird nach weiteren 2 h gewechselt.
- Die HEP-2 Zellen werden anschließend für 48 h bei 37°C und 6% CO₂ inkubiert.
- Die Zellen werden in Methanol für 5 min fixiert und anschließend zweimal mit HBSS gewaschen.
- Bis zur Färbung können die HEP-2 Zellen in HBSS bei 4°C gelagert werden.

2.2.6.4 Antikörperfärbung von chlamydialen Einschlüssen

- Der Pathfinder Antikörper wird 1:6 mit HBSS verdünnt
- 25 µl werden pro Well auf die bewachsenen Deckgläschen getropft.
- Die Platte wird 30 min bei 30°C inkubiert.
- Die Zellen werden zweimal mit HBSS gewaschen.
- Anschließend erfolgt eine Färbung mit 30 µl DAPI (1:1.000) für 10 min bei RT.
- Die Zellen werden zweimal mit HBSS gewaschen und können anschließend in 1 ml PBS bei 4°C gelagert werden.
- Auf Objektträger wird 2 µl Vectashield getropft und die Deckgläschen aufgelegt. Anschließend werden die Deckgläschen mit Nagellack versiegelt.
- Die Auswertung der Infektion erfolgt durch Auszählen im Fluoreszenzmikroskop.

2.2.7 Biophysikalische Methoden

2.2.7.1 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie mit rekombinanten Proteinen

Anhand der Eigenschaft bestimmter Sekundärstrukturen zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich zu absorbieren, kann durch die CD-Spektroskopie die Sekundärstruktur bestimmt werden. Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Luitgard Nagel-Steger in der AG Willbold (Biophysik; HHU) durchgeführt.

- Die Proteinproben werden mittels Bradford auf eine Konzentration von 10 µM eingestellt.
- Die Suprasil Quarz Küvette (Hellma, 1 mm) wird mit 1%iger SDS-Lösung und H₂O gründlich gespült.

2 Material und Methoden

- Anschließend wird das CD-Spektrophotometer J-815 (Jasco) durch eine 5-fach akkumulierte Messung mit CD-Spektroskopiepuffer der Nullwert bestimmt. Dabei wird alle 0,5 nm eine Messung, bei einer Geschwindigkeit von 50 nm min⁻¹ vorgenommen
- Jede Messung mit rekombinantem Protein wird bei 20°C durchgeführt und ebenfalls 5-fach akkumuliert.
- Falls ein Temperaturgradient durchgeführt werden soll, wird dieser in 10°C Intervallen durchgeführt. Die Heizgeschwindigkeit beträgt 10°C min⁻¹. Die Zieltemperatur darf nur um ±0,1°C abweichen und muss 5 s gehalten werden, bevor die nächste Messung startet.
- Die erhaltenen Spektren werden auf dem Dichroweb Server, entsprechend der gemessenen Wellenlängen, mit der Software CONTINLL oder K2D3 analysiert (328-330).

2.2.7.2 Analyse der Sedimentationsgeschwindigkeit mittels Analytischer Ultrazentrifugation (AUZ) mit rekombinanten Proteinen

Die Analytische Ultrazentrifugation (AUZ) ist eine Zentrifugationsmethode zur Bestimmung biophysikalischer Parameter von gelösten Partikeln. Im Gegensatz zur Größenausschlusschromatographie wird dabei keine feste Phase verwendet. Die Detektion der sedimentierenden Partikel findet während des gesamten Zeitraums der Zentrifugation statt. Die Lösung wird wieder durchmischt, sobald die Zentrifugation aufhört. Eine präparative Fraktionierung ist mit dieser Methode daher nicht möglich. Allerdings ist die AUZ sehr gut geeignet für Analysen von Proteinen in einem Größenbereich von wenigen Nanometern bis zu einigen Mikrometern. Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Luitgard Nagel-Steger in der AG Willbold (Biophysik; HHU) durchgeführt.

- Vor der AUZ werden alle Proben mit einem Spektralphotometer (Jasco V-650) in einem Bereich von 210-400 nm gemessen.
- Entsprechend der später in der AUZ verwendeten Wellenlänge (230 oder 280 nm) wird die Absorption eingestellt. Diese muss zwischen 0,5 und 1,1 liegen, um eine einwandfreie Messung zu gewährleisten.
- Die AUZ erfordert spezielle Messzellen (Abbildung 2.2). Diese enthalten zwei Kammern, wobei eine die Probe in Form des rekombinanten Proteins enthält und

2 Material und Methoden

eine nur mit dem jeweiligen Puffer des rekombinanten Proteins als Referenz gefüllt wird.

- Die AUZ wird bei 20°C durchgeführt.
- Die Monomere von Pmp21-D werden bei 40.000 Upm (Optima XL-A An 60Ti) und 230 nm über 300 scans (1 scan entspricht 1,5 min) analysiert. Abweichend davon wird die das gesamten Eluat von Pmp21-D nach OCR bei 20.000 Upm (Optima XL-A An 50Ti) und 280 nm analysiert.
- Die Detektion der Sedimentationsgeschwindigkeit erfolgt während des gesamten Laufs.
- Ein schematischer Aufbau der AUZ ist in Abbildung 2.3 dargestellt.
- Die Analyse der Daten erfolgt mit der Software SEDFIT anhand des Sedimentationskoeffizienten (s -Wert) auf Basis der Lamm`schen Differentialgleichung mit einem spezifischen Volumen von $0,7286 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ für die Aminosäuresequenz von Pmp21-D.
- Die Maßzahl des s -Wertes Svedberg (S) wurde mit einer Auflösung von 200 berechnet.
- Eine detaillierte Anwendung der Software SEDFIT steht auf der in Kapitel 2.1.4 erwähnte Homepage zur Verfügung.
- Die Dichte und Viskosität des PBS-Puffers werden mit SEDNTERP berechnet und entsprechen 1,0053 für die Dichte und 0,01019 für die Viskosität.
- Bei der Auswertung der Daten wurde berücksichtigt, dass der Bereich unter 0,6 S ein Messtechnisch bedingtes ein Dekonvolutionsartefakt enthält. Dies bedeutet, dass man dort ein falschpositives Signal bekommt.

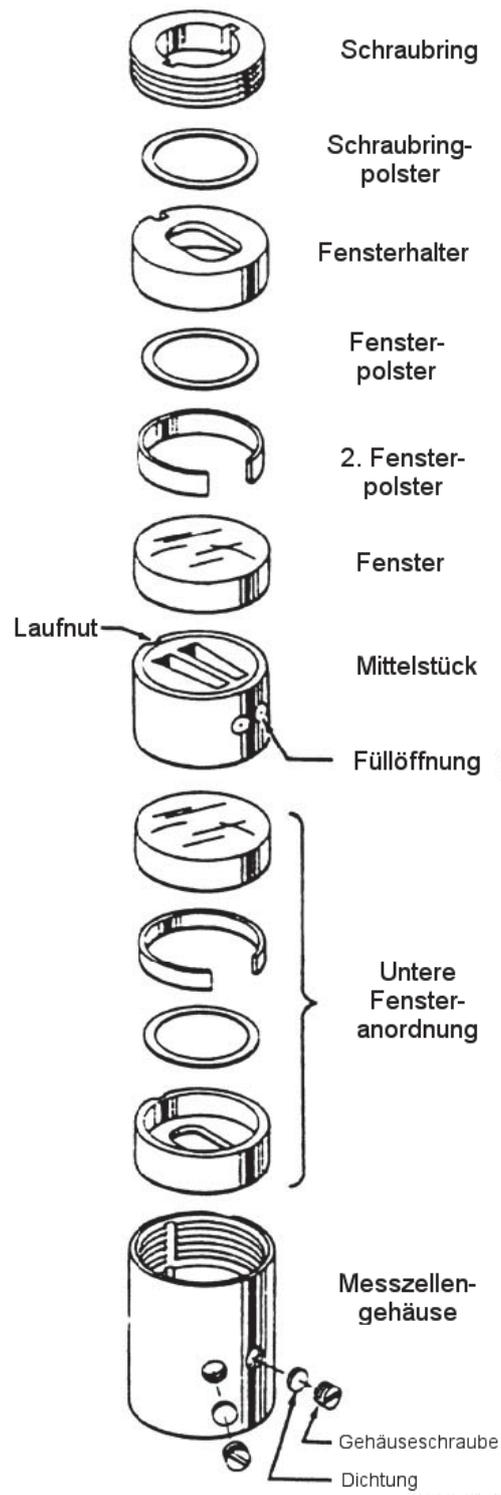


Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau einer AUZ-Messzelle (verändert nach (331)).

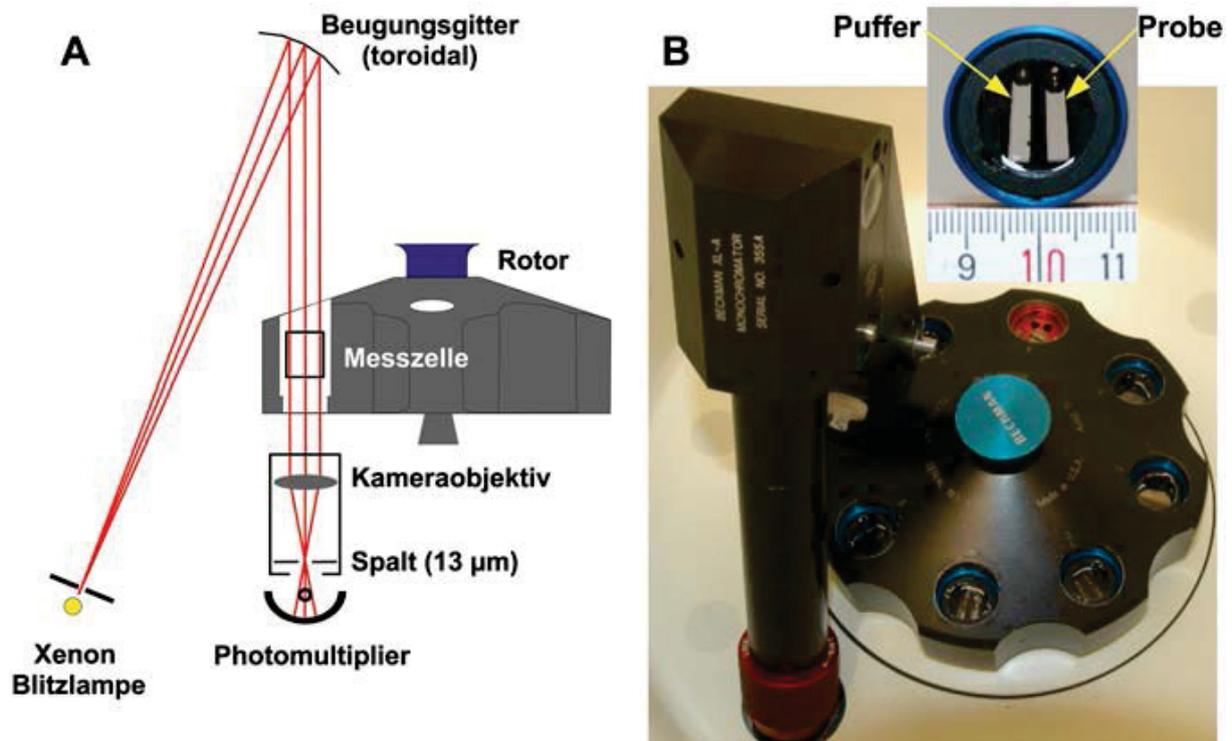


Abbildung 2.3: Aufbau eines Absorptionsphotometers in der AUZ (332).

(A) Schematischer Aufbau des Absorptionsphotometers in einer AUZ. Objektiv und Spalt bewegen sich unterhalb des Rotors, um ortsaufgelöst Absorption zu messen. (B) Einblick in die Kammer einer AUZ mit Rotor und Monochromator sowie Aufsicht auf eine befüllte analytische Zentrifugenzelle (332).

2.2.7.3 Beschichtung von Netzchen zur Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) mit rekombinanten Proteinen

- Das S162 Netzchen wird mit der beschichteten Seite nach oben für 12 s im Plasma Cleaner (Electronic diener, Femto) behandelt, wodurch das Netzchen hydrophil wird.
- Rekombinantes Protein wird für 10 min bei 10.000 xg zentrifugiert und auf eine Konzentration von 1 µM verdünnt.
- 10 µl des rekombinanten Proteins wird für 5 min auf dem Netzchen inkubiert und anschließend mit dem Rand eines Whatman Paper aufgesogen.
- Das Netzchen wird 3 Mal mit ddH₂O gewaschen.
- Kontrastierung der Probe durch Inkubation mit Uranylacetat (1% in H₂O) für 1 min.
- Das Uranylacetat wird mit dem Rand eines Whatman Paper aufgesogen und das Netzchen trocknet für 5 min bei RT.
- Die Netzchen können bis zur Durchführung der TEM bei RT gelagert werden.

2 Material und Methoden

- Die TEM wurde mit einem E902 Elektronenmikroskop (Zeiss) bei 80 kV als Serviceleistung des CAi der HHU mit Unterstützung von Frau Marion Nissen durchgeführt.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden Polymorphe Membranproteine (Pmps) aus *Chlamydia (C.) pneumoniae* und in kleinem Umfang aus *C. trachomatis* charakterisiert. Der Schwerpunkt lag auf der biochemischen und biophysikalischen Charakterisierung des Adhäsins und Invasins Pmp21 aus *C. pneumoniae*. Kapitel 3.1 beschäftigt sich mit der adhäsiven und invasiven Passagierdomäne (*passenger domain*; PD), Kapitel 3.2 hingegen mit der Domäne C-Pmp21. Diese enthält die membranintegrierte Domäne und möglicherweise ein sogenanntes Autochaperon (AC), welches als Vorlage für die Faltung der PD dient.

3.1 Pmp21 aus *C. pneumoniae* enthält repetitive Aminosäuremotive, die amylogene Regionen darstellen

In vorherigen Studien wurden viele Pmps aus *C. pneumoniae* sowie alle Pmp-Proteine aus *C. trachomatis* Serovar E/150 als bakterielle Adhäsine identifiziert, die zur Bindung von chlamydialen Elementarkörperchen (*elementary body*; EB) an die Humanzelle führen (Kapitel 1.3.1 und 1.4.3) (72,73). Trotz der vergleichsweise geringen Sequenzidentität konnte die Identifizierung neuer Pmp-Kandidaten basierend auf dem Vorkommen von einer Autotransporter (AT)-typischen Struktur sowie der spezifischen Motive FxxN und GGA (I, L, V) erfolgen (152). Charakteristisch für diese Pmp-spezifischen Motive ist die häufig alternierende Abfolge im Protein. Die zwischengelagerten Aminosäuresequenzen weisen dabei keine erkennbaren Motive auf (152). Das gehäufte Vorkommen legte nahe, dass den FxxN und GGA (I, L, V) Motiven eine essentielle Funktion innerhalb der Pmp-Familie zukommt. Durch Mutationsstudien mit Pmp21 konnte gezeigt werden, dass mindestens zwei FxxN oder ein FxxN und GGA (I, L, V) Motive für eine erfolgreiche Adhäsion essentiell ist (73,179).

Bioinformatische Strukturvorhersagen von Pmp21 mit Phyre2 und I-Tasser (Kapitel 2.1.4) ergaben einen Hinweis auf die Struktur einer rechtsgewundenen β -Helix (Abbildung 3.1) (74). Es ist bekannt, dass Proteine mit einer ähnlichen Tertiärstruktur in anderen Mikroorganismen Amyloide ausbilden (333). Amyloide zeichnen sich durch eine starke Tendenz zur Selbstinteraktion mit der Ausbildung großer, länglicher und stabiler Oligomere aus (243). Interessanterweise wurde für verschiedene Pmps aus *C. pneumoniae* eine Interaktion mit sich selbst und anderen Pmps durch Far Western Blots detektiert (74). Da die Amyloidbildung von bestimmten Sequenzen abhängig ist, kann sie teilweise bioinformatisch

3 Ergebnisse

vorhergesagt werden. Eine mit der Software WALTZ (334) durchgeführte bioinformatische Analyse führte zu der Identifizierung zahlreicher sogenannter amylogener Regionen innerhalb von Pmp21 (Abbildung 3.1). Diese amylogenen Sequenzbereiche inkludieren zu 48% FxxN Motive und zu 11,8% GGA (I, L, V) Motive innerhalb der Pmp21 Sequenz. Es bestand daher die Möglichkeit, dass durch die Motive neben der Adhäsivität die Faltung der Pmps zugunsten einer oligomeren Amyloidbildung beeinflusst wird.

Um zu untersuchen, ob rekombinante Pmps amyloide Strukturen ausbilden und ob diese Faltung einen Einfluss auf die Adhäsion hat, wurden verschiedene Domänen von dem bisher am umfangreichsten untersuchten Pmp, Pmp21 aus *C. pneumoniae* sowie exemplarisch für *C. trachomatis* PmpA und PmpC untersucht (Abbildung 3.1). Die Fragmente von Pmp21 stammen aus der Arbeit von Dr. Schmidt, das Fragment von PmpC aus der Arbeit von Dr. Becker und das PmpA wurde für die vorliegende Arbeit mittels homologer Rekombination kloniert (siehe Kapitel 2.1.10 und 2.1.11) (74,179). Für Pmp21 wurden die Analysen mit der vollständigen PD N-M-Pmp21 begonnen und dann bezüglich der analysierten Sequenzen immer umfangreicher gekürzt, so dass die Anzahl der Motive immer weiter reduziert wurde. Falls eine oligomere Amyloidbildung auftrat, war es das Ziel eine möglichst kleine Sequenz zu identifizieren, die für die Amyloidbildung maßgeblich war.

PmpA und PmpC dienten der Überprüfung, ob die für Pmp21 gefundenen Charakteristika übertragbar waren.

3 Ergebnisse

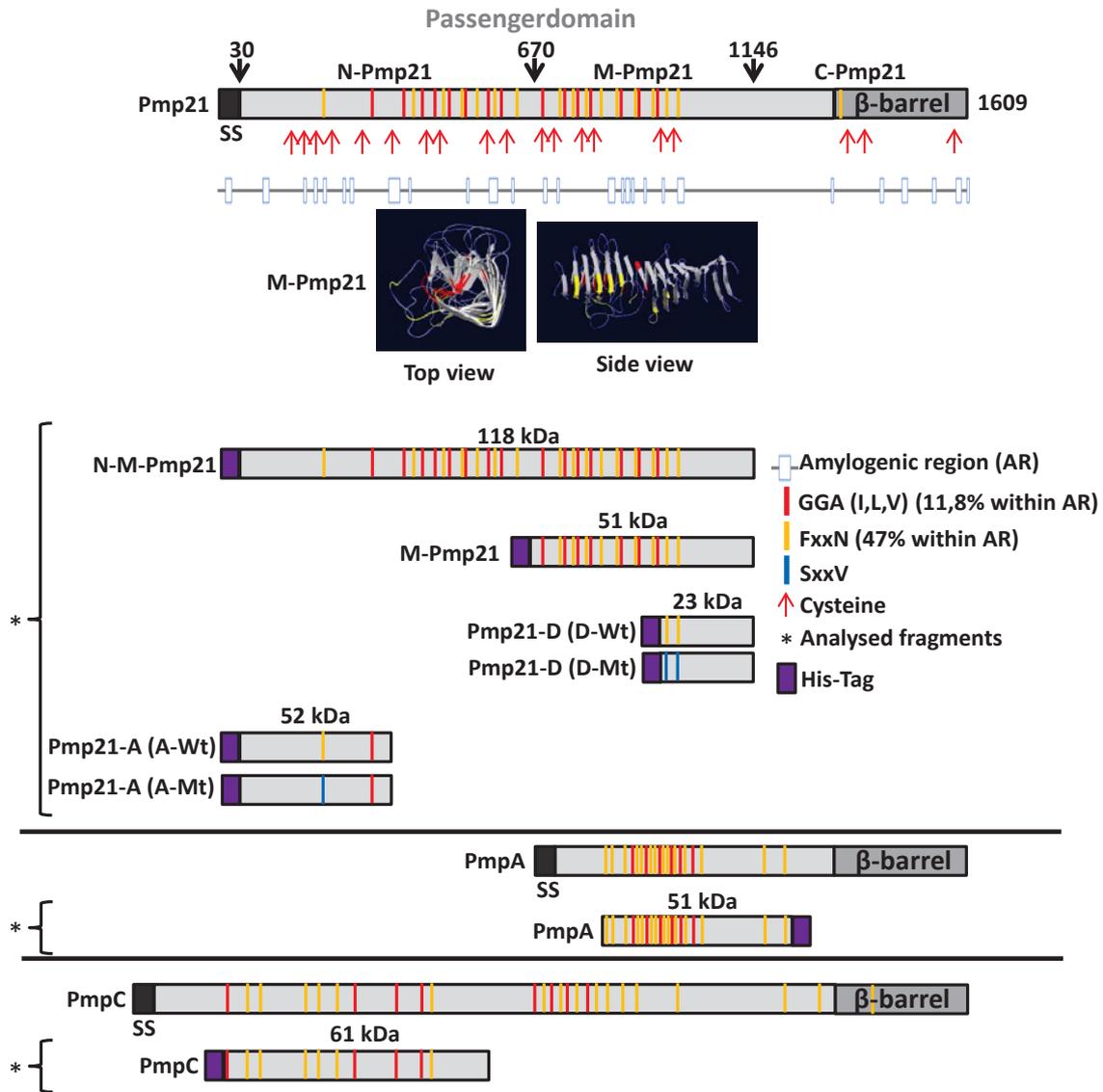


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der repräsentativen Pmp-Kandidaten und der analysierten Fragmente.

Abgebildet sind die repräsentativen Pmp-Kandidaten. Pmp21 aus *C. pneumoniae* sowie PmpA und PmpC aus *C. trachomatis*. Die charakteristische Drei-Domänen-Struktur der Pmps mit N-terminaler Signalsequenz (SS), der PD (*passenger domain*) und der C-terminalen β -Fass- (*β -barrel*)-Domäne ist durch Rechtecke in verschiedenen Grautönen angezeigt. Die Position der Tetrapeptidmotive GGA(I, L, V) und FxxN ist durch rote und orange Linien markiert. Über der Pmp21-Sequenz sind außerdem die natürlichen Prozessierungsstellen in Form schwarzer Pfeile mit ihrer exakten Aminosäure Position dargestellt. Des Weiteren sind die Cysteine innerhalb von Pmp21 durch rote Pfeile angezeigt. Die vorhergesagten amylogenen Bereiche (*amylogenic regions*) in Pmp21 sind durch blaue Kästchen unter der Sequenz dargestellt. Die Strukturvorhersage von M-Pmp21 erfolgte mittels I-Tasser (C-score: -1.58). M-Pmp21 wird als rechtsgewundene β -Helix vorhergesagt. Die Pmp-charakteristischen Motive sind in der Aufsicht (*top view*) und in der Seitenansicht (*side view*) rot (GGA (I, L, V)) und gelb (FxxN) dargestellt. Unter den Vollängenproteinen sind jeweils die in dieser Arbeit analysierten Fragmente (*analysed fragments*) mit ihren N- oder C- terminalen Histidin-Tags (His-Tags) dargestellt. Die Position der zu SxxV mutierten FxxN Motive in der Pmp21-D und Pmp21-A Mutante (D-Mt und A-Mt) sind durch blaue Linien dargestellt.

3.1.1 Nachweis der Selbstinteraktion von Pmp21 als erster Hinweis auf Oligomerisierung

Zur initialen Identifizierung der Selbstinteraktion, wurde die präparative Größenausschlusschromatographie (*preparative size exclusion chromatography*; SEC) (Kapitel 2.2.5.7.1 und 2.2.5.7.2) von heterolog exprimiertem rekombinanten Pmp21 durchgeführt. Die Trennung während der SEC erfolgt über eine Chromatographiesäule, die mit einer porösen stationären Phase gepackt ist und von einer wässrigen mobilen Phase durchströmt wird.

Bei der Trennung mittels SEC ist zu beachten, dass die Retentionszeit bis auf Ausnahmen nicht auf Basis der absoluten Molekülmasse erfolgt. Dadurch, dass sich Proteine in ihrer Form unterscheiden (z.B. globuläre, stabförmige oder flexible Konformationen ausbilden) entsprechen ihre hydrodynamischen Radien nicht exakt ihrem Molekulargewicht. Daher ist es schwierig, eine Molekulargewichtsbestimmung anhand von Kalibriergeraden durchzuführen (317-319). Bei den im Folgenden berechneten Molekulargewichten handelt es sich daher immer um apparente Molekulargewichte. Das optimale Auftrennungsvermögen der verwendeten SEC-Säule lag zwischen 10 – 600 kDa. Daher können apparente Größen außerhalb dieses Bereichs lediglich als Hinweis dienen.

Vor der SEC wurden die *E. coli*-Zellen mit den verschiedenen Pmp-Fragmente denaturierend lysiert. Anschließend wurden die Pmp21-Fragmente säulenbasiert in einem *On Column Refolding* (OCR) mittels ÄKTAprime plus renaturiert (Kapitel 2.2.5.6.1). Beim OCR der Pmp21-Fragmente erfolgte die Renaturierung durch einen Pufferaustausch auf der Nickel-NTA-Säule (Ni-NTA-Säule). Zuerst wurde Guanidin-HCl mit Harnstoff ersetzt, anschließend wurde ebenfalls der Harnstoff entfernt. Die dadurch renaturierten Proteine wurden anschließend mit Imidazol eluiert. Die beiden höchstkonzentrierten Proben wurden gepoolt und direkt im Anschluss für die SEC eingesetzt. Alle SEC Ergebnisse beziehen sich auf ein ursprüngliches Expressionsvolumen von 2 L *Escherichia (E.) coli*-Kultur (bei 37°C exprimiert), wurden mindestens 3 Mal wiederholt und die hier dargestellten Beispiele stellen typische repräsentative Ergebnisse dar.

3.1.1.1 Rekombinantes N-M-Pmp21 bildet Proteinspezies unterschiedlicher Größe aus

Die PD von Pmp21 enthält eine Vielzahl der charakteristischen Pmp-Motive GGA(I,L,V) und FxxN (Abbildung 3.1). Für initiale Analysen wurde die vollständige, rekombinante PD mit der Bezeichnung N-M-Pmp21 verwendet. N-M-Pmp21 spiegelt eine natürlich vorkommende

3 Ergebnisse

Domäne wider, die ebenso wie die vollständig prozessierten Domänen N-, M- und C-Pmp21 aufgrund von Prozessierung während der Infektion und auf der EB-Oberfläche detektiert wurden (73). Ebenso wurden diese Domänen in Proteomanalysen identifiziert (157,167).

Nach OCR von N-M-Pmp21 auf $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ wurde mittels Western Blot die erfolgreiche Aufreinigung und anhand Coomassie gefärbter SDS-PAGE die Reinheit der Probe bestimmt. Die Probe war zwar rein und lag bei einer apparenten Größe von ca. 155 kDa vor, über 50% von N-M-Pmp21 lag allerdings degradiert vor. Besonders prominent war eine Degradationsbande, die bei ca. 65 kDa. lief (Abbildung 3.2 B und D) und dadurch der Größe der auf EBs und im Infektionsprozess vorkommenden M-Pmp21 Domäne entsprach. Dies konnte bereits in früheren Analysen beobachtet werden (179).

Die im Anschluss durchgeführte SEC ergab einen großen Peak (I) nahe der als Totvolumen (V_0) bezeichneten Auftrennungsgrenze der Säule und drei weitere Peaks (II, III, IV), die in Form von Schultern oder ohne vollständige Auftrennung bis zur Basislinie aus diesem hervorgingen. Der Peak nahe des V_0 wurde als N-M-Pmp21- O_1 bezeichnet und hatte eine apparente Größe von ca. 1300 kDa. Die drei weiteren hatten eine apparente Größe von 500 kDa (Peak II), 230 kDa (Peak III) und 63 - 37 kDa (Peak IV). Des Weiteren wurde zusätzlich zu N-M-Pmp21- O_1 eine weitere exemplarische Fraktion für spätere Analysen ausgewählt, die N-M-Pmp21- O_3 bezeichnet wurde und einer apparenten Größe von 555 kDa entsprach (Abbildung 3.2 A).

Von der durchgeführten SEC wurde jede zweite Elutionsfraktion mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert, um das den Peaks zugrunde liegende Pmp21 Protein zu identifizieren (Abbildung 3.2 C und E). N-M-Pmp21 findet sich in den frühesten Elutionsfraktionen bis ca. 65 ml und bildet daher die größten Oligomere aus. Das prominente Degradationsfragment von 65 kDa eluiert ebenfalls in den frühen Elutionsfraktionen bis ca. 75 ml, wobei es einen prominenten Peak bei ca. 68 ml bildet. Dies deutet darauf hin, dass N-M-Pmp21 und das Degradationsfragment entweder jeweils Homooligomere bildeten, die in Lösung separat voneinander vorlagen, oder heterooligomere Komplexe miteinander bildeten. Außerdem wurden weitere kleinere Degradationsfragmente bis ca. 92 ml eluiert. Diese waren jedoch nicht mehr im Western Blot nachweisbar und könnten C-terminale Degradationsfragmente ohne den im Western Blot detektierbaren His-Tag oder auch Verunreinigungen darstellen.

3 Ergebnisse

Aufgrund des sehr großen apparenten Molekulargewichts von N-M-Pmp21 in der SEC war es sehr wahrscheinlich, dass N-M-Pmp21 Oligomere ausbildete, wobei die unterschiedliche Laufweite dieser Oligomere nicht nur auf unterschiedliche Größen, sondern ebenfalls auf unterschiedliche Konformation hindeuten könnte.

Da der Mechanismus der Oligomerisierung, unbekannt ist, können möglicherweise auch kleine N-M-Pmp21 Degradationsfragmente oligomerisieren. Insbesondere, da eine Vielzahl von amylogenen Regionen für N-M-Pmp21 vorhergesagt wurde (Abbildung 3.1), welche dies initiieren könnten. Um die vorhergesagten amylogenen Regionen weiter einzugrenzen und zu analysieren, ob sich in dem natürlich vorkommenden Fragment M-Pmp21 ebenfalls ein Oligomerisierung auslösender Sequenzabschnitt befand, wurde im Folgenden das M-Pmp21-Fragment untersucht.

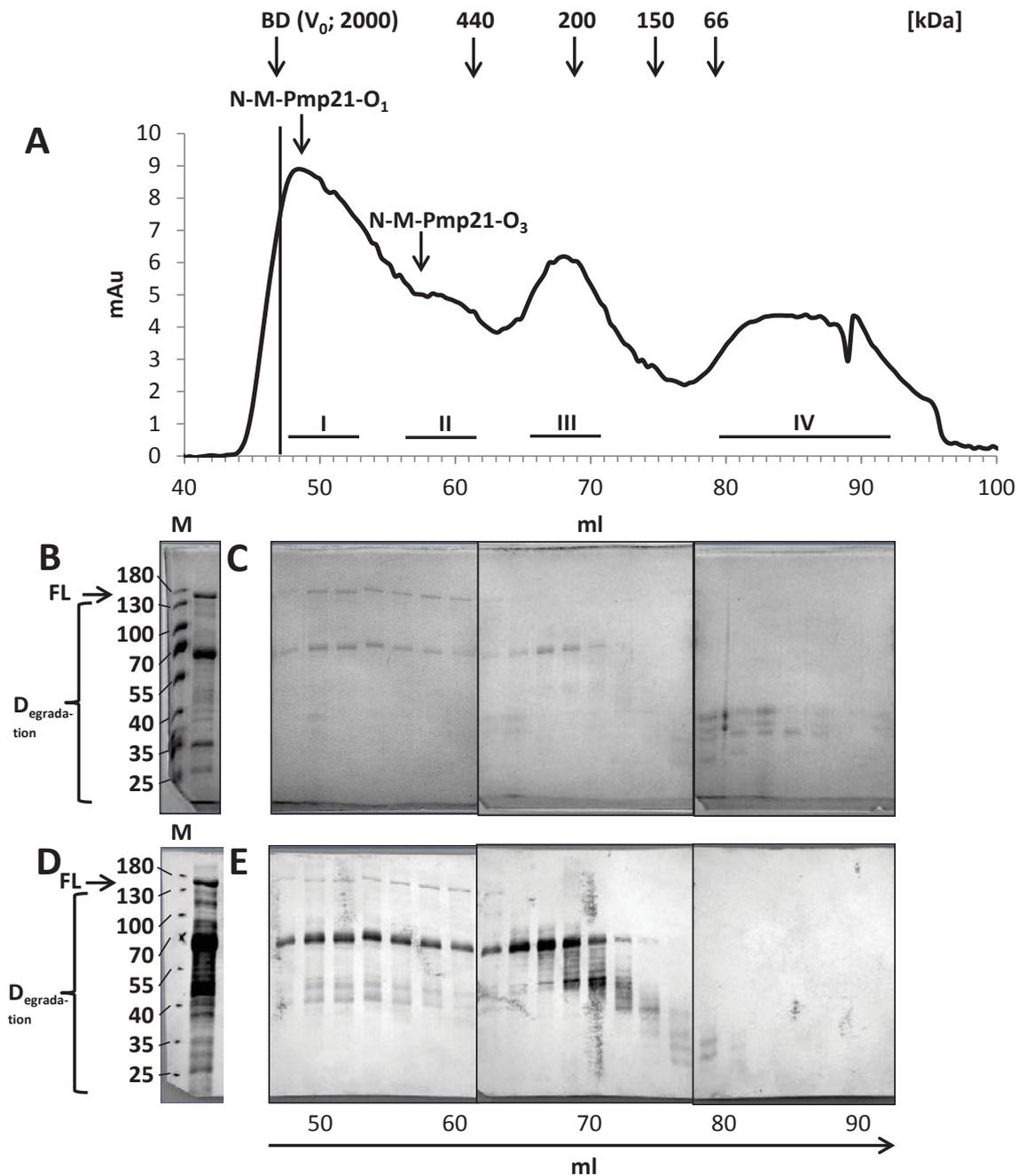


Abbildung 3.2: N-M-Pmp21 bildet Proteinspezies unterschiedlicher Größe aus.

(A) Präparative SEC (HiLoad 16/600 Superdex 200 pg) von N-M-Pmp21 nach der Rückfaltung auf $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$. Die Flussrate zur Trennung der Probe in phosphatgepufferte Salzlösung (*phosphate buffer saline*; PBS) betrug $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Über dem Chromatogramm ist das mittels blue dextran (BD) bestimmte Totvolumen (V_0) sowie die Größen der globulären Standardproteine und das Elutionsvolumen ausgewählter Fraktionen für weitere Analysen angegeben. (B und D) Die Ausgangsprobe für die SEC auf einer Coomassie blau gefärbten SDS-PAGE zeigte das Vollängenprotein (FL) N-M-Pmp21 bei einer apparenten Größe von ca. 155 kDa und weitere Degradationsfragmente ($D_{\text{egradation}}$) bei hauptsächlich 35 und 65 kDa; M: PageRuler™ Größenstandard. (C und E) Die SEC Elutionsfraktionen wurden zu je 1,2 ml gesammelt und jede zweite Fraktion mittels Coomassie blau gefärbter SDS-PAGE sowie mittels Western Blot und anschließender Detektion durch Anti-His Antikörpern überprüft.

3.1.1.2 Rekombinantes M-Pmp21 bildet Proteinspezies unterschiedlicher Größe aus

Nach OCR von M-Pmp21 auf $1,25 \text{ mg ml}^{-1}$ wurde mittels Western Blot die erfolgreiche Aufreinigung und anhand Coomassie gefärbter SDS-PAGE die Reinheit der Probe bestimmt. Die Probe war zwar rein und lag bei einer apparenten Größe von ca. 65 kDa vor, ca. 10 % von M-Pmp21 lag allerdings degradiert vor. Besonders prominent war eine Degradationsbande, die bei ca. 35 kDa lief und deren Größe somit der Hälfte der Domäne M-Pmp21 entsprach (Abbildung 3.3 B und D).

Die SEC ergab einen großen Peak nahe des V_0 der Säule bis ca. 67 ml und einen weiteren zwischen ca. 69 ml und 95 ml. Der zweite Peak schien aus mindestens zwei dicht beieinander liegenden zu bestehen und erstreckte sich von 69 ml bis 95 ml. Der Peak nahe des V_0 wurde als M-Pmp21- O_1 bezeichnet, hatte eine apparente Größe von ca. 1.300 kDa und erreichte erst bei 242 kDa das Basislinienniveau. Der zweite Peak hatte ein apparentes Molekulargewicht von 218 kDa bis 20 kDa. Für spätere Analysen wurde zusätzlich zu M-Pmp21- O_1 eine weitere exemplarische Fraktion ausgewählt, die als M-Pmp21- O_3 bezeichnet wurde und einer apparenten Größe von 555 kDa entsprach (Abbildung 3.3 A).

Von der durchgeführten SEC wurde jede zweite Elutionsfraktion mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert um zu identifizieren, um welche Proteinzusammensetzung es sich bei den detektierten Peaks handelte (Abbildung 3.3 C und E). M-Pmp21 konnte im Western Blot in allen Elutionsfraktionen nachgewiesen werden, wobei das Vorkommen im Verlauf der Elution stark abnahm. Degradationsprodukte konnten zwar auch in allen Elutionsfraktionen nachgewiesen werden, jedoch am meisten im Elutionsbereich des zweiten Peaks. Das prominenteste Degradationsfragment von ca. 35 kDa (im Western Blot) wurde ebenfalls nahe des V_0 eluiert. Die hauptsächliche Elution dieses Degradationsfragments erfolgte jedoch bei ca. 84 ml. Das entsprach einem apparenten Molekulargewicht von ca. 57 kDa und könnte somit immer noch knapp einem Dimer entsprechen.

Zusammengefasst legten die Daten nahe, dass M-Pmp21, ebenso wie N-M-Pmp21, und seine Degradationsfragmente entweder Homooligomere bildeten, die in Lösung separat voneinander vorliegen oder Heterooligomere Komplexe bildeten. Interessanterweise konnte durch die Entdeckung des 35 kDa Degradationsfragments ein Abschnitt identifiziert werden, der in seiner Oligomerisierung stark eingeschränkt zu sein schien. Es entsprach von der Länge in etwa der Hälfte von M-Pmp21. Auffällig war, dass durch Halbierung von M-Pmp21 ein Fragment entstehen würde, das lediglich zwei der charakteristischen FxxN Motive

3 Ergebnisse

enthalten würde und ebenso nur noch zwei vorhergesagte amylogene Regionen (Abbildung 3.1). Um zu überprüfen, ob dieses artifizielle Fragment Pmp21-D (D-Wt) weiterhin zur Oligomerisierung fähig wäre, jedoch im Vergleich zu N-M-Pmp21 und M-Pmp21 (mit zahlreichen Pmp charakteristische Motiven und vorhergesagte amylogene Regionen) in geringerem Ausmaß, wurde im Folgenden der Abschnitt D-Wt analysiert.

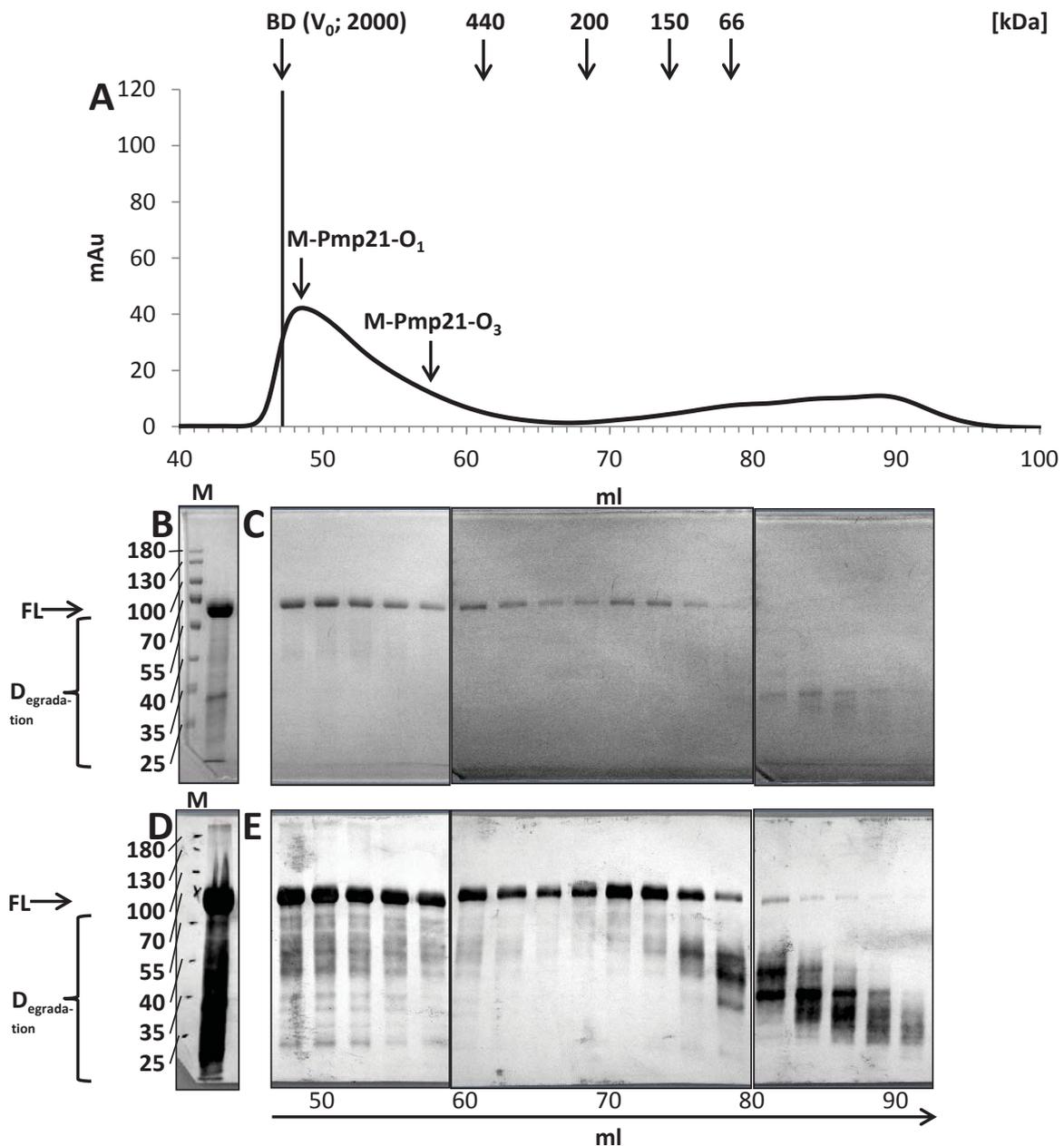


Abbildung 3.3: M-Pmp21 bildet Proteinspezies unterschiedlicher Größe aus.

(A) SEC (HiLoad 16/600 Superdex 200 pg) von M-Pmp21 nach der Rückfaltung auf $1,25 \text{ mg ml}^{-1}$. Die Flussrate zur Trennung der Probe in PBS betrug $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Über dem Chromatogramm ist das mittels BD bestimmte V_0 sowie die Größen der globulären Standardproteine und das Elutionsvolumen ausgewählter Fraktionen für weitere Analysen angegeben. (B und D) Die Ausgangsprobe für die SEC auf einer Coomassie blau gefärbten SDS-PAGE zeigte das FL M-Pmp21 bei einer apparenten Größe von ca. 65 kDa und weitere

Degradationsfragmente ($D_{\text{egradation}}$) bei hauptsächlich 35 kDa; M: PageRuler™ Größenstandard. (C und E) Die SEC Elutionsfraktionen wurden zu je 1,2 ml gesammelt und jede zweite Fraktion mittels Coomassie blau gefärbter SDS-PAGE sowie mittels Western Blot und anschließender Detektion durch Anti-His Antikörpern überprüft.

3.1.1.3 Rekombinantes D-Wt bildet Proteinspezies unterschiedlicher Größe aus

Nach OCR von D-Wt auf $3,1 \text{ mg ml}^{-1}$ wurde mittels Western Blot die erfolgreiche Aufreinigung und anhand Coomassie gefärbter SDS-PAGE die Reinheit der Probe bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass die Probe zu nahezu 100 % rein war und nur ein geringer Anteil D-Wt degradiert vorlag. Allerdings war eine prominente Bande bei ca. 65 kDa erkennbar, die möglicherweise ein SDS-stabiles Dimer darstellte (Abbildung 3.4 B und D).

Die SEC ergab einen großen Peak nahe des V_0 der Säule bis ca. 69 ml und einen weiteren distinkten Peak mit einer kleinen Schulter bei ca. 79 ml und 88 ml (Abbildung 3.4 A). Der Peak nahe des V_0 wurde als D-Wt- O_1 bezeichnet, hatte eine apparente Größe von ca. 1300 kDa und erreichte erst bei 197 kDa das Basislinienniveau. Der zweite Peak mit der Schulter entsprach einer apparenten Größe von 86 bzw. 41 kDa.

Die Peakfraktion des Peaks bei 79 ml wurde zusätzlich mittels analytischer SEC gekoppelt mit Mehrfachwinkel-Lichtstreuung (MALS) untersucht (Kapitel 2.2.5.7.3). Dadurch war es möglich diesen einzelnen Peak als monomere Proteinspezies (D-Wt-M) zu identifizieren (Abbildung 3.4 F).

Des Weiteren wurde zusätzlich zu D-Wt- O_1 und D-Wt-M zwei weitere exemplarische Fraktion für spätere Analysen ausgewählt, die als D-Wt- O_2 , und D-Wt- O_3 bezeichnet wurden. Sie entsprachen apparenter Größen von 839 und 555 kDa (Abbildung 3.4 A).

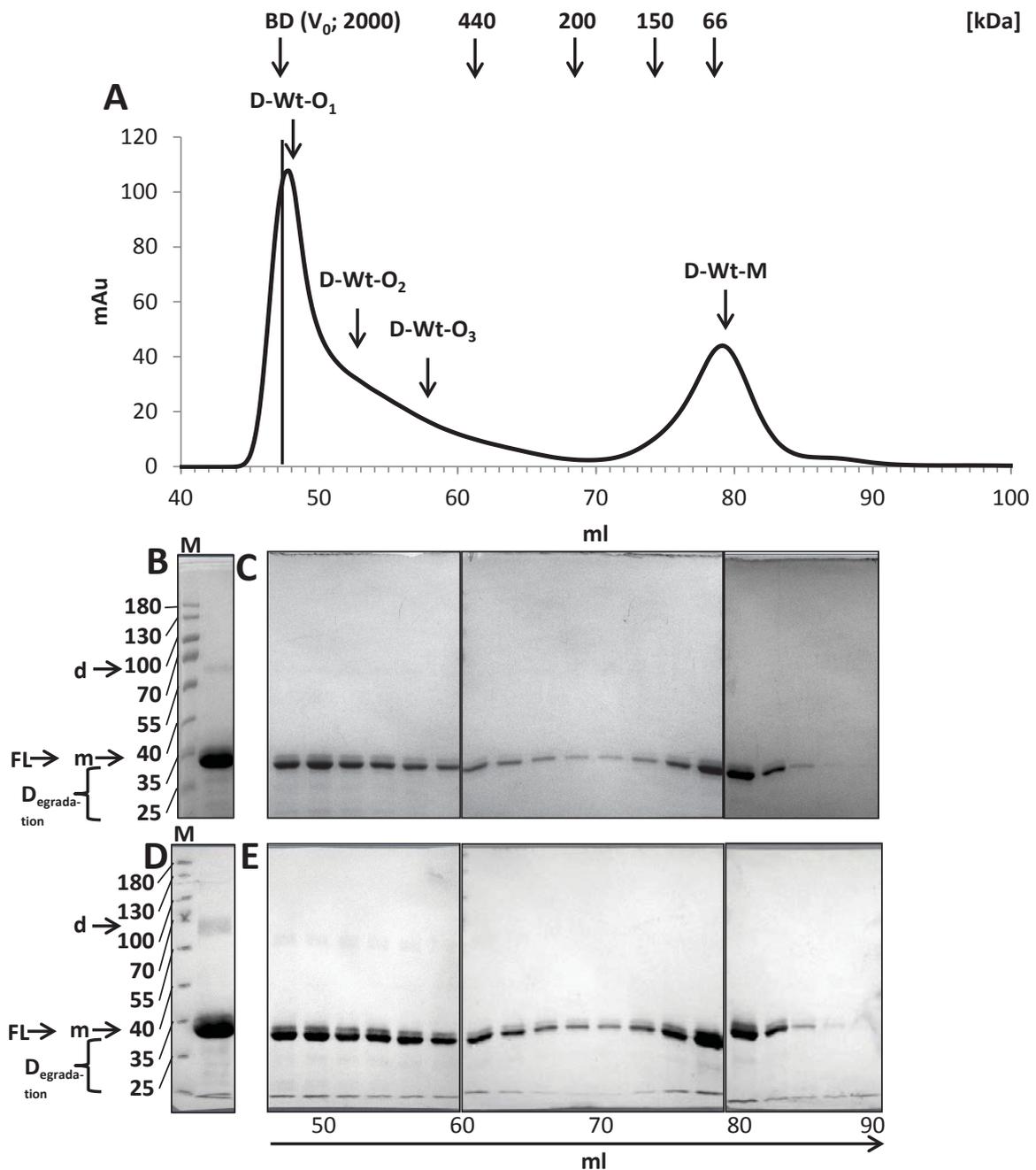
Von der SEC wurde jede zweite Elutionsfraktion mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert um zu identifizieren, ob es sich bei den detektierten Peaks um Degradationsprodukte handelte. D-Wt konnte im Western Blot in allen Elutionsfraktionen nachgewiesen werden. Degradationsbanden konnten hingegen kaum detektiert werden. Allerdings konnte auf doppelter Höhe des Vollängen D-Wt bei ca. 65 kDa ein mögliches Dimer detektiert werden, das bis zu einem Elutionsvolumen von 66 ml sehr schwach im Western Blot detektiert werden konnte (Abbildung 3.4 C und E).

Zusammengefasst legten die Daten nahe, dass D-Wt ebenso wie M-Pmp21 und N-M-Pmp21 entweder Homooligomere bildeten, die in Lösung separat voneinander vorliegen oder Heterooligomere Komplexe bildeten. Interessanterweise war die Neigung Oligomere auszubilden nicht so stark wie bei den bisher untersuchten natürlichen Fragmenten. Was

3 Ergebnisse

sich daraus ableiten ließ, dass D-Wt nicht nur nahe des V_0 eluierte, sondern ein vergleichsweise großer Anteil als Monomer erst relativ spät.

In vorangegangenen Experimenten wurden beide FxxN-Motive in D-Wt zu SxxV mutiert. So wurde entdeckt, dass FxxN für die Adhäsion entscheidend ist (73,179). Im Folgenden wurde daher die SxxV Mutante (D-Mt) von D-Wt in der SEC untersucht. Es sollte analysiert werden, ob durch die Mutation der beiden Motive eine Oligomerisierung unterdrückt würde und FxxN somit einen Einfluss auf die Adhäsion als auch auf die Oligomerisierung hat.



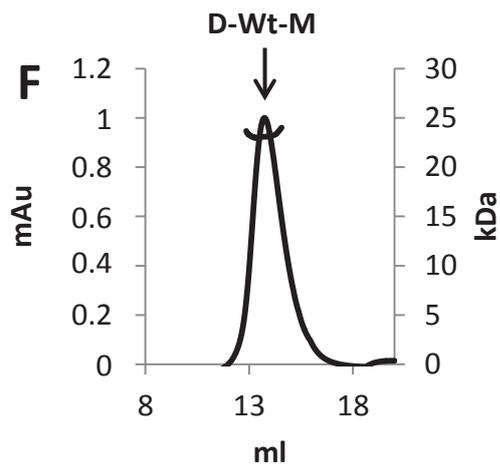


Abbildung 3.4: D-Wt bildet Proteinspezies unterschiedlicher Größe aus.

(A) SEC (HiLoad 16/600 Superdex 200 pg) von D-Wt nach der Renaturierung auf $3,1 \text{ mg ml}^{-1}$. Die Flussrate zur Trennung der Probe (D-Wt-O₁₋₃ und D-Wt-M; stellen exemplarische Fraktionen für spätere Analysen dar) in PBS betrug $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Über dem Chromatogramm ist das mittels blue dextran (BD) bestimmte Totvolumen (V_0) sowie die Größen der globulären Standardproteine und das Elutionsvolumen ausgewählter Fraktionen für weitere Analysen angegeben. (B und D) Die Ausgangsprobe für die SEC auf einer Coomassie blau gefärbten SDS-PAGE zeigte FL D-Wt und Monomere (m) bei einer apparenten Größe von ca. 35 kDa und SDS stabile Dimere (d: ca. 65 kDa); M: PageRuler™ Größenstandard. (C und E) Die SEC Elutionsfraktionen wurden zu je 1,2 ml gesammelt und jede zweite Fraktion mittels Coomassie blau gefärbter SDS-PAGE sowie mittels Western Blot und anschließender Detektion durch Anti-His Antikörpern überprüft. (F) Analytische SEC (Superdex 200 10/300GL; Flussrate $0,3 \text{ ml min}^{-1}$ in PBS) des D-Wt-M Peaks der SEC (Abbildung 3.4 A). In Kombination mit MALS wurde ein Monomer von 23 kDa detektiert.

3.1.1.4 Mutiertes Rekombinantes Pmp21-D (D-Mt) bildet Proteinspezies mit geringerer Größe aus

Nach OCR von D-Mt auf $3,1 \text{ mg ml}^{-1}$ wurde mittels Western Blot die erfolgreiche Aufreinigung und anhand Coomassie gefärbter SDS-PAGE die Reinheit der Probe bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass die Probe rein war und nur ein geringer Anteil D-Wt degradiert vorlag. Allerdings war eine prominente Bande bei ca. 60 kDa erkennbar, die möglicherweise ein SDS-stabiles Dimer darstellte (Abbildung 3.5 B und D).

Die SEC ergab einen großen Peak nahe des V_0 der Säule bis ca. 66 ml und einen weiteren distinkten Peak mit zwei kleinen Schultern bei ca. 71,5, 79 und 88 ml (Abbildung 3.4 A). Der Peak nahe des V_0 wurde als D-Mt-O₁ bezeichnet, hatte eine apparente Größe von ca. 1300 kDa und erreichte erst bei 269 kDa das Basislinienniveau. Der distinkte zweite Peak mit den Schultern entsprach mit apparenten Größe von 160, 86 und 41 kDa dem Monomer von D-Wt und wurde daher als D-Mt-M bezeichnet. Des Weiteren wurde zusätzlich zu D-Wt-O₁ und D-Wt-M zwei weitere exemplarische Fraktion für spätere Analysen ausgewählt, die als D-Mt-O₂, und D-Mt-O₃ bezeichnet wurden. Sie entsprachen apparenter Größen von 839 und 555 kDa.

Von der SEC wurde jede zweite Elutionsfraktion mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert, um zu identifizieren, ob es sich bei den detektierten Peaks um

3 Ergebnisse

Degradationsprodukte handelte. D-Mt konnte im Western Blot in allen Elutionsfraktionen nachgewiesen werden. Degradationsbanden konnten hingegen kaum detektiert werden. Ebenso wurde kein potentiell Dimer mehr detektiert (Abbildung 3.5 C und E).

Die geringere Oligomerbildung von D-Mt bedeutet, dass durch das FxxN Motiv in D-Wt die Oligomerisierung für dieses Fragment begünstigt wird. Um einen Eindruck zu erhalten, welchen Einfluss das FxxN Motiv und das GGA (I, L, V) Motiv in Kombination haben, wurde im Anschluß ein weiteres Pmp21 Fragment untersucht.

In vorangegangenen Experimenten wurde herausgefunden, dass Pmp21-A (A-Wt), welches ein FxxN und ein GGA (I, L, V) Motiv trägt, an HEp-2-Zellen adhären kann (73,179). Im Folgenden wurde daher untersucht, ob auch ein anderes Pmp21-Fragment mit lediglich einem FxxN-Motiv Fähigkeiten zur Oligomerisierung besitzt.

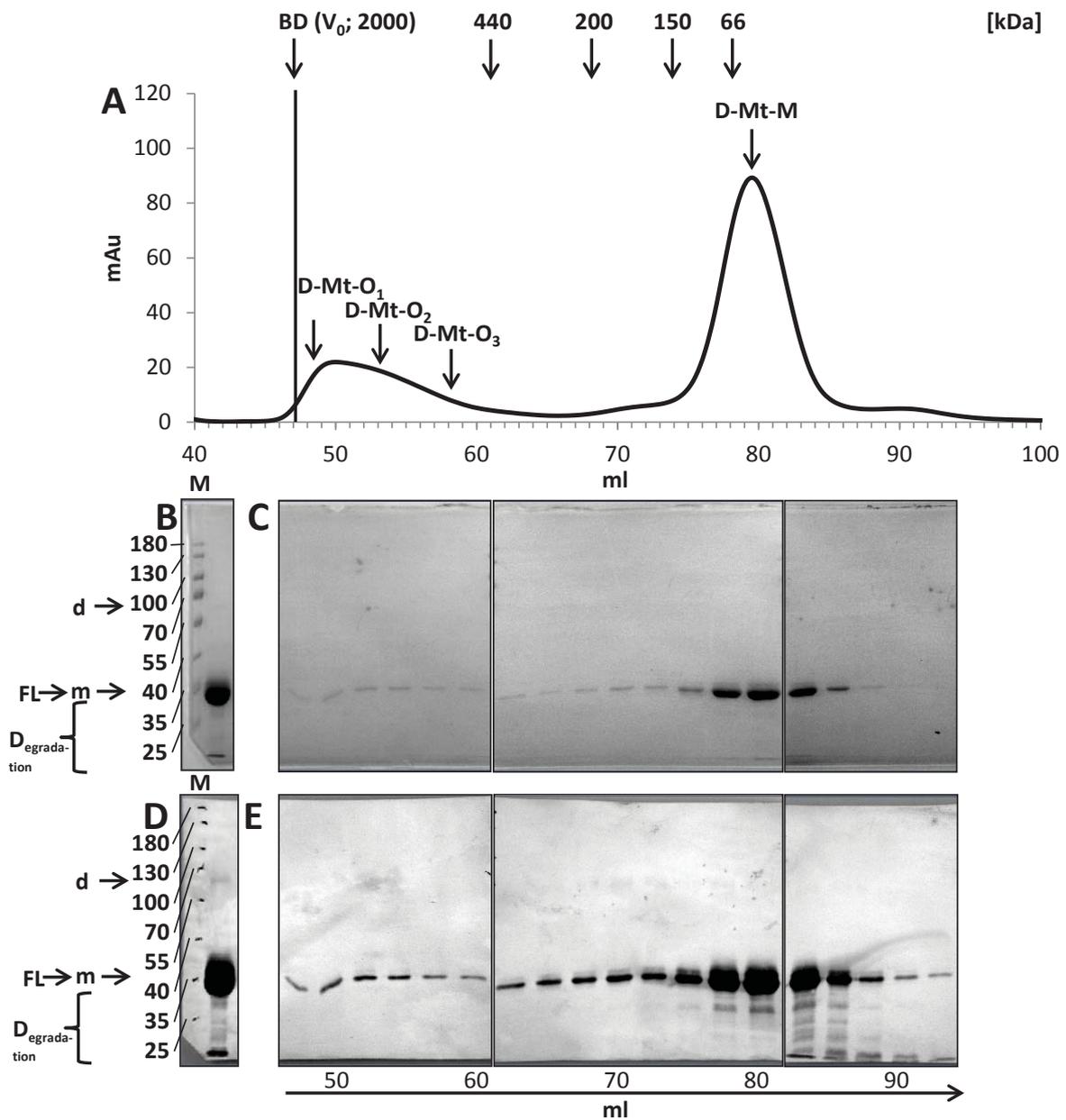


Abbildung 3.5: D-Mt bildet Proteinspezies unterschiedlicher Größe aus.

(A) Preparative SEC (HiLoad 16/600 Superdex 200 pg) von D-Mt nach der Renaturierung auf $3,1 \text{ mg ml}^{-1}$. Die Flussrate zur Trennung der Probe (D-Mt- O_{1-3} und D-Mt-M; stellen exemplarische Fraktionen für spätere Analysen dar) in PBS betrug $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Über dem Chromatogramm ist das mittels BD bestimmte V_0 sowie die Größen der globulären Standardproteine und das Elutionsvolumen ausgewählter Fraktionen für weitere Analysen angegeben. (B und D) Die Ausgangsprobe für die SEC auf einer Coomassie blau gefärbten SDS-PAGE zeigte FL D-Mt und Monomere (m) bei einer apparenten Größe von ca. 35 kDa und SDS stabile Dimere (d: ca. 65 kDa); M: PageRuler™ Größenstandard. (C und E) Die SEC Elutionsfraktionen wurden zu je 1,2 ml gesammelt und jede zweite Fraktion mittels Coomassie blau gefärbter SDS-PAGE sowie mittels Western Blot und anschließender Detektion durch Anti-His Antikörpern überprüft.

3.1.1.5 Rekombinantes A-Wt bildet Proteinspezies unterschiedlicher Größe aus

Nach OCR von A-Wt auf $2,1 \text{ mg ml}^{-1}$ wurde mittels Western Blot die erfolgreiche Aufreinigung und anhand Coomassie gefärbter SDS-PAGE die Reinheit der Probe bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass die Probe zwar sehr rein war, ca. 10 % von A-Wt allerdings nicht dem Vollängenprotein (52 kDa) entsprach, sondern degradiert vorlag. Nicht alle Degradationsbanden konnten im Western Blot durch Anti-His Antikörper detektiert werden. Daher bestand die Möglichkeit, dass bei der Aufreinigung nicht nur A-Wt eluiert wurde, sondern ebenfalls kontaminierendes Protein (Abbildung 3.6 B und D).

Die semipräparative Größenausschlusschromatographie (*semipreparative size exclusion chromatography*; semipräparative SEC) (Kapitel 2.2.5.7.2) ergab einen großen Peak nahe des V_0 der Säule bei ca. 8,2 ml und fünf weitere (I-V) zwischen ca. 9,5 ml und 16,25 ml. Alle Peaks lagen so dicht beieinander, dass sie nicht bis zur Basislinie aufgetrennt werden konnte. Der Peak nahe des V_0 wurde aufgrund seiner den vorherigen Pmp21 Oligomeren ähnelnden Laufweite als A-Wt- O_1 bezeichnet. Entsprechend der Proteinstandards konnte eine apparente Größe von ca. 1.300 kDa berechnet werden. Bei Beginn von Peak I bei ca. 9,5 ml lag die apparente Größe von A-Wt- O_1 immer noch bei ca. 950 kDa. Die folgenden Peaks I, II, III, IV, V hatten apparente Größen von ca. 700 kDa, 420 kDa, 200 kDa, 84 kDa und 58 kDa (Abbildung 3.6 A).

Von der durchgeführten semipreparativen SEC wurde jede zweite Elutionsfraktion mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert um zu identifizieren, ob es sich bei den detektierten Peaks um Oligomere oder Degradationsprodukt handelte. A-Wt konnte im Western Blot in allen Elutionsfraktionen nachgewiesen werden, wobei das Vorkommen im Verlauf der Elution stark abnahm. Degradationsprodukte konnten ebenfalls in allen Elutionsfraktionen nachgewiesen werden. Peak IV, der aufgrund seiner apparenten Größe am ehesten einem A-Wt Monomer entsprach, enthielt trotz der hohen Detektion bei 280 nm lediglich Proteinkonzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze des Western Blots (Abbildung 3.6 C und E).

Zusammengefasst legten die Daten nahe, dass A-Wt mit nur einem FxxN-Motiv und seine Degradationsfragmente entweder Homooligomere bildeten, die in Lösung separat voneinander vorlagen oder Heterooligomere Komplexe bildeten. Allerdings unterscheidet es sich von den meisten anderen untersuchten Pmp-Fragmenten durch Peaks zwischen 440 und 150 kDa. Dies legt nahe, dass entweder von dem FxxN Motiv, dem GGA (I, L, V) Motiv

3 Ergebnisse

oder der AS Sequenz, die diese Motive umgibt, in A-Wt eine Funktion ausgeht, die zur Ausbildung von Oligomeren bestimmter Größe führt.

In den vorangegangenen Kapiteln konnte bereits durch die Analyse von D-Mt ein starker Einfluss von den zwei FxxN Motiven in D-Wt auf die Oligomerisierung gezeigt werden. In vorangegangenen Experimenten wurde das FxxN-Motive in A-Wt zu SxxV mutiert, das zweite Motiv GGA (I, L, V) jedoch nicht. So wurde entdeckt, dass die Anwesenheit von mindestens zwei der Pmp-charakteristischen Motive für die Adhäsion an HEp-2-Zellen entscheidend ist (73,179). Im Folgenden wurde die Mutante von A-Wt (A-Mt) in der semipreparativen SEC untersucht. Es sollte analysiert werden, ob durch die Mutation eines FxxN Motivs bei fortbestehen des GGA (I, L, V) Motivs eine Oligomerisierung unterdrückt wird oder ob von GGA (I, L, V) seinerseits ein Oligomer begünstigender Effekt ausgeht.

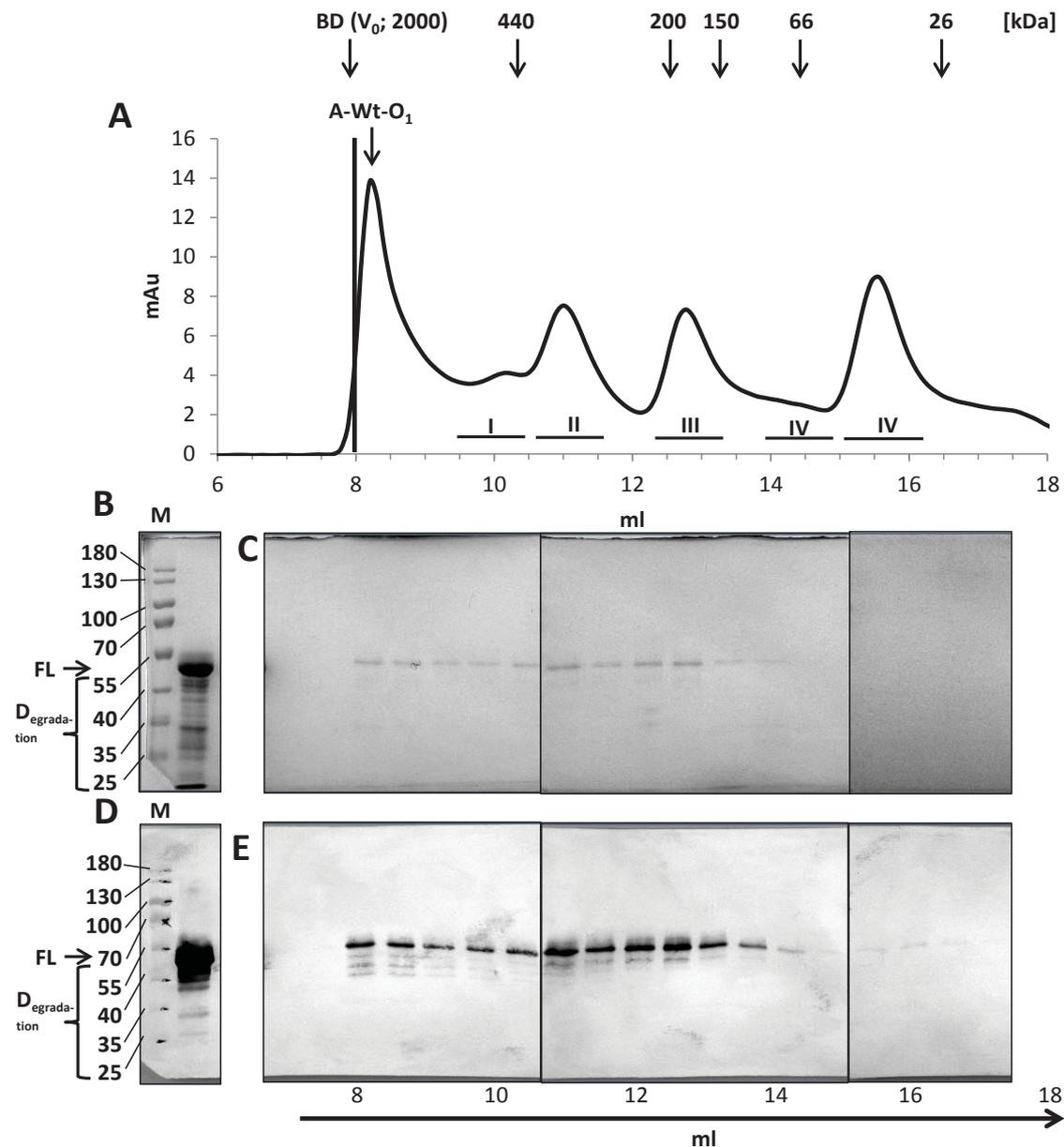


Abbildung 3.6: A-Wt bildet Proteinspezies unterschiedlicher Größe aus.

(A) Semipreparative SEC (HR 10/300 Superdex 200) von A-Wt nach der Renaturierung auf $2,1 \text{ mg ml}^{-1}$. Die Flussrate zur Trennung der Probe in PBS betrug $0,3 \text{ ml min}^{-1}$. A-Wt-O₁ stellte eine exemplarische Fraktion für die spätere Elektronenmikroskopie dar; weitere Peaks und Schultern wurden zum besseren Verständnis mit I-V bezeichnet. Über dem Chromatogramm ist das mittels BD bestimmte V₀ sowie die Größen der globulären Standardproteine und das Elutionsvolumen ausgewählter Fraktionen für weitere Analysen angegeben. (B und D) Die Ausgangsprobe für die semipreparative SEC auf einer Coomassie blau gefärbten SDS-PAGE zeigte FL A-Wt bei einer apparenten Größe von ca. 52 kDa; M: PageRuler™ Größenstandard. (C und E) Die Elutionsfraktionen der semipreparativen SEC wurden zu je 0,3 ml gesammelt und jede zweite Fraktion mittels Coomassie blau gefärbter SDS-PAGE sowie mittels Western Blot und anschließender Detektion durch Anti-His Antikörpern überprüft.

3.1.1.6 Mutiertes Rekombinantes A-Mt bildet größere Proteinspezies aus

Nach OCR von A-Mt auf $2,1 \text{ mg ml}^{-1}$ wurde mittels Western Blot die erfolgreiche Aufreinigung und anhand Coomassie gefärbter SDS-PAGE die Reinheit der Probe bestimmt.

3 Ergebnisse

Dabei wurde festgestellt, dass die Probe zwar sehr rein war, ca. 10 % von A-Mt allerdings nicht dem Vollängenprotein (52 kDa) entsprach, sondern degradiert vorlag. Nicht alle Degradationsbanden konnten im Western Blot durch Anti-His Antikörper detektiert werden. Daher bestand die Möglichkeit, dass bei der Aufreinigung nicht nur A-Mt eluiert wurde, sondern ebenfalls kontaminierendes Protein (Abbildung 3.7 B und D).

Die SEC ergab einen großen Peak innerhalb des V_0 der Säule bei 7,4 ml (A-Mt- V_0) und einen nahe des V_0 bei ca. 8,2 ml (A-Mt- O_1) und fünf weitere (I-V) zwischen ca. 9,5 ml und 16,25 ml. Alle Peaks lagen so dicht beieinander, dass sie nicht bis zur Basislinie aufgetrennt werden konnte. Entsprechend der Proteinstandards konnte für A-Mt- V_0 eine apparente Größe von ca. 2700 kDa und für A-Mt- O_1 von ca. 1300 kDa berechnet werden. Bei Beginn von Peak I bei ca. 9,5 ml lag die apparente Größe von A-Mt- O_1 immernoch bei ca. 950 kDa. Die folgenden Peaks I, II, III, IV und V hatten apparente Größen von ca. 700 kDa, 420 kDa, 200 kDa 82 kDa und 58 kDa. Interessanterweise sind die Peaks I-IV deutlich schwächer ausgeprägt als bei A-Wt und teilweise nur noch rudimentär erkennbar (Abbildung 3.7 A).

Von der durchgeführten SEC wurde jede zweite Elutionsfraktion mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert um zu identifizieren, ob es sich bei den detektierten Peaks um Oligomere oder Degradationsprodukte handelte. A-Mt konnte im Western Blot in allen Peaks nachgewiesen werden, wobei das Vorkommen im Verlauf der Elution stark abnahm. Degradationsprodukte konnten ebenfalls in allen Elutionsfraktionen nachgewiesen werden. Peak IV, der aufgrund seiner apparenten Größe am ehesten einem A-Mt Monomer entsprach, enthielt trotz der starken Detektion bei 280 nm lediglich Proteinkonzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze des Western Blots (Abbildung 3.7 C und E).

Die Daten von A-Mt legen nahe, dass ebenfalls von GGA (I, L, V) ein Effekt ausgeht, der zur Oligomerisierung führt. Tatsächlich scheint das FxxN Motiv diesen durch seine Anwesenheit in A-Wt zu unterdrücken, denn die Oligomere A-Mt- V_0 , sind deutlich größer als alle bei den bisher untersuchten Pmp21-Fragmenten beobachteten.

Zusammengefasst legten die Daten nahe, dass das FxxN Motiv einen Einfluss auf die Oligomerisierung hatte. Besonders eindeutig konnte dieser Effekt bei D-Wt beobachtet werden. Im weiteren Teil der Arbeit wurde die Analyse von D-Wt und D-Mt daher besonders detailliert durchgeführt. Da die SEC den Nachteil einer festen Matrix über das die Proteine getrennt werden, mitbringt, wurde als nächstes eine analytische Ultrazentrifugation (AUZ) durchgeführt.

3.1.2 Rekombinantes D-Wt und D-Mt zeigten in der AUZ Oligomere mit den Anzeichen länglicher Form

Da bei der SEC eine ausgedehnte Grenzfläche zwischen der stationären und der mobilen Phase besteht, existiert ein hohes Potential für nicht-spezifische Interaktionen. Weiterhin ist der Trennbereich der SEC-Säule nicht immer in der Lage, den gesamten Größenbereich einer Probe abzudecken, wodurch eine Übersicht über die wahre Verteilung unzugänglich ist (335). Es bestand demnach die Möglichkeit, dass die Größenverteilung der Pmps durch nicht-spezifische Interaktion mit der stationären Phase verfälscht wurde. Des Weiteren eluierten rekombinanten Pmps während der SEC teilweise nahe des V_0 . Für diese blieb unklar, ob sie von ihrer Form und Größe lediglich im Grenzbereich der Säule anzusiedeln sind oder ob ihre tatsächliche Größe den Grenzbereich bei weitem überschreitet.

Um die benannten Fehlerquellen auszuschließen und darüber hinaus Informationen über die Form der Pmps zu gewinnen, wurde die AUZ durchgeführt (Kapitel 2.2.7.2). Diese dauert zwar mit bis zu 5 h Laufzeit länger als die SEC, bietet aber den Vorteil, dass keinerlei feste Matrix existiert und die Auftrennung lediglich aufgrund der angewandten Zentrifugationskraft stattfindet. Die Grenzfläche zwischen Küvette und Lösung ist minimal und besteht aus chemisch und physikalisch inertem Material, so dass es zu keiner Veränderung der Probe kommt. Der mit einem einzelnen AUZ-Experiment zugängliche Größenbereich erstreckt sich ohne Probleme über vier Größenordnungen der Molmasse. Dadurch kann sichergestellt werden, dass die ursprüngliche Größenverteilung der Probe in der Analyse präzise und richtig wiedergegeben wird. Zusammengefasst machen diese Eigenschaften die AUZ zu einer ideal geeigneten, Methode um ein SEC-Ergebnis zu bestätigen und zu validieren.

Bei den in diesem Kapitel durchgeführten Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen wird der Sedimentationskoeffizient (s -Wert) aus dem Quotienten der maximalen Sedimentationsgeschwindigkeit und der Stärke des Zentrifugalfelds bestimmt. Der s -Wert wird in Svedberg (S) gemessen. Die Größe des s -Wertes ist abhängig von der Masse und Form des Teilchens sowie von seiner Wechselwirkung mit Küvette und Pufferlösung, in denen das Teilchen sedimentiert. Deshalb kann bei Lösungen mit bekannten Eigenschaften und nur einer Art von Teilchen, aus dem s -Wert das Molekulargewicht für das Teilchen bestimmt werden. Je inhomogener eine Lösung bezüglich der enthaltenen Teilchen und ihrer s -Werte ist, umso ungenauer wird die Bestimmung des Molekulargewichts.

Darüber hinaus erschließt die AUZ eine grobe Einschätzung der Form, was mittels Größenausschlusschromatographie nicht möglich ist. Dies geschieht durch Vergleich des experimentell ermittelten Sedimentationskoeffizienten (s -Wert) mit einer perfekten Kugel des gleichen Molekulargewichts. Für die perfekte Kugel ist das minimale Reibungsverhältnis (*frictional ratio*; f/f_0) gleich 1. Die Berechnung des f/f_0 wurde, ebenso wie die S -Werte mit der Software SEDFIT berechnet. Je größer der f/f_0 wird, umso länger ist das untersuchte Molekül. Globuläre Proteine haben beispielsweise durchschnittlich einen $f/f_0=1,2$ (336).

3.1.2.1 Rekombinantes D-Wt hat Anzeichen einer länglichen Form und zeigte in der AUZ eine umfassendere Auflösung großer Oligomere als in der SEC

Nach OCR von D-Wt auf $3,1 \text{ mg ml}^{-1}$ (Abbildung 3.4 B) wurde vor der AUZ eine semipräparative SEC mit der Fraktion D-Wt-O₁ durchgeführt. Diese diente als Kontrolle, ob D-Wt-O₁ durch die Probenverdünnung für die AUZ-Analyse und während des Zeitraums der AUZ (4 h 45 min) dazu neigt, zu D-Wt-M zu zerfallen. D-Wt-O₁ wurde hierzu 20 h bei 20°C inkubiert. Nach dem anschließend durchgeführten semipräparativen SEC Lauf war ersichtlich, dass D-Wt-O₁ auch nach 20 h noch stabil war, da es nicht zum Zerfall zu Monomeren kam (Abbildung 3.8 A). Daher war davon auszugehen, dass die zeitgleich zur semipräparativen SEC durchgeführte AUZ repräsentative Ergebnisse bezüglich der Oligomerkomposition von D-Wt-O₁ (Abbildung 3.8 B) lieferte.

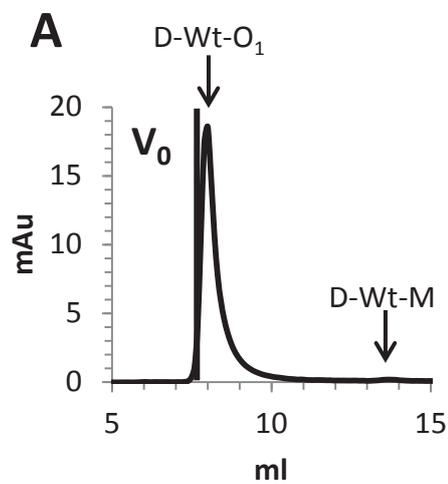
Um D-Wt-M (Abbildung 3.8 F) in der Auftrennung von D-Wt-O identifizieren zu können, wurde ebenfalls zeitgleich eine AUZ mit dieser Probe durchgeführt. Über den Sedimentationskoeffizienten (S) von 1,6 für D-Wt-M konnte aufgrund der hohen Homogenität der Probe über die Software SEDFIT das Molekulargewicht ausgerechnet werden. Die berechneten 23 kDa bestätigten die MALS-Analyse (Abbildung 3.4 F) dahingehend, dass es sich bei D-Wt-M um Monomere handelt. Darüber hinaus konnte eine sehr schwach vertretene, weitere Proteinspezies bei 2,6 S beobachtet werden. Laut Berechnung mit SEDFIT handelte es sich um ein Dimer (Abbildung 3.8 C). Aufgrund des sehr geringen Anteils in der Probe wird die Berechnung allerdings ungenau und ist mit Vorsicht zu betrachten. Außerdem konnte mit SEDFIT anhand der Daten aus Abbildung 3.8 A ein f/f_0 -Wert von 1,88 berechnet werden (Abbildung 3.8 F).

3 Ergebnisse

Im Folgenden wurde das gesamte Material aus dem OCR ohne vorherige SEC in der AUZ eingesetzt (D-Wt). D-Wt-O (87,44 % von D-Wt) zeigte nach der AUZ eine Verteilung von 8 - 85 S mit einem Mittel von 23,77 S und einem f/f_0 -Wert von 2,75 (Abbildung 3.8 E und G).

Anhand der Verteilung wurde deutlich, dass die Größe von D-Wt-O die Auftrennungsleistung der SEC-Säule, die bei ca. 20 S lag, bei weitem überstieg. Darüber hinaus legte der f/f_0 -Wert nahe, dass es sich um längliche, stabförmige Oligomere handelte.

Von D-Mt wurden ebenfalls Oligomere gebildet, die von ihrer Größe bis an die Grenze des V_0 reichten (Abbildung 3.5 A). Um einen Eindruck zu erhalten, ob sich die Oligomere von D-Wt und D-Mt in ihrer Größe und Form ähneln, wurde mit D-Mt ebenfalls eine AUZ durchgeführt



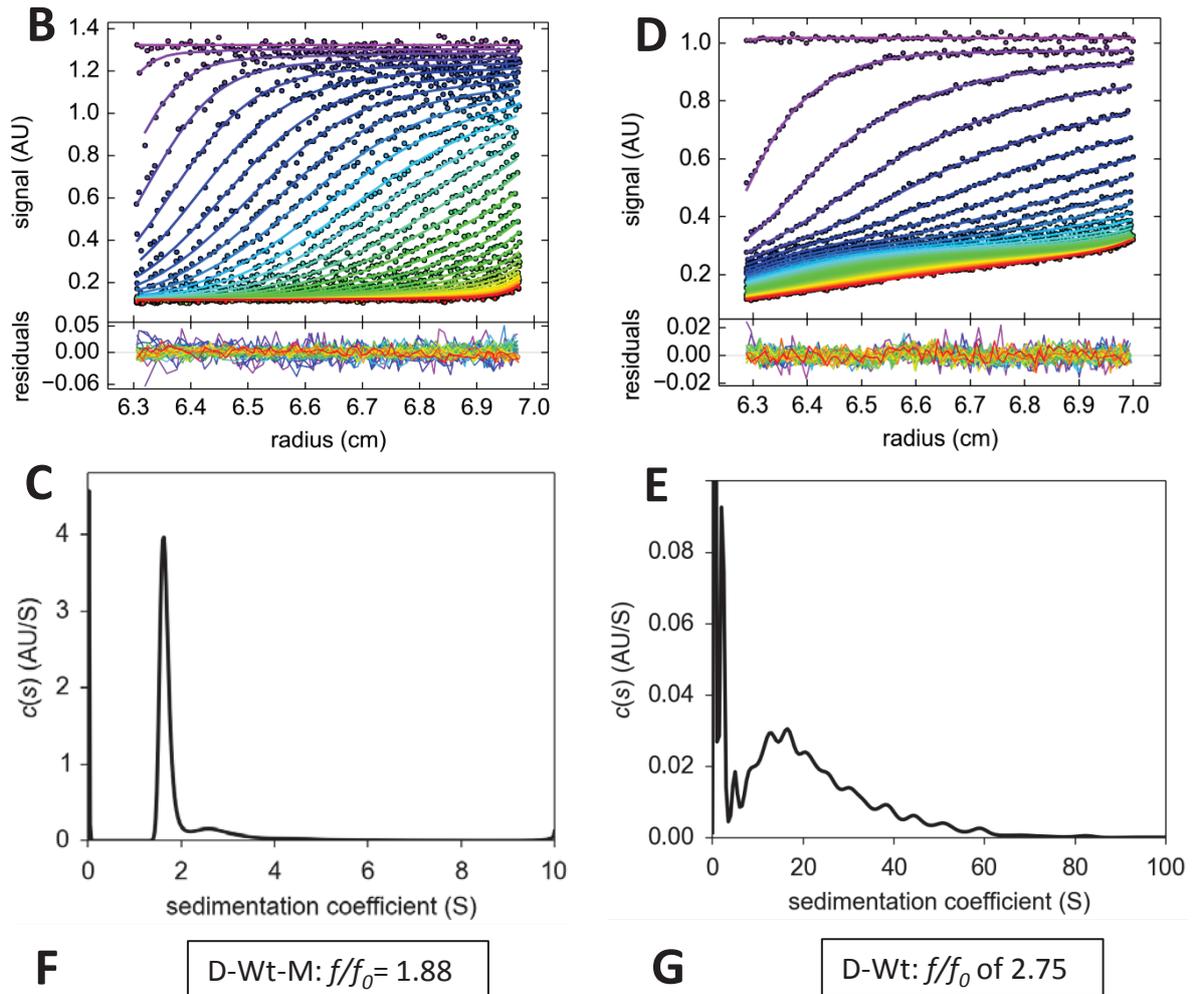


Abbildung 3.8: Analyse von D-Wt mittels AUZ zur Validierung der SEC und erster Hinweise zur Form. (A) Semipräparative SEC (Superdex 200 HR 10/30; Flussrate $0,3 \text{ ml min}^{-1}$) der SEC Fraktion D-Wt-O₁, um den Zerfall von D-Wt-O₁ zu D-Wt-M nach 20 h überprüfen. Datenfit der sedimentierenden Proteine der (B) D-Wt-M Analyse in einem Beckman An-60 Ti Rotor bei 20°C, 230 nm und 40.000 Upm nach 4 h 45 min und der (D) D-Wt Analyse in einem Beckman An-50 Ti Rotor bei 20°C, 280 nm und 20.000 Upm nach 4 h 45 min. Durch AUZ beobachtete Größenverteilung in Form des Sedimentationskoeffizienten (S) von (C) D-Wt-M und (E) D-Wt. Darüber hinaus konnte aufgrund der experimentell ermittelten S-Werte für D-Wt-M und D-Wt der f/f_0 -Wert mittels SEDFIT errechnet werden. (F) Für D-Wt-M lag der f/f_0 -Wert bei 1,88 (G) für D-Wt bei 2,75.

3.1.2.2 Rekombinantes D-Mt hat Anzeichen einer länglichen Form und zeigte in der AUZ eine ähnlich geringe Ausbildung von Oligomeren wie in der SEC

Eine Überprüfung der Stabilität von D-Mt-O₁ mittels semipreparativer SEC, wie für D-Wt-O₁ beschrieben (Abbildung 3.8 A), konnte aufgrund der geringen Menge an D-Mt-O₁ nicht durchgeführt werden. Nach OCR von D-Mt auf $3,1 \text{ mg ml}^{-1}$ (Abbildung 3.5 B) wurde daher direkt die AUZ durchgeführt.

Um D-Mt-M in der Auftrennung identifizieren zu können, wurde zeitgleich eine AUZ mit dieser durch vorherige SEC gewonnenen Probe durchgeführt (Abbildung 3.5 A). Der Wert

3 Ergebnisse

von 1,5 S für D-Mt-M konnte aufgrund der hohen Homogenität der Probe über die Software SEDFIT in das Molekulargewicht umgerechnet werden. Die berechneten 22,5 kDa legten nahe, dass es sich hierbei um ein Monomer handelte (vergleiche Abbildung 3.8 C und Abbildung 3.9 B mit Abbildung 3.4 F). Darüber hinaus konnte ein f/f_0 -Wert von 1,94 berechnet werden (Abbildung 3.9 E).

D-Mt-O (46,79 % von D-Mt) zeigte nach der AUZ eine Verteilung von 8 - 23 S mit einem Mittel von 10,23 S. Der Anteil an Oligomeren, insbesondere von Oligomeren mit einem großen S-Wert, ist damit für D-Mt deutlich geringer als für D-Wt (vergleiche Abbildung 3.9 C und D mit D-Wt Abbildung 3.8 C und D). Der f/f_0 -Wert von 2,75 legte nahe, dass es sich wie bei D-Wt um längliche, stabförmige Oligomere handelte (vergleiche Abbildung 3.9 F mit D-Wt Abbildung 3.8 F).

Da der f/f_0 -Wert für das gesamte Gemisch von D-Wt-O/D-Wt-M und D-Mt-O/D-Mt-M berechnet werden musste, kann er lediglich einen Hinweis auf die Form geben. Die f/f_0 -Werte der Monomere sind kleiner als die der Monomer/Oligomere Gemische. Das legt für D-Wt und D-Mt jedoch nahe, dass die Oligomere beider Proteine deutlich länglicher sind als die Monomere. Da es sich bei den Proben um sehr inhomogene Gemische handelte, ist die Aussagekraft jedoch begrenzt. Zur genaueren Analyse wurde daher im Folgenden eine Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) durchgeführt.

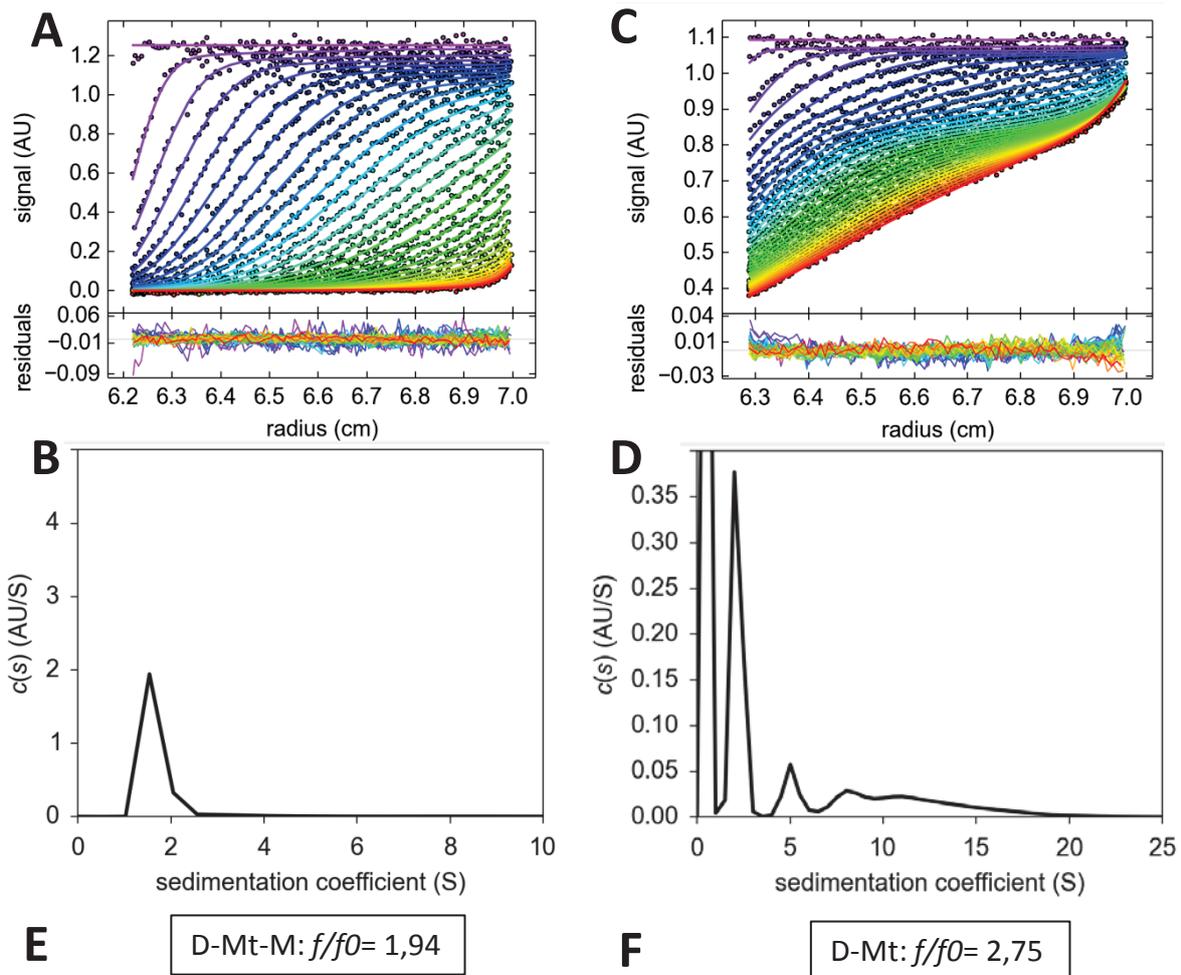


Abbildung 3.9: Analyse von D-Mt mittels AUZ zur Validierung der SEC und erster Hinweise zur Form.

Datenfit der sedimentierenden Proteine der (A) D-Mt-M Analyse in einem Beckman An-60 Ti Rotor bei 20°C, 230 nm und 40.000 Upm nach 4 h 45 min und der (C) D-Mt Analyse in einem Beckman An-50 Ti Rotor bei 20°C, 280 nm und 20.000 Upm nach 4 h 45 min. Durch AUZ beobachtete Größenverteilung in Form des S-Wertes von (B) D-Mt-M und (D) D-Mt. Darüber hinaus konnte aufgrund der experimentell ermittelten S-Werte für D-Mt-M und D-Mt der f/f_0 -Wert mittels SEDFIT errechnet werden. (E) Für D-Mt-M lag der f/f_0 -Wert bei 1,94 (F) für D-Mt bei 2,75.

3.1.3 Darstellung rekombinanter Pmps mittels TEM

Aufgrund der mittels SEC und AUZ ermittelten Größe der Oligomere, sollte eine genaue Identifizierung der Form rekombinanter Pmps mittels TEM (Kapitel 2.2.7.3) sehr gut möglich sein. Die Proben wurden hierzu auf Kohlenstoff-Formvar beschichteten Kupfer-Netzchen mit 1% Uranylacetat kontrastiert. Hierbei lagert sich das Uranylacetat um die Pmp-Strukturen herum und ermöglicht nach Durchdringen des Elektronenstrahls eine Negativabbildung. Da es sich bei den Monomeren jedoch um extrem kleine Strukturen handelt, war es sehr wahrscheinlich, dass diese in der TEM nicht aufgelöst werden können.

3.1.3.1 Rekombinantes Pmp21 bildet überwiegend längliche Protofibrillen aber auch globuläre Oligomere aus

Es wurden exemplarische Fraktionen als potentiell hochmolekulare Oligomerfraktionen mit O_{1-3} und V_0 bezeichnet. Die experimentell bestätigten Monomere wurden mit M bezeichnet. Die Bezeichnungen der exemplarischen Fraktionen entspricht den Elutionsvolumina der exemplarischen Fraktionen von D-Wt-O und M. Die untersuchten Fraktionen der *C. pneumoniae* Pmps entstammen der in den vorherigen Kapiteln beschriebenen SEC. Es wurden die exemplarischen Fraktionen von N-M-Pmp21 (N-M-Pmp21- O_1 und O_3), M-Pmp21 (M-Pmp21- O_1 und O_3), D-Wt (D-Wt- O_{1-3} und D-Wt-M), D-Mt (D-Mt- O_{1-3} und D-Mt-M), A-Wt (A-Wt- O_1 , II und III), A-Mt (A-Mt- V_0 und A-Mt- O_1) aus *C. pneumoniae* sowie PmpA und PmpC aus *C. trachomatis* Serovar E untersucht. PmpA und PmpC wurden untersucht, da sie die Homologe von Pmp19 und Pmp20 aus *C. pneumoniae* darstellen. Es sollte dadurch nicht nur untersucht werden, ob Pmps aus unterschiedlichen Stämmen die gleichen Strukturen ausbilden, sondern gleichzeitig, ob andere Familienmitglieder eines anderen Stammes die gleichen Strukturen ausbilden.

PmpA und PmpC aus *C. trachomatis* Serovar E wurde hierzu rekombinant exprimiert und *E. coli* mit dem gleichen denaturierenden PA1 wie alle anderen Pmp-Fragmente lysiert. Das Lysat wurde anschließend denaturiert mittels Affinitätschromatographie (*affinity purification*) aufgereinigt (Kapitel 2.2.5.6.2). Die Rückfaltung der Proteine erfolgte entweder mittels Dialyse in PBS +200 mM Arginin (PmpA) oder durch Dialyse in PBS (PmpC). Dies diente der Überprüfung, ob die Ausbildung bestimmter Strukturen ausschließlich bei der für Pmp21 verwendeten Renaturierungsmethode OCR entstehen. Beide Proben wurden per Coomassie gefärbter SDS-PAGE und Western Blot auf nahezu 100 %ige Reinheit überprüft (Abbildung 3.10).

Alle potentiell hochmolekularen O_1 Fraktionen sowie PmpA und PmpC zeigten deutlich längliche Strukturen, mit Längen zwischen 102,78 - 46,9 nm, wie sie für amyloide Protofibrillen beschrieben sind (vergleiche Abbildung 1.8 mit Abbildung 3.11) (243). Die M-Pmp21- O_1 Protofibrillen schienen Ansammlungen zu bilden, an denen sie sich verzweigten. Darüber hinaus schienen die Protofibrillen teilweise aus kleineren globulären Segmenten aufgebaut zu sein, die bei PmpA auch separat von den Protofibrillen vorlagen (Abbildung 3.12).

3 Ergebnisse

Die beobachteten Protofibrillen verkürzten sich, je später die Pmps in der SEC (Kapitel 3.1.1) eluierten. Die Fraktionen M-Pmp21-O₃, D-Wt-O₃ und D-Mt-O₃ enthielten fast ausschließlich nur noch kleinere, globuläre Oligomere (Abbildung 3.11).

Die Monomerfraktionen (D-Wt-M und D-Mt-M) sowie die Negativkontrolle (H₂O) zeigten keinerlei Strukturen. Das war für alle drei Proben zu erwarten. Insbesondere steht es nicht im Widerspruch zu den mittels SEC-MALS und AUZ bestimmten Monomeren. Es war nicht zu erwarten, dass 23 kDa große Monomere in der TEM erkennbar sind. Die Oberfläche der *C. pneumoniae* Zellen wurde untersucht, um eine Evidenz der protofibrillären Oligomere *in vivo* zu bekommen. Auf der Oberfläche waren keine abstehenden Protofibrillen erkennbar (Abbildung 3.11).

Die nicht mutierten Pmps erzeugten insgesamt betrachtet eine breite Streuung ähnlich langer Oligomere. Jedoch hoben sich M-Pmp21-O₁, D-Wt-O₁ und PmpC mit 276,37 nm, 278,4 nm und 298,33 nm von den anderen ab, indem sie vereinzelt die längsten Oligomere ausbildeten. Die Mutanten von Pmp21-A und Pmp21-D unterscheiden sich deutlich in ihrer Ausbildung länglicher Proteinoligomere. Während A-Mt stabförmige Oligomere ausbildete, die in Länge (maximal 940 nm) und Form denen von Amyloidfibrillen ähnelten, kam es bei D-Mt nicht zu einer Bildung dieser Strukturen (vergleiche Abbildung 1.8 mit Abbildung 3.11) (228). A-Mt unterschied sich zusätzlich insofern, dass die Amyloidfibrillen in der Probe zwar stark unterrepräsentiert waren, die protofibrillenartigen Oligomere jedoch so stark ineinander verwunden waren, dass sie nicht messbar waren (Abbildung 3.12 A).

Die Breiten der Oligomere zeigten sich als konstanter über die unterschiedlichen Pmps als die Längen. Zwar gab es kleinere Ausreißer zu verzeichnen, aber im Mittel lagen alle zwischen 9,5 und 11 nm (Abbildung 3.12 B).

Wie zu Beginn dieser Arbeit erwähnt, konnten in der Pmp21 Sequenz zahlreiche amylogene Regionen entdeckt werden (Kapitel 3.1). Die hier mittels TEM analysierten Oligomere zeigten starke morphologische Ähnlichkeit zu amyloiden Protofibrillen. Daher wurde als nächstes mit Hilfe amyloidspezifischer Farbstoffe untersucht, ob es sich bei ausgewählten Abschnitten von Pmp21 um amyloide Proteine handeln kann.

3 Ergebnisse

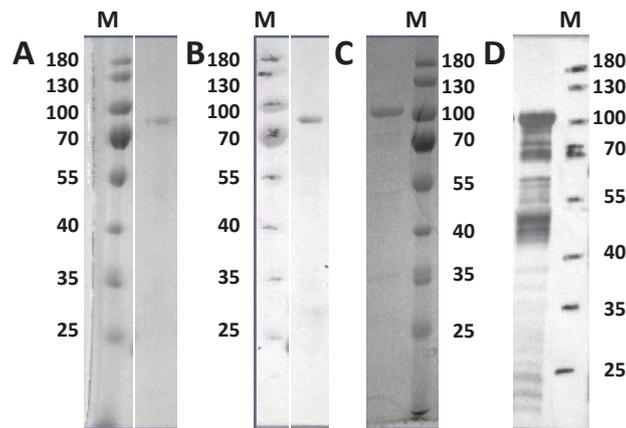
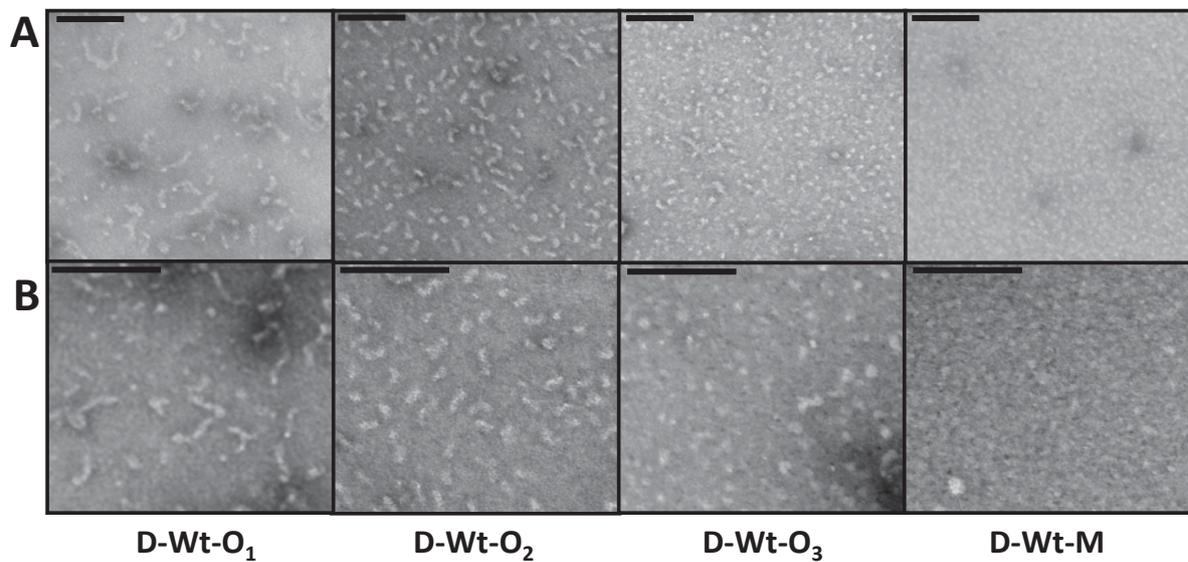
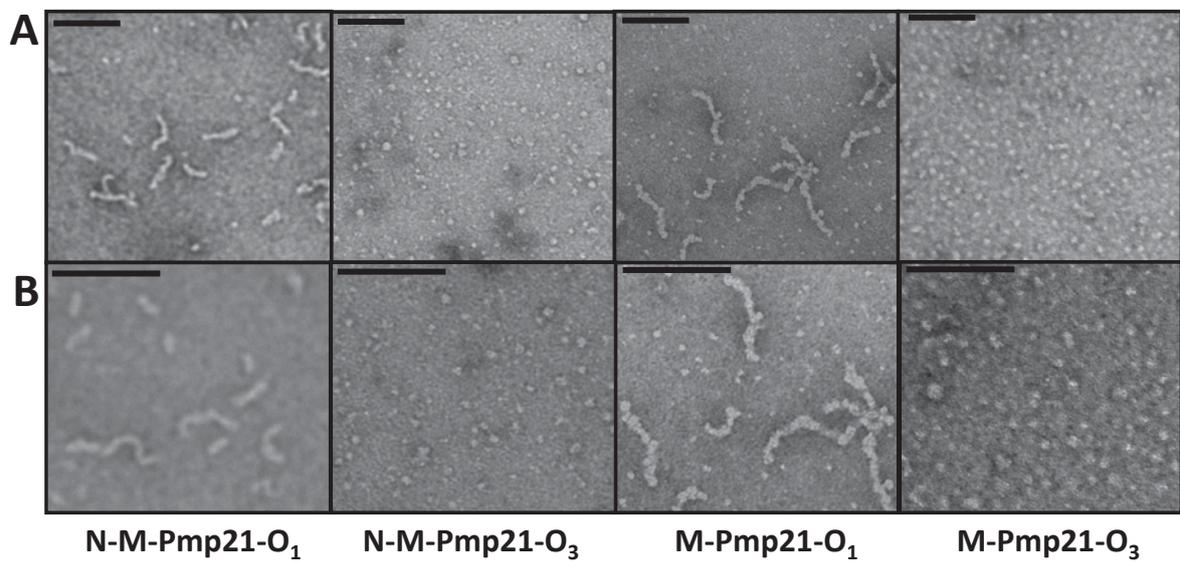
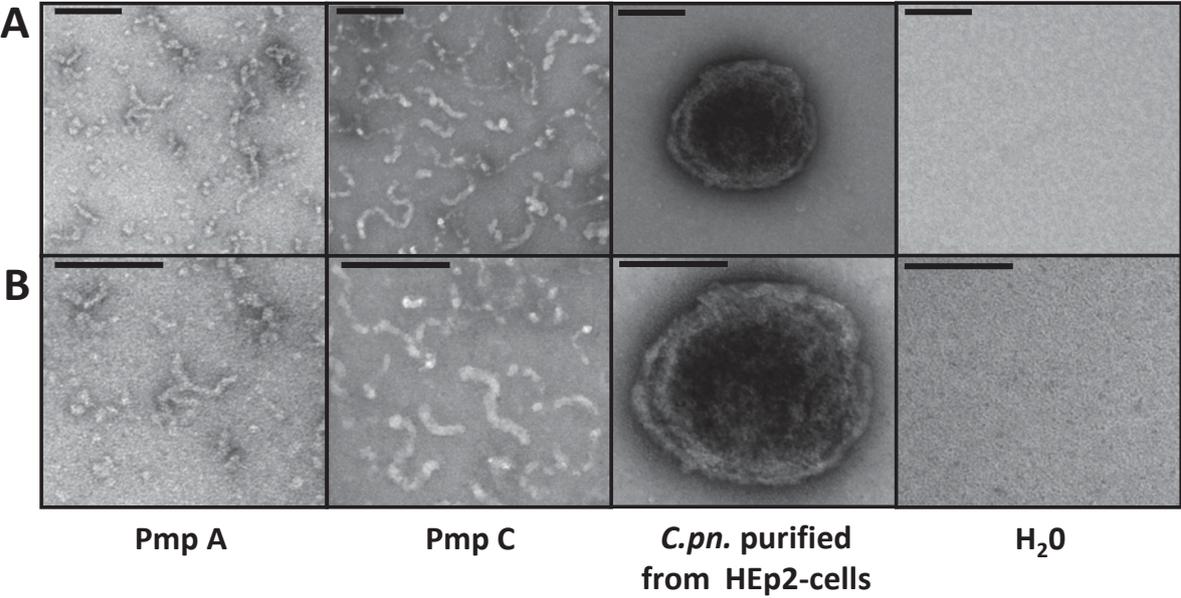
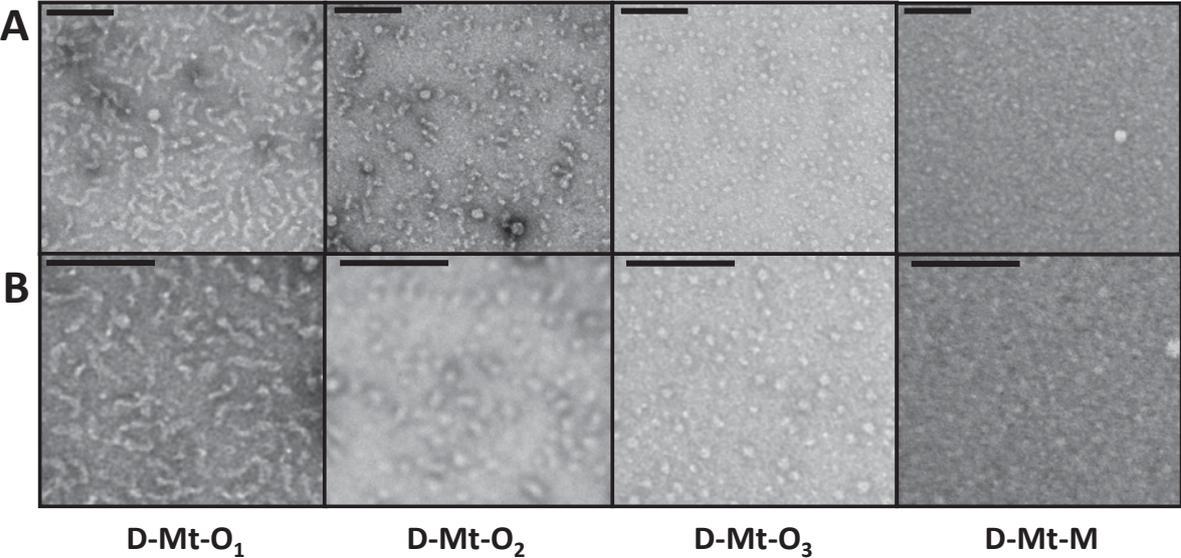


Abbildung 3.10: Überprüfung der Reinheit von PmpA und PmpC aus *C. trachomatis* E.

(A und C) Coomassie gefärbte SDS-PAGE von PmpA und PmpC. (B und D) Western Blot und anschließende Detektion durch Anti-His Antikörpern von PmpA und PmpC.





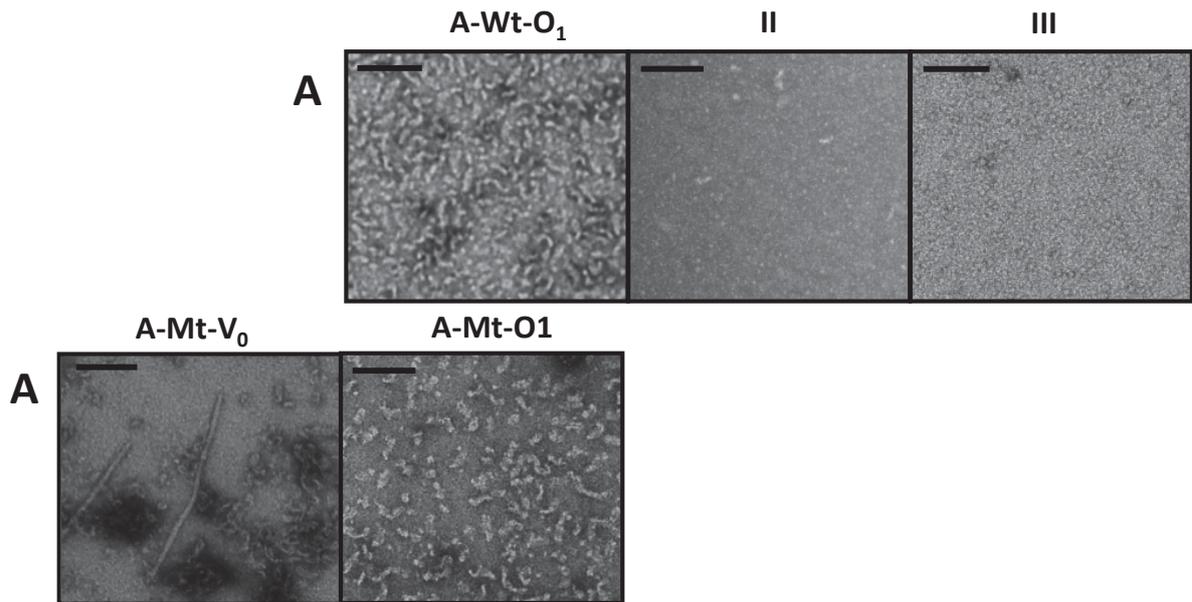
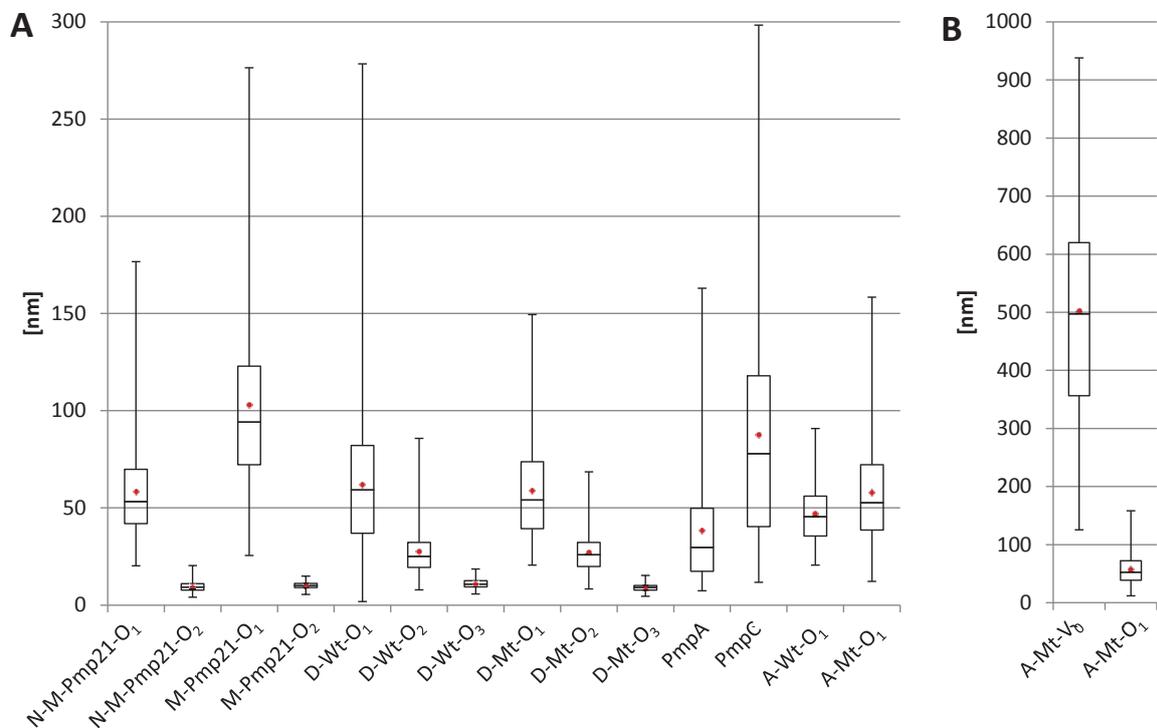


Abbildung 3.11: Pmp21 bildet profibrillären und globuläre Strukturen aus.

TEM (80 kV) von 1 μ M Lösungen von Pmps. Die Proben wurden nach SEC und semipräparativer SEC sowie PmpA und PmpC direkt nach Dialyse aufgetragen. Außerdem wurden gradientengereinigte *C. pneumoniae* Zellen (Kapitel 2.1.12.1) aufgetragen. Als Negativkontrolle diente H₂O. Die Proben wurden bei (A) 50.000 x Vergrößerung und (B) 85.000 x Vergrößerung analysiert (Größenstandard = 100 nm). Die Proben wurden auf Kohlenstoff-Formvar beschichteten Kupfernetzchen mit 1% Uranylacetat kontrastiert. Die Bilder sind repräsentativ für das gesamte Netzchen (n= 2).



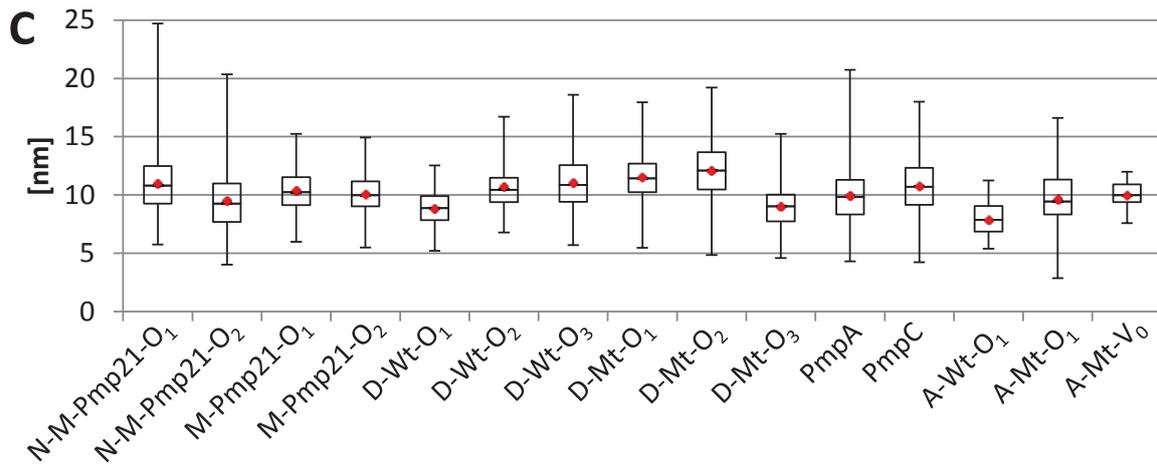


Abbildung 3.12: Pmps bilden protofibrilläre und globuläre Strukturen vergleichbarer Größen aus.

Die Quantifizierung der Länge und Breite von jeweils 300 Strukturen (40 Strukturen von A-Mt-V₀) wurde mit ImageJ durchgeführt und mittels Boxplots dargestellt. Die Boxplots stellen Maxima (oberer *whisker*), 1., 2., 3. Quantil, Minima (unterer *whisker*) sowie den Mittelwert (rote Raute) dar. Länge (A+B) und Breite (C) aller in der TEM analysierten Pmps.

3.1.4 Nachweis amyloider Pmp21 Protofibrillen mittels spezifischer Farbstoffe

Der Nachweis amyloider Protofibrillen ist, neben der länglichen Morphologie, die Protofibrillen besitzen und die gut im TEM zu beobachten ist, durch die Interaktion mit bestimmten Farbstoffen möglich. Dazu zählen die spezifischen Interaktionen mit den zwei klassischen Farbstoffen Thioflavin T (ThT) (Kapitel 2.2.5.14.1) (337) und Kongorot (CR) (Kapitel 2.2.5.14.2) (338).

ThT ist positiv und CR negativ geladen. Daraus erwuchs die Vermutung, dass beide Farbstoffe an unterschiedlichen Stellen binden (337,338) Außerdem ersetzen sie sich nicht gegenseitig bei der Bindung an prototypisches Amyloid β_{42} ($A\beta_{42}$). Dies suggeriert ebenfalls unterschiedliche Bindestellen (339). Daraus resultiert, dass die Farbstoffe als zueinander komplementär bezeichnet werden können.

Um den Nachweis zu bringen, dass es sich bei den im TEM analysierten Oligomeren von Pmps (Kapitel 3.1.3) um geordnete Strukturen und somit um die derzeit einzigen bekannten amyloiden Proteine von Chlamydien handeln könnte, wurden SEC-Fractionen (Kapitel 3.1.1) für Analysen mit den eben genannten Farbstoffen verwendet.

Aufgrund der Problematik, dass es bei einer Aufkonzentrierung der rekombinanten Pmps zu einer Aggregation, bis hin zur Präzipitation kam, konnten nur Fractionen verwendet werden, die bereits in einer Konzentration von mindestens 10 μ M während der SEC eluierten. Dies

3 Ergebnisse

traf lediglich auf die Fraktionen M-Pmp21-O₁, D-Wt-O₁, D-Wt-O₂ und D-Wt-M zu, die im Folgenden mittels ThT-Assay und CR-Absorption untersucht wurden.

3.1.4.1 Pmp21 Protofibrillen haben eine Amyloid-spezifische Thioflavin T Fluoreszenz

ThT ist ein Benzotiazol-Salz. Bei der Bindung an amyloide und amyloid-ähnliche Strukturen kommt es zu einer Konformationsveränderung des Farbstoffes. Diese verursacht die charakteristische Fluoreszenzerhöhung und eine bathochrome Verschiebung der Emissionswellenlänge (337,340,341). Es wurde postuliert, dass ThT orthogonal zu den β -Faltblättern (β -sheets) bindet (342). Für Pmp21 wurden in dieser Arbeit Tertiär- und Sekundärvorhersagen durchgeführt, die zahlreiche β -sheets vorhersagen (Abbildung 3.1 und Abbildung 3.23 B).

Für die Analyse mittels ThT-Fluoreszenz wurden Lösungen von 10 μ M der Negativkontrolle BSA, der Positivkontrolle A β ₄₂, sowie D-Wt-M, D-Wt-O₂, D-Wt-O₁ und M-Pmp21-O₁ bei 37°C inkubiert. Die emittierte Fluoreszenz bei 484 nm erreichte nach 22 h nahezu eine Sättigung (Abbildung 3.13). Daher wurde dieser Zeitpunkt zur Bestimmung der finalen Werte verwendet.

Die finalen Werte (n=3) wurden gegenüber gestellt und bezüglich ihrer Signifikanz ausgewertet. PBS und BSA zeigten mit 46,3 \pm 0,8 und 82,9 \pm 1,9 relativen Fluoreszenzeinheiten (*relative fluorescent units*, RFU) fast keine Fluoreszenz bei 480 nm. Im Gegensatz dazu hatte die Positivkontrolle A β ₄₂ eine stark erhöhte Fluoreszenz von 2392,9 \pm 224,3 RFU. Die Protofibrillen von D-Wt-O₁ und M-Pmp21-O₁ hatten jeweils eine RFU von 3270,25 \pm 130,5 und 4601,8 \pm 303,4 und überschritten A β ₄₂ deutlich. Da es sich bei D-Wt-O₂ um die kürzesten Protofibrillen handelte besaßen diese lediglich eine RFU von 2788 \pm 170,7. Das Monomer D-Wt-M hatte hingegen mit 1415,1 \pm 57,7 RFU wie erwartet die geringste RFU der untersuchten Pmp-Fragmente (Abbildung 3.14).

Alle untersuchten Protofibrillen von Pmp21 hatten eine RFU, die größer als die von A β ₄₂ war. Allerdings musste bei diesem Vergleich berücksichtigt werden, dass equimolare Mengen von A β ₄₂ und Pmp21 eingesetzt wurden und nicht gleiche Massen, wobei die Pmp21-Fragmente 5 - 10 mal länger waren. Aufgrund der oben erwähnten Tatsache, dass die eingesetzten Massen sich unterschieden, lässt sich vermuten, dass Pmp21 weniger ThT-Bindungsstellen hat als A β ₄₂. Es konnte jedoch trotzdem eindeutig gezeigt werden, dass Pmp21 amyloide Strukturen ausbildet.

3 Ergebnisse

Durch die Analyse der Proteine mittels ThT-Fluoreszenz konnten die Protofibrillen der Pmp21 Fragmente als amyloide Proteine identifiziert werden. Erwartungsgemäß nahm die Fluoreszenz mit der Länge der Oligomere zu.

Um durch einen anderen Farbstoff zu bestätigen, dass es sich bei den Pmp21 Oligomeren um amyloide Protofibrillen handelt, wurde eine Absorptionsmessung mit Kongorot (CR) durchgeführt.

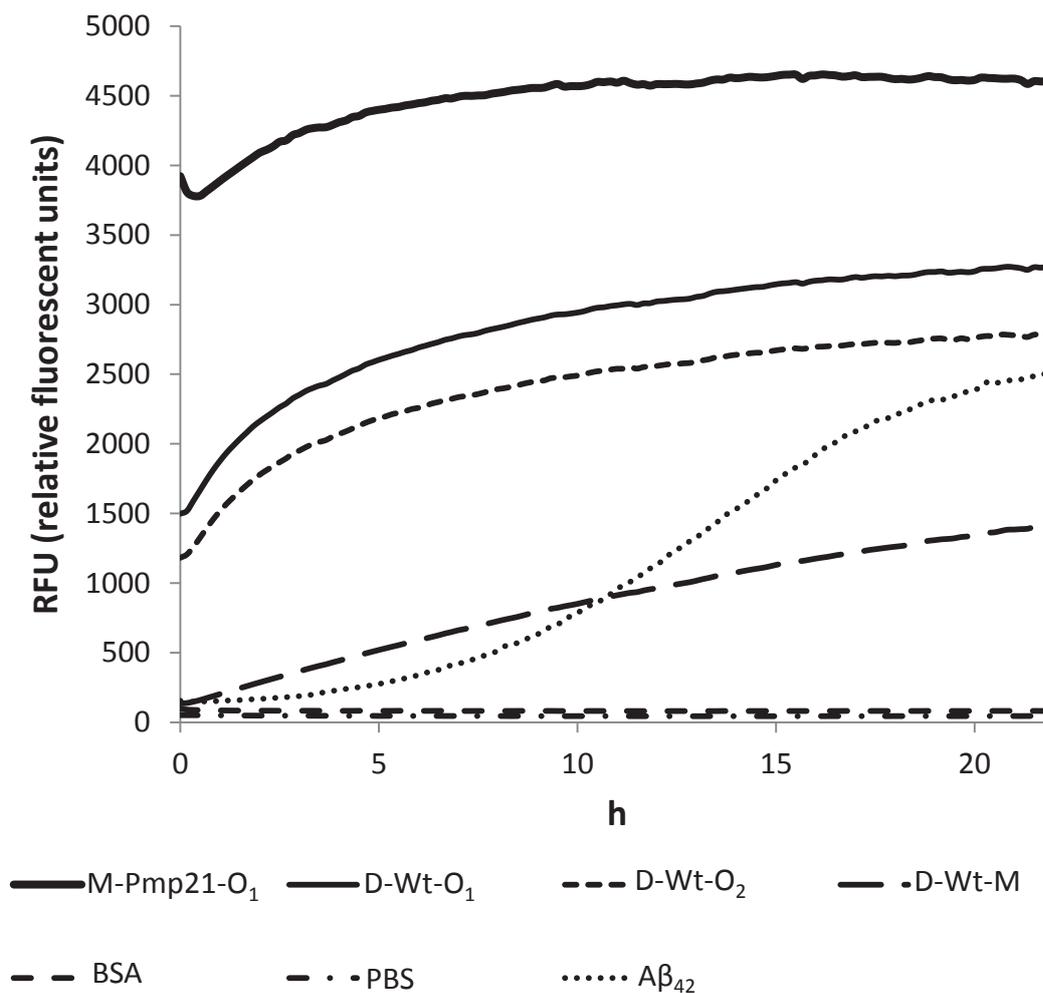


Abbildung 3.13: Die ThT-Fluoreszenz hat nach 22 h ihr Maximum erreicht.

Die Fluoreszenz wird bei 442 nm im Infinite 200 pro-Plattenlesegerät (Tecan) angeregt und die Emission bei 484 nm gemessen. Gemessen wurde die RFU von PBS sowie 10 μ M Lösungen der angegebenen Proteine bei 37°C über einen Zeitraum von 22 h bei 484 nm. BSA wurde als Negativkontrolle verwendet, A β_{42} als Positivkontrolle. Die Kurven stellen typische Ergebnisse von 3 Messungen dar.

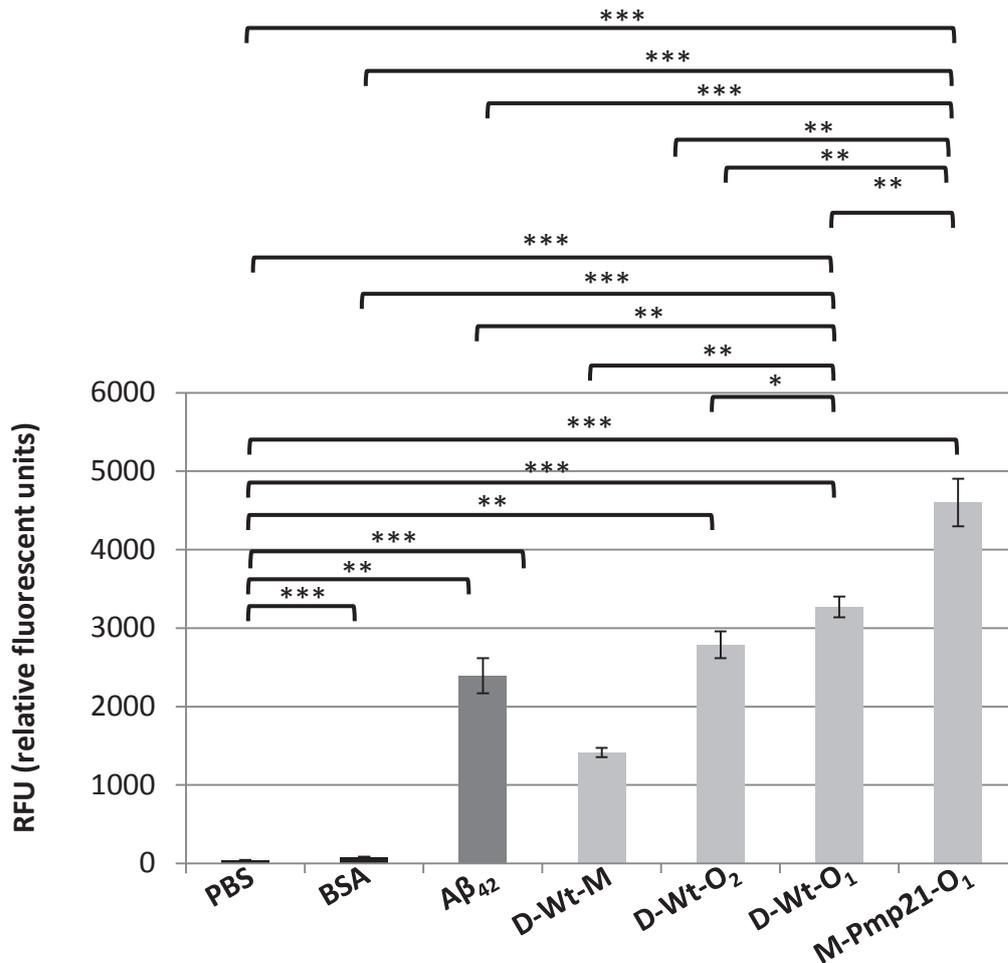


Abbildung 3.14: Die ThT-Fluoreszenz von Pmp21 zeigt ein eindeutiges Signal amyloider Proteine.

Gemessen wurde die RFU von PBS sowie 10 μ M der angegebenen Proteine bei 37°C über einen Zeitraum von 22 h bei 484 nm. BSA wurde als Negativkontrolle verwendet, A β ₄₂ als Positivkontrolle (n=3). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen nach 22 h. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit Student's T-test ermittelt.

3.1.4.2 Pmp21 Protofibrillen können Amyloid-spezifisch mit CR gefärbt werden.

Als weiterer spezifischer Nachweis für Amyloide wurde die Spektralverschiebung der CR Absorption nach Inkubation mit Protein durchgeführt. Die Bindungsinteraktionen zwischen CR und amyloiden Proteinen hängen von der amyloidspezifischen β -sheet-Struktur ab (343). Die genaue CR-Amyloid Struktur konnte allerdings nie gezeigt werden. CR ist ein Azofarbstoff, der eine breite Anwendung beim histologischen *post mortem* Nachweis der Alzheimerischen Erkrankung und somit amyloider Strukturen findet (344).

Für die Analyse mittels CR-Absorption wurden 10 μ M Lösungen der Positivkontrolle A β ₄₂, D-Wt-M, D-Wt-O₂, D-Wt-O₁ und M-Pmp21-O₁ bei 20°C für 30 min in PBS +CR inkubiert. Das typische Absorptionsspektrum von der Kontrolle CR in PBS zeigte ein ausgeprägtes Maximum bei 490 nm und 0,57 AU. Die CR-Absorption der Positivkontrolle A β ₄₂ zeigte im Vergleich zur

3 Ergebnisse

Negativkontrolle eine bathochrome Verschiebung des Maximums auf 500 nm und durch den hyperchromen Effekt von Amyloiden eine Erhöhung auf 0,63 AU. Das A β ₄₂ Maximum hatte außerdem eine für Amyloide typische leichte Schulter bei ca. 541 nm. D-Wt-M zeigte keine bathochrome Verschiebung des Maximums jedoch eine leichte Verschiebung der Kurve. Außerdem hatte D-Wt-M den geringsten hyperchromen Effekt, mit einer Erhöhung auf 0,605 AU. Die Proben D-Wt-O₁ und D-Wt-O₂ zeigten beide eine bathochrome Verschiebung des Maximums auf 500 nm und 502 nm. Zusätzlich wurden Schultern detektiert, die wie bei A β ₄₂ bis zu 541 nm reichten. Der hyperchrome Effekt fiel mit einer Erhöhung auf 0,65 AU bei D-Wt-O₁ größer aus, als bei A β ₄₂. Für D-Wt-O₂ war mit einer AU von 0,67 eine Erhöhung zu D-Wt-M zu beobachten. D-Wt-O₂ absorbiert damit jedoch immernoch geringer als A β ₄₂. M-Pmp1-O1 zeigte, mit einer Verschiebung der Wellenlänge auf 541 nm, eine ebenso starke bathochrome Verschiebung wie A β ₄₂. Jedoch lag mit 0,58 AU kaum hyperchromer Effekt vor (Abbildung 3.15).

Die gemessenen CR-Absorptionsspektren mit und ohne A β ₄₂ haben eine Übereinstimmung mit den publizierten Spektren (326,327). Allerdings ist der hyperchrome Effekt in der Literatur bei einer Verwendung von 20 μ M A β ₄₂ mit einer Erhöhung um 0,2 AU beschrieben. Der in der vorliegenden Arbeit begrenzte hyperchrome Effekt lässt sich teilweise durch erklären, dass die Probenkonzentration aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von D-Wt und Pmp21 auf 10 μ M limitiert werden musste.

Dennoch konnten durch die Analyse der Proteine mittels CR eindeutig Effekte gezeigt werden, wie sie bei amyloiden Proteinen auftreten. Die Absorption und Größe der bathochromen Verschiebung nahm erwartungsgemäß mit der Länge der Oligomere zu. Die Ergebnisse der ThT-Fluoreszenz konnten bestätigt werden. Zusammenfassend kann man feststellen, dass durch zwei, an unabhängige Stellen amyloider Strukturen bindende Farbstoffe gezeigt wurde, dass Pmp21 Protofibrillen amyloide Eigenschaften besitzen.

Die SEC-Analysen aus Kapitel 3.1.1.3 und 3.1.1.4 legten nahe, dass die Oligomerbildung von der An- oder Abwesenheit der FxxN Motive abhängt. Um zu untersuchen, wie stark die Ausbildung der Oligomere bei D-Wt und D-Mt von der Proteinkonzentration abhängig ist, wurden im Folgenden Renaturierungsexperimente mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen durchgeführt.

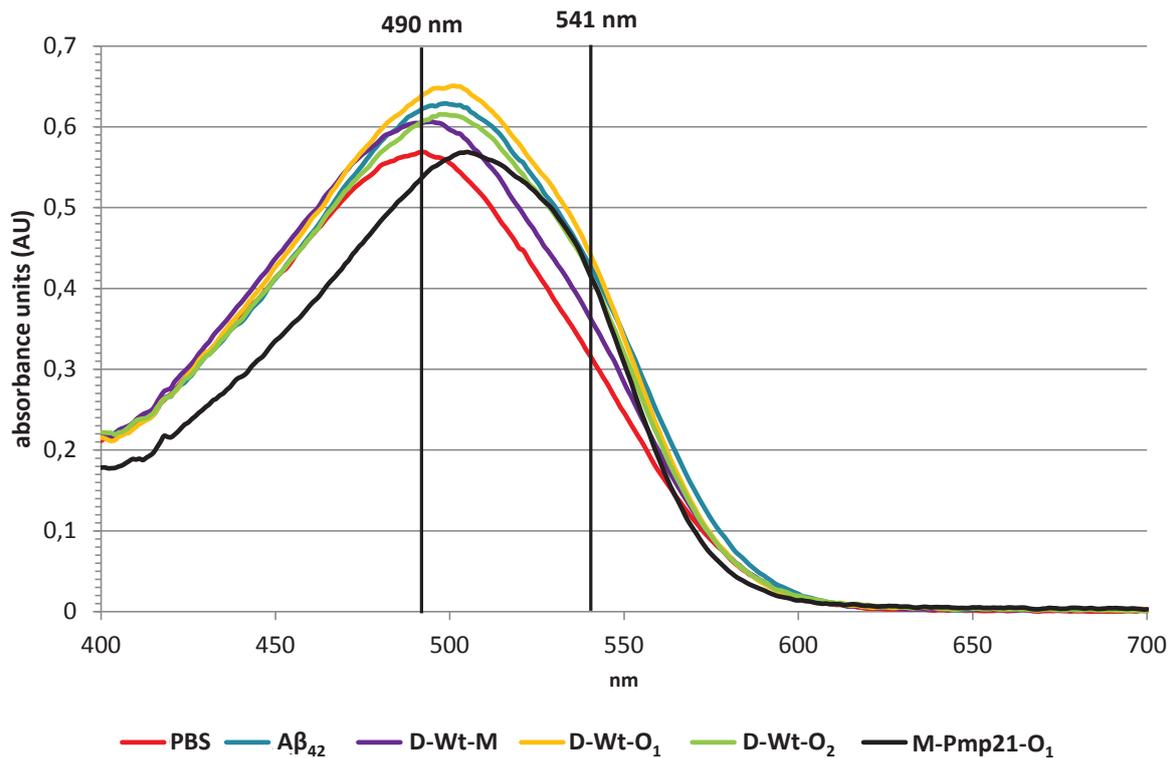


Abbildung 3.15: Die CR-Färbung von Pmp21 zeigt ein Signal amyloider Proteine.

Gemessen wurde die Absorption (*absorbance units*; AU) von PBS sowie 10 μM Lösungen der angegebenen Proteine bei 20°C. Nach Inkubation von 30 min, erfolgte die Messung über ein Spektrum von 400 bis 700 nm. A β_{42} wurde als Positivkontrolle verwendet. Die abgebildeten Spektren sind typisch für die jeweiligen Proteine (n=2).

3.1.5 Das Pmp-charakteristische FxxN Motiv führt zu einer erhöhten Ausbildung von Oligomeren

In früheren Arbeiten wurde herausgefunden, dass eine Mutation des FxxN Motivs in D-Wt zu SxxV (D-Mt) zu Verlust der adhäsiven Eigenschaften führt (73). Daher sollte nun untersucht werden, ob die FxxN Motive einen strukturgebenden Einfluss auf D-Wt haben und die Oligomerausbildung unabhängig von der Proteinkonzentration begünstigen. Dafür wurden D-Wt und D-Mt bei vier verschiedenen Konzentrationen mittels OCR (Kapitel 2.2.5.6.1) renaturiert (0,7, 1,7, 2,4 und 3,1 mg ml^{-1}) und anschließend in der SEC (Kapitel 2.2.5.7.1) untersucht. Um die relative Oligomerausbildung (D-Wt-O/D-Mt-O) zu vergleichen, wurde die Absorption jedes Monomerpeaks gleich 1 gesetzt (Abbildung 3.16).

Bei einer Konzentration von 0,7 mg ml^{-1} wurde D-Wt bereits zu 22% als D-Wt-O eluiert. Im Gegensatz hierzu bildete D-Mt nur 4% D-Mt-O. Durch Erhöhung der Proteinkonzentration auf 1,7 mg ml^{-1} wurde D-Wt-O auf 53% erhöht, während D-Mt nicht mehr als 5% D-Mt-O ausbildete. Eine Konzentrationserhöhung auf 2,4 mg ml^{-1} erhöhte die D-Wt-O Bildung nur

3 Ergebnisse

auf 57%. Im Gegensatz dazu wurde die D-Mt-O Bildung vierfach auf 21% erhöht. Bei der finalen Konzentration von $3,1 \text{ mg ml}^{-1}$ wurde D-Wt-O auf 62% erhöht, während D-Mt-O lediglich auf 28% erhöht wurde (Abbildung 3.16).

Anhand dieser Daten konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Oligomerausbildung zwar nicht gänzlich durch das FxxN Motiv determiniert war. Es trug jedoch zu einer bemerkenswert erhöhten Ausbildung bei.

Um strukturell zu untersuchen, ob sich die Oligomere und Monomere von D-Wt und D-Mt voneinander unterscheiden, wurden im Folgenden Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie durchgeführt.

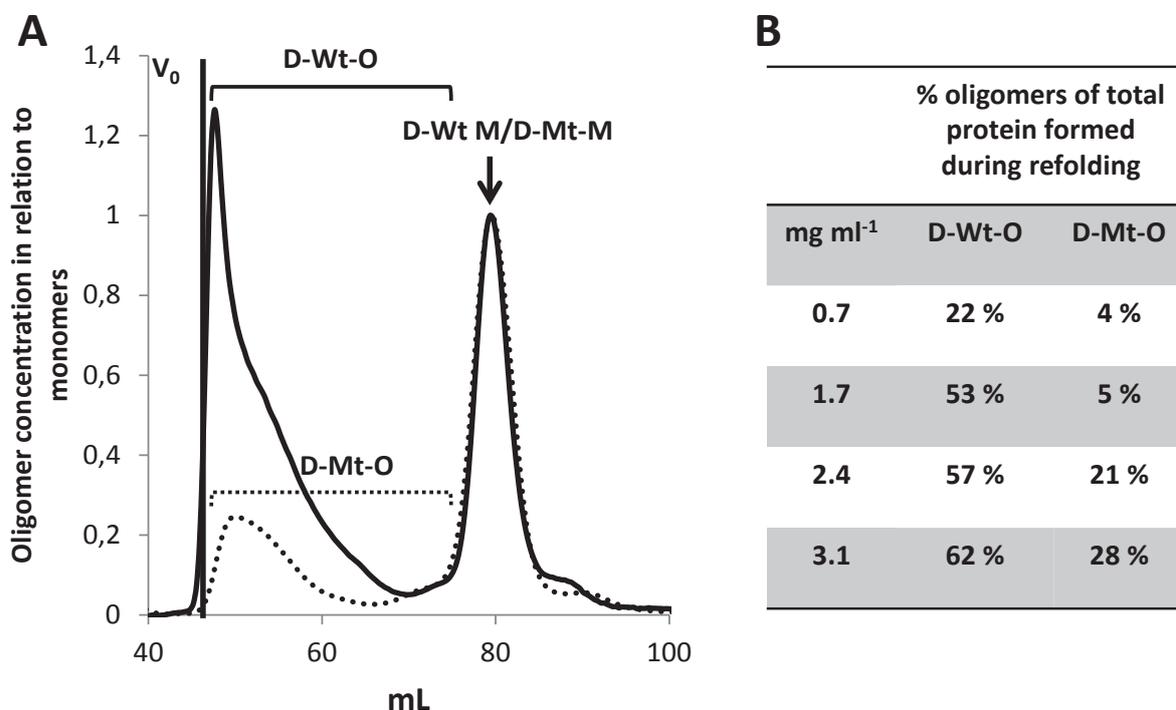


Abbildung 3.16: Das FxxN Motiv führt zu einer bemerkenswert erhöhten Ausbildung von D-Wt-O.

(A) D-Wt (durchgezogene Linie) und D-Mt (gepunktete Linie) wurden zu einer Konzentration von $3,1 \text{ mg ml}^{-1}$ rückgefaltet und der Anteil ausgebildeter Oligo- und Monomere (*oligomer concentration in relation to monomers*) durch präparative SEC (HiLoad 16/600 Superdex 200 pg) bestimmt. Zum Vergleich der relativen Oligomerausbildung wurde der Monomerpeak gleich 1 gesetzt. (B) Relative Oligomerausbildung von D-Wt und D-Mt nach Renaturierung auf distinkte Proteinkonzentrationen (*oligomers of total protein formed during refolding*) (n=2).

3.1.6 Die aufgrund des FxxN Motivs verstärkt gebildeten Oligomere unterscheiden sich durch eine β -sheet-reichere Sekundärstruktur von den Monomeren

Für M-Pmp21 wurde eine β -Helix vorhergesagt (Kapitel 3.1). Außerdem wurden bei den Fraktionen M-Pmp21-O₁ und D-Wt-O₁ Ähnlichkeiten zu amyloiden Proteinen gefunden (Kapitel 3.1.3, Kapitel 3.1.4). Da ThT jedoch nur die Detektion von β -sheets in der Amyloid-

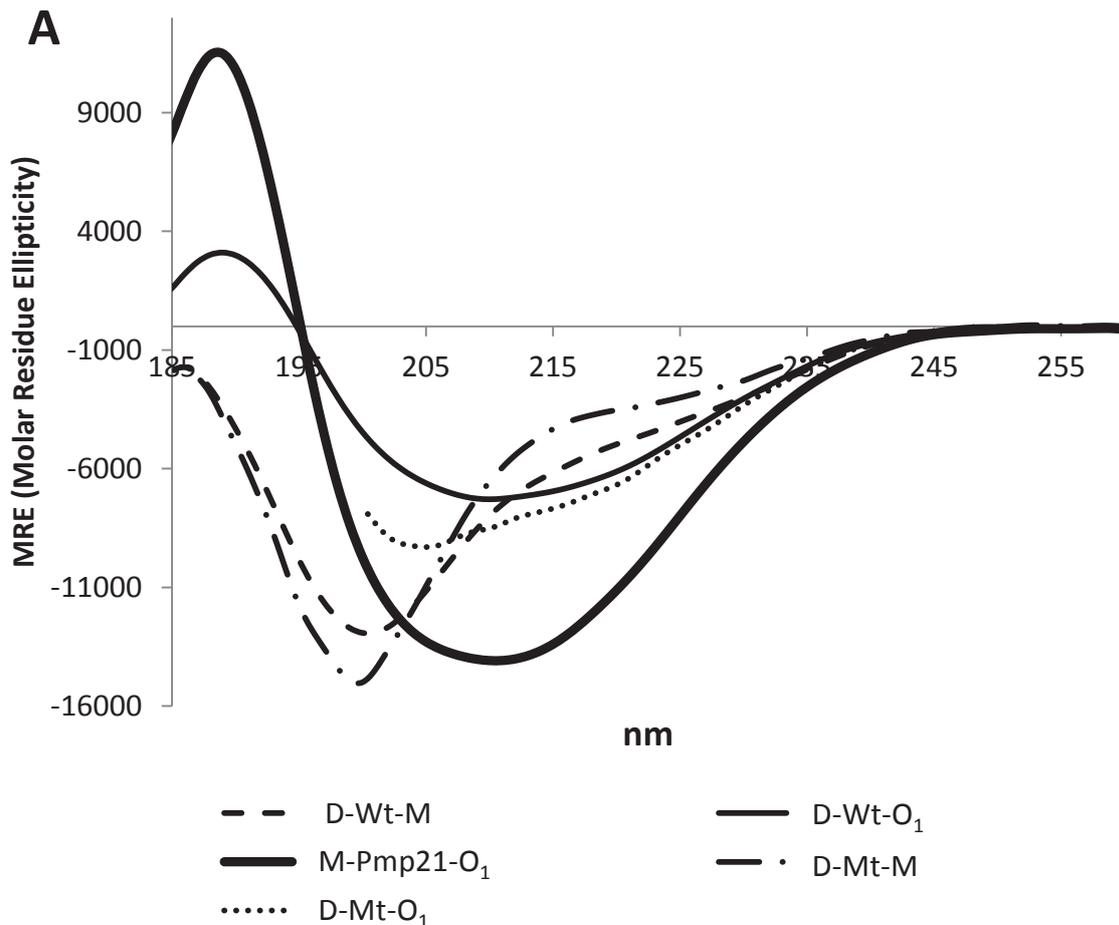
3 Ergebnisse

typischen *cross*- β -Anordnung ermöglicht, blieb es unklar, wie stark die Unterschiede in der Sekundärstruktur tatsächlich ausfielen. Mit den zuvor im Detail analysierten Pmp21-Fragmenten wurde eine CD-Spektroskopie (Kapitel 2.2.7.1) durchgeführt, um weitere Hinweise zu sammeln, dass es sich bei den Oligomeren um amyloide Protofibrillen handelte. Die CD-Spektroskopie wurde bei 20°C mit 10 μ M Lösungen der exemplarischen SEC Fraktionen (M-Pmp21-O₁, D-Wt-O₁, D-Wt-M, D-Mt-O₁ und D-Mt-M) durchgeführt. Die gemessenen Spektren wurden anschließend auf Dichroweb mit der Software CONTINLL ausgewertet.

Es konnte für alle Oligomer-Fraktionen beobachtet werden, dass sie einen höheren Anteil an β -*sheets* als das entsprechende Monomer und Monomere allgemein besitzten. M-Pmp21-O₁ hatte mit 20,1% den höchsten Anteil an β -*sheets* aller getesteten Fraktionen. Von den getesteten Proteinen entsprach dieses CD-Spektrum am ehesten dem von einem ausschließlich aus β -*sheets* bestehenden Protein und hatte Ähnlichkeit mit dem von A β ₄₀ und A β ₄₂ (345). Das wird dadurch unterstrichen, dass laut Berechnung keine α -Helices in M-Pmp21-O₁ vorkamen. Das Spektrum von D-Wt-O₁ ähnelt am meisten dem von M-Pmp21-O₁ und enthielt am zweitmeisten β -*sheets* (11,5%). Den geringsten Anteil an β -*sheets* hatten die beiden Monomerfraktionen D-Wt-M und D-Mt-M (Abbildung 3.17). Obwohl zusätzlich zu den β -*sheets* einige α -Helices errechnet werden konnten, entsprach das Spektrum dieser beiden Fraktionen am ehesten einer zufällig gewundenen (*random coil*) Struktur und somit dem eines ungeordneten Proteins. Das Spektrum von D-Mt-O₁ könnte als Intermediat aus D-Wt-O₁ und D-Wt-M/D-Mt-M bezeichnet werden, da der Anteil an β -*sheets* abnahm und der Anteil an α -Helices zunahm (Abbildung 3.17).

Somit konnte trotz morphologischer Ähnlichkeit in der TEM ein strukturebiologischer Unterschied zwischen D-Wt-O₁ und D-Mt-O₁ gefunden werden. Des Weiteren konnte eindeutig ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Pmp-charakteristischen Motive und der Ausprägung der β -*sheets* gefunden werden. Aufgrund der β -*sheet*-reichen CD-Spektren wurde ein weiterer Hinweis gefunden, dass es sich bei den Oligomeren um amyloide Protofibrillen handelt.

Im Weiteren wurde exemplarisch für D-Wt-O₁ untersucht, ob die Stabilität der Oligomere von den Pmp-charakteristischen Motiven ausging oder durch ionische Wechselwirkungen und Disulfidbrücken hervorgerufen wurde.



B

	α -Helix [%]	β -Sheet [%]
M-Pmp21-O ₁	0	20.1
D-Wt-O ₁	3.4	11.5
D-Wt-M	7.3	4.2
D-Mt-O ₁	8.6	6.7
D-Mt-M	3.6	5.8

Abbildung 3.17: Die Oligomere unterscheiden sich durch eine β -sheet reichere Sekundärstruktur von den Monomeren.

(A) Die CD Spektroskopie wurde bei 20°C durchgeführt. Es wurden jeweils 10 μ M Lösungen von M-Pmp21-O₁ (fette schwarze Linie), D-Wt-O₁ (dünne schwarze Linie), D-Wt-M (gestrichelte Linie) und D-Mt-M (gestrichelt, gepunktete Linie) in CD-Spektroskopiepuffer gemessen (n=2). Aufgrund der geringen Proteinkonzentration konnte D-Mt-O₁ (gepunktete Linie) nicht in den CD-Spektroskopiepuffer umgepuffert werden, sondern wurde direkt nach dem SEC Lauf in PBS gemessen. Aufgrund dessen konnte deshalb lediglich bis 200 nm gemessen werden. (B) Die Spektren wurden auf Dichroweb mit der Software CONTINLL ausgewertet. Anhand der dort hinterlegten Spektrendatenbank wurde eine Vorhersage über die Sekundärstruktur gemacht.

3.1.7 Der Erhalt der oligomeren Struktur beruht zu geringem Anteil auf Disulfidbrücken und nicht auf ionischen Wechselwirkungen

Dass der Erhalt der Oligomere nicht konzentrationsabhängig ist, wurde bereits in dem Vorversuch zur AUZ überprüft (Kapitel 3.1.2.1, Abbildung 3.8 A). Ebenso zeigen die Daten in Kapitel 3.1.5, dass zur Ausbildung der Oligomere das FxxN Motiv sehr förderlich war.

Um zu überprüfen, welche weiteren Bindungen die Oligomere stabilisierten, wurde in zwei weiteren Experimenten mittels semipräparativer SEC (Kapitel 2.2.5.7.2) überprüft, ob die intermolekularen Wechselwirkungen auch auf Disulfidbrücken oder ionischen Wechselwirkungen beruhten. D-Wt besitzt zwei Cysteine (0,9%), die potentiell Disulfidbrücken ausbilden könnten. Ebenso kommen Asparaginsäure (5,9%) und Glutaminsäure (5,4%) vor, die mit Arginin (2,7%) und Lysin (4,1%) Salzbrücken ausbilden könnten.

Dem Laufpuffer für die semipräparative SEC wurde in einem Versuch 100 mM DTT hinzugegeben und in einem weiteren Lauf 1 M NaCl. Es sollte überprüft werden, ob D-Wt-O₁ unter diesen Bedingungen dazu neigte, zu D-Wt-M zu zerfallen. Die semipräparative SEC Kontrolle mit PBS ohne DTT oder zusätzlichem NaCl zeigte, dass D-Wt-O₁ mit einer Konzentration von 0,5 mg ml⁻¹ stabil war. Durch Zugabe von 100 mM DTT war ein Zerfall von D-Wt-O₁ zu D-Wt-M zu beobachten. Dieser war jedoch so gering, dass er sich an der spektroskopischen Nachweisgrenze der semipräparativen SEC befand. Durch Zugabe von 1 M NaCl konnte kein Zerfall zu D-Wt-M beobachtet werden (Abbildung 3.18).

Es ist bekannt, dass amyloide Proteine eher von hydrophoben als von ionischen Wechselwirkungen stabilisiert werden. Dies konnte für D-Wt-O₁ ebenfalls gezeigt werden. Der geringfügige Zerfall von D-Wt-O₁ zu D-Wt-M legte jedoch nahe, dass die Oligomere teilweise von Disulfidbrücken stabilisiert wurden. Um zu überprüfen, ob die Disulfidbrücken einen maßgeblichen Einfluss auf die Sekundärstruktur besaßen, wurde im Folgenden eine CD-Spektroskopie mit dem reduzierenden Agens TCEP durchgeführt.

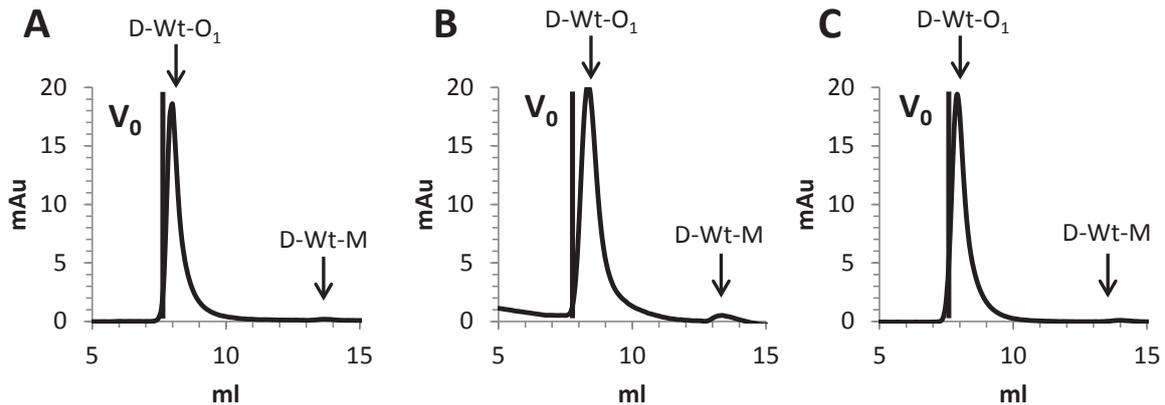


Abbildung 3.18: Die Oligomere können durch Lösen der Disulfidbrücken nur in geringem Maße aufgelöst werden.

Semipräparative SEC (Superdex 200 HR 10/30; Flussrate $0,3 \text{ ml min}^{-1}$) der SEC Fraktion D-Wt-O₁ ($0,5 \text{ mg ml}^{-1}$) bei 4°C mit (A) PBS, (B) PBS +100 mM DTT und (C) PBS +1 M NaCl, um den Zerfall von D-Wt-O₁ zu D-Wt-M zu überprüfen.

3.1.8 D-Wt-O₁ besitzt eine hohe Temperaturstabilität, die von Disulfidbrücken unterstützt wird

In Kapitel 3.1.7 wurde beobachtet, dass D-Wt-O₁ durch Reduktion der Disulfidbrücken zu einem sehr geringen Teil in D-Wt-M zerfallen konnte. Das CD-Spektrum von D-Wt-M entsprach sehr stark dem einer *random coil* Sekundärstruktur (Kapitel 3.1.6). Daher sollte analysiert werden, ob die Sekundärstruktur von D-Wt-O₁ durch Reduktion der Disulfidbrücken beeinträchtigt wurde.

Im Folgenden wurde eine CD-Spektroskopie (Kapitel 2.2.7.1) in Anwesenheit des Reduktionsmittels TCEP (1 mM TCEP) durchgeführt, da es im untersuchten Wellenlängenbereich weniger absorbiert als DTT und gleichzeitig stärker reduzierend wirkt. Des Weiteren sollte anhand eines Temperaturgradienten während der Messung untersucht werden, ob die Stabilität der Oligomere durch Lösen der Disulfidbrücken insgesamt beeinträchtigt wurde. Hier ist die Verwendung von TCEP ebenfalls vorteilhaft, da es temperaturstabiler als DTT ist. Um eine bestmögliche Vergleichbarkeit der CD-Spektren mit und ohne TCEP zu erreichen, wurden die D-Wt-O₁ Proben aus einem Aliquot entnommen und anschließend mit Puffer oder TCEP versetzt.

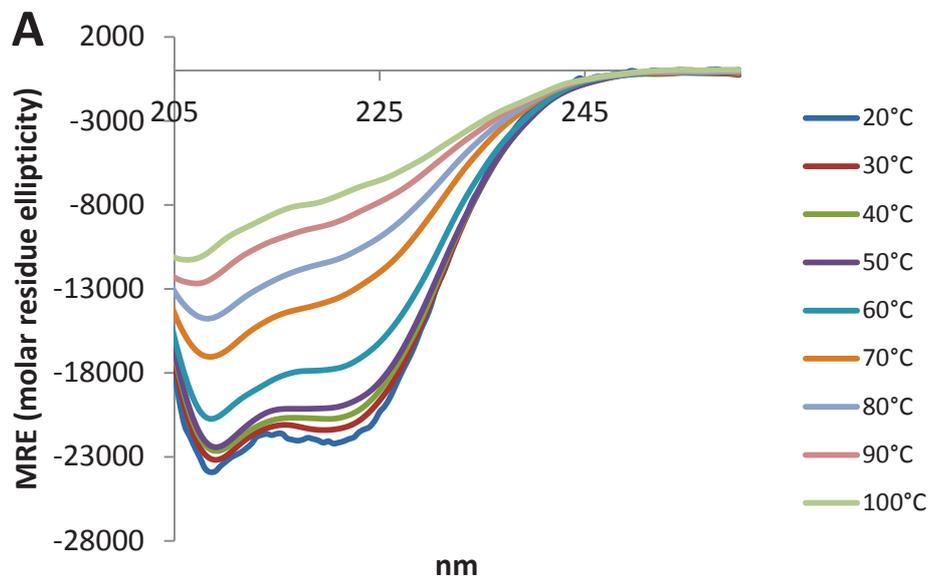
Zur Überprüfung der erfolgreichen Denaturierung durch den Temperaturgradienten wurde BSA verwendet. Die deutlich beginnende Denaturierung von BSA beim Übergang von 50°C auf 60°C entsprach der Erwartung (Abbildung 3.19 A). Ein Denaturierungsbereich zwischen 50°C und 70°C wurde bereits für BSA mit Differential Scanning Calorimetry beschrieben (346)

3 Ergebnisse

Andere Stellen berichten von einer irreversiblen Veränderung des CD-Spektrums ab 40°C (347). D-Wt-O₁ entsprach den zuvor beobachteten CD-Spektren (Kapitel 3.1.6). Durch den Temperaturgradienten konnte erst beim Übergang von 90°C auf 100°C eine eindeutige Veränderung des CD-Spektrums beobachtet werden. Durch Zugabe des Reduktionsmittels allein konnte keine Veränderung der Sekundärstruktur von D-Wt-O₁ beobachtet werden. Durch Lösen der Disulfidbrücken wurde eine eindeutige Veränderung des CD-Spektrums jedoch auf 70°C bis 80°C verringert. Es dann jedoch nicht der Übergang in das bei D-Wt-M beobachtete *random coil* CD-Spektrum zu beobachten, sondern D-Wt-O₁ wird direkt denaturiert (Abbildung 3.19 B und C).

Folglich beeinträchtigt das Lösen der Disulfidbrücken nicht unmittelbar die Sekundärstruktur. Allerdings erhöhen die Disulfidbrücken die Temperaturstabilität. Die Denaturierungsgrenze konnte durch Lösen der Disulfidbrücken um 20°C verringert werden. Sie liegt jedoch nach wie vor noch 20°C über der von BSA. D-Wt-O₁ kann damit, gegenüber den meisten tierischen Proteinen, die ihr Temperaturoptimum bei 37°C haben und bei 43°C überwiegend degradieren, als außergewöhnlich temperaturstabil bezeichnet werden.

Nach ausführlicher biochemischer und biophysikalischer Charakterisierung sollte im Folgenden die biologische Funktion der Oligomere und Monomere von D-Wt und D-Mt in Form von Adhäsions- und Inhibierungsassays untersucht werden.



3 Ergebnisse

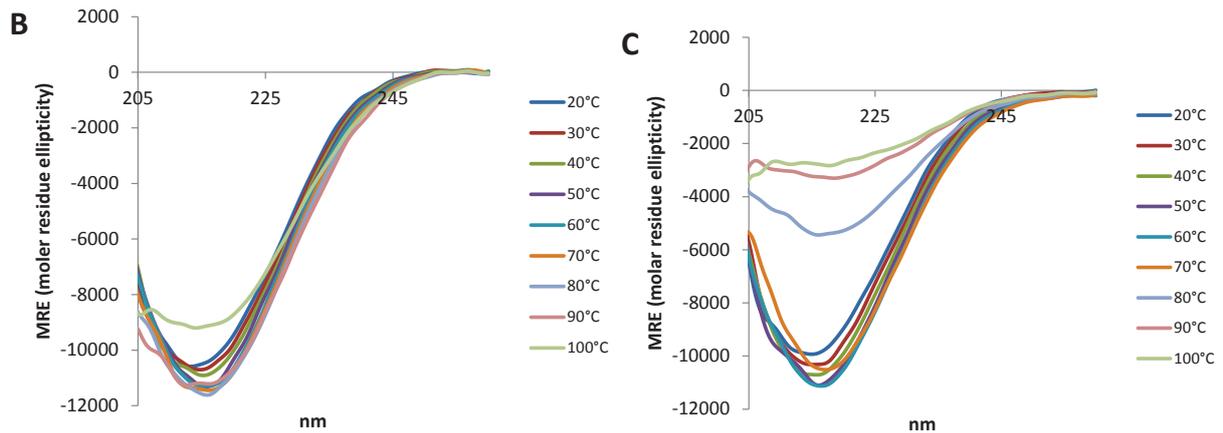


Abbildung 3.19: D-Wt-O₁ hat eine sehr hohe Temperaturstabilität, die durch Lösen der Disulfidbrücken verringert wird.

CD-Spektroskopie von 10 μ M (A) BSA in PBS, (B) D-Wt-O₁ in PBS und (C) D-Wt-O₁ in PBS +1 mM TCEP. Der Temperaturgradient verlief von 20°C bis 100°C. Jede Temperatur wurde für 15 min gehalten. BSA wurde als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Denaturierung im Verlauf des Gradienten verwendet. Das Spektrum zeigt ein typisches Ergebnis (n=2).

3.1.9 Das FxxN Motiv und die dadurch vermittelte Oligomerisierung sind essentiell für die Adhäsion an Humanzellen

In vorherigen Studien wurden Pmp6, 20 und 21 von *C. pneumoniae* und alle Pmps von *C. trachomatis* Serovar E als Adhäsine identifiziert, die wichtig für Infektion von Humanzellen sind (72,73). In den bislang publizierten Adhäsions- und Infektionsstudien war unbekannt, ob Oligomere oder Monomere gebildet wurden und somit auch, ob beide Proteinspezies Adhäsion vermitteln können.

Für diese Analyse wurden im folgenden Latexkügelchen mit D-Wt-O₁-, D-Wt-M-, D-Mt-O₁- und D-Mt-M Protein-Lösungen gleicher Konzentration (100 μ g ml⁻¹) beschichtet und deren Adhäsion an HEp-2-Zellen mittels FACS bestimmt (Kapitel 2.2.6.1) (Abbildung 3.20 A). Die Beschichtung der Latexkügelchen wurde mittels Western Blot überprüft und zeigte keine Unterschiede.

Die Negativkontrolle, mit BSA beschichteten Latexkügelchen, hatte die geringste Adhäsion von 15,9 \pm 3% HEp-2-Zellen mit Latexkügelchen. Die stärkste Adhäsion an HEp-2-Zellen wurde mit D-Wt-O₁ erreicht (50 \pm 4,3% HEp-2-Zellen mit Latexkügelchen). D-Wt-M, D-Mt-O₁ und D-Mt-M führten zu einer ähnliche Anzahl von Zellen mit Latexkügelchen (20,6 \pm 3,2%, 20,5 \pm 2,1% und 20,3 \pm 5%). Folglich zeigte der Adhäsionsassay, dass alle vier Proteinspezies eine Adhäsion vermittelten. Allerdings zeigte die statistische Auswertung mit Student's t-Test, dass lediglich D-Wt-O₁ einen signifikanten Unterschied zu BSA und allen anderen Proteinspezies hatte (Abbildung 3.20 B).

3 Ergebnisse

Diese Ergebnisse implizieren, dass sowohl das FxxN Motiv als auch die gleichzeitige Ausbildung von Oligomeren essentiell für eine Adhäsion an Humanzellen waren. Es war jedoch unklar, ob die Bindung spezifisch an den in vorherigen Studien identifizierten EGF-Rezeptor (EGFR) stattfand (75). Daher wurde im Folgenden ein sogenannter *pull-down* durchgeführt, um die Intensität der Interaktionen der D-Wt-O₁ und D-Wt-M Proteinspezies an den EGFR zu überprüfen.

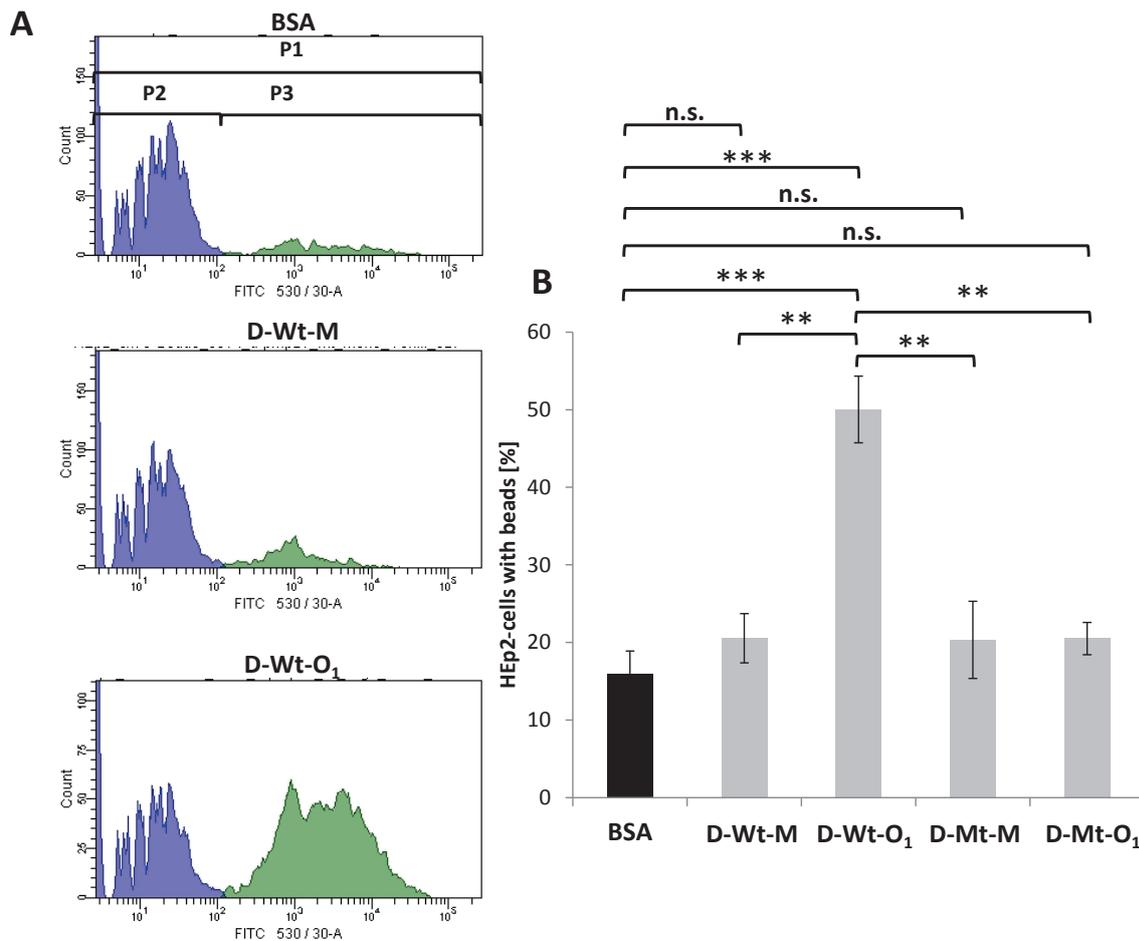


Abbildung 3.20: Sowohl das FxxN Motiv als auch die gleichzeitige Ausbildung von Oligomeren waren essentiell für die Adhäsion an HEP-2-Zellen.

(A) Repräsentative Darstellung der FACS-Ausgabedatei mit Gegenüberstellung der Stärke der Fluoreszenz bei 530 nm (X-Achse) gegen die Zellzahl (Y-Achse) der HEP-2 Zellen. Die Gesamtheit aller gemessenen Einzelzellen (10.000 gemessene Ereignisse) liegt in Fenster P1 (gesamtes dargestelltes Fenster). P1 setzt sich aus der blau markierten Population P2 (Fluoreszenz der Zellen ohne gebundene Kügelchen) und der grün markierten Population P3 (Fluoreszenz der adhärenen Latexkügelchen an HEP-2 Zellen) zusammen. (B) FACS-Auswertung der Adhäsionsexperimente. 1×10^6 grünfluoreszierende Latexkügelchen wurden mit einer $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ Lösung der Negativkontrolle BSA, D-Wt-O₁, D-Wt-M, D-Mt-O₁ oder D-Mt-M gekoppelt. Proteinbeschichtete Kügelchen in $300 \mu\text{l}$ Zellkulturmedium wurden für 5 min bei 700 Upm in einem 10-fachen Überschuss auf konfluente HEP-2 Zellen zentrifugiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die ungebundenen Kügelchen wurden mit PBS gewegewaschen und die Zellen mittels *Cell Dissociation Solution* aus den Vertiefungen der Zellkulturplatte abgelöst und mit 3 % PFA fixiert. Im FACS wurde von jeweils 10.000 HEP-2-Zellen und daran gebundenen Latexkügelchen die mittlere FITC-Fluoreszenz bestimmt und der prozentuale Anteil von Zellen mit Latexkügelchen (P3) bestimmt. Die Ergebnisse sind gemittelt aus 3 unabhängigen Wiederholungen ($n=3$). Die

3 Ergebnisse

Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde über Student's t-Test bestimmt (* $P=0.05$, ** $P=0.01$, *** $P=0.001$, n.s.= nicht signifikant).

3.1.10 Das FxxN Motiv und die dadurch vermittelte Oligomerisierung sind essentiell für die Adhäsion an den EGFR der Wirtszelle

In vorherigen Studien wurde der EGF-Rezeptor als Bindungspartner für das natürlich vorkommende Pmp21-Fragment M-Pmp21 auf HEp-2-Zellen identifiziert (75). Um zu untersuchen, ob das oligomere oder das monomere D-Wt identische oder unterschiedliche Affinitäten für die Adhäsion an den EGFR besitzt, wurde ein sogenannter Rezeptor-*pull-down* (Kapitel 2.2.6.2) mit D-Wt-O₁ und D-Wt-M durchgeführt. Da D-Wt ein Subfragment von M-Pmp21 ist (Abbildung 3.1), wurde als Positivkontrolle rekombinantes M-Pmp21 verwendet. Bei der Identifizierung des EGFR wurde M-Pmp21 nicht mittels OCR und SEC sondern mittels Dialyse aufgereinigt. Die M-Pmp21 Positivkontrolle für das folgende Experiment wurde daher mittels Dialyse in PBS renaturiert. Als Negativkontrollen wurden die rekombinanten Proteine GST, die Bindedomäne des *C. pneumoniae* Adhäsins Außenmembrankomplex Protein B (*outer membrane complex protein B*; OmcB-BD) und das *C. trachomatis* Adhäsin 1 (Ctad1) verwendet (Abbildung 3.21 A) (75,348).

Nach Biotinylierung wurden die rekombinanten Proteine mit HEp-2-Zellen inkubiert und mit ihren zellulären Bindungspartnern vernetzt (*cross-linked*). Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot identische Mengen des EGFR nachgewiesen (Abbildung 3.21 B).

Durch eine Affinitätsreinigung mit einer Streptavidinsäule wurden die biotinylierten rekombinanten Proteine samt Interaktionspartner eluiert. Das Signal des EGFR im Western Blot für D-Wt-O₁ (1,0), war ähnlich zu dem der Positivkontrolle M-Pmp21 (1,03) (Abbildung 3.21 C). Im Gegensatz dazu war das Signal von D-Wt-M deutlich schwächer (0,5). Rekombinantes GST sowie die OcmB-BD interagierten nicht in einem detektierbaren Ausmaß mit dem EGFR. Ein sehr schwaches Signal wurde für Ctad1 detektiert.

Die Ergebnisse legen nahe, dass sowohl D-Wt-O₁ als auch D-Wt-M mit dem EGFR interagieren. Allerdings war die Interaktion des Oligomers doppelt so hoch, wie das des Monomers. Unklar war jedoch weiterhin, wie das Verhalten der Oligomere und Monomere *in vivo* sein könnte. Daher wurde im Folgenden ein Assay zur Inhibierung der Infektion mit *C. pneumoniae* durchgeführt.

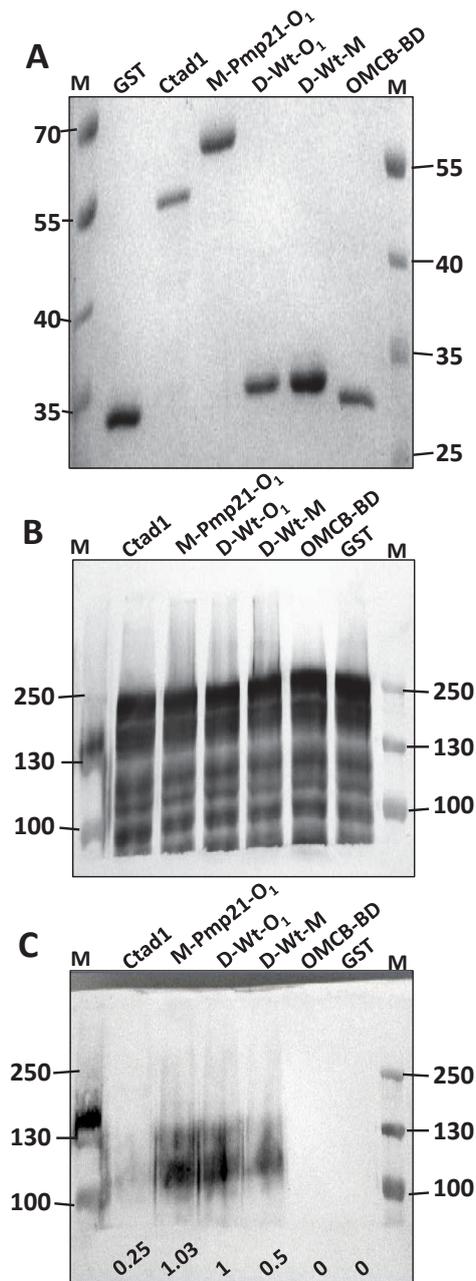


Abbildung 3.21: Die oligomere Form von D-Wt ist wichtig für die Bindung an den EGFR.

(A) Coomassie gefärbte SDS-PAGE der rekombinanten Proteine GST, Ctad1, M-Pmp21, D-Wt-O₁, D-Wt-M und OmcB-BD vor dem *pulldown*. Western Blot des ganzen Zelllysats nach (B) *crosslink* und (C) *pulldown* mit Anti-EGFR Antikörpern. Die relative Konzentration von EGFR wurde mittels ImageJ quantifiziert und in jeder Spur als Verhältnis zu D-Wt-O₁ (n=2) dargestellt.

3.1.11 Das FxxN Motiv und die dadurch vermittelte Oligomerisierung sind essentiell für eine Inhibierung der Infektion

Anhand der Daten aus Kapitel 3.1.9 und Kapitel 3.1.10 war ersichtlich, dass D-Wt-O₁ beschichtete Latexkügelchen am effizientesten an HEp-2-Zellen adhärirten und M-Pmp21

3 Ergebnisse

sowie D-Wt-O₁ am effizientesten an den EGFR adhärirten. Daher war es wahrscheinlich, dass D-Wt-O₁ im Infektionsprozess ebenfalls eine bedeutende Rolle spielt. Um die Relevanz der verschiedenen Oligomere und Monomere, sowie den Einfluß der FxxN Motive, während der Infektion direkt zu testen, wurde überprüft, ob Vorbehandlung der Humanzellen mit den Oligomeren und Monomeren von D-Wt und D-Mt den darauf folgenden Infektionsprozess beeinflussen konnten (Kapitel 2.2.6.3 und 2.2.6.4).

HEp-2-Zellen wurden vor der Infektion mit *C. pneumoniae* mit gleichen Konzentrationen von der Negativkontrolle BSA, der Positivkontrolle Heparin, löslichem D-Wt-O₁, D-Wt-M, D-Mt-O₁ und D-Mt-M, inkubiert. Das Ausmaß der Infektion wurde in Form der Anzahl der durch *C. pneumoniae* ausgebildeten Inklusionen gemessen (Abbildung 3.22 B).

Die Negativkontrolle BSA hatte die stärkste Infektion, mit 96,7 ±8,8% in Bezug auf PBS. Die Positivkontrolle Heparin inhibierte die Infektion signifikant (1,4% ±0,6%). Das Ausmaß der gebildeten Inklusionen variierte bei den Oligomeren und Monomeren von D-Wt und D-Mt zwischen 92,7 ±2,9% bis 53,5 ±2,3%. D-Wt-O₁ zeigte die geringste Infektion mit 53,5% ±2,3% und unterschied sich damit signifikant von PBS behandelten HEp-2-Zellen. Die Inklusionsbildung unterschied sich ebenfalls signifikant von allen anderen D-Wt und D-Mt Proteinspezies. D-Wt-M (83% ±5,7%) zeigte ebenfalls eine signifikant geringere Inklusionsbildung zu PBS. Der inhibierende Effekt von D-Mt-O₁ und D-Mt-M (83 ±1,7% und 92,7 ±2,9%) war hingegen nicht signifikant. (Abbildung 3.22).

D-Wt-O₁ konnte aufgrund seines Oligomierzustands und der FxxN Motive die Infektion inhibieren. D-Wt-M zeigte eine sehr geringe Inhibition, da nur noch FxxN Motive zu Bindung vorhanden waren.

D-Mt-O₁ und D-Mt-M konnten die Infektion aufgrund fehlender FxxN Motive oder fehlender FxxN Motive und Oligomierzustand nicht mehr signifikant inhibieren. Folglich demonstrierten diese Ergebnisse, dass eine Präinkubation mit den verschiedenen Proteinspezies die anschließende Infektion durch *C. pneumoniae* in Abhängigkeit vom FxxN Motiv und der Oligomerisierung inhibierte.

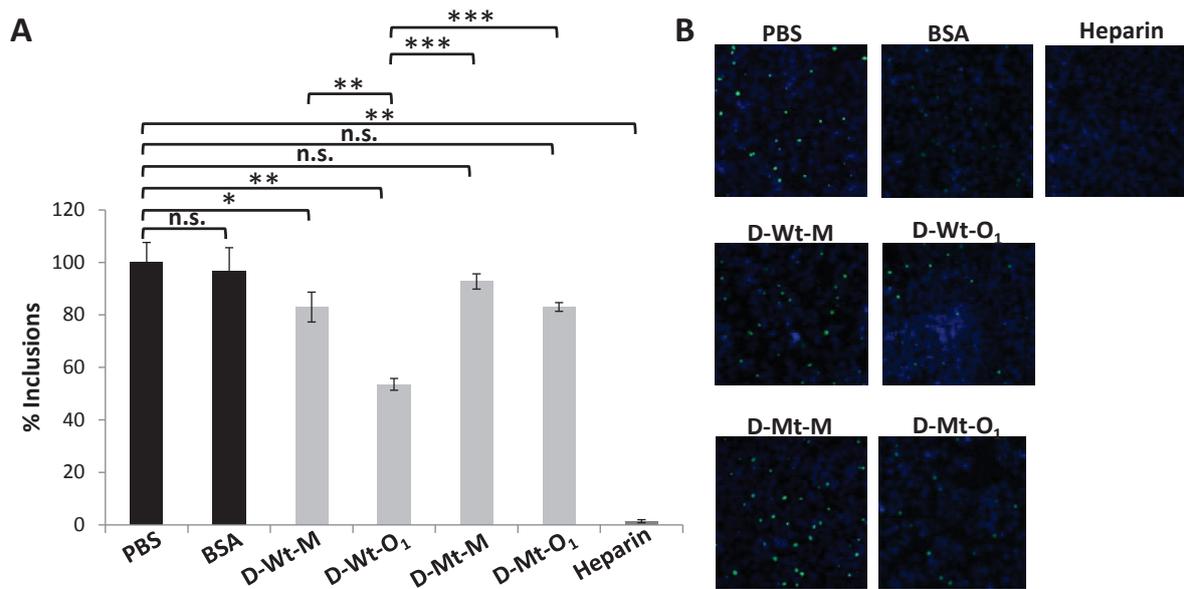


Abbildung 3.22: Sowohl das FxxN Motiv als auch die gleichzeitige Ausbildung von Oligomeren waren essentiell für die Inhibition der *C. pneumoniae* Infektion.

HEp-2-Zellen wurden vor der Infektion mit *C. pneumoniae* EBs (moi= 20) präinkubiert mit PBS, der Positivkontrolle Heparin oder 100 µg ml⁻¹ BSA, D-Wt-O₁, D-Wt-M, D-Mt-O₁ oder D-Mt-M. Die Zellen wurden 48 h nach der Infektion fixiert und die Anzahl der ausgebildeten Inklusionen wurde mikroskopisch bestimmt. Die Anzahl an Inklusionen in 10³ HEp-2-Zellen wurde bestimmt und als relativer prozentualer Anteil der Inklusionen in PBS präinkubierter HEp-2-Zellen ausgedrückt. **(A)** Die Ergebnisse sind gemittelt aus 3 unabhängigen Wiederholungen (n=3). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± Standardabweichung. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde über Student's t-Test bestimmt (*P=0.05, **P=0.01, ***P=0.001, n.s.= nicht signifikant). **(B)** Repräsentative Immunfluoreszenzmikroskopie des Experiments. Zur Detektion der HEp-2-Zellen wurden methanolfixierte Zellen mit DAPI (blau) gefärbt. Die Inklusionen von *C. pneumoniae* wurden mit einem Antikörper gegen das chlamydiale LPS (grün) detektiert.

3.2 Analyse des potentiellen β -barrel von Pmp21 aus *C. pneumoniae* als rekombinant exprimiertes Protein in *E. coli*

Pmps werden aufgrund bioinformatischer Vorhersagen zu der Familie der Typ-V Autotransporter (AT) gezählt (152) (Kapitel 1.4.3). Charakteristisch für ATs ist, dass sie alle nötigen Mechanismen zum Einbau in die Außenmembran, sowie zur Präsentation und Faltung der PD in ihrer AS-Sequenz tragen (296) (Abbildung 3.23 A). Teilweise wird die Faltung der PD durch ein sogenanntes Autochaperon (AC) induziert (300,302). Einen experimentellen Nachweis, ob Pmps ATs darstellen und eine AC besitzen, gab es bislang jedoch nicht und sollte in diesem Abschnitt analysiert werden. Am C-Terminus von ATs befinden sich konservierte AS, die für eine Insertion in die Außenmembran entscheidend sind (297). Um gezielt Bereiche aus Pmp21 (Abbildung 3.23 A), für die Klonierung von Expressionskonstrukten zu selektieren, wurden zunächst Strukturanalysen durchgeführt.

3 Ergebnisse

Eine Sekundärstrukturanalyse mit Phyre 2 (Kapitel 2.1.4) und Pmp21 ergab einen α -helikalen Bereich am N-Terminus und nahe des C-Terminus. Ansonsten wurden überwiegend β -sheet-gefaltete Bereiche, verbunden durch kurze *random coil* Abschnitte, vorhergesagt (Abbildung 3.23 B). Für die Tertiärstrukturvorhersage stellt Phyre 2 einen Modellierungsmodus zur Verfügung, der sich durch hohe Präzision auszeichnet. Allerdings ist in diesem Modus die Länge der zu analysierenden Sequenz begrenzt. Daher wurde für die Tertiärstrukturvorhersage lediglich C-Pmp21 verwendet. Die Tertiärstrukturvorhersage ergab mit hoher Konfidenz einen β -barrel mit α -helikalem Linker (Abbildung 3.23 C). Am N-Terminus wurden mit geringer Konfidenz ausschließlich *random coils* vorhergesagt. Die Position der vorhergesagten α -Helix in C-Pmp21 und die C-terminalen β -sheets stimmten in Sekundär- und Tertiärstrukturvorhersage überein.

Als Kriterien für die Auswahl des Expressionskonstruktes des potentiellen Autochaperones (pAC; pCN2) galt zum einen, dass dieses C-terminal von der bekannten Prozessierungsstelle der Domänen M-Pmp21/C-Pmp21 liegen sollte (157). Zum anderen sollte es N-terminal des β -barrels liegen. Anhand der Strukturvorhersagen konnte dieser Bereich auf die AS 1147 - 1298 eingegrenzt werden (Abbildung 3.23 D). Über homologe Rekombination wurde die DNA-Sequenz von pAC mit der DNA-Sequenz für einen C-terminalen His Tag versehen in einen durch IPTG induzierbaren Expressionsvektor kloniert (Kapitel 2.1.11 und 2.2.4.4). Durch den N-terminalen His Tag sollte verhindert werden, dass nach der Expression unvollständig translatierte Proteine ebenfalls aufgereinigt werden. Die Daten zur Analyse des pAC sind in Kapitel 3.2.9 dargestellt.

Für das C-Pmp21 Expressionskonstrukt (pSL12; Abbildung 3.23 D) mit dem β -barrel, wurde die gesamte DNA-Sequenz verwendet und über homologe Rekombination in einen durch IPTG induzierbaren Expressionsvektor mit periplasmatischer Signalsequenz (PelB) und N-terminalem His Tag kloniert (Kapitel 2.1.11). Die PelB Sequenz stammt ursprünglich von der Pektat Lyase B aus *Erwinia carotovora* (349). Sie wird in kommerziellen Vektoren zur periplasmatischen Expression rekombinanter Proteine verwendet (350). Der His Tag diente der Aufreinigung und der Oberflächenlokalisierung. Außerdem enthält C-Pmp21 am C-terminalen Ende ein Phenylalanin. Für den AT AIDA-I aus *E. coli* konnte ein Phenylalanin am C-terminalen Ende gefunden werden. Dieses war für die erfolgreiche Insertion in die Außenmembran entscheidend und musste die letzte AS im Expressionskonstrukt darstellen (298).

3 Ergebnisse

Für AIDA-I wurde beschrieben, dass eine konstitutive Expression dazu führte, dass der β -barrel stabil gefaltet in die äußere Membran inseriert wurde (298). Als Alternative zur induzierbaren Expression wurde im Verlauf dieser Arbeit das Plasmid pSL12 mit dem konstitutiven Promotor des Vektor pIG501 versehen. Das entstandene Expressionskonstrukt pSL13 wurde als kCmp21 bezeichnet (Kapitel 2.1.11).

Im Folgenden sollte ein Bakterienstamm zur Expression von pSL12 und pSL13 identifiziert werden.

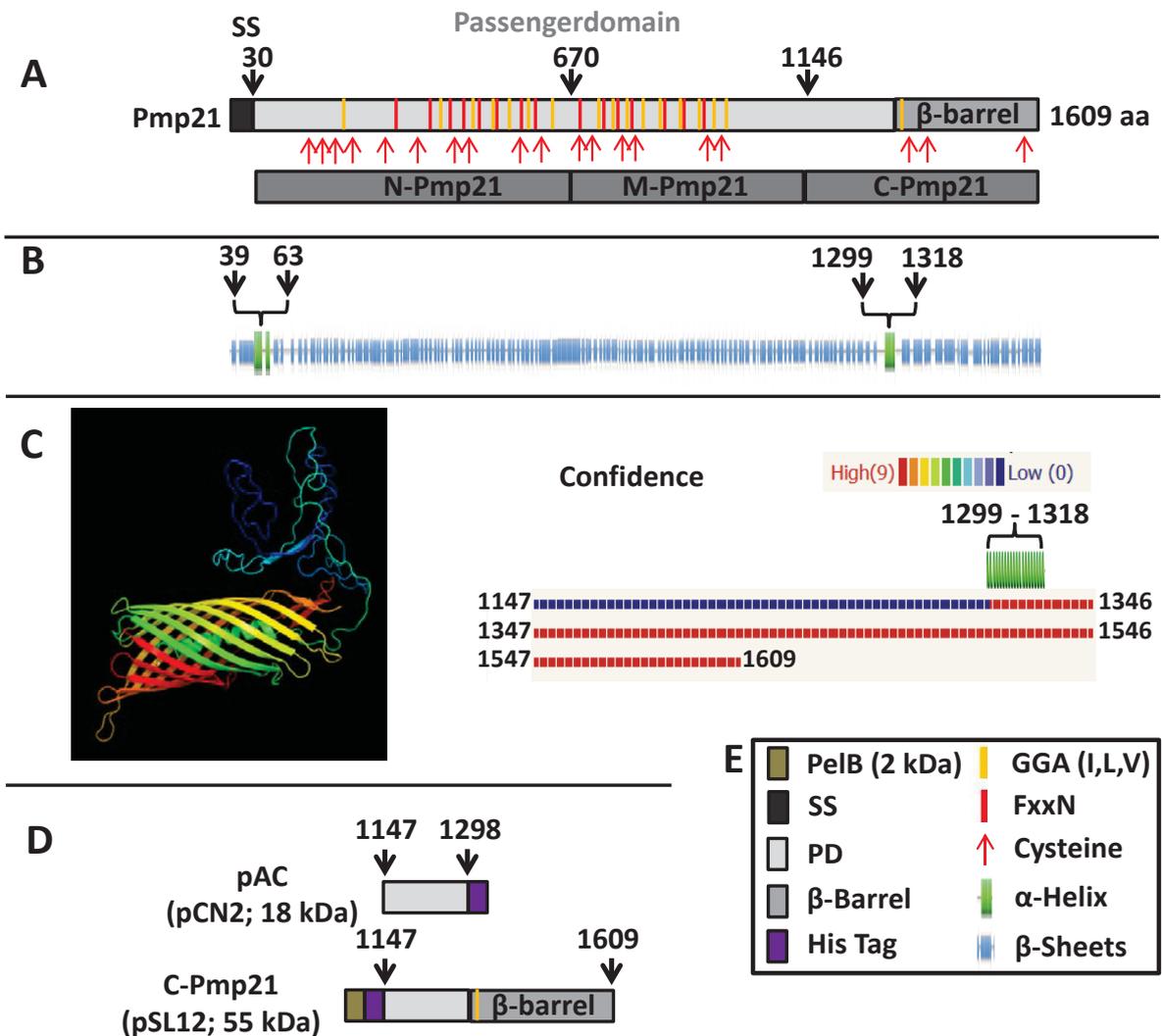


Abbildung 3.23: Schematische Darstellung der analysierten Pmp21 Fragmente.

(A) Abgebildet ist das Volllänge Pmp21 aus *C. pneumoniae*. Die charakteristische Drei-Domänen-Struktur der Pmps mit N-terminaler Signalsequenz (SS), der PD (*passenger domain*) und der C-terminalen β -barrel-Domäne ist durch Rechtecke in verschiedenen Grautönen dargestellt. Die Position der Tetrapeptidmotive GGA (I, L, V) und FxxN ist durch rote und orange Linien markiert. Des Weiteren sind die Cysteine innerhalb von Pmp21 durch rote Pfeile dargestellt. Die Pfeile über der schematischen Darstellung zeigen die AS (aa) Positionen der Prozessierungsstellen. Unter dem Schema sind die entstehenden Fragmente (N-M-C-Pmp21) dargestellt (B) Die durch Phyre2 vorhergesagte Sekundärstruktur (blau: β -sheets, grün: α -Helices). Die Klammern über der schematischen Darstellung zeigen die aa Positionen der α -Helices. (C) Tertiärstrukturvorhersage durch Phyre2

3 Ergebnisse

des für die Röntgenkristallographie ausgewählten Abschnitts C-Pmp21. Die Färbung der Tertiärstrukturvorhersage entspricht der des Spektrums des sichtbaren Lichts von N-Terminus (blau) zu C-Terminus (rot). Grafische Darstellung der Konfidenz (*confidence*) der Tertiärstrukturvorhersage von hoch in rot (*high*) zu niedrig in blau (*low*). Die Zahlen neben der Konfidenzdarstellung stellen die *aa* Positionen in der Tertiärstrukturvorhersage dar. Die Position des α -helikalen Linkers markiert die Klammer über der Darstellung. (D) Die anhand der Vorhersagen ausgewählten Fragmente pAC-Pmp21 (*aa* 1146 - 1300; pCN2) und C-Pmp21 (*aa* 1146 - 1609; pSL12), mit His-Tag (lila) und periplasmatischer Signalsequenz PelB (braun). E: Legende

3.2.1 Identifizierung eines Bakterienstammes der zur Expression von rekombinatem C-Pmp21 geeignet ist

Im Folgenden wurden vier verschiedene Expressionsbedingungen getestet, um durch Wachstumsanalyse in Form der OD_{600} einen ersten Hinweis auf korrekte Faltung oder durch ein schwaches Wachstum einen ersten Hinweis auf Toxizität der rekombinanten Proteine zu erhalten. Ebenfalls sollte anhand einer möglichst hohen und stabilen OD_{600} die Bedingung gefunden werden, die bei der später folgenden Aufreinigung der Proteine, die höchste Ausbeute pro Liter Expressionskultur ergeben könnte.

Als initialer Test auf optimales Wachstum von Expressionskulturen wurde BL21 mit dem Leervektor, der nur die multiple Klonierungsstelle und den His-Tag, sowie M-Pmp21 als Beispiel für ein zytosolisches rekombinantes Pmp-Protein bei 30°C exprimiert. Dadurch wurde festgestellt, dass nach Induktion bei OD_{600} : 0,6 und einem optimalen Wachstum zum Erntezeitpunkt 4 h nach Expression (T:4) eine OD_{600} von $2,45 \pm 0,07$ bzw. $2,4 \pm 0,14$ zu erzielen war (Abbildung 3.24 A).

Bei der Expression von C-Pmp21 in BL21 zeigte sich nach Induktion bei OD_{600} : 0,6 kein weiteres signifikantes Wachstum bis zum Zeitpunkt T:4 (OD_{600} : $0,65 \pm 0,07$). Um die Zellmasse zum Erntezeitpunkt zu erhöhen und somit voraussichtlich auch die Ausbeute an rekombinatem Protein, erfolgte die Induktion im Folgenden bei zwei höheren OD_{600} (1,4; 2,4). Eine Induktion bei OD_{600} : 1,4 führte wie zuvor zu keinem weiteren signifikanten Wachstum (OD_{600} : $1,65 \pm 0,35$). Nach Induktion bei OD_{600} : 2,4 zeigte sich zunächst weiteres Wachstum, welches nach 4 Stunden jedoch zu einer Abnahme der Zellzahl führte (OD_{600} : $1,6 \pm 0,35$) und somit möglicherweise auch zu einer Abnahme des rekombinant exprimierten C-Pmp21 (Abbildung 3.24 B). Daher wurde für weiterführende Versuche (Kapitel 3.2.3 und folgende) C-Pmp21 in BL21 bei einer OD_{600} von 1,4 induziert.

Im Folgenden wurden zusätzliche Expressionsbedingungen getestet, die zu einer korrekten Faltung von C-Pmp21 führen könnten. Aus zeitlichen Gründen wurden diese jedoch nicht mehr in weiterführenden Experimenten (Kapitel 3.2.3 und folgende) verwendet.

3 Ergebnisse

C-Pmp21 enthält im β -barrel drei Cysteine. Dies wird allgemein als unüblich für Typ-V AT angesehen, da sie den Einbau in die Membran der *E. coli*-Zelle durch Disulfidbrückenbildung beeinträchtigen können (294,295,351). Dies kann durch reduzierende Bedingungen verhindert werden (352). Um dies für C-pmp21 in BL21 zu überprüfen erfolgte die Expression mit und ohne 10 mM β -Mercaptoethanol (β -ME) bis zu Zeitpunkt T:2. Nach der Induktion bei OD_{600} : 1,4 konnte jedoch kein signifikanter Unterschied im Wachstum festgestellt werden (Abbildung 3.24 C).

Der Temperaturbereich zwischen 4°C - 12°C ist als eine Strategie bekannt, um während der heterologen Expression eine native Faltung zu erreichen (353). Daher wurde außerdem eine Expression von C-Pmp21 in ArcticExpress Zellen durchgeführt. Der Vorteil von ArcticExpress Zellen besteht darin, dass sie besonders geeignet für die Expression bei 4°C - 12°C sind. Des Weiteren enthalten sie Chaperone aus psychrophilen Bakterien die selbst bei einer Expressionstemperatur von 10°C noch zur erfolgreichen Faltung von heterolog exprimierten Proteinen führen können (354).

Nach der Induktion bei OD_{600} : 0,6 und 10°C erfolgte die Expression über 24 h. Aufgrund des sehr schwachen Wachstums erfolgte die Messung der OD_{600} erst ab T:16. Bei T:24 betrug für das Kontrollprotein M-Pm21 die OD_{600} : $1,3 \pm 0,15$ und für C-Pmp21 $1,3 \pm 0,2$. Folglich konnte unter diesen Bedingungen kein Unterschied im Zellwachstum festgestellt werden (Abbildung 3.24 D).

Im Folgenden wurde die Auswirkung konstitutiver Expression mit kC-Pmp21 untersucht. Der Zeitpunkt T:0 stellt in dem Fall einer exponentiell wachsenden Kultur nicht die Induktion mittels IPTG dar, sondern lediglich eine OD_{600} : 0,6. Um eine Ausbildung von Disulfidbrücken zu unterdrücken, wurde kC-pmp21 ebenfalls mit und ohne 10 mM β -ME exprimiert. Das Zellwachstum mit β -ME war zwar teilweise besser, jedoch nicht signifikant. Im Gegensatz zu der induzierten Expression in BL21 bei einer OD_{600} : 0,6 konnte die Stagnation des Wachstums nach IPTG Zugabe bis zu T:2 umgangen werden. (Abbildung 3.24 E).

Neben der Wachstumsanalyse wurden Proben zur Proteinexpressionskontrolle entnommen, auf eine OD_{600} : 1 eingestellt und mittels Western Blot sichergestellt, dass C-Pmp21 unter allen Bedingungen exprimiert wurde (Abbildung 3.25). C-Pmp21 hatte dabei unter allen Bedingungen eine apparente Laufweite von ca. 57 kDa. Die berechnete Größe ohne PelB beträgt 53 kDa. Durch vergleichende Western Blot Analyse des exprimierten Leervektors pSL4 wurde sichergestellt, dass der Anti His Antikörper kein *E.coli* Protein auf Höhe von C-

3 Ergebnisse

Pmp21 detektiert um ein falsch positives Ergebnis zu vermeiden. Die Stärke der Expression wurde anhand der auf verschiedenen Western Blot Membranen detektierten Proteine lediglich abgeschätzt. Anhand der ausgeprägten Banden erscheint die Expression für C-Pmp21 in ArcticExpress Zellen und C-Pmp21 in BL21 am stärksten. kC-Pmp21 zeigte eine extrem schwache Expression und deutete damit auf eine niedrige Proteinausbeute hin (Abbildung 3.25).

In Anbetracht der bisherigen Datenlage, wäre eine Expression von C-Pmp21 in ArcticExpress Zellen die beste Wahl für weiterführende Experimente gewesen. Da diese Ergebnisse zeitlich jedoch gegen Ende dieser Arbeit generiert wurden, wurde die Expression für weiterführenden Experimenten (Kapitel 3.2.3 und folgende) mit C-Pmp21 in BL21 ohne 10 mM β -ME durchgeführt.

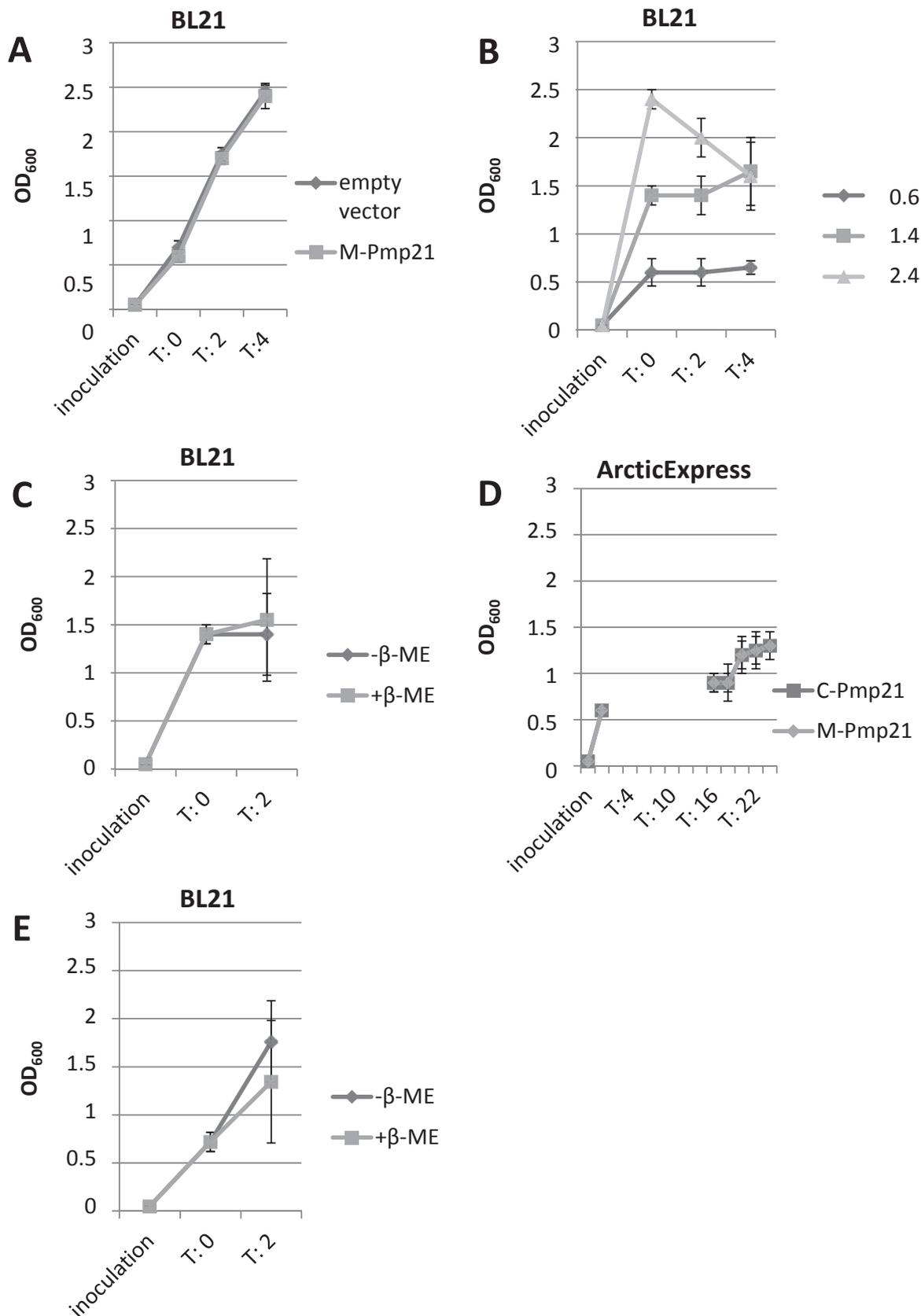


Abbildung 3.24: Die maximale OD₆₀₀ von C-Pmp21 unterscheidet sich nicht nach Expression in BL21 ±10 mM β-ME oder in ArcticExpress Zellen.

Die Wachstumskurven wurden durch Messung der OD₆₀₀ verschiedener Expressionskulturen erstellt. Je Zeitpunkt wurde die OD₆₀₀ von zwei unabhängigen Kulturen pro Expressionsbedingung gemessen. Bei

3 Ergebnisse

Inokulation betrug für alle Kulturen die OD_{600} : 0,05. Der Zeitpunkt T:0 entspricht bei **A-D** der Induktion mit 1 mM IPTG. Bei **E** wurde der konstitutive Promotor aus pIG501 verwendet. Die dargestellten Messpunkte (T:2 - maximal T:24) entsprechen der jeweiligen Stunde nach Induktion. Die Expression in BL21 erfolgte bei 30°C, die in ArcticExpress Zellen bei 10°C. (**A**) Leervektor (pSL4) und M-Pmp21 (pEG27) exprimiert in BL21, induziert bei OD_{600} : 0,6; (**B**) C-Pmp21 (pSL12) exprimiert in BL21, induziert bei verschiedenen OD_{600} (0,6; 1,4; 2,4); (**C**) C-Pmp21 (pSL12) exprimiert in BL21, induziert bei OD_{600} : 1,4 und kultiviert in Medium \pm β -ME; (**D**) C-Pmp21 (pSL12) und M-Pmp21 (pEG27) exprimiert in ArcticExpress Zellen, induziert bei OD_{600} : 0,6; (**E**) C-Pmp21 mit konstitutiver Expression (kC-Pmp21; pSL13) exprimiert in BL21 und kultiviert in Medium \pm β -ME. Die Ergebnisse sind gemittelt aus 3 unabhängigen Wiederholungen (n=3).

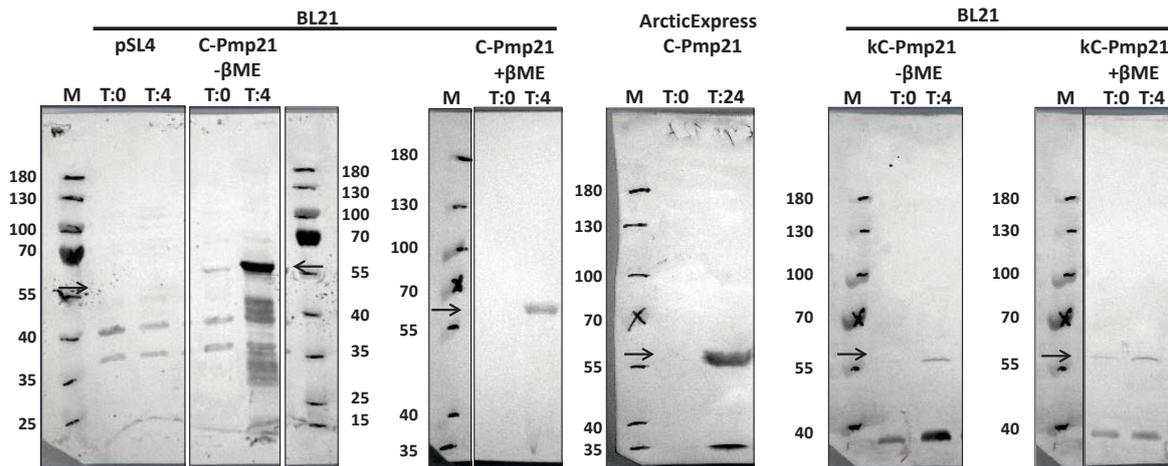


Abbildung 3.25: C-Pmp21 wurde sowohl in BL21 als auch in ArcticExpress Zellen exprimiert.

Der Leervektor mit multipler Klonierungsstelle (pSL4) wurde in BL21 exprimiert und zeigt kein detektierbares Protein auf Höhe von C-Pmp21 (53 kDa + 2 kDa PelB). C-Pmp21 wurde induzierbar in BL21 \pm 10 mM β -ME, ArcticExpress Zellen und konstitutiv (kC-Pmp21) in BL21 \pm 10 mM β -ME exprimiert. Nach Induktion (außer kC-Pmp21) in LB-Medium bei einer OD_{600} : 0,6 (T:0) mit 1 mM IPTG erfolgte weiteres Wachstum für 4 - 24 h (T:4 - 24); M: PageRuler™ Größenstandard. Die Expression wurde mittels Western Blot und anschließender Detektion durch Anti-His Antikörpern überprüft (Kapitel 2.2.5.11). Die Ergebnisse wurden 2 Mal wiederholt und die hier dargestellten Beispiele stellen typische, repräsentative Ergebnisse dar.

3.2.2 Die unterschiedlichen Expressionstämme führen zu einer unterschiedlichen Temperaturstabilität von C-Pmp21

Für verschiedene Außenmembranproteine mit β -barrel-Domänen ist bekannt, dass sie sich durch eine hohe Stabilität auszeichnen. Diese führt dazu, dass sie erst nach Zugabe von SDS und hohen Temperaturen denaturieren (355-357). Darüber hinaus gibt es β -barrel Membranproteine, die vor einer Hitzebehandlung in SDS-PAGE-Probenpuffer aufgrund ihrer kompakten Faltung in der SDS-PAGE schneller migrieren als ungefaltet (355-357). Für den Typ-V AT AIDA-I aus *E. coli* wurden beobachtet, dass er vor Hitzebehandlung bei 39 kDa läuft und entfaltet bei 51 kDa (298,355). Für den Typ-V AT EspP aus *E. coli* wurde beschrieben, dass eine vollständige Denaturierung erst nach 15 min bei 90°C erreicht wurde (358).

Im Folgenden sollte ein Hinweis erlangt werden, ob der postulierte β -barrel von Pmp21 nach heterologer Expression ebenfalls über eine hohe Stabilität verfügt, die sich in einem

3 Ergebnisse

abnormalen Laufverhalten äußert. IPTG induziertes, exprimiertes AIDA-I diente dabei als Kontrolle, ob der Assay unter den hiesigen Laborbedingungen funktional war. Zellen aus den zuvor beschriebenen Expressionskulturen (Kapitel 3.2.1) wurden entnommen und auf eine OD_{600} : 1 eingestellt. Anschließend wurden Proben mit SDS-PAGE Probenpuffer versehen und für 30 Minuten bei 30°C oder für 30 Minuten bei 90°C inkubiert wurden. Das Laufverhalten der Proteine wurde mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot verglichen.

Bei AIDA-I konnte nach Inkubation bei 30°C eine Bande bei ca. 55 kDa und eine bei ca. 40 kDa detektiert werden. Nach Inkubation bei 90°C konnte eine weitere Bande bei ca. 51 kDa detektiert werden. Außerdem wurde die Bande bei 40 kDa schwächer (Abbildung 3.26 A). Generell wurde nach induzierter Expression von AIDA-I eine unprozessierte (NP) Proteinspezies mit periplasmatischer Signalsequenz bei ca. 55 kDa und eine prozessierte (P) Proteinspezies ohne periplasmatische Signalsequenz bei ca. 51 kDa erwartet (298). NP war nicht stabil gefaltet und lag daher bereits durch eine Probenvorbereitung bei 30°C vollständig entfaltet in der SDS-PAGE vor. Bei P war deutlich ein abnormales Laufverhalten erkennbar. Diese zeichnete sich dadurch aus, dass sie erst nach Probenvorbereitung bei 90°C auf der erwarteten Höhe lief. (Abbildung 3.26 A). Die Beobachtungen entsprachen den Erwartungen und gelten als typisch für AIDA-I (298).

C-Pmp21 wurde in BL21 $\pm\beta$ -ME, ArcticExpress Zellen, und in Form von kC-Pmp21 $\pm\beta$ -ME exprimiert. Bei C-Pmp21 in BL21 $\pm\beta$ -ME wurden sowohl bei 30°C als auch bei 90°C Banden bei ca. 57 kDa detektiert (Abbildung 3.26 B und C). Nach der Expression in ArcticExpress Zellen konnten durch Probenvorbereitung bei 30°C, zwei zusätzliche Banden bei ca. 35 kDa und ca. 47 kDa detektiert werden. Eine deutliche Abnahme der Banden durch Probenvorbereitung bei 90°C ist jedoch nicht zu beobachten (Abbildung 3.26 D). Bei kC-Pmp21 $\pm\beta$ -ME konnte eine zusätzliche Bande bei ca. 40 kDa beobachtet werden. Nach Probenvorbereitung bei 90°C war diese Bande weder bei kC-Pmp21 $-\beta$ -ME noch bei kC-Pmp21 $+\beta$ -ME detektierbar (Abbildung 3.26 E und F).

Ein β -barrel-typisches Laufverhalten konnte nach der Expression in BL21 $\pm\beta$ -ME und Arctic Express Zellen nicht beobachtet werden. Für das konstitutiv exprimierte C-Pmp21 war zwar das Charakteristikum erkennbar, dass die Bande bei 40 kDa abnahm, jedoch konnte keine zusätzliche Bande oder eine Zunahme der Bandeintensität bei 53 kDa detektiert werden. Es fanden sich daher lediglich Anzeichen dafür, dass das Laufverhalten von C-Pmp21 und kC-Pmp21 in Abhängigkeit von der Expressionsmethode variierte. Bei AIDA-I wurde ein

3 Ergebnisse

deutlicher Unterschied im Laufverhalten in Abhängigkeit von induzierter oder konstitutiver Expression beobachtet (298).

In Abbildung 3.26 B und D schien bei der Bande bei 57 kDa eine leichte Doppelbande erkennbar zu sein. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die PelB Signalsequenz (2kDa) nicht abgespalten wurde, weil C-Pmp21 nicht vollständig auf der Oberfläche präsentiert wurde. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob C-Pmp21 nach Expression in BL21 auf der äußeren Membran präsentiert wird.

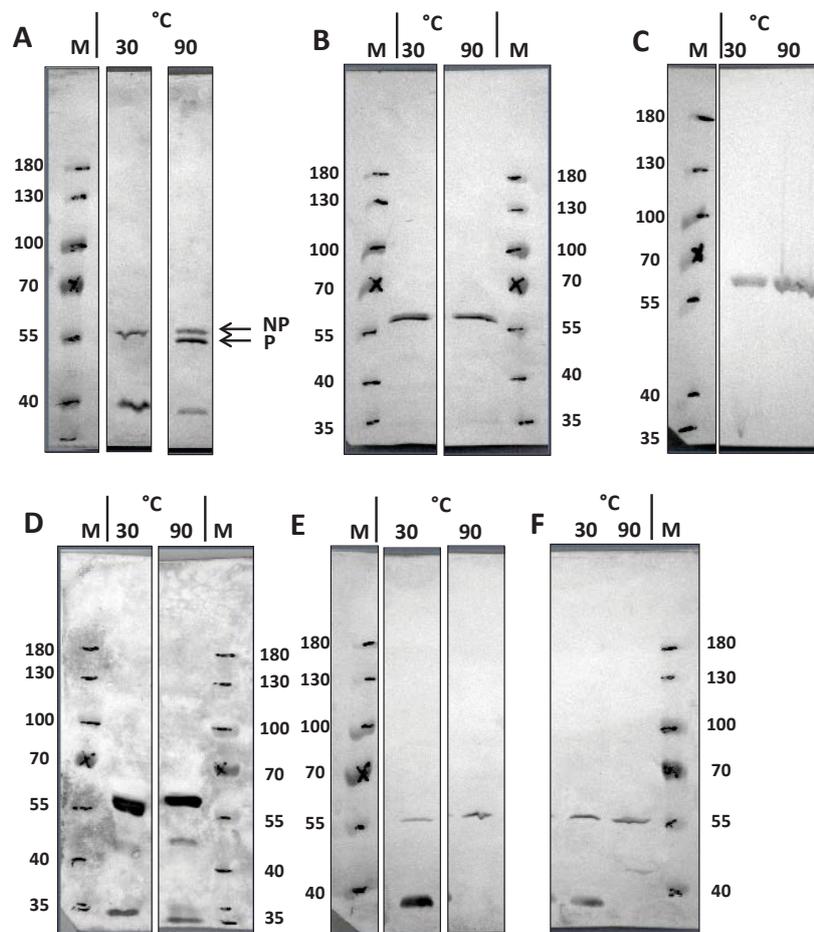


Abbildung 3.26: C-Pmp21 zeigte in Abhängigkeit von der Expressionsbedingung ein typisches Laufverhalten für einen β -barrel in der SDS-PAGE.

Das Laufverhalten von (A) AIDA-I (pIG101) nach induzierter Expression (B) C-Pmp21 (pSL12) -β-ME (C) C-Pmp21 (pSL12) +β-ME, (D) C-Pmp21 (pSL12) nach Expression in ArcticExpress Zellen, (E) kC-Pmp21 (pSL13) -β-ME und (F) kC-Pmp21 (pSL13) +β-ME. Die stabil integrierte Form (P) von AIDA-I konnte deutlich von der nicht stabilen Form (NP) unterschieden werden. Daher diente AIDA-I als Kontrolle auf Funktionalität des Assays. M: PageRuler™ Größenstandard. Die Detektion erfolgte nach Western Blot mittels anschließender Detektion durch Anti-His Antikörpern. Die Ergebnisse wurden mindestens 3 Mal wiederholt und die hier dargestellten Beispiele stellen typische, repräsentative Ergebnisse dar.

3.2.3 C-Pmp21 konnte auf der Oberfläche von BL21 nachgewiesen werden

Eine einfache und effiziente Möglichkeit, um die Präsentation von heterolog exprimierten ATs auf der Oberfläche von *E. coli* nachzuweisen, ist der Proteaseverdau (Kapitel 2.2.5.2). Dem Verdau folgt ein Western Blot mit Antikörperdetektion gegen das Membranprotein selber oder gegen einen angefügten N-terminalen His Tag. Für den Typ-V AT AIDA-I aus *E. coli* wurde so mit den Proteasen Trypsin, Proteinase K und Chymotrypsin eine Oberflächenpräsentation nach heterologer Expression in *E. coli* nachgewiesen (359).

Als Kontrolle wurde die Integrität der *E. coli*-Außenmembran durch die Detektion des periplasmatischen Maltosebindende Proteins (MBP) überprüft. Mit dem MBP-Antikörper konnten Doppelbanden bei allen Proben auf Höhe von ca. 42 kDa (MBP) und ca. 65 kDa (#) detektiert werden. Es wurde nicht berichtet, dass MBP unter denaturierenden Bedingungen Dimere bei ca. 65 kDa ausbilden kann. Daher kann diese Bande nur mit einer unspezifischen Detektion des polyklonalen Antikörpers erklärt werden. Unabhängig davon ist die Zellintegrität, aufgrund der Anwesenheit von MBP in den Experimenten, jedoch als nicht beeinträchtigt anzusehen (Abbildung 3.27 A+B).

Im Folgenden wurde als Kontrolle AIDA-I mit IPTG induzierbarem Promotor heterolog exprimiert. Die P-Proteinspezies konnte erfolgreich abverdaut werden. Die NP-Proteinspezies hingegen konnte nicht abverdaut werden, weil sie nicht vollständig durch die äußere Membran transportiert wurde (Abbildung 3.27 A). Ähnliche Beobachtungen wurden bereits mit AIDA-I gemacht (298). Deshalb wurde die Methode des Trypsinverdaus von C-Pmp21 zur Überprüfung der Oberflächenlokalisierung als geeignet angesehen.

Der Verdau von intakten C-Pmp21 exprimierenden *E. coli*-Zellen mit Trypsin zeigte eine Abnahme von ca. 50% der C-Pmp21 Bande (Abbildung 3.27 B). Es war daher davon auszugehen, dass mindestens 50% von C-Pmp21 auf die Oberfläche transportiert wurde. Da eine Trennung des oberflächenlokalisierten C-Pmp21 von periplasmatischem oder zytosolischem C-Pmp21 durch eine Membranisolation möglich war, wurde im Folgenden eine Membranisolation mit anschließendem Test auf geeignete Detegenzien durchzuführen.

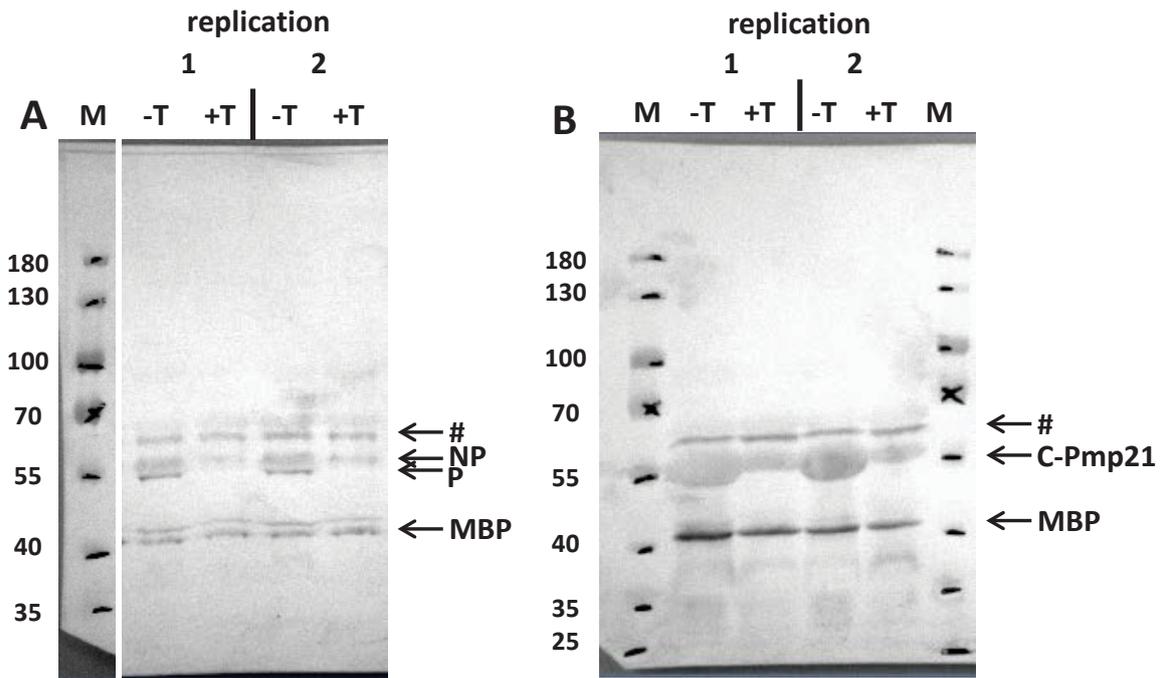


Abbildung 3.27: Bis zu 50% des exprimierten C-Pmp21 wird auf die Oberfläche von *E. coli* transportiert.

Durch Trypsinverdau ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) mit ganzen Zellen nach Expression ($\text{OD}_{600:4}$) bei 37°C für 1 h konnte die Oberflächenlokalisation überprüft werden. Die Ansätze mit Trypsin (+T) sowie ohne (-T) wurden im Western Blot mittels anschließender Detektion durch Anti-His Antikörper verglichen. Durch Detektion des periplasmatischen MBP mit einem entsprechenden Antikörper wurde die Integrität der *E. coli* Zellen während des Trypsinverdaus kontrolliert. Die mit # gekennzeichnete Bande deutet auf eine Unspezifität des MBP-Antikörpers hin; M: PageRuler™ Größenstandard. (A) Positivkontrolle: Verdau von *E. coli* Zellen mit heterolog exprimiertem AIDA-I nach Induktion mit IPTG. Die vollständig auf die Oberfläche transportierte, prozessierte Form P kann deutlich von der nicht vollständig auf die Oberfläche transportierten, nicht prozessierten Form NP unterschieden werden. (B) Verdau von *E. coli* Zellen mit heterolog exprimiertem C-Pmp21. Die Ergebnisse wurden mindestens 3 Mal wiederholt und die hier dargestellten Beispiele zeigen zwei typische, repräsentative Wiederholungen (*replications*) dar.

3.2.4 Isolation von *E. coli* Membranen mit C-Pmp21

Bevor C-Pmp21 aus den *E. coli* Membranen mit Detergenzien in Lösung gebracht werden kann und für weitere Reinigungsschritte zur Verfügung steht, muss eine Isolation der *E. coli* Membranen durchgeführt werden. Hierzu wurden die Zellen mit Hilfe einiger Durchläufe durch einen Zellaufschließer (*cell disruptor*) aufgeschlossen (Kapitel 2.2.5.3.2). Das Lysat wurde zuerst in einem Niedriggeschwindigkeits- und anschließend in einem Hochgeschwindigkeitszentrifugationsschritt getrennt, um zuerst Zelldebris, sowie Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) und anschließend lösliche Proteine von Zellmembranen zu trennen (Kapitel 2.2.5.4). Von jedem Zwischenschritt wurden äquivalente Konzentrationen in SDS-PAGE und im Western Blot analysiert (Abbildung 3.28).

Das SDS-Gel zeigt im Zellpellet eine Vielzahl von diskreten Banden wobei eine Bande bei ca. 57 kDa besonders prominent ist (Abbildung 3.28 A). Mit Hilfe des Western Blots (Abbildung

3 Ergebnisse

3.28 B) konnte C-Pmp21 bei ca. 57 kDa identifiziert werden. Das deutet darauf hin, dass nicht alle Zellen aufgeschlossen werden konnten oder C-Pmp21 in *inclusion bodies* vorlag. Der Vergleich von Pellet (Pe) und Überstand S1 zeigt, dass im Vergleich zum Zellpellet ein geringerer Anteil C-Pmp21 löslich oder membranassoziiert vorlag. Durch einen Hochgeschwindigkeitszentrifugationsschritt mit dem Überstand S1 konnte C-Pmp21 vollständig von den löslichen Proteinen (S2) getrennt werden und eindeutig als membranassoziiert bzw. -integriert identifiziert werden (Me).

Die Membranisolation deutet darauf hin, dass C-Pmp21 nach dem Transport in das Periplasma automatisch in die äußere Membran inseriert wurde. Um C-Pmp21 für weitere Analysen aufzureinigen zu können, musste dieses daher zuvor aus der Membran solubilisiert werden.

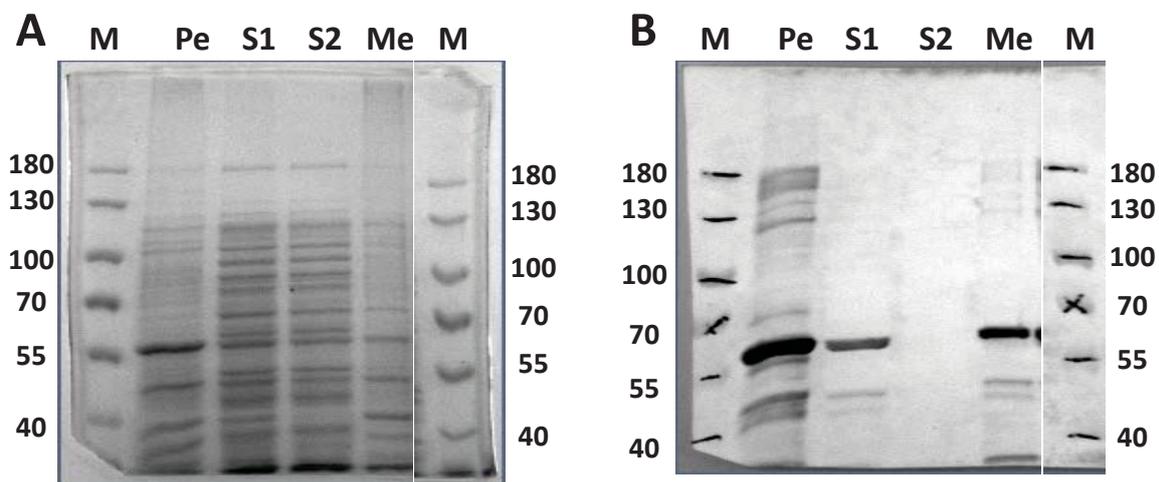


Abbildung 3.28: C-Pmp21 konnte erfolgreich mitsamt Membran isoliert werden.

Die Isolation von *E. coli* Membranen wurde mittels (A) Coomassie gefärbter SDS-PAGE und (B) Western Blot mit anschließender Detektion durch Anti-His Antikörpern überprüft; M: PageRuler™ Größensstandard. Das *E. coli* Zellpellet wurde in Lysispuffer gelöst und die Zellen durch mehrmaliges Passieren eines *cell disruptors* aufgeschlossen. Die Zelldebris und potentielle *Inclusion Bodies* (Pe) wurden anschließend durch Zentrifugation (19.000 xg) von den Membranen und löslichen Proteinen getrennt (S1). Die Membranen (Me) wurden schließlich durch Zentrifugation bei 100.000 xg von den löslichen Proteinen (S2) getrennt. Die Ergebnisse wurden mindestens 3 Mal wiederholt und die hier dargestellten Beispiele stellen typische, repräsentative Ergebnisse dar.

3.2.5 Detergenzscreening

Die zur Solubilisierung benötigte Detergenzkonzentration hängt teilweise von der kritischen mizellaren Konzentration (*critical micellar concentration; CMC*) des jeweiligen Detergenz ab. Die *CMC* stellt die Konzentration dar, bei der die Detergenzmonomere beginnen durch Selbstassoziation Mizellen auszubilden (360). Konzentrationen weit größer als die *CMC* werden üblicherweise zur Solubilisierung genutzt. Dadurch soll sichergestellt werden, dass

eine ausreichende Menge an Detergenz vorhanden ist, um die Lipiddoppelschicht abzusättigen, aufzubrechen und Mizellen aus Lipiden und Detergenzien zu bilden, wodurch das Zielprotein aus der Membran gelöst wird. Die Konzentration des Detergenz ist aber auch immer von dem jeweiligen Zielprotein abhängig. Die ideale Detergenzkonzentration für Solubilisierung, Aufreinigung und Kristallisierung muss daher empirisch bestimmt werden (361).

3.2.5.1 Detergenzscreening zur Solubilisierung von C-Pmp21

Zur Solubilisierung wurde ein Detergenzscreening durchgeführt, in dem 12 Detergenzien, die zur Solubilisierung von Membranproteinen geeignet sind, auf ihre Fähigkeit zur Solubilisierung von C-Pmp21 getestet wurden (Kapitel 2.2.5.5.1) (298,362). Es wurde die Solubilisierung mit 1 - 2% Detergenz bei verschiedenen Temperaturen (8°C, 20°C und 30°C) sowie ohne und mit 200 mM NaCl analysiert. SDS diente als Positivkontrolle.

Mit der Positivkontrolle SDS konnte C-Pmp21 unter allen Bedingungen im Vergleich zur Ausgangsprobe (*initial membrane isolate*) erfolgreich solubilisiert werden (Abbildung 3.29). Das gleiche traf für FC-16 zu. Die beste Solubilisierung konnte mit FC-16 und 200 mM NaCl beobachtet werden. Fos MEA 12 solubilierte C-Pmp21 lediglich durch Zugabe von 200 mM NaCl bei 8°C und 30°C. Daher wurden diese Detergenzien für weitere Screens verwendet.

Fos MEA 12 kann bei zu niedrigen Temperaturen ausflocken. Daher wurden weitere Analysen bei 30°C durchgeführt. Eine Salzkonzentration von 200 mM NaCl war entsprechend der Ergebnisse am effektivsten und wurde ebenfalls beibehalten. Es war bekannt, dass der β -barrel von AIDA-I aus *E.coli* erfolgreich mit Lauryldimethylamine-N-Oxide (LDAO) solubilisiert werden konnte (298). Daher wurde dieses Detergenz ebenfalls weiter verwendet. Im Folgenden sollte getestet werden, welches der Detergenzien C-Pmp21 am spezifischsten solubilierte um die spätere Aufreinigung zu erleichtern.

3 Ergebnisse

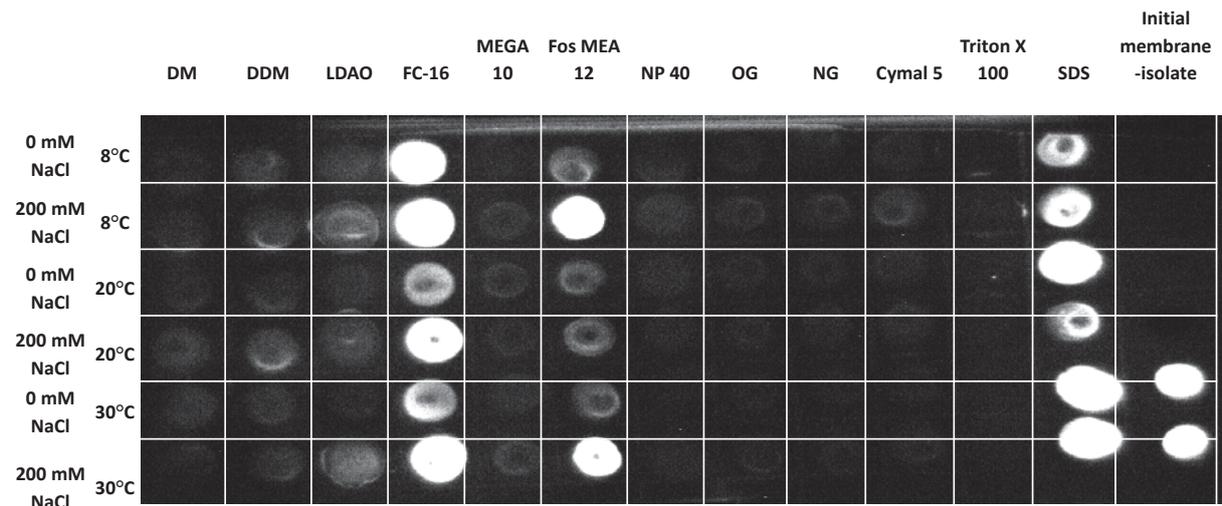


Abbildung 3.29: C-Pmp21 konnte durch FC-16 und Fos MEA 12 am besten solubilisiert werden.

E. coli Membranen mit C-Pmp21 wurden auf 5 mg ml^{-1} Gesamtprotein mit Solubilisierungspuffer verdünnt (Ausgangssprobe: *initial membrane isolate*) und für 1 h bei den oben dargestellten Salzkonzentrationen, Temperaturen und Detergenzien (2% v/v bei Triton X-100 und SDS; 1% v/v bei allen anderen) inkubiert. Hierbei diente SDS als Positivkontrolle. Anschließend wurden unlösliche Bestandteile bei $100.000 \times g$ abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Nitrocellulosemembran getropft und mittels horseradish peroxidase (HRP) gekoppelten Anti His Antikörpern detektiert. Die Ergebnisse wurden 2 Mal wiederholt und die hier dargestellten Beispiele stellen typische, repräsentative Ergebnisse dar.

3.2.5.2 Detergenzscreen zur Auswahl des für C-Pmp21 selektivsten Detergenz

Durch den vorherigen Screen (Kapitel 3.2.5.1) konnte nicht eindeutig analysiert werden, ob C-Pmp21 vollständig aus dem *initial membrane isolate* solubilisiert wurde. Außerdem bestand die Möglichkeit, dass durch eines der ausgewählten Detergenzien nur ein besonders geringer Anteil *E. coli* Membranproteine solubilisiert würde und es somit einen Vorteil bei der späteren Aufreinigung verschaffen könnte. Daher wurde der Detergenzscreen aus Kapitel 3.2.5.1 nun mit der Vorauswahl an Detergenzien wiederholt. Anschließend erfolgte die Analyse bezüglich vollständiger Löslichkeit aus den Membranen und Reinheit mittels SDS-PAGE und Western Blot.

Lediglich durch FC-16 konnte ein großer Anteil C-Pmp21 aus dem Pellet gelöst werden (Abbildung 3.30). Mit Fos MEA 12 wurde nur ein sehr geringer Anteil C-Pmp21 und ein großer Anteil verunreinigender *E. coli* Membranproteine solubilisiert werden. Für LDAO konnte keine Solubilisierung detektiert werden.

Um eine vollständige Solubilisierung zu erreichen musste im Folgenden das geeignete Membranproteinkonzentration- zu Detergenz-Verhältnis von FC-16 bestimmt werden.

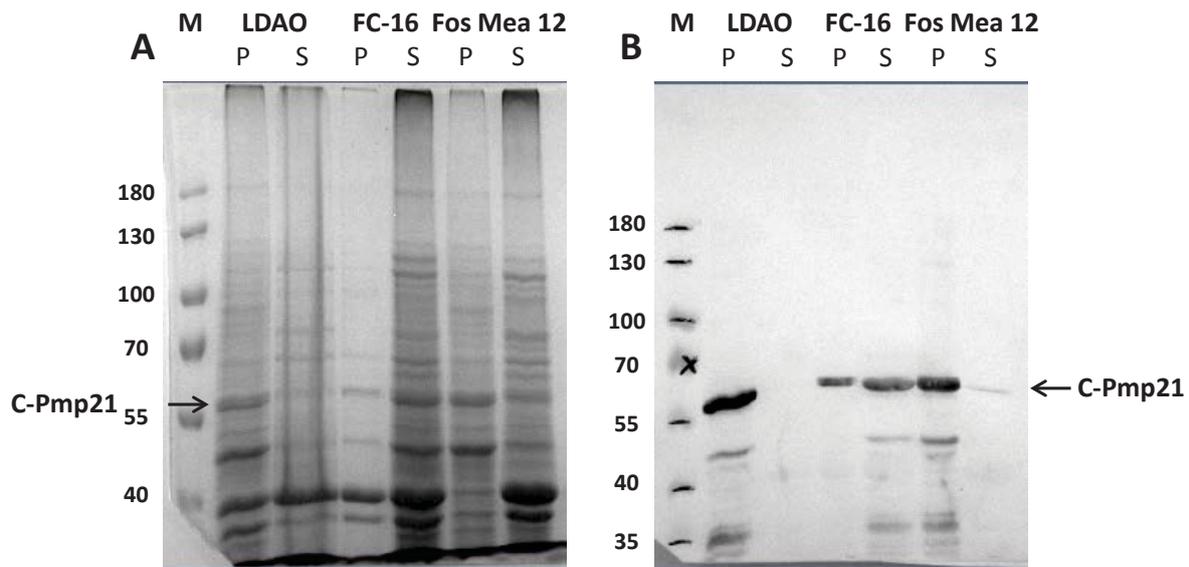


Abbildung 3.30: Aufgrund der geringen Löslichkeit in den anderen Detergenzien bleibt FC-16 am besten geeignete zur Solubilisierung von C-Pmp21.

Die Solubilisierung von *E. coli* Membranen mit C-Pmp21 (5 mg ml^{-1} Gesamtprotein) erfolgte mit 200 mM NaCl bei 30°C mit jeweils 1% LDAO, FC-16 oder Fos MEA 12. Anschließend wurden Pellet (P) und Überstand (S) in der (A) SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung und (B) im Western Blot mit anschließender Detektion durch alkalische Phosphatase gekoppelte Anti-His Antikörper, überprüft; M: PageRuler™ Größenstandard.

3.2.5.3 Bestimmung der Membranproteinkonzentration, die zur vollständigen Solubilisierung führt

Die Membranproteinkonzentration wurde auf $5, 4, 3, 2 \text{ mg ml}^{-1}$ mit Solubilisierungspuffer verdünnt und wie in Kapitel 3.2.5.1 mit 200 mM NaCl und 1% FC-16 bei 30°C solubilisiert. Anschließend erfolgte die Analyse bezüglich vollständiger Löslichkeit aus den Membranen durch Vergleich von Pellet (P) und Überstand (S) im Western Blot.

Bei allen Membranproteinkonzentrationen konnte eine kräftige Bande von C-Pmp21 im Überstand festgestellt werden (Abbildung 3.31). Die C-Pmp21-Konzentration im Pellet nahm mit Verringerung der Membranproteinkonzentration kontinuierlich ab. Bei 2 mg ml^{-1} konnte kein C-Pmp21 mehr im Pellet detektiert werden.

2 mg ml^{-1} war die optimale Membranproteinkonzentration für die höchste Solubilisierungseffizienz und wurde bei den folgenden Aufreinigungen verwendet.

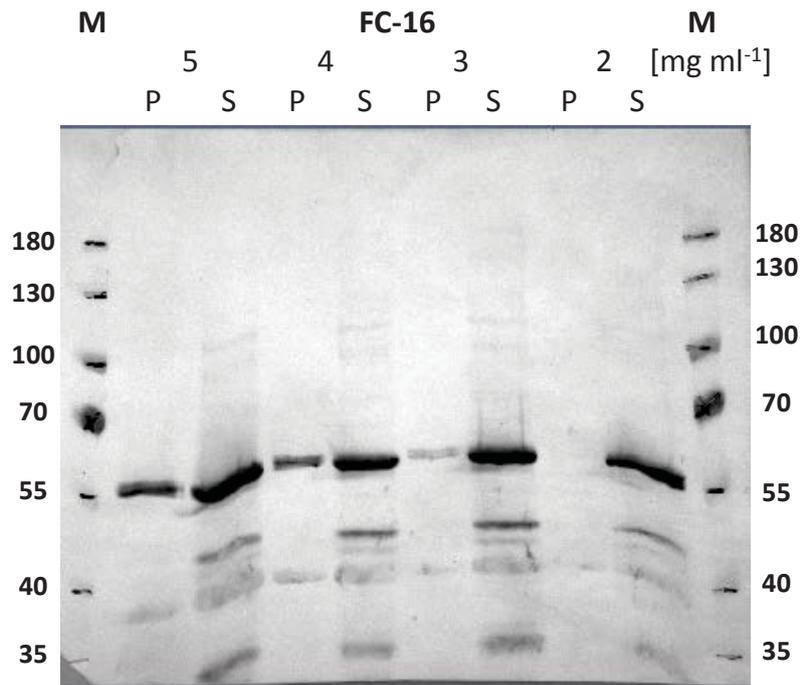


Abbildung 3.31: C-Pmp21 wird am effizientesten bei einer Membrankonzentration von 2 mg ml⁻¹ solubilisiert. Die Solubilisierung von *E. coli* Membranen mit C-Pmp21 (5, 4, 3, 2 mg ml⁻¹ Gesamtprotein) erfolgte mit 200 mM NaCl bei 30°C mit 1% FC-16. Anschließend wurden Pellet (P) und Überstand (S) von C-Pmp21 im Western Blot mit anschließender Detektion durch Anti-His Antikörpern überprüft; M: PageRuler™ Größenstandard.

3.2.6 Selektion einer homogenen C-Pmp21 Proteinspezies mittels Aufreinigung durch immobilisierte Metall-Ionen-Affinitätschromatographie (IMAC) und SEC

Membranproteine werden üblicherweise als Protein-Detergenz-Komplexe (PDK) aufgereinigt. Die Löslichkeit des PDK in Wasser erlaubt die Anwendung der gleichen Aufreinigungstechniken wie für wasserlösliche Proteine. Der Hauptunterschied bei Membranproteinen besteht darin, dass die Aufreinigung mit Detergenz in allen Laufpuffern durchgeführt wird. Dies ist nötig, da PDKs dynamisch sind. Bei Abwesenheit von freiem Detergenz im Laufpuffer würden sie sofort die während der Solubilisierung eingebrachte Detergenzhülle verlieren. Die Detergenzkonzentration sollte jederzeit über der CMC liegen, kann aber ca. zehnfach geringer sein als die für die Solubilisierung benötigte Konzentration. Als Richtwert kann eine Detergenzkonzentration von 0,1% angenommen werden (363).

3.2.6.1 Aufreinigung von C-Pmp21 mittels IMAC

Um die optimalen Wasch- und Elutionsbedingungen aus Kombination von Lauf- und Elutionspuffer zur Aufreinigung zu ermitteln und teures Detergenz zu sparen, erfolgten die ersten Aufreinigungen in kleinem Maßstab aus Pellets von 1 L Expressionskulturen. Ein

3 Ergebnisse

typisches IMAC Chromatogramm ist in Abbildung 3.32 A zu sehen (2.2.5.6.3). Die jeweils höchsten Fraktionen wurden in der SDS-PAGE und im Western Blot analysiert (Abbildung 3.32 B und C).

C-Pmp21 konnte bei ca. 57 kDa nicht im Durchfluss und in den Waschfraktionen, sondern lediglich in den Elutionsfraktionen detektiert werden. Zusätzlich zu der Bande bei ca. 57 kDa wurden in den Elutionsfraktionen noch Banden bei ca. 50 und 35 kDa detektiert. Im Western Blot wird ersichtlich, dass diese ebenfalls durch den Anti His Antikörper detektiert werden konnten. Somit handelte es sich dabei vermutlich um nicht vollständig entfaltetes C-Pmp21 oder Degradationsprodukte. In Folgenden wurde eine SEC der vereinigten und aufkonzentrierten Elutionsfraktionen durchgeführt um die Reinheit und Homogenität von C-Pmp21 zu überprüfen.

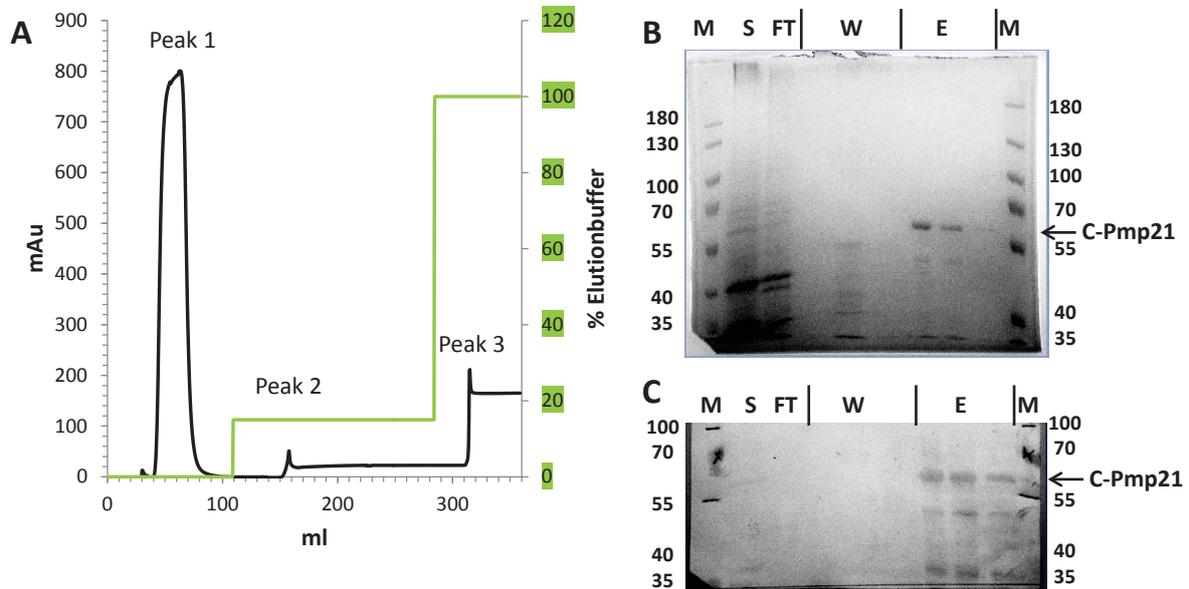


Abbildung 3.32: Aufreinigung von C-Pmp21 aus 1 L Expressionskultur mittels IMAC.

(A) Chromatogramm einer IMAC. Die x-Achse zeigt das Elutionsvolumen bei einer Flußrate von 2 ml min^{-1} , während die linke y-Achse die Absorption bei 280 nm in *milli absorbance units* (*mAu*) zeigt. Die rechte y-Achse den Anteil des imidazolhaltigen Elutionspuffers (200 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 200 mM Imidazol, 0,1% FC-16, pH 8) in %. Das schwarze Chromatogramm zeigt die *mAu* des Eluats, während die grüne Linie den Anteil des Elutionspuffer zum jeweiligen Elutionsvolumen darstellt. Das Signal des Durchfluss (Peak 1 / FT) entsprach nicht gebundenen Proteinen des Überstands mit den solubilisierten Proteinen. Durch einen Waschschrift (Peak 2 / W) mit 15% Elutionspuffer (75 mM Imidazol, pH 8) wurden unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Die Elution von C-Pmp21 erfolgte mit 100% Elutionspuffer (200 mM Imidazol, pH 8) (Peak 3 / E). Exemplarische Fraktionen des Überstands (S), Durchfluss (FT), Waschschrift (W) und der Elution (E) wurden mittels (B) Coomassie gefärbter SDS-PAGE und (C) Western Blot mit anschließender Detektion durch Anti-His Antikörpern überprüft; M: PageRuler™ Größenstandard. Die Ergebnisse wurden mindestens 3 Mal wiederholt und die hier dargestellten Beispiele stellen typische, repräsentative Ergebnisse dar.

3.2.6.2 Selektion einer homogenen C-Pmp21 Proteinspezies durch SEC

Alle IMAC-Elutionsfraktionen wurden vereinigt und für die semipräparative SEC auf 4,2 mg ml⁻¹ aufkonzentriert (*Vivaspin® 2 Centrifugal concentrators* mit Polyethersulfon-Membran und Ausschlussgröße von 30 kDa wurden nach Herstellerangaben verwendet; Kapitel 2.1.1). Durch SEC (Kapitel 2.2.5.7.2) kann die Homogenität, Reinheit und Stabilität eines PDK bestimmt werden. Das Elutionsvolumen und die Form des Chromatogramms geben Auskunft über den Oligomierzustand und die Dispersion des PDK. Wenn ein Peak nahe des V_0 liegt deutet das auf Aggregation des PDK hin. Existieren mehrere Peaks deutet das auf verschiedene oligomere Formen von PDKs hin (361). Für die Proteinkristallisation ist es wichtig eine oligomere Form des PDK zu isolieren.

Ein typisches SEC Chromatogramm ist in Abbildung 3.33 A zu sehen. Es ist ein Hauptpeak (3) mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 370 kDa zu Erkennen. Der Peak 3 besitzt mehrere Seitenpeaks bzw. Schultern, die bis an das Totvolumen (V_0) der Säule reichen und somit vermutlich teilweise Aggregate darstellten (1, 2, 4, 5). Die apparenten Molekulargewichte betragen: Peak 1= ca. 1130 kDa, Peak 2= ca. 640 kDa, Peak 4= ca. 245 kDa und Peak 5= ca.70 kDa. Es wurden 0,3 ml Fraktionen gesammelt und in der SDS-PAGE untersucht. In den Peaks 1 - 4 konnte eine Bande auf Höhe von ca. 57 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 3.33 B und C). Im Western Blot wurden die Banden 1, 3 und 4 als C-Pmp21 identifiziert (Abbildung 3.33 D und E). Des Weiteren konnten hauptsächlich in Peak 4 wieder die vermeintlichen Degradationsbanden in Höhe von 50 kDa nachgewiesen werden. In Peak 5 konnte kein Protein nachgewiesen werden.

Im Folgenden wurde das Protein im Peak 3 aufkonzentriert, da dieser am größten war und somit C-Pmp21 offenbar eine Tendenz zur verstärkten Ausbildung des PDK bei diesem Elutionsvolumen hatte. Um zu überprüfen ob die Homogenität des Peaks erhalten werden konnte oder sich das Elutionsvolumen änderte, wurden mit dem aufkonzentriertem C-Pmp21 weitere SEC Untersuchungen durchgeführt.

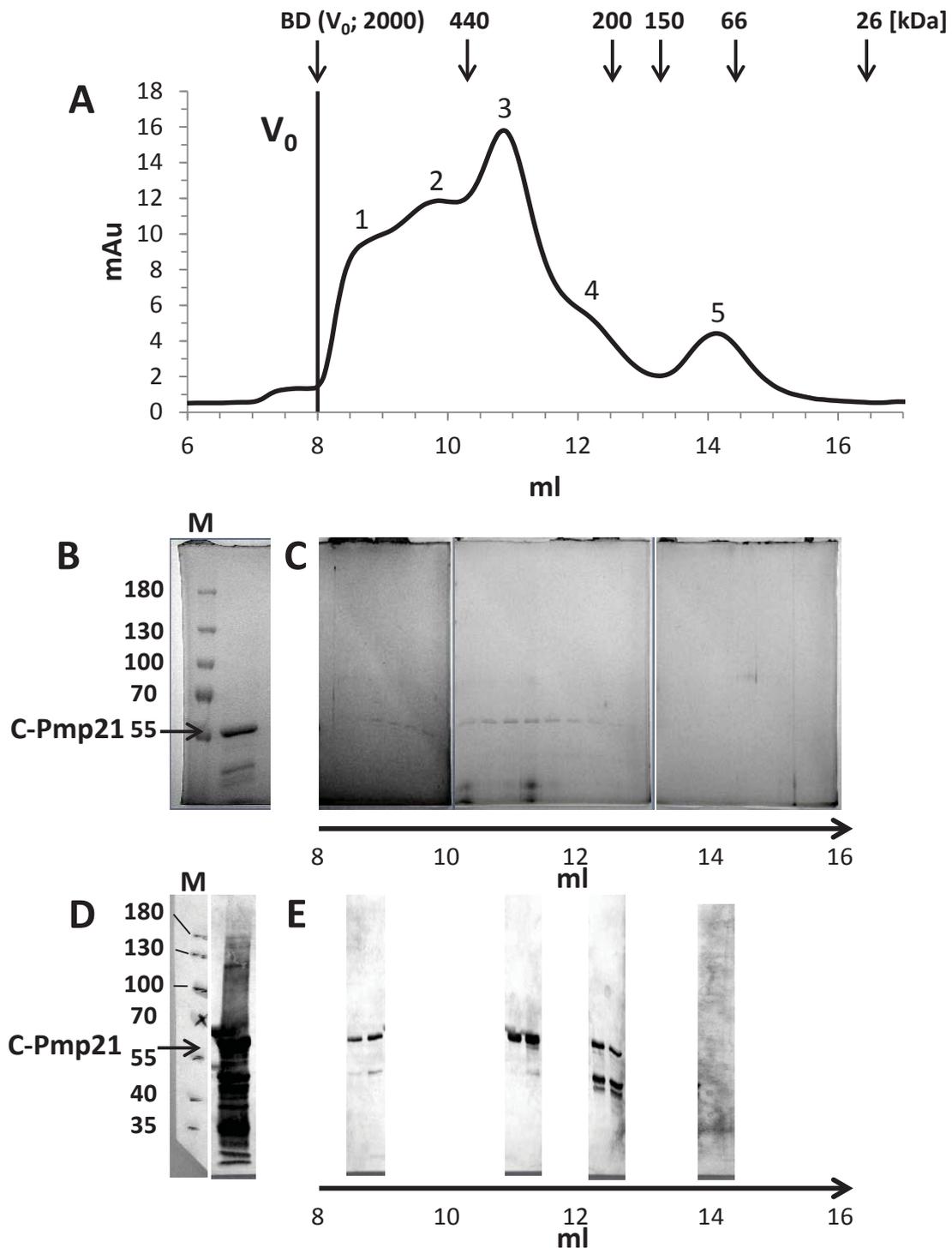


Abbildung 3.33: C-Pmp21 bildet Aggregate und Proteinspezies unterschiedlicher Größe.

(A) Semipräparative SEC (HR 10/30 Superdex 200) von C-Pmp21 nach der Aufkonzentrierung der vereinigten IMAC Elutionsfraktionen auf $4,2 \text{ mg ml}^{-1}$. Die Flussrate zur Trennung der Probe in SEC-Laufpuffer (200 mM HEPES, 200 mM NaCl, 0,1% FC-16, pH 8) betrug $0,3 \text{ ml min}^{-1}$. Über dem Chromatogramm ist das mittels blue dextran (BD) bestimmte Totvolumen (V_0) sowie die Größen der globulären Standardproteine angegeben (B und D) Die Ausgangsprobe für die SEC auf einer Coomassie blau gefärbten SDS-PAGE und im Western Blot mit anschließender Detektion durch Anti-His Antikörpern; M: PageRuler™ Größenstandard. (C) Die SEC Elutionsfraktionen wurden zu je 0,3 ml gesammelt und jede Fraktion mittels Coomassie blau gefärbter SDS-PAGE überprüft. (D) Ausgewählte Fraktionen wurden mittels Western Blot und anschließender Detektion durch Anti-His Antikörpern analysiert.

3.2.6.3 Aufkonzentrierung von C-Pmp21 führte zu Aggregation

Für die Proteinkristallisation muss die Proteinkonzentration, die benötigt wird, um erfolgreich einen Kristall zu züchten, empirisch ermittelt werden. Es empfiehlt sich jedoch mit einer vergleichsweise hohen Konzentration von 10 - 15 mg ml⁻¹ zu beginnen, da die Kristallbildung schneller eintritt oder es schneller zu einer Präzipitation der Proteine kommt, was auf eine Fehlfaltung hinweisen kann (361). Während der Aufkonzentrierung kann es durch eine prozessbedingte partiell sehr hohe Proteinkonzentration am Boden des *Vivaspin*[®] *2 concentrators* zu einer Aggregation der aufgereinigten Proteine kommen. Um dies zu überprüfen, wurde in einer weiteren SEC überprüft, ob es zu einer Veränderung des Elutionsvolumens von C-Pmp21 Peak 3 kommt.

In Abbildung 3.34 sind exemplarisch die SEC Chromatogramme vor und nach der Aufkonzentrierung von Peak 3 überlagert. Ca. 50% von Peak 3 eluierten nach der Aufkonzentrierung auf 1,5 mg ml⁻¹ nahe des V₀ (Peak 1). Es wurde ersichtlich, dass Aufkonzentrierung zur Aggregation von Peak 3 führte.

Bei der Aufkonzentrierung kommt es vor, dass freie Mizellen des Detergenz, die zu groß sind um die Membran zu passieren, zusammen mit dem PDK aufkonzentriert werden. Diese Akkumulation führt nicht nur während der Kristallisierung zu einer erhöhten Phasentrennung, welche die Kristallisierung inhibieren kann (361), sondern kann ebenfalls zu einer detergenzbedingten Aggregation von C-Pmp21 führen. Um dieses zu verhindern wurden Aufkonzentrierungen von Peak 3 unter Verwendung geringerer FC-16 Konzentrationen durchgeführt und deren Aggregationsverhalten mittels SEC analysiert.

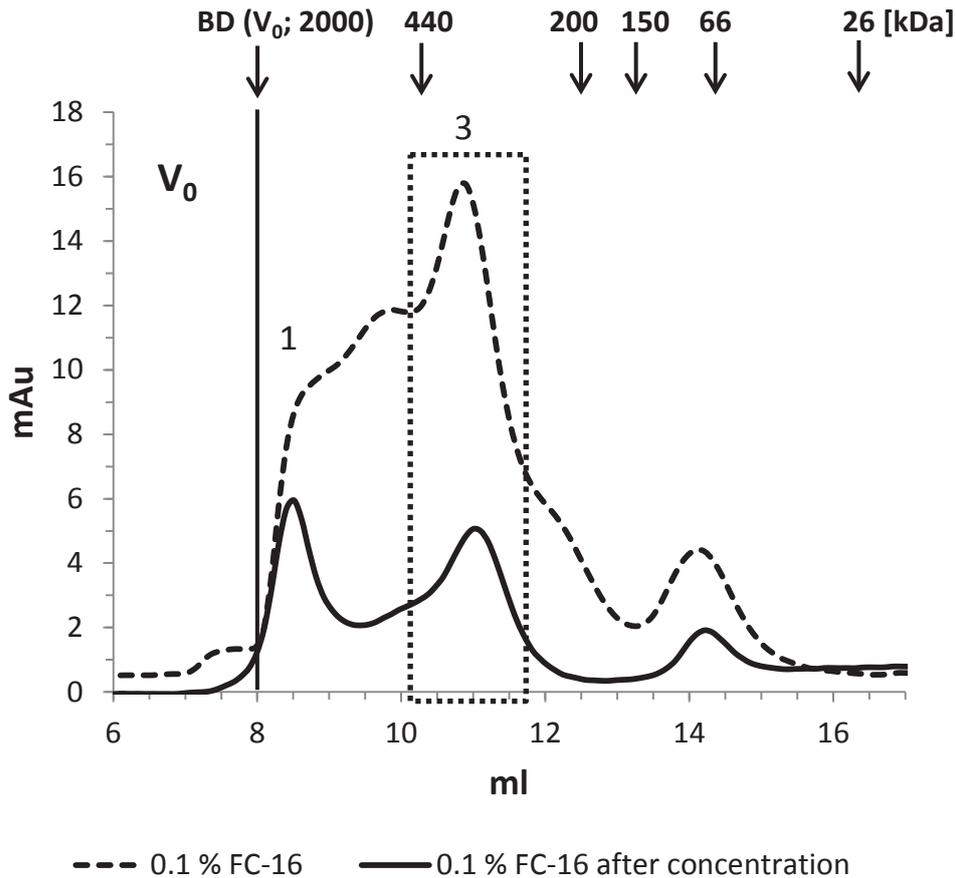


Abbildung 3.34: Aufkonzentrierung von C-Pmp21 führte zu Aggregation.

Die Flussrate zur Trennung der Probe in SEC-Laufpuffer (200 mM HEPES, 200 mM NaCl, 0,1% FC-16, pH 8) betrug $0,3 \text{ ml min}^{-1}$. Über dem Chromatogramm ist das mittels blue dextran (BD) bestimmte Totvolumen (V_0) sowie die Größen der globulären Standardproteine angegeben. (--) Semipräparative SEC (HR 10/30 Superdex 200) von C-Pmp21 nach der IMAC ($4,2 \text{ mg ml}^{-1}$). (—) Semipräparative SEC (HR 10/30 Superdex 200) von C-Pmp21 nach der Aufkonzentrierung (*after concentration*) der markierten Peakfläche (10,2–11,7 ml) auf $1,5 \text{ mg ml}^{-1}$. Die Aufkonzentrierung erfolgte in *Vivaspin® 2 Centrifugal concentrators* mit Polyethersulfon-Membran und einer Ausschlussgröße von 100 kDa nach Herstellerangaben (Kapitel 2.1.1).

Daher wurde im Folgenden die FC-16 Konzentration während der IMAC und allen Folgeschritten auf 0,01% verringert (Abbildung 3.35 A). Die SEC direkt nach der IMAC zeigte im Vergleich zu der SEC mit 0,1% FC-16 (Abbildung 3.35) eine stärkere Ausbildung von Aggregaten (Peak 1). Nach Aufkonzentrierung der Proteine von Peak 3 und wiederholter SEC wurde allerdings eine geringere Ausbildung von Aggregaten als bei 0,1% FC-16 beobachtet. Folglich konnte eine Aggregation durch Verwendung einer geringeren FC-16 Konzentration verhindert werden. Daher wurde bei weiteren Aufreinigungen 0,01% FC-16 in allen Laufpuffern verwendet.

C-Pmp21 enthält 3 Cysteine von denen nicht bekannt ist, ob sie natürlicherweise Disulfidbrücken ausbilden. Durch unnatürliche Ausbildung von Disulfidbrücken kann

3 Ergebnisse

während der Aufreinigung ebenfalls die Aggregation von Proteinen begünstigt werden (364). Aufgrund der verwendeten IMAC Säule mit chelatiertem Nickel war es nicht möglich, bereits ab der Solubilisierung ein reduzierendes Agens zu verwenden. Daher wurde C-Pmp21 nach der Elution zu 50% mit SEC-Laufpuffer, der 4 mM β -ME enthielt, gemischt und anschließend aufkonzentriert. Nach anschließender SEC (Abbildung 3.35 B) konnte eine deutlich geringere Ausbildung von Aggregaten in Form von Peak 1 beobachtet werden. Nach Aufkonzentrierung von Peak 3 und wiederholter SEC wurde eine geringere Ausbildung von Aggregaten als ohne β -ME beobachtet. Folglich wurde für die finale Aufreinigung die Konzentration von FC-16 in allen Laufpuffern auf 0,01% FC-16 reduziert und C-Pmp21 vor der Aufkonzentrierung für die SEC mit β -ME haltigem SEC-Laufpuffer um 50% verdünnt.

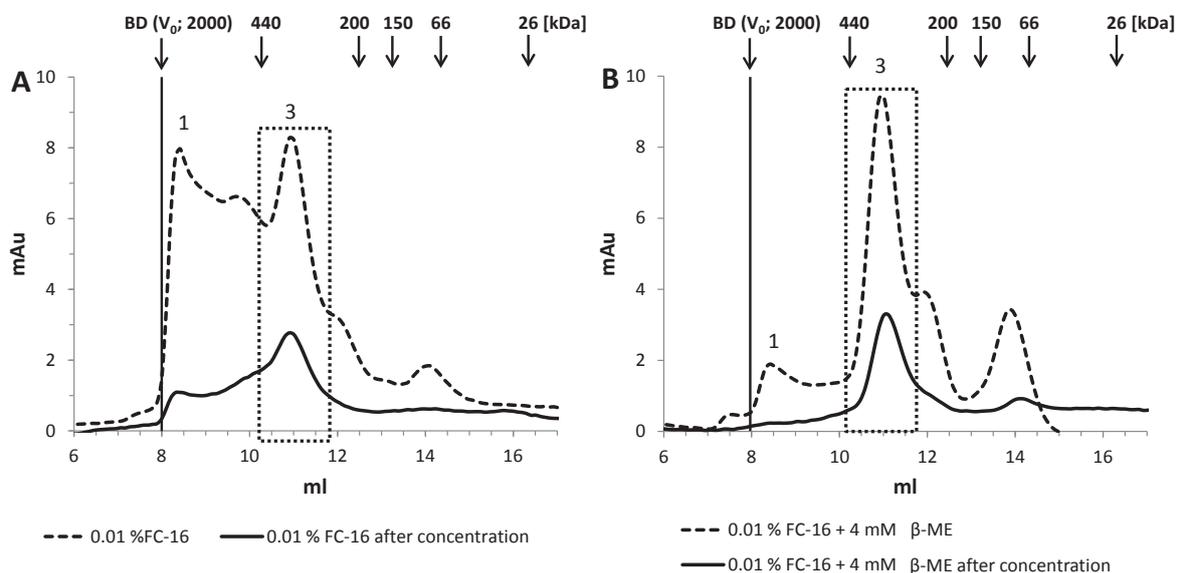


Abbildung 3.35: Eine geringere FC-16 Konzentration im Laufpuffer, sowie β -ME verringern die Ausbildung von C-Pmp21-Aggregaten.

Die Flussrate zur Trennung der Probe in SEC-Laufpuffer (200 mM HEPES, 200 mM NaCl, 0,01% FC-16, pH 8) betrug $0,3 \text{ ml min}^{-1}$. Über dem Chromatogramm ist das mittels blue dextran (BD) bestimmte Totvolumen (V_0) sowie die Größen der globulären Standardproteine angegeben. (A) (--) Semipräparative SEC (HR 10/30 Superdex 200) von C-Pmp21 ($2,4 \text{ mg ml}^{-1}$) mit 0,01% FC-16 nach der IMAC mit 0,01% FC-16 (–). Semipräparative SEC (HR 10/30 Superdex 200) von C-Pmp21 mit 0,01% FC-16 nach der Aufkonzentrierung der markierten Peakfläche (10,2–11,7 ml) auf $0,4 \text{ mg ml}^{-1}$. (B) (--) Semipräparative SEC von C-Pmp21 ($2,4 \text{ mg ml}^{-1}$) wie in (A), allerdings mit Zusatz von 4 mM β -ME nach der IMAC. (–) Semipräparative SEC von C-Pmp21 wie in (A), allerdings mit Zusatz von 4 mM β -ME nach der Aufkonzentrierung der markierten Peakfläche (10,2–11,7 ml) auf $0,4 \text{ mg ml}^{-1}$.

3.2.6.4 Finale Aufreinigung im Maßstab für Kristallisationsexperimente

Um eine angemessen hohe Proteinkonzentration für Kristallisationsexperimente zu erhalten, erfolgte die Aufreinigung aus Zellpellets von 12 L BL21 Expressionskultur. Entsprechend der vorher empirisch bestimmten Bedingungen erfolgte die Aufreinigung mittels IMAC (Abbildung 3.36 A). Das eluierte C-Pmp21 wurde dann mit 50% SEC-Laufpuffer verdünnt, auf

3 Ergebnisse

27 mg ml⁻¹ in *Vivaspin*® 2 *Centrifugal concentrators* und einer Ausschlussgröße von 100 kDa nach Herstellerangaben (Kapitel 2.1.1) aufkonzentriert und mittels SEC der ausgeprägteste Peak (3) für die zweite Aufkonzentrierung ausgewählt. Peak 3 von C-Pmp21 wurde auf 14 mg ml⁻¹ aufkonzentriert. Die erneute SEC ergab keine wesentliche Aggregation (Abbildung 3.36 B). Vor dem Beginn der Kristallisierungsexperimente wurde eine hohe Reinheit von C-Pmp21 in der Coomassie gefärbten SDS-PAGE sichergestellt (Abbildung 3.36 C).

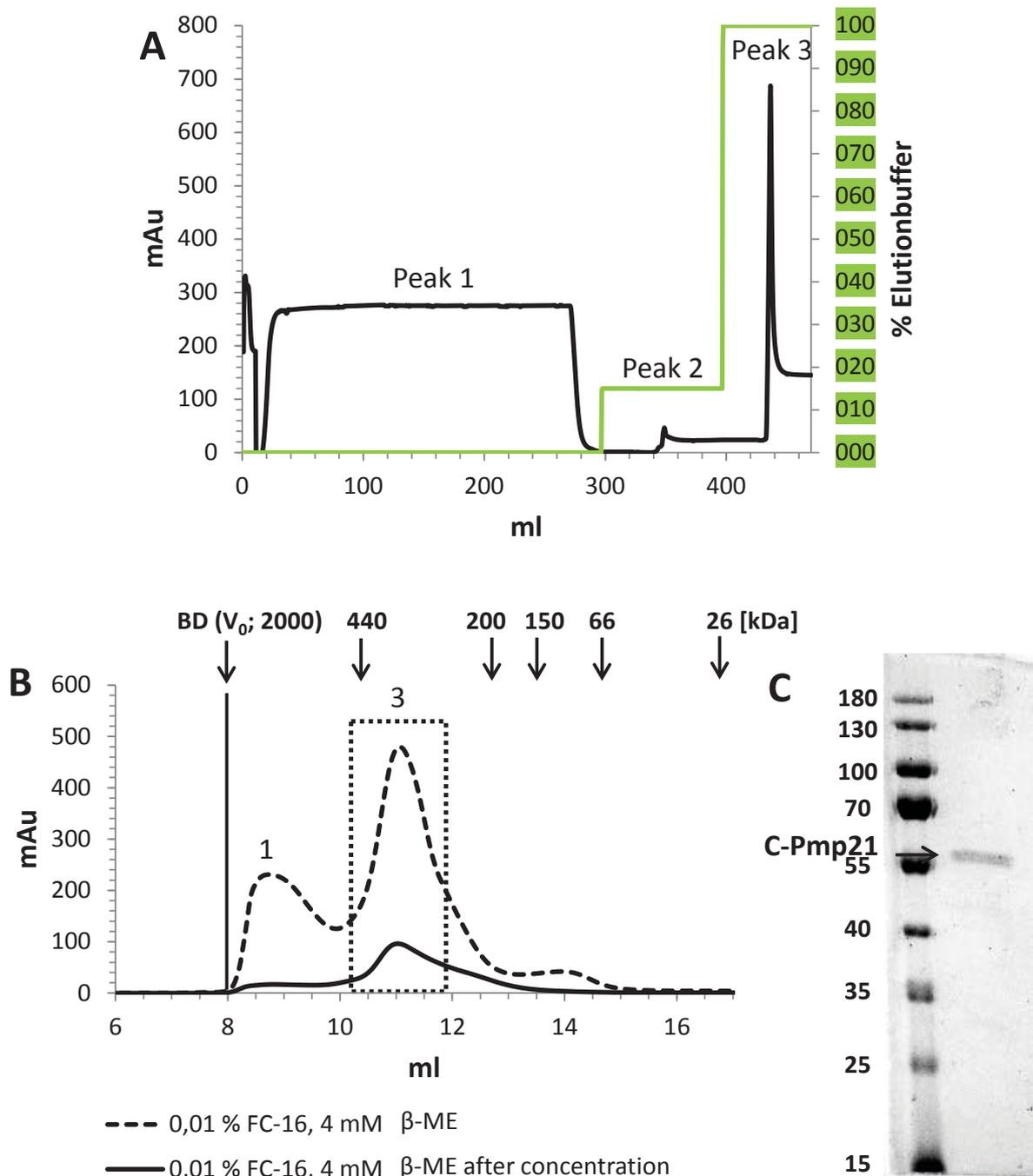


Abbildung 3.36: Finale Aufreinigung von C-Pmp21 aus dem Pellet von 12 L Expressionskultur.

(A) Chromatogramm einer IMAC. Die x-Achse zeigt das Elutionsvolumen, während die linke y-Achse die Absorption bei 280 nm in *milli absorbance units (mAu)* zeigt. Die rechte y-Achse zeigt den Anteil des

3 Ergebnisse

imidazolhaltigen Elutionspuffers in %. Die schwarze Kurve zeigt die *mAu* des Eluats, während die grüne Kurve den Anteil des Elutionspuffer zum jeweiligen Elutionsvolumen darstellt. Das Signal des Durchfluss (Peak 1) entsprach nicht gebundenen Proteinen des Überstands mit den solubilisierten Proteinen. Durch einen Waschschriff (Peak 2) mit 15% Elutionspuffer (200 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 75 mM Imidazol, 0,01% FC-16, pH 8) wurden unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Die Elution von C-Pmp21 erfolgte dann mit 100% Elutionspuffer (200 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 200 mM Imidazol, 0,01% FC-16, pH 8) (Peak 3). **(B)** (--) Semipräparative SEC (HR 10/30 Superdex 200) von C-Pmp21 nach der Aufkonzentrierung der vereinigten IMAC Elutionsfraktionen auf 27 mg ml^{-1} . Die Flussrate zur Trennung der Probe in SEC-Laufpuffer (20 mM Hepes, 200 mM NaCl, 0,01% FC-16, 4 mM β -ME, pH 8) betrug $0,3 \text{ ml min}^{-1}$. (–) SEC unter den gleichen Bedingungen nach der Aufkonzentrierung der markierten SEC-Peakfläche 3 (10,2-11,7 ml) auf 14 mg ml^{-1} . **(C)** Die aufkonzentrierte SEC Peakfraktion 3 wurde parallel mittels Coomassie gefärbter SDS-PAGE auf ihre Reinheit überprüft.

3.2.7 Pmp21 ähnelt mit seiner β -sheet-reichen Sekundärstruktur der eines β -barrel

Um die Sekundärstruktur des rekombinanten C-Pmp21 zu bestimmen, wurde eine Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie durchgeführt. CD-Spektroskopie ist eine erprobte Möglichkeit zur Analyse von β -barrel Proteinen, das unter anderem ausgiebig zur Analyse von OmpA aus *E. coli* verwendet wurde (356,365,366). Dadurch sollte ebenfalls die Entscheidung gefällt werden, ob natives Protein vorlag, das für die Kristallisierung geeignet ist und kein *random coil* gefaltetes Protein.

Für die CD-Spektroskopie wurden die Proteine der SEC-Peaks 1, 2 und 3 (Abbildung 3.33) verwendet. Anhand der Daten war erkennbar, dass die Elliptizität aller Proteine bei ca. 200 nm die x-Achse schnitt (Abbildung 3.37 A). Das sprach dafür, dass bei keinem der Peaks eine ausschließliche *random coil*-Struktur vorlag. Es gab bei keinem der Proteine ein distinktes Minimum bei 217 nm, welches für eine eindeutig ausgeprägte β -sheet-Struktur sprechen würde. Die Spektren entsprachen vielmehr einem durchgehenden Minimum von 205 - 225 nm. Die Proteine aus Peak 1 und 2 hatten eine höhere Elliptizität als die Proteine aus Peak 3. Außerdem außerdem konnte bei ca. 212 nm eine Erhöhung der Elliptizität festgestellt werden. Das spräche für einen höheren α -Helixanteil als bei Peak 1 und 2. Insgesamt betrachtet würde man jedoch bei den Spektren der Proteine von Peak 1, 2 und 3 eine Mischung von α -Helices, β -sheets und *random coils* erwarten.

Um eine genauere Aussage über die Sekundärstrukturen treffen zu können, wurde mit der Software K2D3 eine Analyse der Spektren durchgeführt. K2D3 wurde speziell für die Auswertung von Spektren mit eingeschränktem Umfang der Wellenlängenanalyse und zur Erkennung von β -sheets programmiert (367). Die Auswertung ergab, dass die Proteine aus Peak 1 und 2 sich am ähnlichsten bezüglich des Anteils der Sekundärstrukturelemente waren (Abbildung 3.37 B). Peak 3 unterschied sich dahingehend, dass der Anteil an α -Helices ca.

3 Ergebnisse

doppelt so hoch war wie bei Peak 1 und 2. Der Anteil an β -sheets war entsprechend geringer. Der Anteil an *random coils* war bei allen untersuchten Peaks knapp unter 50%.

Es wurde daher geschlussfolgert, dass trotz geringer Abweichungen eine native Faltung von C-Pmp21 in allen 3 Peaks der Proteinspezies vorlag und der Versuch einer Kristallisierung vielversprechend sein könnte.

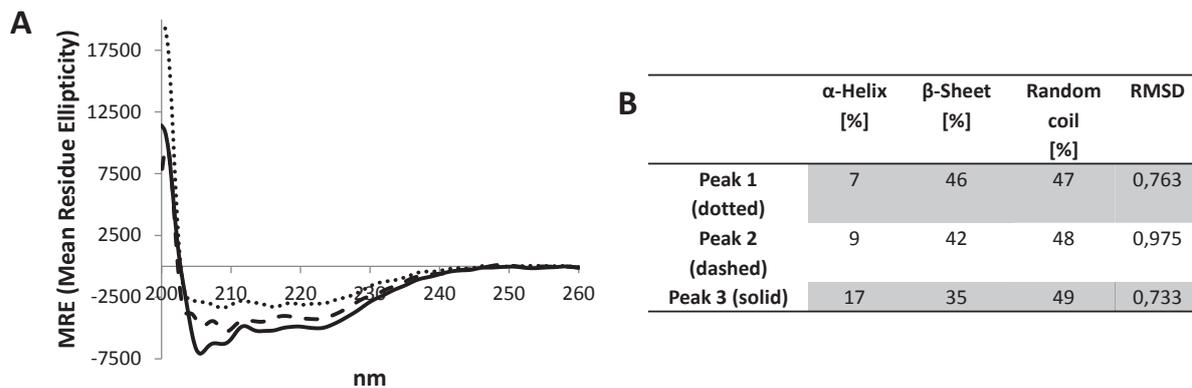


Abbildung 3.37: Alle C-Pmp21 Proteinspezies bilden zu ähnlichen Verhältnissen β -sheet-reiche Strukturen aus.

(A) CD-Spektroskopie von 10 μ M Lösungen von C-Pmp21 bei 20°C. Direkt nach der semipräparativen SEC (Abbildung 3.33) erfolgte die Analyse der 3 höchsten Peaks: 1 (gepunktete Linie), 2 (gestrichelte Linie) und 3 (durchgehende Linie) in SEC Laufpuffer (20 mM HEPES, 200 mM NaCl, 0,01% FC-16, pH 8) ($n=2$). (B) Die CD-Spektroskopie wurde auf Dichroweb mittels K2D3 und einem Referenz Set, das einen Bereich von 200 - 240 nm abdeckt, ausgewertet. Peak 1 entspricht der gepunkteten Linie (*dotted*), Peak 2 der gestrichelten Linie (*dashed*) und Peak 3 der durchgehenden Linie (*solid*). Die RMSD (*root-mean-square-deviation*) gibt die Verlässlichkeit der Vorhersage an (367).

3.2.8 Kristallisationsversuche mit C-Pmp21

Im Folgenden wurden Proteine aus Peak 3 von C-Pmp21, wie in Kapitel 3.2.6 (Abbildung 3.36) beschrieben, aufgereinigt und für die Kristallisierung verwendet. Für die Röntgenkristallographie werden qualitativ hochwertige und große Kristalle benötigt. Eine Vorhersage erfolgreicher Bedingungen zur Kristallisierung ist auch bei ähnlichen Proteinen nur sehr bedingt möglich. Daher müssen diese Bedingungen empirisch ermittelt werden (361). Daher wurden fünf verschiedene Kristallisationsscreens mit je 96 verschiedenen Pufferbedingungen bei maximal zwei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt (Kapitel 2.2.5.13). Zur Kristallisation wurde die sogenannte *sitting-drop*-Methode bei 18°C und initial eine C-Pmp21 Konzentration von 3,5 mg ml⁻¹ gewählt. Die Evaluation der Kristallisationsscreens erfolgte regelmäßig während des gesamten Kristallisationsprozesses von 35 Tagen sowie einmalig nach 90 Tagen. Nach 35 Tagen hatten sich keine Kristalle gebildet. Daher wurde getestet, ob im Tropfen die Proteinkonzentration ausreichend war

3 Ergebnisse

um die benötigte Sättigung zu erreichen. Bei ausreichender Sättigung sollten sich entweder Kristalle oder leichtes Präzipitat (*Light precipitate; LP*) bilden. Aus *LP* könnte noch die Bildung von Kristallen erfolgen. Bei schwerer Präzipitierung (*Heavy precipitate; HP*) war dies sehr unwahrscheinlich. *HP* deutet eher darauf hin, dass entweder die Proteinkonzentration zu hoch ist oder die Pufferbedingungen unpassend sind. Bleiben die Tropfen klar (*Clear drop; CL*) kann davon ausgegangen werden, dass die benötigte Sättigung noch nicht erreicht wurde.

Bei einer C-Pmp21 Konzentration von $3,5 \text{ mg ml}^{-1}$ kam es bei keinem der ausgewählten Puffertests zur Ausbildung von *HP* (Abbildung 3.38). Außerdem war zu beobachten, dass die in diesen Tests die Ausbildung von *LP* in etwa gleich mit *CL* war. Um die Sättigung zu erreichen oder eine Ausbildung von Kristallen oder *HP* aus *LP* zu forcieren, wurde ein erneuter Screen mit einer C-Pmp21 Konzentration von 14 mg ml^{-1} durchgeführt. Durch die Erhöhung der C-Pmp21 Konzentration kam es zu einer erhöhten Ausbildung von *LP* und *HP*. Es konnte allerdings auch jetzt keine Ausbildung von Kristallen beobachtet werden (Abbildung 3.38). Die abschließende Evaluation der Kristallisationsexperimente nach 90 Tagen (Daten nicht gezeigt) zeigte ebenfalls keine Ausbildung von Proteinkristallen. Aus Zeitgründen wurde die Arbeit an dieser Stelle beendet.

Obwohl die Struktur von C-Pmp21 nicht mittels Röntgenkristallographie aufgeklärt werden konnte, trugen die Analysen dazu bei, C-Pmp21 besser zu charakterisieren. Es konnte die Oberflächenpräsentation und die Insertion in die Außenmembran nachgewiesen werden (Kapitel 3.2.3 und 3.2.4). Fos-Choline werden zu den harschen Detergenzien gezählt (368). Die Tatsache, dass C-Pmp21 mit FC-16 aufgereinigt werden konnte und trotzdem in der CD-Spektroskopie eine Faltung aufwies und zusätzlich einen hohen Anteil β -sheets besitzt, deutet auf eine ebenfalls auf eine hohe Stabilität hin und zum anderen darauf, dass es sich um einen β -barrel handeln kann.

3 Ergebnisse

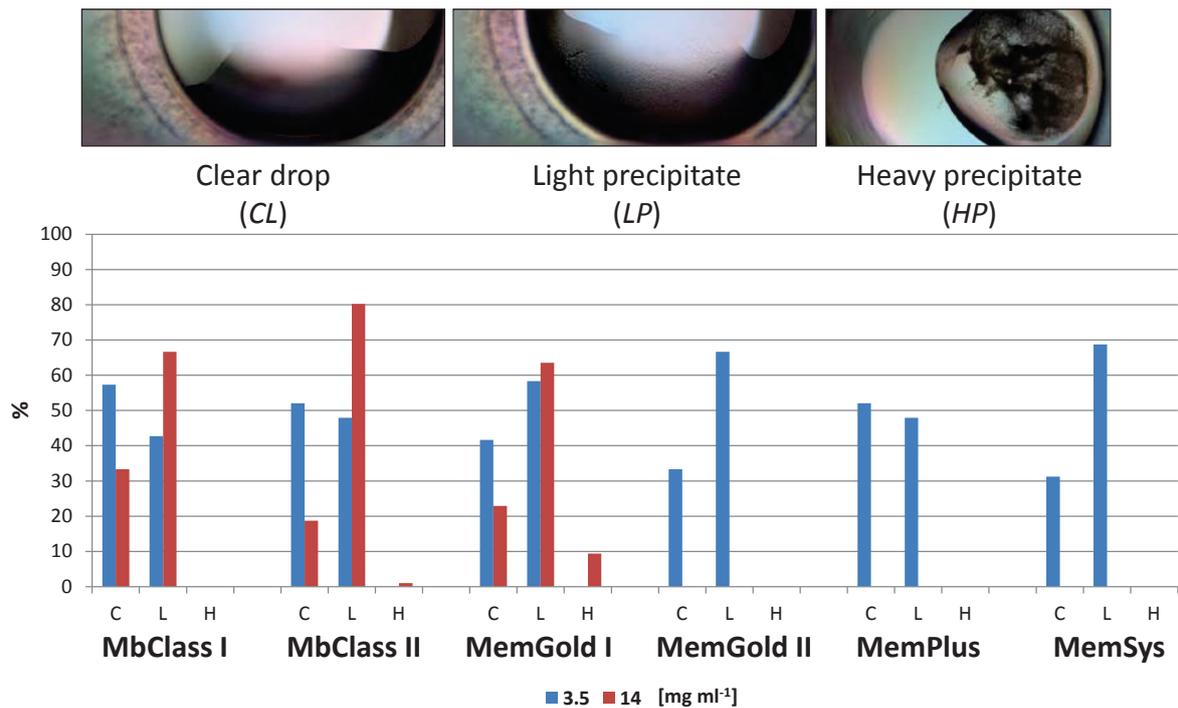


Abbildung 3.38: C-Pmp21 führt bei einer Konzentration von 3.5 und 14 mg ml⁻¹ zu einer geringen Präzipitation.

(A) Klassifizierung der während der Screens beobachteten Tropfenstadien (Kapitel 2.2.5.13). (B) Auswertung von zwei verschiedenen C-Pmp21 Konzentrationen und bis zu 480 Kristallisationsbedingungen nach 35 Tagen. Mb Class I, MbClass II, MemGold I, MemGold II, MemPlus und MemSys sind die Bezeichnungen der verwendeten Pufferkombinationen (Tabelle 2.1).

3.2.9 Analyse der Selbstinteraktion und autarken Faltung des pAC in Pmp21

Teilweise wird die Faltung der PD von Typ V ATs durch ein sogenanntes Autochaperon (AC) induziert (300,302) (Kapitel 1.6.1). Das Alignment der Sequenzen, die bei der Identifizierung der *S. flexneri* IscA Autochaperon Domäne verwendet wurden, zeigte keine Homologie zu Pmp21 (Daten nicht gezeigt) (369). Dennoch bestand die Möglichkeit, dass es sich bei dem N-terminalen Sequenzabschnitt von C-Pmp21, der nicht eindeutig dem vorhergesagten β -barrel zugeordnet werden konnte, um ein Autochaperon in Pmp21 handeln könnte. Die Strukturvorhersage dieses Proteinabschnittes entsprach einer überwiegenden *random coil*-Faltung (Abbildung 3.23). Um experimentelle Evidenz für die mögliche Anwesenheit einer Autochaperondomäne in Pmp21 zu erlangen, wurde das potentielle Autochaperon (pAC) (Kapitel 3.2) nach erfolgreicher heterologen Expression in *E. coli* BL21 (Kapitel 2.2.5.1) mittels OCR rückgefaltet (Kapitel 2.2.5.6.1) und mittels SEC (Kapitel 2.2.5.7.1) analysiert.

Ein Peak eluierte vor dem BD im V_0 und ein weiterer im späteren Elutionsvolumen (V_e). Der V_0 -Peak entsprach einem apparenten Molekulargewicht von ca. 1920 kDa, der V_e -Peak entsprach einem apparenten Molekulargewicht von ca. 57 kDa. Der Peak im V_0 würde für

3 Ergebnisse

hochmolekulare Oligomere von ca. 108 Untereinheiten, der V_e -Peak für trimeres pAC sprechen (Abbildung 3.39 A).

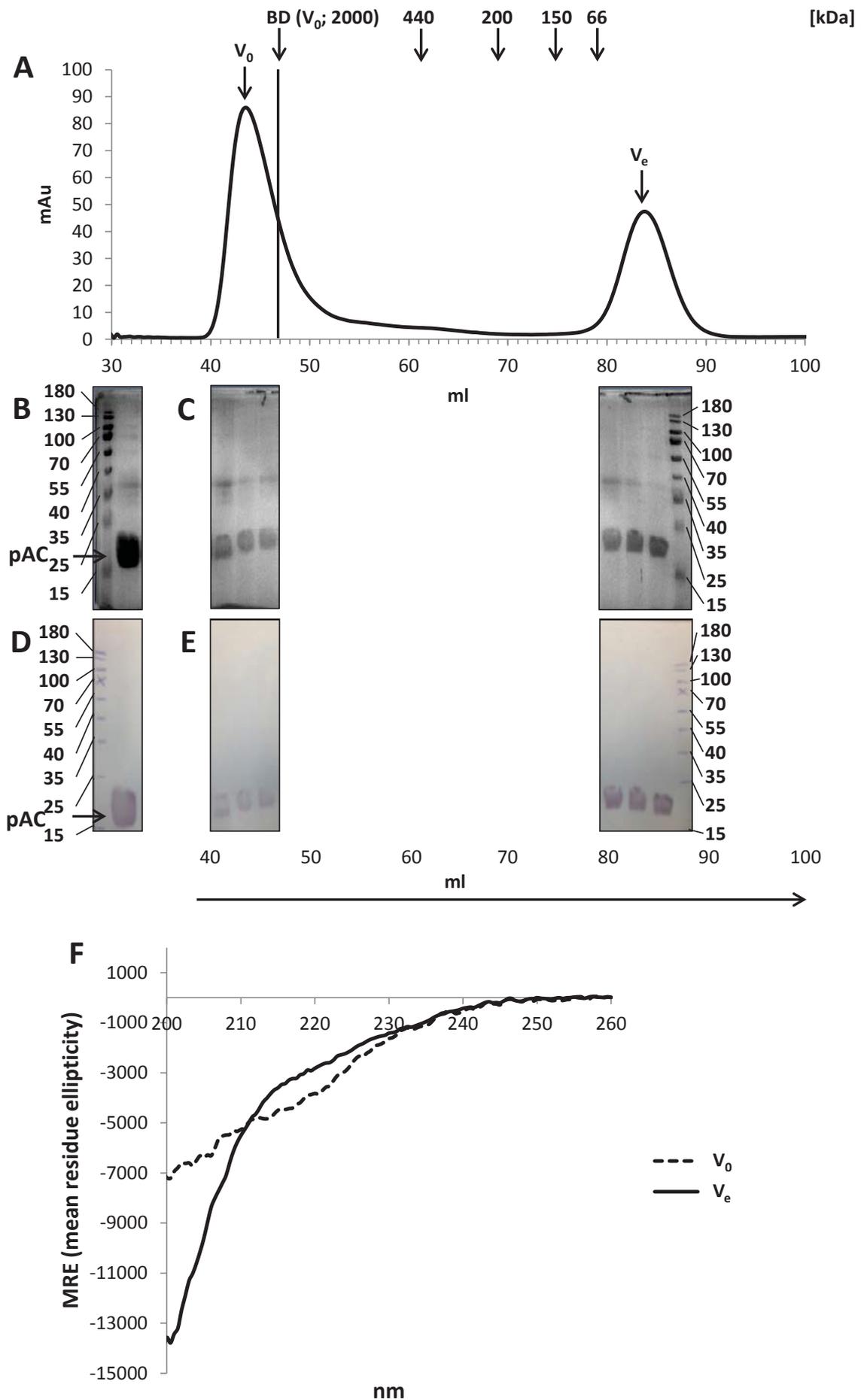
Die Ausgangsprobe für die SEC zeigte in der Coomassie blau gefärbten SDS-PAGE das pAC bei einer apparenten Größe zwischen 16 und 23 kDa lief. Außerdem wurden weitere Proteine bei ca. 37, ca. 55, ca. 70 und ca. 100 kDa detektiert (Abbildung 3.39 B). Im Western Blot mit Anti His Antikörper konnte lediglich das Protein bei einer Größe zwischen 16 und 23 kDa als pAC identifiziert werden (Abbildung 3.39 D).

Die Analyse der SEC Elutionsfraktionen ergab, dass pAC sowohl im V_0 -, als auch im V_e -Peak zusammen mit den im Western Blot nicht detektierbaren Proteinen vorlag (Abbildung 3.39 C und E).

Die CD-Spektroskopie ergab, dass es sich bei dem Peak nahe des V_0 nicht um gefaltete Oligomere sondern um ungefaltete Aggregate handelte. Der apparente Trimerpeak im späteren V_e ergab eine hauptsächliche *random coil*-Faltung (Abbildung 3.39 F). Dies entsprach der Tertiärstrukturvorhersage für pAC-Pmp21 aus Kapitel 3.2.

Die Daten legen somit nahe, dass die Tertiärstrukturvorhersage (Abbildung 3.23), trotz der geringen *confidence*, der CD-spektroskopisch bestimmten Tertiärstruktur unter den verwendeten Bedingungen entspricht. In Kapitel 3.1.6 konnte für die Hälfte der Passagierdomäne (M-Pmp21), welche direkt an das pAC anschließt eine überwiegend β -*sheet*-reiche Faltung festgestellt werden. Das bedeutet, dass die Daten nicht für ein AC in Pmp21 sprechen.

3 Ergebnisse



3 Ergebnisse

Abbildung 3.39: Der Sequenzabschnitt pAC bildet große ungefaltete Oligomere und kleinere *random coil* gefaltete Oligomere oder Monomere.

(A) Preparative SEC (HiLoad 16/600 Superdex 200 pg) des pAC nach der Rückfaltung. Die Flussrate zur Trennung der Probe in PBS betrug $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Über dem Chromatogramm ist das mittels blue dextran (BD) bestimmte Totvolumen (V_0) sowie die Größen der globulären Standardproteine angegeben. Die Ausgangsprobe für die SEC wurde auf einer (B) Coomassie blau gefärbten SDS-PAGE sowie (D) mittels Western Blot und anschließender Detektion durch Anti-His Antikörpern analysiert; M: PageRuler™ Größenstandard. Die SEC Elutionsfraktionen wurden zu je 1,2 ml gesammelt und je drei nebeneinander liegende Fraktionen des Peaks mittels (C) Coomassie blau gefärbter SDS-PAGE sowie (E) mittels Western Blot und anschließender Detektion durch Anti-His Antikörpern überprüft. (F) Die CD Spektroskopie wurde bei 20°C durchgeführt. Es wurden jeweils $10 \mu\text{M}$ Lösungen des Maximums von V_0 und V_e in PBS verwendet.

4 Diskussion

Eine erfolgreiche Infektion setzt die Kontaktaufnahme des Pathogens mit der Wirtszelle voraus. Als wichtige Kandidaten zur Generierung eines Impfstoffes zur Verhinderung einer chlamydialen Infektion werden daher unter anderem Komponenten des chlamydialen Außenmembrankomplexes (*chlamydial outer membrane complex*; COMC) gesehen, welche potentielle Adhäsine bzw. Invasine darstellen.

Die initiale und vermutliche reversible Interaktion von *Chlamydia (C.) pneumoniae* Elementarkörperchen (*elementary bodies*; EBs) findet durch das Adhäsins Außenmembrankomplex Protein B (*outer membrane complex protein B*; OmcB) über Glykosaminoglykanen (GAGs) mit der Wirtszelle statt (65,71). Diese reversible Interaktion hilft dem EB vermutlich dabei, die Rezeptoren für die irreversible Bindung eines oder mehrerer weiterer chlamydialer Adhäsine zu finden, um dann die EB-Internalisierung einzuleiten.

Die Genfamilie der Polymorphen Membranproteine (*pmps*) repräsentiert 5% der Codierungskapazität des chlamydialen Genoms und beinhaltet in *C. pneumoniae* 21 Mitglieder. Von *C. pneumoniae* CWL029 werden 16 Pmps exprimiert, und es gibt Nachweise zur Oberflächenlokalisierung von Pmp6, Pmp8, Pmp10, Pmp11, Pmp20 und Pmp21 (151,157,163). Darüber hinaus wurden alle neun Pmps von *C. trachomatis* L2 in der äußeren Membran gefunden und alle Pmps von *C. trachomatis* E auf der Oberfläche von EBs (156,159-162). Die hohe Codierungskapazität legt eine außerordentliche Bedeutung für die chlamydiale Biologie nahe.

Für alle Polymorphen Membranproteine (Pmps) wird eine für TypVa Autotransporter (AT) charakteristische drei-Domänen-Struktur, bestehend aus Signalsequenz (SS), Passagierdomäne (*passenger domain*; PD) und β -Fass (β -*barrel*) vorhergesagt. Aufgrund dieser Struktur und einer hohen Anzahl der Motive GGA (I, L, V) sowie FxxN wurden die Pmps in einer Familie zusammengefasst (151,152). In früheren Analysen wurden Pmp2, Pmp6, Pmp14, Pmp16, Pmp19, Pmp20 und Pmp21 von *C. pneumoniae* und alle Pmps von *C. trachomatis* als Adhäsine identifiziert. Die Adhäsion der Pmps ist entgegen der von OmcB vermutlich irreversibel. Die Wichtigkeit der analysierten Pmps wurde außerdem durch die inhibierende Wirkung auf die Infektion nach einer Vorbehandlung humaner Zellen mit rekombinanten Pmps belegt (72,73). Die Pmp21 Domäne M-Pmp21 aus *C. pneumoniae* konnte als Adhäsins und Invasins identifiziert werden, wobei der epidermale

4 Diskussion

Wachstumsfaktorrezeptor (*epidermal growth factor receptor*; EGFR) den Pmp21-Rezeptor auf der Wirtszelle darstellt (75). Außerdem wurde für die zwei Pmp21 Domänen Pmp21-A und Pmp21-D festgestellt, dass mindestens zwei FxxN oder ein FxxN und ein GGA (I, L, V) Motiv vorhanden sein müssen, um eine Adhäsion an die Wirtszelle zu ermöglichen (73). Für die Pmp21 Domäne M-Pmp21 konnte *in vitro* eine Selbstinteraktion sowie eine Interaktion mit weiteren Pmps nachgewiesen werden (74). Interessanterweise konnte die Ausbildung von Oligomeren bereits für PmpD, dem Homolog von Pmp21 aus *C. trachomatis* beobachtet werden (127). Außerdem wurde berichtet, dass Pmps aus *C. psittaci* supramolekulare Komplexe ausbilden können (370)

Für einige Pmps wurde außerdem bioinformatisch die Struktur einer rechtshändigen β -Helix vorhergesagt (57,74,167) (Kapitel 3.1). Eine solche Konformation wird für 97 % der Typ Va ATs vorhergesagt (192,193,196). Sie wurde aber auch experimentell durch *solid state NMR* bei HET-s aus *Podospora anserina* gefunden, einem amyloiden Protein, das für eine ausgeprägte Oligomerisierung bekannt ist (333). Generell gilt die β -helikale-Faltung als alternative Möglichkeit zur hauptsächlich bekannten *cross*- β -Faltung von Amyloiden (371). Interessanterweise ergab eine bioinformatische Vorhersage, dass Pmp21 zahlreiche amylogene Regionen enthält (Kapitel 3.1). Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Ausprägung und Art der Oligomerisierung analysiert, eine mögliche Oligomerisierungssequenz identifiziert, sowie die Funktion des oligomeren Pmp21 untersucht werden.

Der C-terminale Bereich von Pmp21 wird durch die *in vivo* vorkommende Domäne C-Pmp21 repräsentiert (73,157). Da der TypVa AT Mechanismus für Pmps bisher lediglich postuliert wird, sollte C-Pmp21 heterolog exprimiert, nativ aus der Membran in ausreichender Konzentration isoliert und aufgereinigt sowie für die Strukturbestimmung mittels Röntgenkristallographie kristallisiert werden.

Im C-terminalen Bereich von TypV ATs ist häufig eine Autochaperon (AC) Domäne enthalten, welche für die Faltung der PD sorgt (303,372,373). Es ist nicht bekannt, ob Pmps eine solche Domäne enthalten. Daher wurde der Teil von C-Pmp21, der nicht den potentiellen β -barrel bildet, bezüglich einer potentiellen Autochaperon (pAC)-Domäne untersucht.

4.1.1 Homooligomerisierung von Pmp21 Domänen

Aufgrund der Prozessierung von Pmp21 stehen *in vivo* drei extrazelluläre Domänen (N-M-Pmp21, N- und M-Pmp21) und drei membranständige Domänen (N-M-C-Pmp21, M-C-pmp21 und C-Pmp21) zur Oligomerisierung zur Verfügung. Alle untersuchten natürlichen extrazellulären Domänen von Pmp21 (N-M-Pmp21 und M-Pmp21), sowie die beiden gekürzten Abschnitte von N-Pmp21 (Pmp21-A (A-Wt) und die Pmp21-A Mutante (A-Mt)) sowie M-Pmp21 (Pmp21-D (D-Wt) und die Pmp21-D Mutante (D-Mt)) zeigten nach der Rückfaltung in der Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*; SEC) eine ausgeprägte Homooligomerisierung. Diese überstieg sogar das Auftrennungsvermögen der SEC-Säule, was dazu führte, dass viele Pmp21-Fragmente nahe oder im Totvolumen (V_0) eluierten (Kapitel 3.1.1).

Mittels analytischer SEC gekoppelter Mehrfachwinkel-Lichtstreuung (MALS) konnte für D-Wt neben den Oligomeren ein ausgeprägter Monomerpeak identifiziert werden (Kapitel 3.1.1). Bei dem gleichen Elutionsvolumen zeigte auch D-Mt einen Peak. Ein so ausgeprägter Peak fehlt bei den natürlich prozessierten Fragmenten N-M-Pmp21 und M-Pmp21. Allerdings kann nicht behauptet werden, dass diese Fragmente keine Monomere ausbilden. Lediglich, dass sie scheinbar unterrepräsentiert sind. Der Monomerpeak von D-Wt eluiert in der SEC früher als erwartet für ein Protein dieser Masse. Die apparente Größe des Monomers in der SEC entspricht dem eines Trimers. Dies liegt vermutlich an dem hydrodynamischen Radius des Proteins. Denn Proteine gleicher Masse können aufgrund ihrer Form ein unterschiedliches Laufverhalten besitzen (374). Dafür, dass dieser Effekt auf alle anderen untersuchten Pmp21-Fragmente übertragbar ist spricht, dass N-M-Pmp21 auch bei einem Elutionsvolumen von ca. 62 ml eluierte und M-Pmp21 auch bei ca. 72 ml. Beide Elutionsvolumina würden einem apparenten Trimer der beiden Proteine entsprechen. In der semipräparativen SEC von A-Wt und A-Mt wurde ebenfalls Protein bei dem Elutionsvolumen eines apparenten Trimers (13,2 ml) entdeckt.

Wie sich später in der Circular Dichroism (CD)-Spektroskopie (Kapitel 3.1.6) zeigte, sind die Monomere von D-Wt und D-Mt zufällig gewunden (*random coil*) gefaltet, wohingegen der Proteinstandard für die Säule aus globulären Proteinen besteht. Es könnte daher sein, dass die natürlich prozessierten Fragmente N-M-Pmp21 und M-Pmp21 ebenfalls zu einem geringen Teil Monomere ausbilden, diese jedoch aufgrund einer potentiellen *random coil*

Struktur bei einem ähnlichen Volumen wie ihre Oligomere eluieren und daher nicht von diesen unterschieden werden können.

Des Weiteren zeigten SDS-PAGE und Western Blot der natürlich prozessierten Fragmente eine starke Degradation (Kapitel 3.1.1). Die Degradationsfragmente eluierten teilweise mit den Vollängenproteinen und machten so eine Unterscheidung nicht möglich.

Interessanterweise führt eine Mutation der FxxN Motive in D-Wt dazu, dass weniger oligomere Protofibrillen gebildet werden. Das FxxN Motiv scheint demnach für die Oligomerisierung relevant zu sein. Bei A-Wt führt eine Mutation des FxxN Motivs jedoch zu einer verstärkten Bildung noch größerer Oligomere, die im V_0 der semipräparativen SEC-Säule eluierten. A-Mt enthält jedoch, anders als D-Mt, noch ein GGA (I, L, V) Motiv. Man könnte spekulieren, dass das FxxN Motiv *in vitro* zu einer Oligomerisierung führt, die entstehenden Oligomere aber gleichzeitig auf die Größe von Protofibrillen limitiert. Das GGA (I, L, V) Motiv besitzt ebenfalls einen Oligomer induzierenden Effekt. Dieser ist jedoch nicht limitiert, wodurch eine Mutation des FxxN Motivs in A-Mt darin resultiert, dass die Oligomere größer als die von A-Wt wurden.

Die SEC-Säule ließ aufgrund des Auftrennungsvermögens nur eine begrenzte Analyse der Oligomere zu. Es schien allerdings aufgrund des ausgeprägten Monomerpeaks und der Experimente in Kapitel 3.1.5 offensichtlich, dass D-Wt tendenziell zuerst Monomere und ab Erreichen einer bestimmten Schwellenwertkonzentration verstärkt Oligomere bildet. Diese Oligomere ließen dann allerdings zumindest in der SEC keine offensichtlichen Module aus Oligomeren bestimmter Größen erkennen. Sie schienen, sofern ausreichend Substrat in Form von D-Wt-M vorhanden ist, fortwährend zu immer größeren Komplexen zu oligomerisieren, bis das V_0 der SEC-Säule erreicht war. Um dies zu belegen, sollten allerdings umfangreichere Kinetiken gezielt zur Oligomerisierung durchgeführt werden.

4.1.1.1 Das Dimer als universelle Voraussetzung für die Homooligomerisierung

Um den Ablauf der Oligomerisierung von Pmp21 zu verstehen, müsste die Suche nach dem kleinstmöglichen Oligomer mit der gleichen Faltung wie die größeren Oligomere beginnen. Das theoretisch kleinste Oligomer ist eine Zusammenlagerung von zwei Molekülen. Für das humane $A\beta_{42}$ sind Dimere beschrieben und für diese wird diskutiert, ob sie der erste Schritt der Zusammenlagerung auf dem Weg zu präfibrillären Strukturen darstellen (375,376).

4 Diskussion

Die AUZ von D-Wt-M legt nahe, dass es nach der Renaturierung zu einer Dimerisierung der Monomere kommen kann (Abbildung 3.8). Es konnte zusätzlich zu dem mit SEDFIT berechneten Monomer bei 1,6 S ein weiterer kleiner Peak bei 2,6 S beobachtet werden. Dieser könnte laut Berechnung ein Dimer darstellen und das deutet darauf hin, dass die Monomere in geringem Ausmaß zu einer Selbstinteraktion neigen, die zu einer weiteren Oligomerisierung führen könnte. Um diese Dimere als Ursprung für die größere Oligomere zu identifizieren, müssten sie isoliert und strukturbiochemisch untersucht werden. Eine Möglichkeit zur Strukturanalyse von stabilen Dimeren könnte das *crosslinken* sein. So konnten beispielsweise erfolgreich A β Dimere durch *crosslinken in vitro* fixiert und nach anschließender Isolierung analysiert werden (377,378). Durch *in vitro* Experimente könnte nach Inkubation bei dimerauslösenden Aggregationsbedingungen (z.B. Proteinkonzentration, Pufferbedingungen und Aggregationszeit) eine Analyse von Pmp21 Dimeren Aufschlüsse über die frühen Mechanismen der Oligomerisierung durch beispielsweise Änderungen in der Sekundärstruktur von *random coil* zu β -Faltblättern (*β -sheet*) geben.

In der SDS-PAGE von D-Wt-O konnten ebenfalls Dimere gefunden werden (Abbildung 3.4). Möglicherweise entstanden diese erst durch die Probenvorbereitung. Denn nach der Identifizierung kleinerer Oligomere (Di-, Tri und Tetramere) in der SDS-PAGE von A β_{42} , Curli aus *E. coli* und der Agglutinin-ähnliche Sequenz 5 (*agglutinin-like sequence 5*; Als5) aus *Candida albicans* wurden zum Vergleich unter nativen Bedingungen SEC-Läufe durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass einige der in der SDS-PAGE vorkommenden Oligomere in der SEC nicht existieren. Es wurde anschließend kontrovers diskutiert, warum einige der kleineren Oligomere durch die Probenvorbereitung für die SDS-PAGE entstanden sind (284,379,380).

Dennoch kann die unvollständige Monomerisierung und das Fortbestehen von D-Wt-Dimeren in der denaturierenden SDS-PAGE auf eine hohe Stabilität hindeuten. Diese hohe Stabilität ist charakteristisch für amyloid-ähnliche Proteine wie A β_{42} , und die mikrobiellen Adhäsine Curli und Als5 (273,284,381-383).

4.1.1.2 Die Oligomere scheinen einen zielgerichteten Aufbau aus kleineren Modulen zu besitzen

Um die maximale Größe der Oligomere von D-Wt und D-Mt zu ermitteln und um zu überprüfen, ob die maximale Größe durch Mutation der zwei FxxN Motive beeinflusst

4 Diskussion

werden kann, wurde eine AUZ mit D-Wt und D-Wt-M sowie mit D-Mt und D-Mt-M durchgeführt (Kapitel 3.1.2). Es handelt sich bei der AUZ um ein Trennsystem mit nur einer Phase. Wechselwirkungen von D-Wt und D-Mt mit Oberflächen und Grenzflächen sind dadurch auf ein Minimum reduziert. Eine Veränderung der Oligomierzusammensetzung der Probe durch die Messmethode kann deshalb weitgehend ausgeschlossen werden.

Zur Überprüfung der Oligomerstabilität von D-Wt ohne äußere Einflüsse und über den Zeitraum der AUZ, wurde parallel eine semipräparative SEC durchgeführt. Bemerkenswerterweise wurde dadurch festgestellt, dass die Oligomere über einen Zeitraum von 20 h in PBS nicht zu Monomeren zerfallen und somit eine Analyse mittels AUZ einen verlässlichen Überblick über die Oligomerkomposition geben sollte (Abbildung 3.8 A).

Die in der AUZ identifizierten D-Wt-O hatten bemerkenswert hohe S-Werte von 8 - 85 S mit einem Mittel von 26,6 S. D-Mt-O hatte S-Werte von 8 - 23 S und ein Mittel von 10,2 S (Abbildung 3.8 und Abbildung 3.9). Dies legte zuerst die Vermutung nahe, dass der Rückfaltungsprozess nicht erfolgreich und es zur Ausbildung von amorphen Aggregaten gekommen war. Amorphe Aggregation ist ein ungeordneter dreidimensionaler Prozess, wobei Monomere in jeder Richtung an Aggregate angelagert werden können. Im Gegensatz dazu ist die lineare Aggregation ein geordneter eindimensionaler Prozess, bei dem Monomere nur am Ende der Aggregatkette angefügt werden können (384).

Die AUZ erlaubt eine grobe Einschätzung der Form, was mittels Größenausschlusschromatographie nicht zugänglich ist. Dies geschieht durch Vergleich des experimentell ermittelten Sedimentationskoeffizienten (s -Wert) mit einer perfekten Kugel des gleichen Molekulargewichts. Für die perfekte Kugel ist das minimale Reibungsverhältnis (*frictional ratio*; f/f_0) gleich 1. Die Berechnung des f/f_0 wurde, ebenso wie die S-Werte, mit der Software SEDFIT berechnet. Je größer der f/f_0 wird, umso länger ist das untersuchte Molekül. Globuläre Proteine haben beispielsweise durchschnittlich einen $f/f_0= 1,2$ (336).

Der *frictional ratio* (f/f_0) konnte aufgrund der Messbedingungen nur von der gesamten Probe, die eine Mischung aus Oligomeren und Monomeren darstellte, bestimmt werden. Für D-Wt betrug der $f/f_0= 2,6$ und von D-Mt 2,75. Der f/f_0 -Wert der separat messbaren Monomere war kleiner (Abbildung 3.8 und Abbildung 3.9). Dieses Ergebnis deutete an, dass es sich bei den Oligomeren um stark elongierte Fibrillen handelte. Vergleichbare f/f_0 -Werte erreichen Proteine, wie das humane Fibrinogen (MW= 330 kDa; 7,6 S; $f/f_0= 2,3$) oder Tropomyosin (MW= 570; 6,4 S; $f/f_0= 3,6$) (385). Von beiden Proteinen ist eine stark

4 Diskussion

elongierte Molekülstruktur bekannt (386-388). D-Wt und D-Mt scheinen somit ähnlich elongiert geformt und einem geordneten Prozess folgend gefaltet zu sein. Dies machte eine Funktionalität dieser Oligomere wahrscheinlicher. Im Gegensatz zum humanen Fibrinogen und Myosin haben die Monomere von D-Wt und D-Mt allerdings lediglich ein MW von 23 kDa. Das es sich um eine ungerichtete Aggregation handeln könnte, erscheint durch die Vielzahl der „Anbaumöglichkeiten“ einzelner Monomere dadurch noch unwahrscheinlicher. Eine Bestimmung des MW der Oligomere ist mit der durchgeführten Sedimentationsgeschwindigkeitsmessung nicht, bzw. nur insofern möglich, dass die Bestimmung bei einer Probe, die aus so vielen verschiedenen Proteinspezies wie D-Wt-O zusammengesetzt ist, als Schätzwert angesehen werden muss. Für genauere Bestimmungen müsste eine Messung des Sedimentationsequilibriums mit einer nahezu 100% homogenen Probe durchgeführt werden. Um dennoch eine grobe Einschätzung bezüglich der Anzahl der Untereinheiten durchzuführen wurde für D-Wt-O eine Berechnung des Molekulargewichts (MW) mit SEDFIT durchgeführt. Laut dieser entspricht das berechnete MW bei S-Werten zwischen 8 - 85 S ca. 300 - 6083 kDa. Dem entsprechend sind die Oligomere in der Probe aus 13 - 265 D-Wt Untereinheiten zusammengesetzt.

Das wellige Profil der AUZ suggeriert außerdem, dass Oligomere nicht in jeder Größe entstehen. Die Detektion distinkter Oligomere war jedoch aufgrund der großen Heterogenität der Oligomeranzahl schwierig. Um verschiedene Oligomere zu unterscheiden, sollten die korrespondierenden Peaks idealerweise bis zur Basislinie getrennten Gauß-Kurven entsprechen. Die Oligomere unterschieden sich jedoch nur wenig in ihren S-Werten von ihrem nächstgrößeren bzw. -kleineren Oligomer, was zur Überlappung der jeweiligen Kurve führte. Die Auflösung zwischen den Oligomeren konnte aufgrund der limitierten Trennstrecke innerhalb der Messzelle und der für die AUZ bereits niedrigen Rotorgeschwindigkeit nicht verbessert werden. Dennoch erschien es, als würden bestimmte große Oligomere bevorzugt gebildet. Bei $A\beta_{42}$ wurde für kleinere Oligomere beschrieben, dass diese häufig als ein Vielfaches von sechs auftreten und globuläre Form besitzen (389,390). Diese werden anschließend für den Aufbau größerer Oligomere genutzt. Ob es sich bei den verschiedenen großen Oligomerspezies von D-Wt und D-Mt ebenfalls um Bausteine aus mehreren Untereinheiten handelte konnte nicht gezeigt werden. Da es jedoch verschieden große Proteinspezies in scheinbar regelmäßigen Abständen gab, könnte es einen ähnlichen modularen Oligomerisierungsprozess bei Pmp21 geben.

4.1.2 Die Protofibrilläre Struktur der Oligomere ähnelt der amyloider Proteine

Zur weiteren strukturellen Analyse der Oligomere wurde eine Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) mit ausgewählten Elutionsfraktionen der SEC von N-M-Pmp21 (N-M-Pmp21-O₁ und O₃), M-Pmp21 (M-Pmp21-O₁ und O₃), D-Wt (D-Wt-O₁₋₃ und D-Wt-M), D-Mt (D-Mt-O₁₋₃ und D-Mt-M) aus *C. pneumoniae* sowie PmpA und PmpC aus *C. trachomatis* Serovar E durchgeführt. Die AUZ legte bereits eine elongierte Struktur nahe. Für alle eluierten Oligomere, nahe des V₀ der SEC (O₁) konnte mittels TEM die elongierte Struktur bestätigt werden (Abbildung 3.11 und Abbildung 3.12). Die Oligomere ähnelten mit der gebogenen Struktur, einer Dicke von ca. 10 nm und einer mittleren Länge von 40 - 105 nm sehr stark sogenannten amyloiden Protofibrillen von A β ₄₀ und A β ₄₂ (vergleiche mit Kapitel 1.5) (242,243). Amyloide Protofibrillen stellen ein Intermediat zwischen Oligomeren und Amyloidfibrillen bei der Ausbildung von Amyloidfibrillen dar oder dienen als Speicherform, die bei Bedarf in kleinere Untereinheiten zerfällt und so dem Aufbau von Amyloidfibrillen dient (Abbildung 4.1) (243,391). Daher wird diese Art protofibrillärer Amyloide teilweise auch als „*curvilinear fibrillar aggregates*“ oder „*immature fibrils*“ bezeichnet (392). Man findet sie für eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine mit amyloiden Eigenschaften, wie Cytochrom C und β 2 Microglobulin (392,393). Für CsgA, eine Untereinheit des Adhäsins Curli aus *E. coli*, konnte ebenfalls ein protofibrilläres Intermediat identifiziert werden, allerdings ist dieses nadelförmig (394).

Interessanterweise konnten in der TEM von A-Mt-V₀ neben Klumpen aus Protofibrillen ebenfalls Strukturen entdeckt werden, die mit ihrer Länge (maximal 940 nm) und Dicke (ca. 10 nm) der von Amyloidfibrillen ähnelten (Abbildung 3.11 und Abbildung 3.12 (228)). Die Mutante A-Mt ist allerdings nicht mehr adhäsiv (73,179). Das legt nahe, dass die Bindungsstellen innerhalb des Proteins nicht ausreichend sind oder durch die massive Oligomerisierung so umstrukturiert wurden, dass die Bindungsstellen vom Wirtszellrezeptor abgeschirmt sind.

Die Länge der Pmp21 Oligomeren nahm während der SEC mit zunehmendem Elutionsvolumen ab (O₂). Bemerkenswert ist, dass die Dicke von ca. 10 nm erhalten blieb, bis ein globuläres Stadium (O₃) von 10 nm erreicht wurde (Abbildung 3.11 und Abbildung 3.12). Dies könnte bedeuten, dass die Pmp21 Protofibrillen aus globulären Oligomeren zusammengesetzt waren. Ein solcher Aufbau konnte ebenfalls bei A β und Curli beobachtet

4 Diskussion

werden, bei denen ein hexameres Oligomer die Basis zur Protofibrillenbildung darstellt (Abbildung 4.1) (243,394). Es wurde gezeigt, dass es möglich ist, solche amyloiden Oligomere mit konformationsspezifischen Antikörpern nachzuweisen (395). Des Weiteren zeichnen sich diese Oligomere dahingehend aus, dass sie eine hohe strukturelle Ähnlichkeit auch zwischen weit voneinander entfernten Spezies aufweisen. So konnte mit einem Antikörper, der gegen die Konformation von humanen A β Oligomere entwickelt wurde, ebenfalls *in vitro* generierte Oligomere des Curli Proteins CsgA von *E. coli* detektiert werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die mit Krankheiten assoziierte A β Oligomere während der Fibrillogenese eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu sogenannten funktionellen Amyloiden wie Curli besitzen, die strukturelle Ähnlichkeit jedoch nicht zwangsläufig eine Toxizität für den Organismus bedeutet (277,396). Um weitere Evidenzen für globuläre, amyloide Pmp21 Oligomere zu sammeln, bietet sich in Zukunft die Verwendung solcher Antikörper an. Hierüber könnten weitere Hinweise zum Aufbau der Pmp21 Oligomere gesammelt werden.

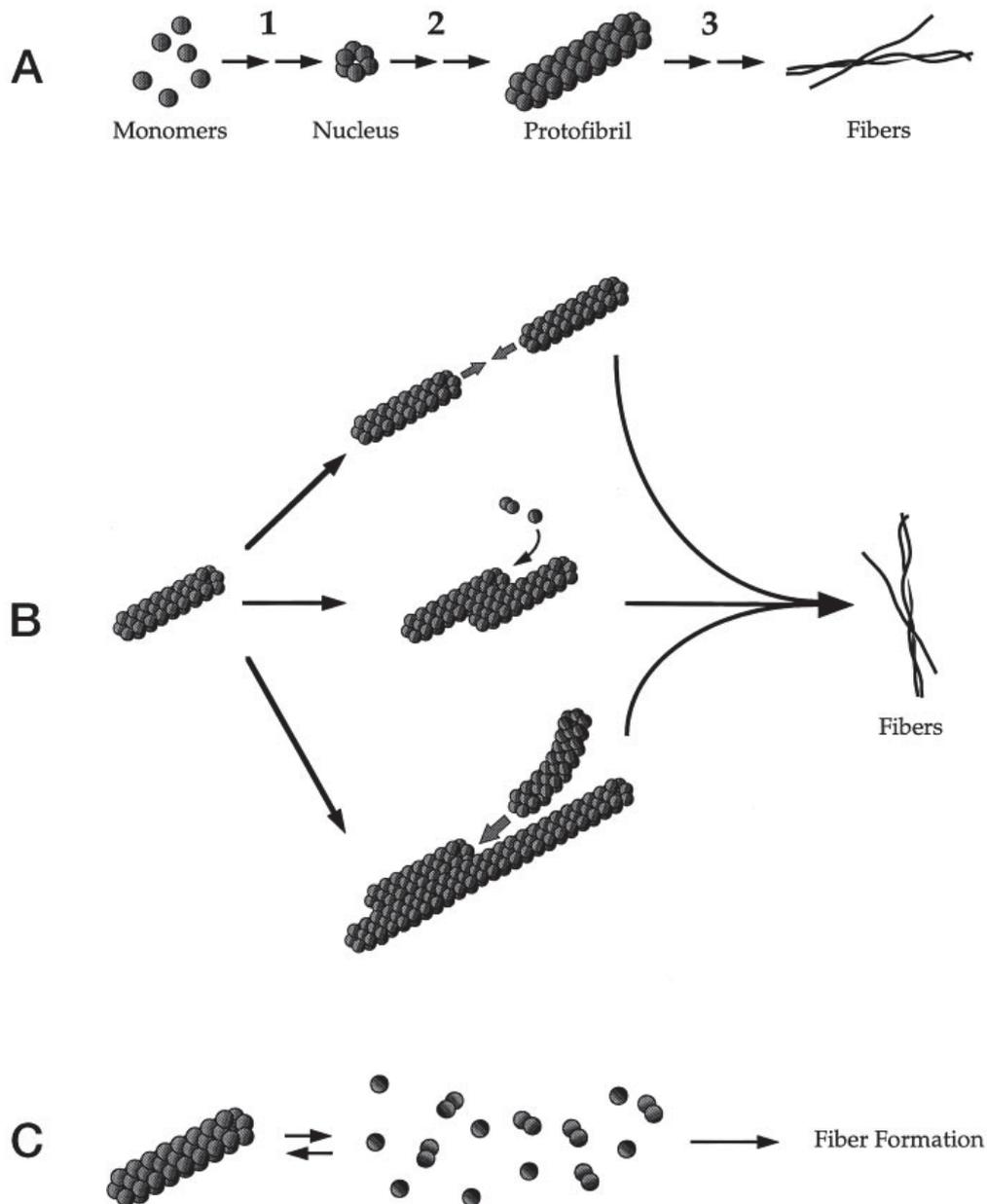


Abbildung 4.1: Modell der Fibrillogenese von Aβ (243).

(A) Die Aβ-Fibrillogenese ist eine keimbasierte Polymerisierung, in der monomerisches Aβ zuerst Dimere und anschließend hexamerische Keime ausbildet (1), die zu Protofibrillen polymerisieren (2). Diese Protofibrillen können weiter zu Amyloidfibrillen polymerisieren (3). (B) Mehrere Mechanismen beschreiben die Polymerisierung zu Amyloidfibrillen. Die einfachste ist die Ende-zu-Ende Polymerisierung von Protofibrillen. Allerdings ist sie aufgrund von kinetischen Barrieren in Zusammenhang mit Diffusion und zielgerichteter Anlagerung der einzelnen Protofibrillen, die unwahrscheinlichste. Wahrscheinlicher ist die seitliche Anlagerung der einzelnen Protofibrillen, und eine Elongation an den Enden durch Anlagerung von Monomeren, Dimeren oder Hexameren. Alternativ könnte die Polymerisierung der Protofibrillen zu Amyloidfibrillen durch eine initiale seitliche Anlagerung gefördert werden.

(C) Letztlich ist es ebenfalls möglich, dass die Protofibrillen selbst nicht zu Amyloidfibrillen polymerisieren können, sondern lediglich Vorstufen für die Fibrillogenese (Monomere, Dimere und Hexamere) speichern und bei Bedarf zur Verfügung stellen (243).

4.1.2.1 Protofibrilläre Strukturen werden von Pmps aus *C. trachomatis* ausgebildet

Da Pmps in allen Chlamydien Spezies präsent sind, wurde mit PmpA und PmpC aus *C. trachomatis* stichprobenartig überprüft, ob diese ebenfalls zur Ausbildung von Protofibrillen neigen. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob die Renaturierungsmethode, die bei Pmp21 eingesetzt wurde, die Ausbildung von Protofibrillen begünstigt. Daher wurden PmpA und PmpC mit anderen Methoden renaturiert und nicht in der SEC getrennt. So erhielt man einen Überblick über alle gebildeten Oligomere (Kapitel 3.1.3.1). PmpA bildete im Mittel die kleinsten Protofibrillen aus. Dies ist vermutlich durch die Zugabe von Arginin während der Renaturierung mittels Dialyse in phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffer saline*; PBS) bedingt, um die Löslichkeit von Proteinen zu begünstigen (397). Allerdings werden dadurch nicht nur ungewollte Proteinpräzipitationen, sondern Protein-Protein-Interaktionen allgemein verhindert (398). Das nur mittels Dialyse in PBS renaturierte PmpC bildete dahingegen vereinzelt die längsten Protofibrillen aus und im Mittel die zweitlängsten. Die Analysen der Pmps aus *C. trachomatis* Serovar E und die unterschiedlichen Renaturierungsmethoden legen nahe, dass die Ausbildung von oligomeren Komplexen bis hin zu Protofibrillen eine generelle Eigenschaft der Pmps darstellt und somit eine entscheidende Rolle während des Adhäsionsprozesses spielen könnte.

4.1.2.2 Die Oligomere auf der EB-Oberfläche unterscheiden sich möglicherweise von den beobachteten Protofibrillen

Auf ebenfalls TEM-analysierten EBs von *C. pneumoniae* konnten allerdings keine protofibrillär geformten Strukturen gefunden werden. Diese wurden möglicherweise durch die für die Ernte der EBs erforderliche Ultraschallstabbehandlung der Humanzellen zerstört. Die Ultraschall-Behandlung wird teilweise zum Aufbrechen der Amyloidfibrillen in globuläre Oligomere verwendet (399). Die Konzentration der Pmps auf den EBs könnte außerdem deutlich niedriger liegen, als dies in den *in vitro* Analysen der Fall war, und somit eine weitere Erklärung liefern, warum keine protofibrillären Strukturen sichtbar waren. Möglicherweise werden Oligomere gebildet, welche aber konzentrationsbedingt *in vivo* nie zu der *in vitro* beobachteten Länge oligomerisieren können. Für das Als5 Protein aus *Candida albicans* wurde beispielweise eine Domäne identifiziert, die *in vitro* zur Ausbildung von Amyloidfibrillen mehrerer μm Länge führt (284). *In vivo* bildet das Volllängenprotein

allerdings keine langen Amyloidfibrillen aus, weil es Membran-verankert ist, sondern sogenannte Amyloid-Nanodomänen die der Biofilmbildung und der Adhäsion dienen (286).

4.1.3 Pmp21 Subdomänen bilden amyloide Protofibrillen

Da es sich bei den Pmp-Oligomeren trotz der Ähnlichkeit zu amyloiden Protofibrillen nicht zwangsläufig um diese handeln musste, wurden Analysen mit den amyloidspezifischen Farbstoffen ThT und CR durchgeführt. Diese ermöglichen eine spezifische Detektion von amyloidartigen Proteinen.

Interessanterweise belegte sowohl die ThT-Fluoreszenz als auch die Absorptionsanalyse mittels CR, dass die Pmp21 Subdomäne M-Pmp21-O₁, sowie die Subdomänen D-Wt-O₁₋₃ im direkten Vergleich mit der Positivkontrolle A β ₄₂ amyloidspezifische β -sheet-Strukturen enthielten (Abbildung 3.14 und Abbildung 3.15). Für Curli aus *E. coli* konnte dieser Effekt mit *in vivo* Material nachgewiesen werden (273). Für verschiedene Peptide der Als Adhäsine aus *Candida albicans* konnte ebenfalls eine Detektion erfolgen, allerdings mit *in vitro* Material (284). Die amyloiden Chapline aus *Streptomyces coelicolor* wurden ebenfalls *in vitro* mittels ThT-Fluoreszenz und CR-Färbung nachgewiesen (270). Chapline bilden ein Netzwerk aus Amyloidfibrillen und Cellulose, mit dem sie die Adhäsion an hydrophobe Oberflächen ermöglichen, aber auch eine Rolle bei der Sporen- und Fruchtkörperentwicklung spielen (400).

Eine weitere Klasse von amyloiden, sekretierten mikrobiellen Proteinen stellen die Hydrophobine dar. Sie spielen in Pilzen eine ähnliche Rolle bei der Sporen- und Fruchtkörperentwicklung wie die Chapline. Zusätzlich sind sie an der Adhäsion an die Oberfläche des Wirtes, sowie am Schutz vor der angeborenen Immunantwort während der Infektion des Wirtes beteiligt (401,402). Die Aminosäuresequenzen der Hydrophobine sind, wie die der Pmps, sehr unterschiedlich. Allerdings besitzen sie acht konservierte Cysteine, die strukturell relevant sind (280). Das SC3 Hydrophobin enthält einen hohen Anteil β -sheets. SC3 bildet nach Sekretion und ins Wasser und Selbstassemblierung an der Luft eine 5-12 nm breite stangenartige Struktur aus (403). Es konnte ebenfalls eine ThT-Fluoreszenz und CR-Färbung nachgewiesen werden (404).

Die Tatsache, dass monomerisches D-Wt ebenfalls nach 22 h Inkubation mit ThT eine hohe Fluoreszenz aufweist, ist auf eine Oligomerisierung in Laufe der Messung zurückzuführen. (Abbildung 3.13). Die Oligomerisierung verlief dabei nicht in einer sigmoidalen Kurve mit

exponentieller Wachstumsphase, wie sie für A β oder Curli häufig beobachtet wurde (277,405). Die Oligomerisierung von D-Wt-M findet eher in einer beschränkten Wachstumskurve ohne exponentielle Phase statt. Allerdings ist ein sigmoidaler Verlauf der Oligomerisierung nicht zwingend Voraussetzung für die Amyloidbildung. Für A β wurden ähnliche Oligomerisierungsverläufe wie die für D-Wt-M beobachtet, wenn geringe Proteinkonzentrationen verwendet wurden (406).

Des Weiteren wird diskutiert, ob amyloiddetektierende Farbstoffe die Ausbildung von amyloiden Strukturen initiieren (407). Dies wäre sowohl eine Erklärung für die erhöhte ThT-Fluoreszenz des Monomers als auch für die erhöhte Absorption des Monomers bei der Färbung mittels CR.

4.1.4 Das FxxN Motiv in D-Wt induziert die Ausbildung von Oligomeren

D-Wt und D-Mt weichen in ihrer Kapazität Oligomere auszubilden stark voneinander ab (Abbildung 3.16). D-Wt und D-Mt wurden bei unterschiedlichen Konzentrationen renaturiert. Je höher die Proteinkonzentration während der Renaturierung, umso wahrscheinlicher sind die Proteine räumlich benachbart, was die Ausbildung von Oligomeren begünstigen sollte. Allerdings konnte gezeigt werden, dass das FxxN Motiv entscheidend bei der Ausbildung von Oligomeren war. Bei der höchsten Renaturierungskonzentration (3,1 mg ml⁻¹) wurden von D-Wt 62% Oligomere gebildet und von D-Mt lediglich 28%. Bei einer Renaturierungskonzentration von 1,7 mg ml⁻¹ war die Oligomerisierung von D-Wt gegenüber D-Mt sogar 10-fach erhöht. Es ist bekannt, dass bestimmte Proteinsequenzen die Ausbildung von amyloidähnlichen Strukturen begünstigen (229,230). Dass es sich bei dem Bereich, in dem sich die FxxN Motive in D-Wt befinden, um einen solchen handeln könnte, wurde im Vorfeld bereits durch bioinformatische Analysen vorhergesagt (Abbildung 3.1).

Die Lyse und Renaturierung von D-Wt erfolgte in Puffern mit 5 mM β -ME, um falsch ausgebildete Disulfidbrücken zu lösen. Nach der Renaturierung erfolgte in der SEC das Umpuffern in PBS ohne β -ME (Kapitel 3.1.1). Daher bestand die Möglichkeit, dass die nach der SEC gefundenen Oligomere kovalent verknüpft waren. Durch eine semipräparative SEC mit 100 mM DTT konnte nur ein geringer Zerfall von D-Wt-O₁ in D-Wt-M und damit ein Einfluss der Cysteine auf die Oligomerisierung festgestellt werden (Abbildung 3.18). Es wurde berichtet, dass Provassopressin unter oxidierenden Bedingungen *in vitro* durch Disulfidbrückenbildung homooligomere Proteinfibrillen ausbilden kann. Diese

Proteinfibrillen sind ebenfalls *in vivo* von Bedeutung. Für die Fibrillenbildung ist dabei weniger ein Cystein an spezifischer Position relevant, sondern vielmehr die generelle Präsenz eines Cysteins (408). Es besteht daher die Möglichkeit, dass die, wenn auch geringe, Ausbildung von Oligomeren der Pmp21-D Mutante (Abbildung 3.16) lediglich auf der Wechselwirkung von Cysteinen beruht.

4.1.4.1 Die Oligomere besitzen Amyloid-ähnliche Sekundärstrukturen

Ein weiteres Merkmal β -sheet-reicher amyloider Protofibrillen ist ein charakteristisches Circular dichroismus (CD)-Spektrum. Das CD-Spektrum von M-Pmp21-O₁ und D-Wt-O₁ ähnelte in seinem Verlauf mit einem breiten Minimum sehr stark dem des amyloiden HET-s aus dem filamentösen Pilz *Podospora anserina* (333) (vergleiche Abbildung 3.17 und Abbildung 4.2). Allerdings mit dem Unterschied, dass M-Pmp21-O₁ und D-Wt-O₁ die y-Achse bei 195 nm schnitten und HET-s bei 200 nm. Der Schnittpunkt bei 195 nm spricht für einen geringeren Anteil β -sheets. Des Weiteren lag das Minimum von M-Pmp21-O₁ und D-Wt-O₁ bei ca. 213 nm und nicht exakt bei 217 nm, was typisch für reine β -sheets wäre. Eine Analyse zur Sekundärstrukturvorhersage anhand des CD-Spektrums durch CONTINLL ergab, dass M-Pmp21-O₁ und D-Wt-O₁ jeweils 20,1% und 11,5% β -sheets ausbildeten (Abbildung 3.17). Das war deutlich geringer als bei HET-s (45%) (333). Allerdings handelte es sich bei dem untersuchten HET-s um Amyloidfibrillen und nicht um Protofibrillen. Das könnte ein Anzeichen dafür sein, dass der höhere Anteil an β -sheets zu der geordneteren Amyloidfibrillenstruktur führt. Die β -sheet Struktur von Curli Fibrillen erscheint im CD-Spektrum (Abbildung 4.3) noch ausgeprägter (273,277) als die von HET-s (Abbildung 4.2) (333).

In den CD-Spektren wurde deutlich, dass M-Pmp21-O₁ und D-Wt-O₁ deutlich mehr β -sheets ausbildeten als D-Mt-O₁. D-Mt-O₁ zeigte Tendenzen zu einer *random coil* Struktur, wie sie von den Monomeren von D-Wt und D-Mt ausgebildet wurde (Abbildung 3.17). Das deutet an, dass durch die FxxN Motive die β -sheet-reicheren Konformationen eingenommen wurden, welche wiederum zu einer ausgeprägteren Oligomerisierung führten.

Die von D-Wt-M und D-Mt-M gebildeten *random coil* Strukturen mit Minima bei ca. 200 nm unterschieden sich deutlich von HET-s-Monomeren. HET-s bildet α -Helix-reiche Monomere (333) (Abbildung 4.2). Allerdings unterscheiden sich die monomeren Konformationen amyloider Proteine. Für CsgA ist bekannt, dass diese Hauptkomponente von Curli aus *E. coli*

4 Diskussion

in löslicher, monomerischer Form überwiegend *random coils* bildet (Abbildung 4.3) (277). Als solche wird es auf die Oberfläche von *E. coli* transportiert und dort zu Amyloidfibrillen assembliert (271,273).

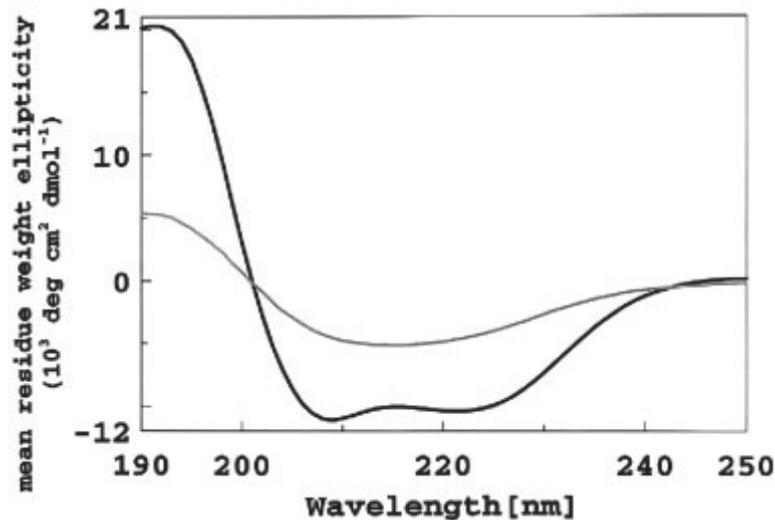


Abbildung 4.2: CD-Spektroskopie von löslichem und fibrillärem HET-s (333).

Der Anteil von β -sheets ist in HET-s Fibrillen deutlich erhöht. Nach Berechnung der Sekundärstruktur an der CD-Spektroskopie enthielt lösliches HET-s (schwarze Kurve; $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$) 30% α -Helices, 20% β -sheets und 50% *random Coils*. Fibrilläres HET-s (graue Kurve; $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$) enthielt 10% α -Helices, 45% β -sheets und 45% *random Coils* (333).

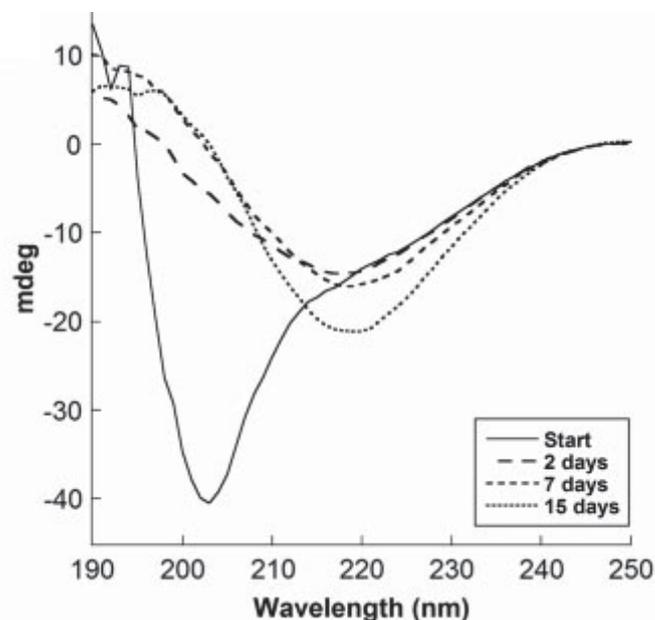


Abbildung 4.3: *In vitro* Polymerisierungsprozess von CsgA analysiert mittels CD-Spektroskopie über mehrere Tage (277).

Frisch aufgereinigtes CsgA ($10 \mu\text{M}$ Lösung) wurde innerhalb von 15 Tagen zu vier Zeitpunkten untersucht (277). CsgA wurde bei Raumtemperatur ohne Schütteln inkubiert. Direkt nach dem Start ist eine ausgeprägte *random coil* Struktur erkennbar. Nach zwei Tagen hat eine deutliche Umwandlung zu einer Struktur mit überwiegend β -sheets stattgefunden. Anhand des zunehmenden Minimums bei 217 nm ist erkennbar, dass die β -sheet Struktur sich bis zum 15. Tag weiter ausprägt (277).

4.1.4.2 Die β -sheet-reichen Oligomere zeigen Parallelen zu bekannten β -Helices

Besonders in der Aufsichtsperspektive einer modellierten M-Pmp21-Struktur wird die β -helikale Faltung, ähnlich der Struktur des amyloiden HET-s aus *Podospora anserina*, deutlich (vergleiche Abbildung 1.6 und Abbildung 3.1) (333). Durch die Auflösung der ebenfalls β -helikalen Tertiärstruktur von Pertaktin wurde eine 12-fache Wiederholung von 20-34 Aminosäuren identifiziert, die vermutlich für die β -helikale Faltung verantwortlich sind (207). Hauptsächlich tragen diese repetitiven Sequenzen kleine unpolare (Glycin, Alanin) und große unpolare (Isoleucin, Leucin, Valin, Phenylalanin, Tryptophan) Seitenketten. Die großen unpolaren Seitenketten ragen dabei in das Innere der β -Helix. Diese Aminosäuren sind auch Bestandteile der Pmp-spezifischen Motive GGA(I, L, V) und FxxN und ragen laut Strukturvorhersage ebenfalls in das Innere der β -Helix.

Für eine Beteiligung der Pmp-charakteristischen Motive an der Faltung spricht, dass diese in den vorhergesagten β -helikalen Tertiärstrukturen der Pmps häufig in den sogenannten Loops der β -helikalen Struktur lokalisiert sind (74) (Kapitel 3.1). Für das β -helikale Antigen 43 (*antigen 43*; AG43) aus *E. coli* sind Dimere bekannt, die durch eine klettverschlussartige Interaktion der AS im Bereich der Loops entstehen (208).

Aus den hier diskutierten Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die experimentell gefundenen β -sheet-reichen Strukturen von M-Pmp21-O₁ und D-Wt-O₁ möglicherweise die vorhergesagten β -Helices bilden könnten (Kapitel 3.1) (74).

4.1.5 Einfluss von ionischer Wechselwirkungen und Disulfidbrücken auf die Stabilität von D-Wt-O₁

Es ist bekannt, dass die Proteinfaltung und Protein-Protein-Interaktion aufgrund ihrer ionischen Wechselwirkung stabilisiert oder destabilisiert werden kann. Der Prozess wird als „Ein-“, bzw. „Aussalzen“ bezeichnet und ist insbesondere bei globulären Proteinen gut untersucht (409). Erste quantitative Studien mit Proteinen aus Eiern gehen zurück auf Hofmeister bis in das 18. Jahrhundert. In diesen Studien wurde gezeigt, dass bestimmte Ionen Proteine mit unterschiedlicher Effizienz aussalzen können (410). Durch eine semipräparative SEC mit 1 M NaCl konnte gezeigt werden, dass die gebildeten D-Wt Oligomere nicht in Monomere zerfallen (Abbildung 3.18). Bei nicht amyloiden Proteinen, wie z.B. Thermolysin, ist bei einer Erhöhung der NaCl-Konzentration eine Erhöhung der Löslichkeit zu erwarten. So konnte man durch die Erhöhung der NaCl Konzentration auf 1 M

4 Diskussion

die Löslichkeit von Thermolysin auf ca. 7 mg ml^{-1} erhöhen (411). Da man bei einer physiologisch geltenden Salzlösung wie PBS 137 mM NaCl verwendet, kann D-Wt somit als schwer einsalzbar bezeichnet werden. Dies kann ein weiteres Indiz für eine amyloide Interaktion darstellen. So wurde für das Curli Protein CsgA festgestellt, dass eine NaCl-Konzentration von 0 - 500 mM keinen Einfluss auf die mit ThT detektierten Amyloidfibrillen hatte. (394). Zusätzlich wurde für das „*islet amyloid polypeptide*“ beobachtet, dass hohe Salzkonzentrationen die Ausbildung von stabilen Amyloidfibrillen sogar begünstigen können (412).

Um die thermische Stabilität zu bestimmen, wurde eine CD-Spektroskopie mit einem schrittweisen Temperaturgradienten von 20° - 100°C durchgeführt. Das Kontrollprotein BSA zeigte eine kontinuierliche Entfaltung der α -helikalen-Sekundärstruktur mit jeder Temperaturerhöhung. Besonders deutlich wurde die Denaturierung ab 50°C . Ein Denaturierungsbereich zwischen 50°C und 70°C wurde bereits für BSA mit Differential Scanning Calorimetry beschrieben (346). Andere Stellen berichten von einer irreversiblen Veränderung des CD-Spektrums ab 40°C (347). Hingegen zeigte D-Wt- O_1 erst eine beginnende Entfaltung der β -sheet-Struktur beim Übergang von 90°C auf 100°C . Es wurden zahlreiche Analysen zur physiko-chemischen Stabilität von globulären Proteinen durchgeführt, die ihre intramolekularen Wechselwirkungen zur Aufrechterhaltung der nativen Konformation beschreiben (413). Die Anzahl der Studien bezüglich der Thermostabilität amyloider Proteine ist jedoch gering (414-420). Die existierenden Studien zeigen allerdings, dass amyloide Proteine häufig eine extrem hohe Stabilität gegenüber thermischer Dissoziation besitzen. In vielen Fällen werden Temperaturen weit über 100°C benötigt, um eine vollständige Dissoziation zu erreichen (414,415). Allerdings gibt es auch weniger extreme Beispiele amyloider Thermostabilität, teilweise übersteigen sie dennoch die Stabilität vieler globulärer Proteine. So wurden für α -Synucleinfibrillen, K3-Fibrillen und β 2m Fibrillen Entfaltungstemperaturen zwischen ca. 40°C , ca. 43°C und ca. 57°C bestimmt (421). Es konnten ebenfalls temperaturstabile funktionelle Amyloide bei Bakterien gefunden werden. Von den Pflanzenpathogenen *Xanthomonas axonopodis*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia chrysanthemi* und *Pseudomonas syringae* werden Hitze-stabile, Glycin-reiche, Harpin-Proteine durch ein Typ-III-System sekretiert. In der Wirtspflanze rufen sie dadurch eine hypersensitive Reaktion (*hypersensitive response*) hervor, die Ähnlichkeit zur Apoptose bei Tieren hat (422). Da für D-Wt- O_1 in der semipräparativen SEC festgestellt wurde, dass

Disulfidbrücken offenbar einen Einfluss auf die intermolekulare Stabilität der Oligomere hatten (Kapitel 3.1.7), wurde D-Wt-O₁ zusätzlich mit 1 mM TCEP als Reduktionsmittel versetzt. Die Wiederholung der temperaturabhängigen CD-Analyse zeigte eine schneller Entfaltung der Sekundärstruktur. Allerdings lag die beginnende Entfaltung von D-Wt-O₁ bei 80°C nach wie vor noch 20°C über der von BSA. D-Wt-O₁ kann damit, gegenüber den meisten tierischen Proteinen, die ihr Temperaturoptimum bei 37°C haben und bei 43°C überwiegend degradieren, als außergewöhnlich temperaturstabil bezeichnet werden.

4.1.6 Auswirkung der protofibrillären Pmps von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* auf die Adhäsion

Die Adhäsion der Pmps an humane Epithelzellen wurde für zahlreiche Pmps aus unterschiedlichen Spezies beschrieben (72-74,179). Die Wichtigkeit der Pmps für die Infektiosität von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* EBs wurde dadurch bestätigt, dass die Blockierung der humanen Rezeptoren durch eine Vorbehandlung der Humanzellen mit rekombinanten Pmps die anschließende Infektion deutlich reduziert (72-74,179).

Die Pmp-charakteristischen Motive, die in allen Pmps zahlreich sind, wurden als essentiell für die Adhäsivität der Pmps beschrieben. Es ist zwingende Voraussetzung für eine erfolgreiche Adhäsion, dass mindestens zwei des Pmp-charakteristischen FxxN Motive oder ein GGA (I, L, V) und ein FxxN Motiv vorhanden sind (73,179). Zusätzlich fand man heraus, dass rekombinante Pmp-Fragmente mit vielen Motiven tendenziell stärker an Epithelzellen adhären als Pmp-Fragmente mit wenigen Motiven (72,74). Dennoch war unklar, ob die Motive direkt am Adhäsionsprozess beteiligt sind oder eine bestimmte strukturelle Konformation der Pmps aufrechterhalten, für die Adhäsion selber allerdings unerheblich sind.

Die Ergebnisse der Adhäsionsassays mit D-Wt (D-Wt-O₁ und D-Wt-M) sowie D-Mt (D-Mt-O₁ und D-Mt-M) implizierten, dass sowohl das FxxN Motiv als auch die gleichzeitige Ausbildung von Oligomeren essentiell für eine Adhäsion an Humanzellen sind (Kapitel 3.1.9). Interessanterweise konnte in einem Rezeptor-*pull-down* mit D-Wt-O₁ und D-Wt-M gezeigt werden, dass oligomeres D-Wt doppelt so effektiv an den Pmp21 Rezeptor EGFR bindet wie das monomere D-Wt (Kapitel 3.1.10). Unerwarteter Weise wurden bei diesem Experiment eine geringe Interaktion von Ctad1 mit EGFR nachgewiesen. Kürzlich wurde gezeigt, dass Ctad1 an Integrin β 1 bindet (348). Es ist bekannt, dass Integrin und EGFR über bestimmte Mechanismen miteinander in Verbindung stehen (423). Daher bestand die Möglichkeit, dass

4 Diskussion

durch Ctd1 vermittelte Integrinaktivierung, den EGFR in räumliche Nähe brachte und es so zu einem falsch positiven Signal für Ctd1 kam.

Die Ergebnisse des Inhibierungsassays demonstrierten, dass eine Präinkubation mit den verschiedenen Proteinspezies die anschließende Infektion durch *C. pneumoniae* in Abhängigkeit vom FxxN Motiv und der Oligomerisierung inhibierte (Kapitel 3.1.11). So konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Pmps aufgrund ihrer FxxN-Motive verstärkt adhäsive Oligomere mit amyloidähnlichen Strukturen ausbildeten. Für manche Amyloide ist bekannt, dass sie schnell und mit hoher Affinität an zelluläre Membranen binden (424). Die amyloid ähnlichen Pmp21-Strukturen waren allerdings nur in Kombination mit den FxxN-Motiven zu einer Adhäsion fähig und hatten Relevanz für die Infektion. Es besteht dennoch die Möglichkeit, dass Pmp21 zu der Klasse der mikrobiellen funktionellen Amyloide gezählt werden kann.

Der Prototyp der mikrobiellen funktionellen Amyloide ist das Amyloid Curli, welches von vielen Enterobacteriaceae gebildet wird und für Biofilmbildung, Immunaktivierung und Zellinvasion verantwortlich ist (271,425-427). Aufgrund eines 300 nm Durchmessers von chlamydialen EBs erscheint es unwahrscheinlich, dass Pmps generell Fibrillen von mehreren 100 nm bis zu mehreren μm ausbilden, wie dies für Curli der Fall ist. Ebenfalls ist keine Biofilmbildung von Chlamydien bekannt. In *E. coli* wird die Biofilmbildung von Curli massiv unterstützt. Allerdings unterscheiden sich die Mechanismen der Proteinsekretion grundlegend. Bei Curli aus *E. coli* werden die fibrillenbildenden Einheiten (CsgA) von einem separat exprimiertem, in der Außenmembran inserierten, Sekretionssystem (CsgG) in großer Anzahl in den extrazellulären Raum befördert (Abbildung 4.4 A). Im extrazellulären Raum findet ein Anbau von CsgA an CsgG über verknüpfende Proteine (CsgF und CsgB) und die Assemblierung zu Amyloidfibrillen statt (428). Die Insertion von Pmp-Proteinen in die Außenmembran wird im Gegensatz zu Curli jedoch als Typ-V AT postuliert. Die ATs tragen ihr Sekretionssystem, den β -Barrel und die adhäsive PD jedoch in einer einzigen Sequenz. Eine Amyloidfibrillenbildung wie bei Curli erscheint daher unwahrscheinlich. Allerdings wurden für viele Pmps aus *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* Prozessierungsstellen entdeckt oder postuliert (73,189). Durch die Prozessierung wurden bis zu fünf verschiedene Pmp-Fragmente alleine für Pmp21 nachgewiesen (Abbildung 3.1). Es ist daher prinzipiell möglich, dass es *in vivo* zu einer Oligomerbildung von Pmps kommt, diese jedoch aufgrund des Typ-V AT Systems und der Prozessierung gut bezüglich ihrer Größe kontrolliert ist (Abbildung 4.4

4 Diskussion

B). Eine gut kontrollierte Oligomerisierung würde erklären, warum die *in vivo* Detektion von Protofibrillen auf EBs mit bildgebenden Verfahren (Abbildung 3.11) nicht erfolgreich war.

Ein ähnlicher Mechanismus, bei dem ein teilweise amyloides Protein lediglich sehr kurze Oligomere bildet, wurde für das Adhäsion Als5 aus *Candida albicans* gefunden (Abbildung 4.4 C) (429,430). Jedes Als5 Molekül ist C-terminal fest auf der Außenmembran verankert und trägt lediglich im N-terminalen Bereich hinter der Bindedomäne eine 17 AS lange Amyloid-bildende Sequenz (430). Das Als5 wird dennoch zu den funktionellen Amyloiden gezählt, da es aufgrund der Amyloid-bildenden Sequenz sogenannte *amyloid-patches/adhesin nanodomains* von 100 - 1.000 nm Größe ausbildet (285). Diese *amyloid-patches/adhesin nanodomains* entstehen, nach der Adhäsion der Bindedomänen zweier *Candida albicans*-Zellen. In Folge der Adhäsion wird Als5 auseinander gezogen und präsentiert dadurch die Amyloid-bildende Sequenz. Dadurch interagieren mehrere ALS5 Moleküle miteinander und ermöglichen eine stabilere Adhäsion (285).

Von *C. trachomatis* EBs wurden mittels Affinitätschromatographie Blumen-ähnlichen Strukturen isoliert (127). Diese könnten daher die *in vivo* Struktur der *in vitro* beobachteten Pmp21 Protofibrillen darstellen. Die *in vivo* weniger ausgeprägte Oligomerisierung könnte durch eine Vergrößerung der Kontaktfläche zur Wirtszelle nützlich sein, um z.B. mehrere EGFR Moleküle zu binden und die Adhäsion zu verstärken.

Es ist auch vorstellbar, dass das Potential Protofibrillen auszubilden hilfreich bei der Organisation der Inklusion innerhalb der Wirtszelle ist. Hier könnten sie durch Bindung an den EGFR in der Inklusionsmembran stabilisierend bei der Differenzierung von EB zu RB wirken.

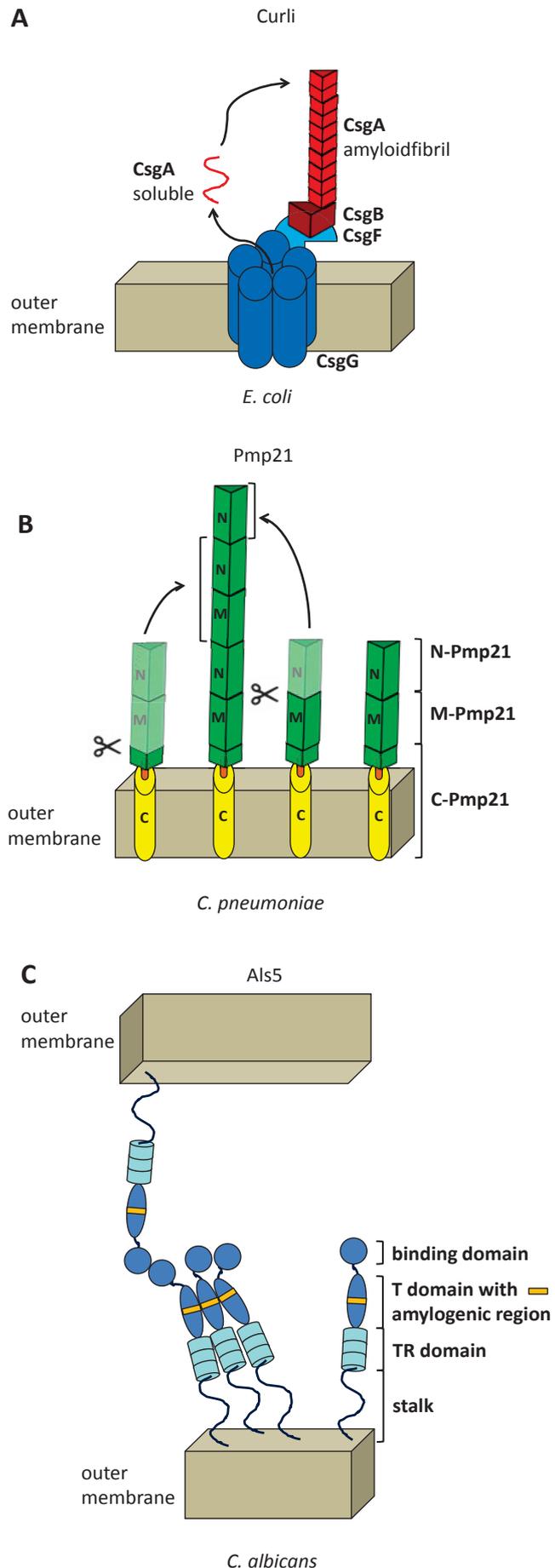
Interessanterweise gibt es eine deutliche Korrelation zwischen chlamydialer Infektion und der Ausbildung von amyloiden Plaques in den Gehirnen von Mäusen (431-433). Allerdings besteht bisher kein Beweis für eine direkte oder indirekte Verbindung zwischen der Ausbildung von amyloiden Plaques in Gehirnen von Mäusen und Pmps.

In Zukunft sollte überprüft werden, ob die anderen 20 Mitglieder der Pmp Familie ebenfalls amyloide Protofibrille ausbilden und miteinander heterooligomerisieren können. Gleiches gilt für die neun Pmps aus *C. trachomatis* (51,152,191,434). Falls eine solche Interaktion gezeigt werden kann, könnte die dadurch mögliche große antigenische Komplexität es den Chlamydien ermöglichen vielfältig auf die Abwehrmechanismen des Immunsystems zu reagieren (152,194).

4 Diskussion

Abbildung 4.4: Adhäsine mit amyloiden Anteilen unterschiedlicher Ausprägung.

(A) Schema des Aufbaus von Curli in der *E. coli* Außenmembran (*outer membrane*). CsgG stellt eine Pore dar, durch die forwährend lösliches (*soluble*) CsgA antransportiert werden kann. An der Pore CsgF und CsgB, die als Basis für die aus CsgA aufgebaute Amyloidfibrille dienen. (B) Darstellung von Pmp21 mit seinen verschiedenen Domänen auf der Oberfläche von *C. pneumoniae* (Kapitel 1.4.3.3). Aufgrund des postulierten Typ V AT-Systems ist die Anzahl der für eine Interaktion zur Verfügung stehenden Domänen begrenzt. Die Schere stellt die Prozessierungsstellen zwischen den Domänen dar. Die prozessierten Pmp21 Domänen (blassgrün), könnten schließlich zur Ausbildung von kurzen, Amyloid-ähnlichen, länglichen Oligomeren führen. (C) Schematische Darstellung von Als5 auf der Außenmembran von *Candida albicans*. Als5 ist Aufgebaut aus der Bindedomäne (*binding domain*), T Domäne mit Amyloidbildender Sequenz (*T domain with amylogenic region*), TR Domäne (*TR domain*) und Stengel (*stalk*). Nach Interaktion von Bindedomänen verschiedener Zellen, kommt es zur Ausbildung der sogenannten *amyloid-patches/adhesin nanodomains*. Hier dargestellt durch die Interaktion von drei Als5-Molekülen an ihren Amyloidbildenden Sequenzen.



4.1.7 Ausblick: Wann kommt es während des chlamydialen Entwicklungszyklus zur Ausbildung von Amyloid-ähnlichen Pmp-Strukturen?

Die Ausbildung von amyloiden Strukturen ist pH-Wert abhängig. Es konnte beispielsweise für das prototypische A β ₄₂ gezeigt werden, dass es in wässrigen Lösungen bei einem physiologischen pH-Wert Amyloidfibrillen bildet. Daher werden Experimente mit der Monomerkonformation bei basischem pH-Wert durchgeführt, denn dabei konnte eine stabile *Random-Coil*-Monomerkonformation über 24 h hinweg beobachtet werden (435,436). Da die Faltung von Proteinen durch pH-Änderungen beeinflusst wird, muss die Faltung des A β ₄₂ unter physiologischen Bedingungen nicht mit der Faltung bei basischen pH-Werten vergleichbar sein. Es sollte in Zukunft überprüft werden, ob die Oligomerbildung von Pmp21 ebenfalls pH-wertabhängig ist, denn alle Experimente mit Pmp21 wurden bei physiologischem pH-Wert (pH 7,4) durchgeführt. Dies ähnelt dem natürlichen pH-Wert während der Infektion von Humanzellen. Denn in Vesikeln mit EBs von *C. trachomatis* oder *C. Burnetii*, an die ein pH-Indikator gekoppelt war, konnte in einem Zeitraum von 2 - 24 h nach der Infektion ein pH-Abfall von 7 - 5,8 beobachtet werden (437). Allerdings dauert die Infektion mit *C. pneumoniae* von Adhäsion bis Freisetzung ca. 84 h und es ist unklar, wie sich der pH-Wert in diesem Zeitraum verändert. Falls die Ausbildung von Pmp-Oligomeren pH-wertabhängig ist, wäre es hilfreich zu wissen, welchen pH-Wert das Inklusionslumen zu den späteren Zeitpunkten der Infektion besitzt. Für die Adhäsion besonders entscheidend wäre allerdings der pH-Wert des *in vivo*-Mediums während der Präsentation der Pmps auf der chlamydialen Oberfläche und welchen pH-Wert die Oberfläche des Wirtszellgewebes zum Zeitpunkt der Adhäsion besitzt. Falls die Erkenntnisse von A β ₄₂ übertragbar sind, könnte man so bestimmen, in welchem Stadium des chlamydialen Entwicklungszyklus es zur Ausbildung von Pmp Oligomeren kommen kann.

4.2 Experimenteller Nachweis, dass Pmps entsprechend des Typ-V AT Sekretionsweg einen β -barrel ausbilden

Die Pmps werden aufgrund bioinformatischer Vorhersagen zu den Typ-V AT gezählt (152,292) (Kapitel 3.2). Experimentell konnte dies jedoch bisher nicht nachgewiesen werden, sondern lediglich die Oberflächenlokalisierung sowie die Funktion als Adhäsion (73,74,126,127,156,157,167,438,439). Für 97% aller Autotransporter wurde eine β -helikale Struktur, ähnlich der von Pertaktin aus *Bordetella pertussis*, vorhergesagt (192,193,196). In

Kapitel 3.1.6 wurde der Abschnitt M-Pmp21 der PD als β -sheet-reich identifiziert. Zur weiteren Charakterisierung wurde der Abschnitt C-Pmp21 heterolog in *E. coli* exprimiert. Durch verschiedene Tests sollte anschließend überprüft werden, ob C-Pmp21 Eigenschaften von Typ-V ATs besitzt (Kapitel 3.2).

4.2.1 Heterologe Expression von C-Pmp21

Die heterologe Expression von Membranproteinen ist häufig toxisch für *E. coli*, weil es zu Misfaltungen mit Porenbildung in der Membran kommen kann. Diese Zellyse äußert sich durch eine abnehmende OD₆₀₀ (440). Eine abnehmende OD₆₀₀ konnte während der Expression von C-Pmp21 (pSL12) nur beobachtet werden, wenn bei einer sehr hohen OD₆₀₀ von 2,4 induziert wurde. Bei den OD₆₀₀ von 0,6 und 1,4 stagnierte das Wachstum jedoch (Abbildung 3.24 B). Die Stagnation des Wachstums deutete darauf hin, dass die Zellen durch die C-Pmp21 Expression geschwächt waren. Die Ursache für die Zellyse während der Expression bei einer OD₆₀₀ von 2,4 könnte sein, dass sich die *E. coli*-Zellen zusätzlich nicht mehr in der exponentiellen Wachstumsphase befanden.

C-Pmp21 enthält drei Cysteine. Dies ist eher untypisch für Typ-V ATs. Denn Cysteine können den Einbau in die Membran der *E. coli*-Zelle durch Disulfidbrückenbildung beeinträchtigen (294,295,351). Durch β -Mercaptoethanol (β -ME) sollte die Beeinträchtigung des Wachstums durch möglicherweise falsch ausgebildete Disulfidbrücken im Protein verhindert werden (352). Es konnte jedoch nicht beobachtet werden, dass es zu einer signifikanten Erhöhung des Wachstums von C-Pmp21 exprimierenden *E. coli*-Zellen durch den Einsatz von β -ME kam (Abbildung 3.24 C). Deshalb können Disulfidbrücken nicht als Grund für das stagnierende Wachstum angesehen werden. Ein weiteres Wachstum konnte lediglich bei der Verwendung von ArcticExpress Zellen als Expressionsstamm oder bei der Verwendung eines konstitutiven Promotors (kC-Pmp21; pSL13) erreicht werden (Abbildung 3.24 D und E). Dies ist auf die gedrosselte Expression durch die niedrige Temperatur (ArcticExpress Zellen) oder die gedrosselte Expression durch den konstitutiven Promotor (kC-Pmp21) zurückzuführen. Für die Strategie, mit gedrosselter Expression erfolgreich heterolog exprimierte Proteine herzustellen, findet man zahlreiche Beispiele (353). So konnte durch die Verwendung der konstitutiven Expression bereits der β -barrel von AIDA-I erfolgreich für die Kristallisierung exprimiert werden (298).

Eine erfolgreiche Expression zeichnet sich allerdings nicht zwangsläufig nur durch ein kontinuierliches Zellwachstum aus. Bedeutend wichtiger ist die korrekte Faltung des heterologen Proteins. Bei der OD_{600} : 1,4 konnte eine vielversprechende Menge C-Pmp21 exprimiert werden (Abbildung 3.25). Da diese Expressionsbedingung im Verlauf dieser Arbeit als erste von den erwähnten getestet wurde, erfolgten damit die initialen Versuche zur Oberflächenlokalisation, sowie Proteinaufreinigung für die Kristallisierung (Kapitel 3.2.3 und folgende, Kapitel 4.2.3 - 4.2.7).

4.2.2 C-Pmp21 zeigt Charakteristika anderer β -barrel-Proteine

Das Laufverhalten von C-Pmp21 und dem konstitutiv exprimierten C-Pmp21 in der SDS-PAGE wurde untersucht, um dadurch Rückschlüsse auf die korrekte Faltung zu ziehen (Kapitel 3.2.2). Es ist bekannt, dass sich β -barrel von Typ V ATs dadurch auszeichnen, dass sie sehr Temperatur- und SDS-stabil sind. Nach der Probenvorbereitung bei 37° oder 50°C für die SDS-PAGE migrieren sie aufgrund ihrer kompakten Faltung bei einem niedrigeren als dem berechneten Molekulargewicht. Erst bei einer Probenvorbereitung bei 90°C kann eine vollständige Entfaltung gewährleistet werden (Abbildung 4.5 A und B) (298,355,441). Liegt jedoch eine Fehlfaltung vor, zeigt sich die geringere Stabilität dadurch, dass der β -barrel vollständig entfaltet und auf der berechneten Höhe läuft. Eine unvollständige Faltung kann beispielsweise durch eine unvollständige Abspaltung der periplasmatische Sec-Signalsequenz entstehen (Abbildung 4.5 B) (298).

Nach Expression in ArcticExpress Zellen zeigten sich weitere zwei Banden (ca. 35 kDa und ca. 43 kDa), die schneller migrierten als die berechnete Laufweite des ungefalteten β -barrel. Für die Kontrolle AIDA-I konnte ebenfalls eine Bande bei ca. 35 kDa detektiert werden, was auf die SDS-stabile Faltung hindeutet (298). Nach Probenvorbereitung bei 90°C nahm die Intensität dieser Bande ab, da sich durch diese Probenvorbereitung die erwartete Bande des entfalten Proteins (P) bildete. Bei C-Pmp21 und kC-Pmp21 war dies nicht der Fall (Abbildung 3.26). Möglicherweise aggregierte das Protein in den Ladetaschen der SDS-PAGE und war deshalb nicht sichtbar. Daher sollte eine Optimierung des Probenpuffers vorgenommen werden, um eine vollständige Entfaltung zu erreichen. Dies war bereits für den β -barrel aus AIDA-I notwendig (298).

Somit konnte durch dieses Experiment nur eine bedingte Ähnlichkeit von C-Pmp21 und kC-Pmp21 zu anderen β -barreln festgestellt werden. Es ist jedoch bekannt, dass sich das

4 Diskussion

Laufverhalten von β -barreln unterscheiden kann (298,441). Es könnte daher sein, dass sich kC-Pmp21 in seinem Laufverhalten generell von dem bekannter β -barrel unterscheidet.

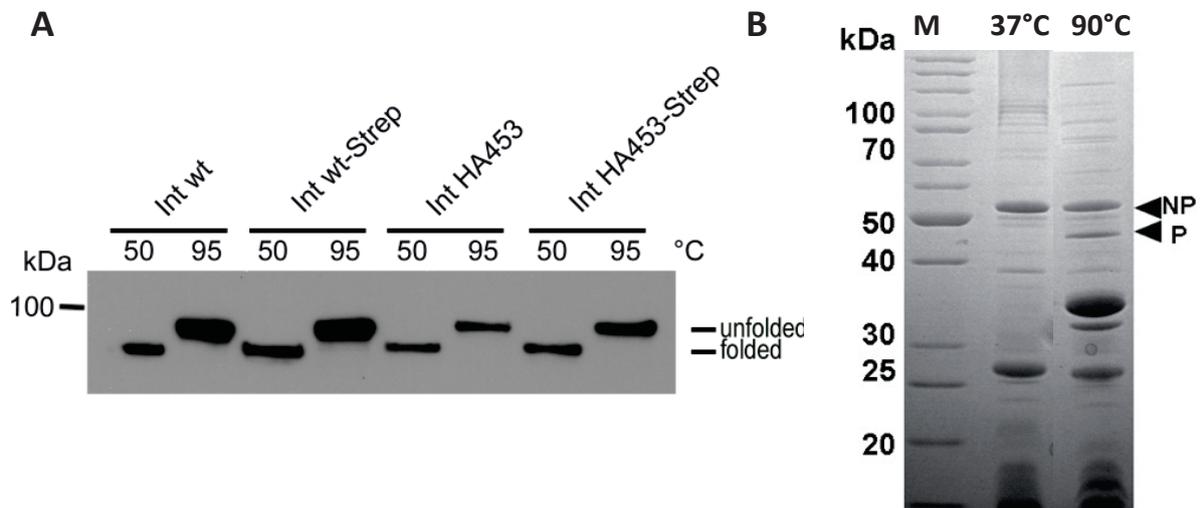


Abbildung 4.5: Exemplarische Darstellung des Laufverhaltens verschiedener β -barrel (298,441).

(A) Western Blot zur Analyse des Laufverhaltens von wildtypischem Intimin (Int wt), endständig Streptavidin getaggttem Intimin (Int wt-Strep), Intimin mit inseriertem HA-Tag an Aminosäure 453 (Int HA453) und Intimin mit Streptavidin und HA-Tag (Int HA453-Strep) (441). (B) Coomassie gefärbte SDS-PAGE zur Analyse des Laufverhaltens von endständig getaggttem AIDA-I. Die stabil integrierte Form ohne periplasmatische Signalsequenz (P) konnte deutlich von der nicht stabilen Form mit periplasmatischer Signalsequenz (NP) unterschieden werden (298).

4.2.3 C-Pmp21 wird auf die Oberfläche von *E.coli* transportiert

Zum Nachweis der erfolgreichen Insertion in die Außenmembran und der Oberflächenpräsentation des TypVa AT Passagiers ist es ein gängiges Verfahren, den Passagier durch eine Protease wie Trypsin oder Protease K von der Oberfläche der intakten *E. coli*-Zelle abzuverdauen. Anschließend wird die Abwesenheit des Proteins im Vergleich zu unverdauten Zellen als Nachweis für die Oberflächenlokalisierung interpretiert (298,355,441). Nach der induzierten Expression von C-Pmp21 in BL21 *E. coli*-Zellen ist der Abverdau durch Trypsin nur teilweise erfolgreich gewesen (Kapitel 3.2.3). Man sieht im Western Blot allerdings deutlich, dass lediglich der obere Teil der C-Pmp21 Bande unverdaut geblieben ist. Möglicherweise hat die Trypsinkonzentration in diesem Experiment nicht ausgereicht. Teilweise wurden für AIDA-I 10-fach höhere Trypsinkonzentrationen verwendet (359). Allerdings wurde im Western Blot sichtbar, dass lediglich der untere Teil der C-Pmp21-Bande abverdaut wurde. Ein ähnlicher Effekt ist beim AIDA-I-Experiment zu erkennen (Abbildung 3.27). Es wurde gezeigt, dass bei Überlastung des Sec-Transportwegs AIDA-I nur teilweise prozessiert (P) und auf die Oberfläche transportiert wurde. Das unprozessierte AIDA-I (NP)

ist unvollständig in die Außenmembran integriert, weshalb der N-terminale Teil nicht abverdaut werden kann (298). Es war demnach wahrscheinlich, dass ein unvollständiger Transport über den Sec-Transportweg auch bei C-Pmp21 vorlag und die 2 kDa große Signalsequenz nicht abgespalten worden war.

Dennoch stellt die Oberflächenpräsentation von C-Pmp21 den ersten experimentellen Hinweis dar, dass es sich bei Pmp21 um einen TypV AT handelt. Besonders nennenswert ist hierbei, dass, obwohl der TypV AT Sekretionsmechanismus in Gram-negativen Pathogenen weit verbreitet ist, die chlamydialen Pmps bis dato als einzige potentiell Typ-V-sekretierte Proteine außerhalb der *Proteobacteria* angesehen werden (153).

4.2.4 Membranisolation und Solubilisierung von C-Pmp21

Nachdem eine Oberflächenpräsentation von C-Pmp21 nachgewiesen wurde, erfolgte die Membranisolation und die sich anschließende Solubilisierung von C-Pmp21. Nach Zellaufschluß und Abzentrifugation der Zelltrümmer bei geringer Geschwindigkeit, enthielt das Pellet auch einen großen Anteil C-Pmp21, obwohl die Zellmembranen nach diesem Zentrifugationsschritt im Überstand waren (Abbildung 3.28). Dies weist darauf hin, dass es im Cytosol zur Ausbildung von *inclusion bodies* kam. Diese können bereits bei einer niedrigen Zentrifugationsgeschwindigkeit pelletiert werden (442,443).

Bei dem Detergenzscreen mit *E. coli* Membranen wurden die zwei besten Detergenzien (FC-16 und Fos-Mea 12), sowie das erfolgreich bei AIDA-I verwendete Detergenz Lauryldimethylamine-N-Oxide (LDAO) für detailliertere Screens ausgewählt. Diese zwitterionische Detergenzien enthalten positive und negative Ladungen in ihrer hydrophilen Kopfgruppe. Sie gelten als neutral in ihrer Ladung, können aber häufig Protein-Protein-Interaktionen auflösen und werden daher als mittelmäßig bezüglich ihrer Milde (Milde bezeichnet dabei die Fähigkeit, Proteine während der Solubilisierung nicht zu entfalten) bezeichnet (362). Viele strukturbiologische Studien von Außenmembranproteinen wurden mit zwitterionischen Detergenzien durchgeführt (444-446). Der β -barrel von AIDA-I, welcher ein Homolog zum β -barrel in C-Pmp21 darstellt, wurde beispielsweise mit LDAO solubilisiert (298). Für C-Pmp21 hatte jedoch FC-16 die besten Solubilisierungseigenschaften. Daher wurde es für die C-Pmp21 Solubilisierung aus der Außenmembran zur Aufreinigung verwendet.

4.2.5 Aufreinigung einer homogenen C-Pmp21 Proteinspezies mittels IMAC und SEC

C-Pmp21 konnte mittels IMAC in hoher Reinheit aufgereinigt werden (Abbildung 3.32). In der SEC war jedoch nicht ein einzelner, sondern mehrere Protein-Detergenz-Komplexe (PDK) erkennbar (Abbildung 3.33). Insbesondere während der Aufkonzentrierung kam es zu Aggregation der PDK (Abbildung 3.34). Dies war nicht ungewöhnlich, denn es war zu erwarten, dass die FC-16-Mizellen die Membran bei der Aufkonzentrierung nicht passieren. Es kam somit zu einer Erhöhung der FC-16-Konzentration. Es wird berichtet, dass dies zu einer Aggregation des PDK aufgrund der erhöhten Detergenzkonzentration führen kann (362). Um diese Aggregation zu verhindern, wurde die Detergenzkonzentration während der Aufkonzentrierung und SEC verringert. Zusätzlich wurde β -ME in den Puffer für die Aufkonzentrierung und die SEC gegeben, um intermolekulare Disulfidbrücken zwischen C-Pmp21 Molekülen zu lösen (Abbildung 3.35). Dadurch wurde auch bei hohen Proteinkonzentrationen ein Elutionsprofil mit einem überwiegend homogenen Peak erreicht (Abbildung 3.36).

4.2.6 Die experimentell analysierte Sekundärstruktur gibt Hinweise auf den vorhergesagten β -barrel

Das CD-Spektrum von C-Pmp21 stellte eindeutig die Sekundärstruktur eines gefalteten Proteins dar, da das Minimum noch deutlich vor 200 nm lag (vergleiche Abbildung 3.37 mit Abbildung 4.6 A). Wie laut der Tertiärstrukturvorhersage von C-Pmp21 (Abbildung 3.23) für einen β -barrel zu erwarten war, zeichnete sich das CD-Spektrum (Abbildung 3.37 A) durch eine β -sheet-reiche Sekundärstruktur aus. Ähnliche CD-Spektren sind für den β -barrel OmpA aus *E. coli* bekannt (Abbildung 4.6 B). Die deutlichere β -sheet Ausprägung im CD-Spektrum von OmpA lässt sich dadurch erklären, dass OmpA keinen α -helikalen Linker besitzt, sondern lediglich aus β -sheets und *random coils* besteht (356). Im CD-Spektrum von C-Pmp21 Peak 3 hingegen waren durch die Unterbrechung des Minimums bei 212 nm Tendenzen erkennbar, die auf einen Anteil α -Helices hindeuteten und somit den Linker repräsentieren könnten. Des Weiteren bestand der Sequenzabschnitt C-Pmp21 nicht ausschließlich aus dem vorhergesagten β -barrel. In Kapitel 3.2.9 wurde festgestellt, dass der N-terminale Abschnitt von C-Pmp21 aus *random coils* besteht. Dies führt ebenfalls dazu, dass es Abweichungen in der Sekundärstruktur von C-Pmp21 und einem reinen β -barrel wie OmpA kommen kann. Damit scheint die Abweichung in den Sekundärstrukturen von OmpA

4 Diskussion

und C-Pmp21 weitestgehend aufgeklärt. Eine genauere Aussage kann noch durch die Tertiärstrukturanalyse des Proteins getroffen werden.

Zur genaueren Bestimmung der Sekundärstruktur aus dem CD-Spektrum wurde dieses mit der Software K2D3 analysiert. Die Daten legen, dass ein nicht unerheblicher Anteil von 17% aus α -Helices besteht und lediglich 35% aus β -sheets. Für die Strukturvorhersage von C-Pmp21 (Abbildung 3.23) wurde der β -barrel der Esterase EstA von *Pseudomonas aeruginosa* (Kapitel 3.1.6) als bestes Template vorgeschlagen und für die Homologiemodellierung verwendet. EstA besteht zu 46,6% aus β -sheets (UniProtKB - O33407 (ESTA_PSEAE)). Falls Template und Modell so gut übereinstimmen, wie es durch die Konfidenz suggeriert wird, wäre demnach für C-Pmp21 ein höherer Anteil β -sheets zu erwarten gewesen. Dies liegt möglicherweise daran, dass die K2D3 Vorhersage Schwächen mit der Vorhersage von β -sheet-reichen Strukturen zeigt. Häufig werden automatisch mehr α -Helices vorhergesagt, als tatsächlich vorhanden sind (367). Durch die Schwächen bei der Vorhersage β -sheet-reicher Proteine lässt sich möglicherweise auch die sogenannte *root-mean-square deviation* (RMSD) erklären, der bei allen Peaks zwischen 0,73 und 0,98 und damit außerhalb des zuverlässigen Bereichs von 0,1 liegt (367). Die Vorhersage mittels K2D3 könnte durch den N-terminalen Abschnitt von C-Pmp21 erschwert worden sein. Dieser wurde laut Sekundärstrukturvorhersage mittels Phyre2 (Abbildung 3.23) als β -sheet-reich vorhergesagt. Somit ist er für K2D3 ebenfalls schwierig zu bearbeiten.

Letztlich lässt sich sagen, dass C-Pmp21 in diesem Experiment gefaltet vorlag und durch den β -sheet-Reichtum eindeutige Tendenzen eines β -barrels aufweist. Diese Hinweise waren ausreichend, um Kristallisationsexperimente zu starten.

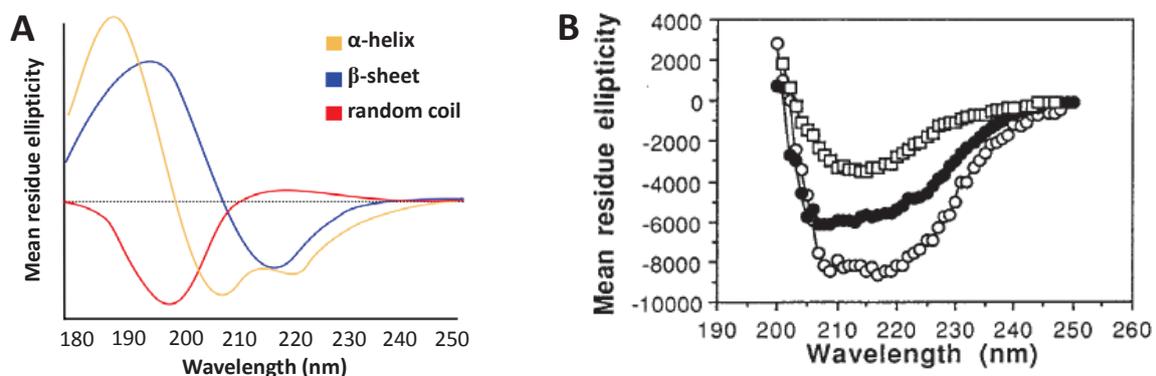


Abbildung 4.6: Exemplarische Darstellung reiner Sekundärstrukturen und eines β -barrels im CD-Spektrometer (356).

(A) Optimaler Verlauf reiner Sekundärstrukturen. (B) OmpA aus *E. coli* hat Parallelen zum CD-Spektrum von C-Pmp21. OmpA in (o) octyl-POE, (●) SDS und (□) die N-terminale Domäne in SDS (356).

4.2.7 Kristallisationstests mit C-Pmp21

Nach Kristallisationsexperimenten über 35 Tage mit einer C-Pmp21 Konzentration von 3,5 mg ml⁻¹ konnte keine schwere Präzipitierung (*heavy precipitate; HP*) ausgemacht werden. Deshalb wurde die Proteinkonzentration auf 14 mg ml⁻¹ erhöht. Allerdings führte dies ebenfalls nur bei 3,5% der getesteten Pufferbedingungen zur Ausbildung von *HP*, jedoch nicht zur Ausbildung von Proteinkristallen (Kapitel 3.2.8). Falsch gefaltete Proteine, insbesondere Membranproteine mit einem hohen Anteil hydrophober Aminosäuren, würden bei einer so hohen Konzentration überwiegend ausfallen (361). Das bestätigt die CD-Daten, nach denen C-Pmp21 gefaltet vorlag.

Die Präzipitationsgrenze schien mit 14 mg ml⁻¹ C-Pmp21 lediglich für wenige Bedingungen erreicht zu sein. Da die Konzentration der Präzipitanten durch die unterschiedlichen Pufferbedingungen bereits variabel ist, sollte für zukünftige Experimente die Proteinkonzentration zum Erreichen der Nukleationsphase weiter erhöht werden (Abbildung 4.7). Durch die Erhöhung der Proteinkonzentration würde die Löslichkeit im Tropfen weiter verringert werden, was schließlich zur Übersättigung führt. Dies ist ein thermodynamisch instabiler Zustand, der die Proteine entweder dazu bringt organisierte Kristalle auszubilden oder in Form von amorphen Proteinen zu präzipitieren. Kristallisation und Präzipitation sind zwei kompetitive Prozesse, weshalb es wichtig ist, die optimalen Kristallisationsbedingungen empirisch zu ermitteln (447).

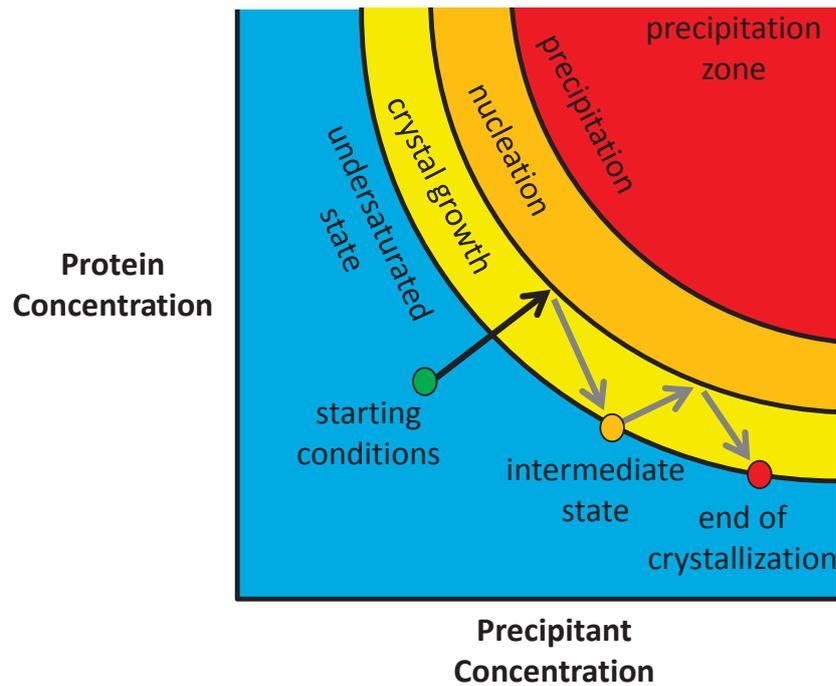


Abbildung 4.7: Allgemeines Phasendiagramm der Proteinkristallisation.

Auf der X-Achse ist die Proteinkonzentration (*protein concentration*), auf der Y-Achse die Präzipitanten-Konzentration (*precipitant concentration*) dargestellt. Entscheidend bei der Proteinkristallisation ist der Übergang von den Anfangsbedingungen (*starting conditions*) in der ungesättigten Phase (*undersaturated state*) über die Kristallwachstumsphase (*crystal growth*) bis zur Nukleationsphase (*nucleation*). Ist die Nukleationsphase einmal erreicht, kann es zum Kristallwachstum kommen. Während des Kristallwachstums kommt es entsprechend der räumlichen Nähe der Proteinmoleküle zu einer Annäherung an die ungesättigte Phase (*intermediate state*). Wenn die Proteinkonzentration während dieses Prozess zu gering wird, endet die Kristallbildung (*end of crystallization*). Der Nukleationsphase folgt die Präzipitationsphase (*precipitation*). Diese wird auf der Suche nach der Nukleationsphase manchmal erreicht und kann sich in der Bildung von leichtem Präzipitat (*light precipitate; LP*) äußern, aus dem noch Proteinkristalle gebildet werden können. Ein weiteres Fortschreiten in die Präzipitationszone (*precipitation zone*) sollte jedoch vermieden werden, da dadurch hauptsächlich amorphe Proteinpräzipitate gebildet werden, aus dem sich keine Proteinkristalle mehr bilden können (verändert nach: (448)).

4.2.8 Eine Autochaperon-Domäne lässt sich in C-Pmp21 nicht nachweisen

Das Alignment der Sequenzen, die bei der Identifizierung der *Shigella flexneri* IscA Autochaperon Domäne verwendet wurden, zeigte keinen homologen Bereich im Pmp21 Vollständigprotein. Nun war der Sequenzabschnitt von C-Pmp21, der nicht eindeutig dem vorhergesagten β -barrel zugeordnet werden konnte (pAC-Pmp21), anhand der Lokalisierung von Autochaperonen in anderen Typ-V ATs der wahrscheinlichste für ein Autochaperon in Pmp21. Daher wurde dieser Sequenzabschnitt mittels Strukturvorhersage durch I-Tasser und Phyre2 analysiert (Abbildung 3.23). Die Tertiärstrukturvorhersage entsprach mit geringer Konfidenz einer überwiegenden *random coil* Faltung, während die Vorhersage der Sekundärstruktur eine β -sheet-reiche Faltung zeigte. Aufgrund der experimentell bestimmten β -sheet-reichen Faltung von den an pAC grenzenden Domänen M-Pmp21 und

D-Wt (Abbildung 3.17 und Abbildung 3.20 bis Abbildung 3.22) wäre für ein dazwischenliegendes Autochaperon ebenfalls eine β -sheet-reiche Faltung zu erwarten gewesen. Um experimentelle Evidenz für die An- oder Abwesenheit einer Autochaperondomäne zu erlangen, wurde der Abschnitt pAC in C-Pmp21, der nicht dem β -barrel entsprach, heterolog in *E. coli* exprimiert. Nach Renaturierung mittels säulenbasierter Rückfaltung (*On Column Refolding*; OCR) erfolgte die Analyse mittels SEC, die einen Peak nahe des V_0 und einen weiteren im späteren Elutionsvolumen (V_e) ergab (Abbildung 3.39). Der V_e -Peak entsprach einem apparenten Molekulargewicht (MW) von 57 kDa. Dies würde bei einem theoretischen MW von 18 kDa für trimeres pAC-Pmp21 sprechen. Allerdings war auch für D-Wt-M herausgefunden worden, dass es zu einer starken Abweichung von apparentem und tatsächlichem Molekulargewicht in der SEC kommen kann. Für D-Wt-M sprach die apparente Laufweite ebenfalls zuerst für ein Trimer, was sich jedoch nicht bestätigte (Abbildung 3.4). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass dies ebenfalls für pAC zutrifft. Daher muss an dieser Stelle angezweifelt werden, dass es sich bei pAC um ein Trimer handelt, und es sollte wie bei D-Wt-M eine SEC mit anschließender Mehrfachwinkellichtstreuung durchgeführt werden, um das Molekulargewicht exakt zu bestimmen.

Die CD-Spektroskopie von pAC ergab, dass es sich bei dem Protein im Peak nahe des Totvolumens nicht um gefaltete Oligomere wie in Kapitel 3.1.6 handelte, sondern um ungeordnete Strukturen (449). Das Protein im V_e -Peak zeigte eine hauptsächlich *random coil* Faltung. Die Tertiärstrukturvorhersage für pAC-Pmp21 konnte somit bestätigt werden.

Wenn man die Daten aus Kapitel 3.2.9 hinzuzieht, deutet dies darauf hin, dass in Pmp21 die Faltung nicht durch ein formgebendes Autochaperon initiiert wird.

4.3 Ausblick: Die Aufgabe der Pmp-charakteristischen Motive FxxN und GGA (I, L, V) während der Faltung der Passagierdomäne

In Kapitel 3.1 wurde herausgefunden, dass die Pmp21 PD eine starke Tendenz hat aufgrund des FxxN Motivs selbständig amyloidähnliche Strukturen auszubilden. Es besteht daher die Möglichkeit, dass Pmp21 kein AC für die Faltung benötigt, sondern die faltungsinizierenden Elemente in Form der Motive über den gesamten Passagier verteilt sind. Amyloide Proteine falten sich aufgrund eines Mechanismus, der als sterischer Reißverschluss (*steric zipper*) bezeichnet wird (450). Dabei wird im Optimalfall lediglich eine sechs Aminosäuren lange

4 Diskussion

steric zipper-Sequenz benötigt. Sobald genügend konformationelle Freiheit für die Sequenz besteht, den Zipper auszubilden, erfolgt die Fibrillogenese des gesamten Proteins. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass RNase A Amyloidfibrillen ausbildet, sobald eine *steric zipper*-Sequenz in einen flexiblen Loop inseriert wurde (451). Eine Insertion dieser Sequenz in einen stabiler gefalteten Bereich führt allerdings nicht zu einer Ausbildung von Amyloidfibrillen (450). Falls die *steric zipper*-Sequenz allerdings mit Glycin flankiert wurde, entstand genug konformationelle Freiheit, die zu einer Ausbildung von Amyloidfibrillen führte (452). Pmps gelten allgemein durch ihre charakteristischen GGA (I, L, V)-Motive als glycinreich (152). Die PD von Pmp21 enthält 125 Glycine (11,2%), was eine ausreichende Flexibilität ermöglichen sollte. In Kombination mit den FxxN Motiven, die zu einer Ausbildung von Amyloid-ähnlichen Protofibrillen führen (Kapitel 3.1), besteht damit eine sehr gute Grundlage für eine Faltung welche unabhängig von Chaperonen erfolgt.

5 Anhang

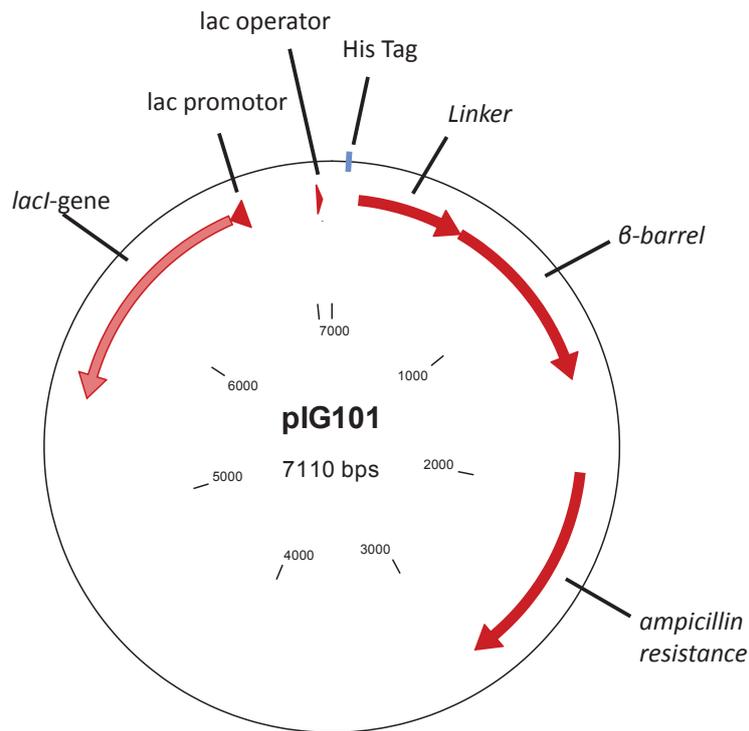


Abbildung 5.1: Plasmidkarte von pIG101 (Kapitel 2.1.11).

Dargestellt sind die Positionen der Ampicillin Resistenz (*ampicillin resistance*), des *lacI*-Gens (*lacI-gene*), des *lac* promotors (*lac promotor*), des *lac* operators (*lac operator*), des 6x His Tag (*His Tag*) und von AIDA-I (Zusammengesetzt aus *Linker* und β -*barrel*).

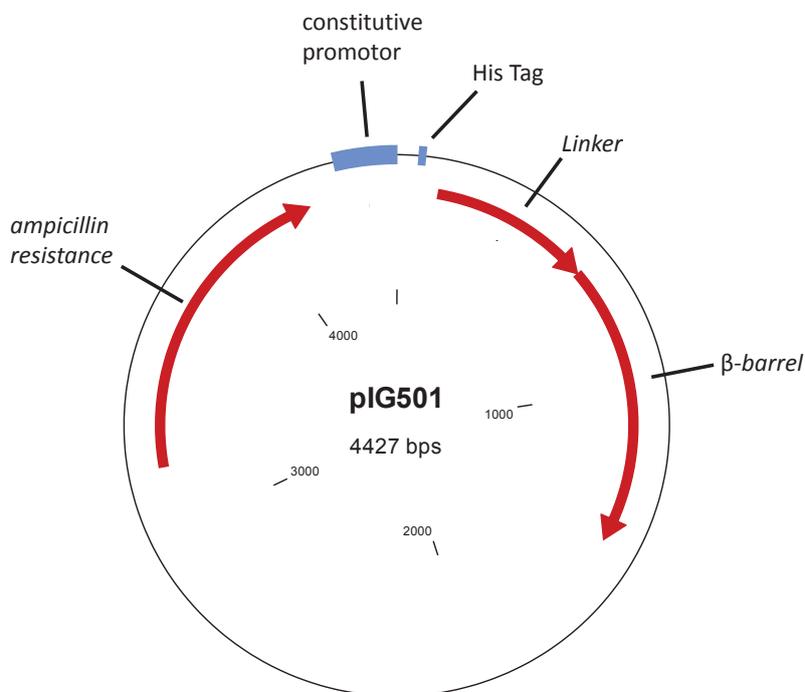


Abbildung 5.2: Plasmidkarte von pIG501 (Kapitel 2.1.11).

Dargestellt sind die Positionen der Ampicillin Resistenz (*ampicillin resistance*), des konstitutiven Promotors (*constitutive Promotor*), des 6x His Tag (*His Tag*) und von AIDA-I (Zusammengesetzt aus *Linker* und β -*barrel*).

6 Literaturverzeichnis

1. Harris R.L., W. T. W., Jr. (1985) "Contribution to the Question of Pneumotyphus": a discussion of the original article by J. Ritter in 1880. *Reviews of Infectious Diseases* **7**, 119-122
2. Ritter, J. (1880) Beitrag zur Frage des Pneumotyphus (Eine Hausepidemie in Uster [Schweiz] betreffend). *Deutsches Archiv für Klinische Medizin* **25**, 53-96
3. Halberstädter, L. P., S. (1907) Über Zelleinschlüsse parasitärer Natur beim Trachom. *Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte* **26**, 44-47
4. Moulder, J. W. (1966) The relation of the psittacosis group (Chlamydiae) to bacteria and viruses. *Annu Rev Microbiol* **20**, 107-130
5. Longbottom, D., and Coulter, L. J. (2003) Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J Comp Pathol* **128**, 217-244
6. Everett, K. D. E., Bush, R. M., and Andersen, A. A. (1999) Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 415-440
7. Grayston, J. T., Kuo, C. C., Campbell, L. A., and Wang, S. P. (1989) Chlamydia-Pneumoniae Sp-Nov for Chlamydia Sp Strain Twar. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 88-90
8. Rurangirwa, F. R., Dilbeck, P. M., Crawford, T. B., McGuire, T. C., and McElwain, T. F. (1999) Analysis of the 16S rRNA gene of micro-organism WSU 86-1044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order Chlamydiales: proposal of Waddliaceae fam. nov., Waddlia chondrophila gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 577-581
9. Lagkouvardos, I., Weinmaier, T., Lauro, F. M., Cavicchioli, R., Rattei, T., and Horn, M. (2014) Integrating metagenomic and amplicon databases to resolve the phylogenetic and ecological diversity of the Chlamydiae. *Isme J* **8**, 115-125
10. Collingro, A., Tischler, P., Weinmaier, T., Penz, T., Heinz, E., Brunham, R. C., Read, T. D., Bavoil, P. M., Sachse, K., Kahane, S., Friedman, M. G., Rattei, T., Myers, G. S. A., and Horn, M. (2011) Unity in Variety-The Pan-Genome of the Chlamydiae. *Mol Biol Evol* **28**, 3253-3270
11. Horn, M. (2008) Chlamydiae as Symbionts in Eukaryotes. *Annu Rev Microbiol* **62**, 113-131
12. Nunes, A., and Gomes, J. P. (2014) Evolution, phylogeny, and molecular epidemiology of Chlamydia. *Infect Genet Evol* **23**, 49-64
13. Stephens, R. S., Myers, G., Eppinger, M., and Bavoil, P. M. (2009) Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of Chlamydia resolved. *Fems Immunol Med Mic* **55**, 115-119
14. Aitken I.D., L. D. (2007) Chlamydial abortion. *Diseases of Sheep* **4**, 105-112
15. Pospischil, A., Reitt, K., and Thoma, R. (2002) "Chlamydiae in cattle and pigs and the zoonotic potential". *Deut Tierarztl Woch* **109**, 444-456
16. Pospischil, A., Thoma, R., Hilbe, M., Gresi, P., and Gebbers, J. O. (2002) Abortion in woman caused by caprine Chlamydophila abortus (Chlamydia psittaci serovar 1). *Swiss Med Wkly* **132**, 64-66
17. Pospischil, A., Thoma, R., Hilbe, M., Grest, P., Zimmermann, D., and Gebbers, J. O. (2002) Abortion in humans by Chlamydophila abortus (Chlamydia psittaci serovar 1). *Schweiz Arch Tierh* **144**, 463-466
18. Pospischil, A., Thoma, R., and Sydler, T. (2002) Abortion in swine caused by bacteria. *Prakt Tierarzt* **83**, 274-280
19. Pospischil, A., Thoma, R., von Bomhard, W., Reitt, K., Cantieni, J., Zimmermann, D., and Polkinghorne, A. (2002) Abortion in the cow by Chlamydia psittaci. *Schweiz Arch Tierh* **144**, 467-472
20. Beeckman, D. S. A., and Vanrompay, D. C. G. (2009) Zoonotic Chlamydophila psittaci infections from a clinical perspective. *Clin Microbiol Infec* **15**, 11-17

21. Petrovay, F., and Balla, E. (2008) Two fatal cases of psittacosis caused by *Chlamydophila psittaci*. *Journal of medical microbiology* **57**, 1296-1298
22. Hartley, J. C., Stevenson, S., Robinson, A. J., Littlewood, J. D., Carder, C., Cartledge, J., Clark, C., and Ridgway, G. L. (2001) Conjunctivitis due to *Chlamydophila felis* (*Chlamydia psittaci* feline pneumonitis agent) acquired from a cat: Case report with molecular characterization of isolates from the patient and cat. *J Infection* **43**, 7-11
23. Dean, D., Rothschild, J., Ruettger, A., Kandel, R. P., and Sachse, K. (2013) Zoonotic Chlamydiaceae Species Associated with Trachorna, Nepal. *Emerg Infect Dis* **19**, 1948-1955
24. Rohde, G., Straube, E., Essig, A., Reinhold, P., and Sachse, K. (2010) Chlamydial Zoonoses. *Dtsch Arztebl Int* **107**, 174-U124
25. Wheelhouse, N., and Longbottom, D. (2012) Endemic and Emerging Chlamydial Infections of Animals and Their Zoonotic Implications. *Transbound Emerg Dis* **59**, 283-291
26. Ojcius D.M., D. T., Bavoil P.M. (2005) Can chlamydia be stopped? *Scientific American* **292**, 72-79
27. Bebear, C. d. B., B. (2009) Genital *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Infec* **15**, 4-10
28. Mabey, D. C. W., Solomon, A. W., and Foster, A. (2003) Trachoma. *Lancet* **362**, 223-229
29. Pascolini, D., and Mariotti, S. P. (2012) Global estimates of visual impairment: 2010. *Brit J Ophthalmol* **96**, 614-618
30. Polack, S., Brooker, S., Kuper, H., Mariotti, S., Mabey, D., and Foster, A. (2005) Mapping the global distribution of trachoma. *B World Health Organ* **83**, 913-919
31. Smith, J. L., Haddad, D., Polack, S., Harding-Esch, E. M., Hooper, P. J., Mabey, D. C., Solomon, A. W., and Brooker, S. (2011) Mapping the Global Distribution of Trachoma: Why an Updated Atlas Is Needed. *Plos Neglect Trop D* **5**
32. WHO. (2012) Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections - 2008.
33. Detels, R., Green, A. M., Klausner, J. D., Katzenstein, D., Gaydos, C., Handsfield, H. H., Pequegnat, W., Mayer, K., Hartwell, T. D., and Quinn, T. C. (2011) The Incidence and Correlates of Symptomatic and Asymptomatic *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* Infections in Selected Populations in Five Countries. *Sex Transm Dis* **38**, 503-509
34. Harris, S. R., Clarke, I. N., Seth-Smith, H. M. B., Solomon, A. W., Cutcliffe, L. T., Marsh, P., Skilton, R. J., Holland, M. J., Mabey, D., Peeling, R. W., Lewis, D. A., Spratt, B. G., Unemo, M., Persson, K., Bjartling, C., Brunham, R., de Vries, H. J. C., Morre, S. A., Speksnijder, A., Bebear, C. M., Clerc, M., de Barbeyrac, B., Parkhill, J., and Thomson, N. R. (2012) Whole-genome analysis of diverse *Chlamydia trachomatis* strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing. *Nat Genet* **44**, 413-U221
35. Lysen, M., Osterlund, A., Rubin, C. J., Persson, T., Persson, I., and Herrmann, B. (2004) Characterization of *ompA* genotypes by sequence analysis of DNA from all detected cases of *Chlamydia trachomatis* infections during 1 year of contact tracing in a Swedish county. *J Clin Microbiol* **42**, 1641-1647
36. Morre, S. A., Rozendaal, L., van Valkengoed, I. G. M., Boeke, A. J. P., Vader, P. C. V., Schirm, J., de Blok, S., van den Hoek, J. A. R., van Doornum, G. J. J., Meijer, C. J. L. M., and van den Brule, A. J. C. (2000) Urogenital *Chlamydia trachomatis* serovars in men and women with a symptomatic or asymptomatic infection: an association with clinical manifestations? *J Clin Microbiol* **38**, 2292-2296
37. Yang, B., Zheng, H. P., Feng, Z. Q., Xue, Y. H., Wu, X. Z., Huang, J. M., Xue, X. J., and Jiang, H. N. (2010) The Prevalence and Distribution of *Chlamydia trachomatis* Genotypes among Sexually Transmitted Disease Clinic Patients in Guangzhou, China, 2005-2008. *Jpn J Infect Dis* **63**, 342-345
38. Hahn, D. L. (1999) *Chlamydia pneumoniae*, asthma, and COPD: what is the evidence? *Ann Allerg Asthma Im* **83**, 271-+

39. Senn, L., Jatón, K., Fitting, J. W., and Greub, G. (2011) Does Respiratory Infection Due to *Chlamydia pneumoniae* Still Exist? *Clin Infect Dis* **53**, 847-848
40. Grayston, J. T., Campbell, L. A., Kuo, C. C., Mordhorst, C. H., Saikku, P., Thom, D. H., and Wang, S. P. (1990) A New Respiratory-Tract Pathogen - *Chlamydia-Pneumoniae* Strain Twar. *J Infect Dis* **161**, 618-625
41. Hammerschlag, M. R. (2000) *Chlamydia pneumoniae* and the lung. *Eur Respir J* **16**, 1001-1007
42. Kuo, C. C., Jackson, L. A., Campbell, L. A., and Grayston, J. T. (1995) *Chlamydia-Pneumoniae* (Twar). *Clin Microbiol Rev* **8**, 451-&
43. Hahn, D. L., Azenabor, A. A., Beatty, W. L., and Byrne, G. I. (2002) *Chlamydia pneumoniae* as a respiratory pathogen. *Front Biosci* **7**, E66-E76
44. Grayston, J. T. (1992) Infections Caused by *Chlamydia-Pneumoniae* Strain Twar. *Clin Infect Dis* **15**, 757-763
45. Sriram, S., Stratton, C. W., Yao, S. Y., Tharp, A., Ding, L. M., Bannan, J. D., and Mitchell, W. M. (1999) *Chlamydia pneumoniae* infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Ann Neurol* **46**, 6-14
46. Gerard, H. C., Dreses-Werringloer, U., Wildt, K. S., Deka, S., Oszust, C., Balin, B. J., Frey, W. H., Bordayo, E. Z., Whittum-Hudson, J. A., and Hudson, A. P. (2006) *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's brain. *Fems Immunol Med Mic* **48**, 355-366
47. Balin, B. J., and Appelt, D. M. (2001) Role of infection in Alzheimer's disease. *J Am Osteopath Assoc* **101**, S1-6
48. Roulis, E., Polkinghorne, A., and Timms, P. (2013) *Chlamydia pneumoniae*: modern insights into an ancient pathogen. *Trends in microbiology* **21**, 120-128
49. Vandahl, B. B. S., Birkelund, S., and Christiansen, G. (2004) Genome and proteome analysis of *Chlamydia*. *Proteomics* **4**, 2831-2842
50. Weinmaier, T., Hoser, J., Eck, S., Kaufhold, I., Shima, K., Strom, T. M., Rattei, T., and Rupp, J. (2015) Genomic factors related to tissue tropism in *Chlamydia pneumoniae* infection. *Bmc Genomics* **16**
51. Kalman, S., Mitchell, W., Marathe, R., Lammel, C., Fan, L., Hyman, R. W., Olinger, L., Grimwood, L., Davis, R. W., and Stephens, R. S. (1999) Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C-trachomatis*. *Nat Genet* **21**, 385-389
52. Read, T. D., Brunham, R. C., Shen, C., Gill, S. R., Heidelberg, J. F., White, O., Hickey, E. K., Peterson, J., Utterback, T., Berry, K., Bass, S., Linher, K., Weidman, J., Khouri, H., Craven, B., Bowman, C., Dodson, R., Gwinn, M., Nelson, W., DeBoy, R., Kolonay, J., McClarty, G., Salzberg, S. L., Eisen, J., and Fraser, C. M. (2000) Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39. *Nucleic Acids Res* **28**, 1397-1406
53. Shirai, M., Hirakawa, H., Kimoto, M., Tabuchi, M., Kishi, F., Ouchi, K., Shiba, T., Ishii, K., Hattori, M., Kuhara, S., and Nakazawa, T. (2000) Comparison of whole genome sequences of *Chlamydia pneumoniae* J138 from Japan and CWL029 from USA. *Nucleic Acids Res* **28**, 2311-2314
54. Chi, E. Y., Kuo, C. C., and Grayston, J. T. (1987) Unique ultrastructure in the elementary body of *Chlamydia* sp. strain TWAR. *Journal of bacteriology* **169**, 3757-3763
55. Higashi, N. (1965) Electron Microscopic Studies on the Mode of Reproduction of Trachoma Virus and Psittacosis Virus in Cell Cultures. *Exp Mol Pathol* **76**, 24-39
56. Popov, V. L., Shatkin, A. A., Pankratova, V. N., Smirnova, N. S., von Bonsdorff, C. H., Ekman, M. R., Morttinen, A., and Saikku, P. (1991) Ultrastructure of *Chlamydia pneumoniae* in cell culture. *FEMS microbiology letters* **68**, 129-134
57. Stephens, R. S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchell, W., Olinger, L., Tatusov, R. L., Zhao, Q. X., Koonin, E. V., and Davis, R. W. (1998) Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* **282**, 754-759
58. Beeckman, D. S., De Puyseleer, L., De Puyseleer, K., and Vanrompay, D. (2014) *Chlamydial* biology and its associated virulence blockers. *Crit Rev Microbiol* **40**, 313-328

59. Wolf, K., Fischer, E., and Hackstadt, T. (2000) Ultrastructural analysis of developmental events in *Chlamydia pneumoniae*-infected cells. *Infection and immunity* **68**, 2379-2385
60. Dautry-Varsat, A., Subtil, A., and Hackstadt, T. (2005) Recent insights into the mechanisms of *Chlamydia* entry. *Cellular microbiology* **7**, 1714-1722
61. Stephens, R. S., Fawaz, F. S., Kennedy, K. A., Koshiyama, K., Nichols, B., van Ooij, C., and Engel, J. N. (2000) Eukaryotic cell uptake of heparin-coated microspheres: a model of host cell invasion by *Chlamydia trachomatis*. *Infection and immunity* **68**, 1080-1085
62. Beswick, E. J., Travelstead, A., and Cooper, M. D. (2003) Comparative studies of glycosaminoglycan involvement in *Chlamydia pneumoniae* and *C-trachomatis* invasion of host cells. *J Infect Dis* **187**, 1291-1300
63. Davis, C. H., and Wyrick, P. B. (1997) Differences in the association of *Chlamydia trachomatis* serovar E and serovar L2 with epithelial cells in vitro may reflect biological differences in vivo. *Infection and immunity* **65**, 2914-2924
64. Wuppermann, F. N., Hegemann, J. H., and Jantos, C. A. (2001) Heparan sulfate-like glycosaminoglycan is a cellular receptor for *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis* **184**, 181-187
65. Moelleken, K., and Hegemann, J. H. (2008) The *Chlamydia* outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding. *Molecular microbiology* **67**, 403-419
66. Taraktchoglou, M., Pacey, A. A., Turnbull, J. E., and Eley, A. (2001) Infectivity of *Chlamydia trachomatis* serovar LGV but not E is dependent on host cell heparan sulfate. *Infection and immunity* **69**, 968-976
67. Chen, J. C. R., Zhang, J. P., and Stephens, R. S. (1996) Structural requirements of heparin binding to *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 11134-11140
68. Fadel, S., and Eley, A. (2007) *Chlamydia trachomatis* OmcB protein is a surface-exposed glycosaminoglycan-dependent adhesin. *Journal of medical microbiology* **56**, 15-22
69. Fadel, S., and Eley, A. (2008) Differential glycosaminoglycan binding of *Chlamydia trachomatis* OmcB protein from serovars E and LGV. *Journal of medical microbiology* **57**, 1058-1061
70. Stephens, R. S., Koshiyama, K., Lewis, E., and Kubo, A. (2001) Heparin-binding outer membrane protein of chlamydiae. *Molecular microbiology* **40**, 691-699
71. Carabeo, R. A., and Hackstadt, T. (2001) Isolation and characterization of a mutant Chinese hamster ovary cell line that is resistant to *Chlamydia trachomatis* infection at a novel step in the attachment process. *Infection and immunity* **69**, 5899-5904
72. Becker, E., and Hegemann, J. H. (2014) All subtypes of the Pmp adhesin family are implicated in chlamydial virulence and show species-specific function. *MicrobiologyOpen* **3**, 544-556
73. Molleken, K., Schmidt, E., and Hegemann, J. H. (2010) Members of the Pmp protein family of *Chlamydia pneumoniae* mediate adhesion to human cells via short repetitive peptide motifs. *Molecular microbiology* **78**, 1004-1017
74. Becker, E. (2013) *Charakterisierung der chlamydialen Pmp Adhäsine Familie* Doktorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
75. Molleken, K., Becker, E., and Hegemann, J. H. (2013) The *Chlamydia pneumoniae* Invasin Protein Pmp21 Recruits the EGF Receptor for Host Cell Entry. *PLoS pathogens* **9**
76. Kuo, C. C., Takahashi, N., Swanson, A. F., Ozeki, Y., and Hakomori, S. I. (1996) An N-linked high-mannose type oligosaccharide, expressed at the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*, mediates attachment and infectivity of the microorganism to HeLa cells. *J Clin Invest* **98**, 2813-2818
77. Soriani, M., Petit, P., Grifantini, R., Petracca, R., Gancitano, G., Frigimelica, E., Nardelli, F., Garcia, C., Spinelli, S., Scarabelli, G., Fiorucci, S., Affentranger, R., Ferrer-Navarro, M., Zacharias, M., Colombo, G., Vuillard, L., Daura, X., and Grandi, G. (2010) Exploiting Antigenic Diversity for Vaccine Design THE CHLAMYDIA ArtJ PARADIGM. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 30126-30138

78. Su, H., Raymond, L., Rockey, D. D., Fischer, E., Hackstadt, T., and Caldwell, H. D. (1996) A recombinant Chlamydia trachomatis major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 11143-11148
79. Wuppermann, F. N., Moelleken, K., Julien, M., Jantos, C. A., and Hegemann, J. H. (2008) Chlamydia pneumoniae GroEL1 protein is cell surface associated and required for infection of HEp-2 cells. *Journal of bacteriology* **190**, 3757-3767
80. Abromaitis, S., and Stephens, R. S. (2009) Attachment and Entry of Chlamydia Have Distinct Requirements for Host Protein Disulfide Isomerase. *PLoS pathogens* **5**
81. Kuo, C. C., Puolakkainen, M., Lin, T. M., Witte, M., and Campbell, L. A. (2002) Mannose-receptor positive and negative mouse macrophages differ in their susceptibility to infection by Chlamydia species. *Microb Pathogenesis* **32**, 43-48
82. Puolakkainen, M., Kuo, C. C., and Campbell, L. A. (2005) Chlamydia pneumoniae uses the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor for infection of endothelial cells. *Infection and immunity* **73**, 4620-4625
83. Gabel, B. R., Elwell, C., van Ijzendoorn, S. C. D., and Engel, J. N. (2004) Lipid raft-mediated entry is not required for Chlamydia trachomatis infection of cultured epithelial cells. *Infection and immunity* **72**, 7367-7373
84. Hodinka, R. L., Davis, C. H., Choong, J., and Wyrick, P. B. (1988) Ultrastructural-Study of Endocytosis of Chlamydia-Trachomatis by McCoy Cells. *Infection and immunity* **56**, 1456-1463
85. Hybiske, K., and Stephens, R. S. (2007) Mechanisms of Chlamydia trachomatis entry into nonphagocytic cells. *Infection and immunity* **75**, 3925-3934
86. Stuart, E. S., Webley, W. C., and Norkin, L. C. (2003) Lipid rafts, caveolae, caveolin-1, and entry by Chlamydiae into host cells. *Exp Cell Res* **287**, 67-78
87. Ward, M. E., and Murray, A. (1984) Control Mechanisms Governing the Infectivity of Chlamydia-Trachomatis for HeLa-Cells - Mechanisms of Endocytosis. *J Gen Microbiol* **130**, 1765-1780
88. Carabeo, R. A., Grieshaber, S. S., Fischer, E., and Hackstadt, T. (2002) Chlamydia trachomatis induces remodeling of the actin cytoskeleton during attachment and entry into HeLa cells. *Infection and immunity* **70**, 3793-3803
89. Coombes, B. K., and Mahony, J. B. (2002) Identification of MEK- and phosphoinositide 3-kinase-dependent signalling as essential events during Chlamydia pneumoniae invasion of HEp2 cells. *Cellular microbiology* **4**, 447-460
90. Clifton, D. R., Fields, K. A., Grieshaber, S. S., Dooley, C. A., Fischer, E. R., Mead, D. J., Carabeo, R. A., and Hackstadt, T. (2004) A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 10166-10171
91. Wang, J., Chen, L. L., Chen, F., Zhang, X. Y., Zhang, Y. Q., Baseman, J., Perdue, S., Yeh, I. T., Shain, R., Holland, M., Bailey, R., Mabey, D., Yu, P., and Zhong, G. M. (2009) A chlamydial type III-secreted effector protein (Tarp) is predominantly recognized by antibodies from humans infected with Chlamydia trachomatis and induces protective immunity against upper genital tract pathologies in mice. *Vaccine* **27**, 2967-2980
92. Carabeo, R. A., Dooley, C. A., Grieshaber, S. S., and Hackstadt, T. (2007) Rac interacts with Abi-1 and WAVE2 to promote an Arp2/3-dependent actin recruitment during chlamydial invasion. *Cellular microbiology* **9**, 2278-2288
93. Lane, B. J., Mutchler, C., Al Khodor, S., Grieshaber, S. S., and Carabeo, R. A. (2008) Chlamydial entry involves TARP binding of guanine nucleotide exchange factors. *PLoS pathogens* **4**
94. Kumar, Y., and Valdivia, R. H. (2008) Actin and intermediate filaments stabilize the Chlamydia trachomatis vacuole by forming dynamic structural scaffolds. *Cell host & microbe* **4**, 159-169
95. Peters, J., Wilson, D. P., Myers, G., Timms, P., and Bavoiil, P. M. (2007) Type III secretion a la Chlamydia. *Trends in microbiology* **15**, 241-251

96. Hackstadt, T., Todd, W. J., and Caldwell, H. D. (1985) Disulfide-Mediated Interactions of the Chlamydial Major Outer-Membrane Protein - Role in the Differentiation of Chlamydiae. *Journal of bacteriology* **161**, 25-31
97. Newhall, W. J., and Jones, R. B. (1983) Disulfide-Linked Oligomers of the Major Outer-Membrane Protein of Chlamydiae. *Journal of bacteriology* **154**, 998-1001
98. Grieshaber, N. A., Fischer, E. R., Mead, D. J., Dooley, C. A., and Hackstadt, T. (2004) Chlamydial histone-DNA interactions are disrupted by a metabolite in the methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 7451-7456
99. AbdelRahman, Y. M., and Belland, R. J. (2005) The chlamydial developmental cycle. *Fems Microbiol Rev* **29**, 949-959
100. Clausen, J. D., Christiansen, G., Holst, H. U., and Birkelund, S. (1997) Chlamydia trachomatis utilizes the host cell microtubule network during early events of infection. *Molecular microbiology* **25**, 441-449
101. Grieshaber, S. S., Grieshaber, N. A., and Hackstadt, T. (2003) Chlamydia trachomatis uses host cell dynein to traffic to the microtubule-organizing center in a p50 dynamitin-independent process. *J Cell Sci* **116**, 3793-3802
102. Saka, H. A., and Valdivia, R. H. (2010) Acquisition of nutrients by Chlamydiae: unique challenges of living in an intracellular compartment. *Curr Opin Microbiol* **13**, 4-10
103. Heuer, D., Lipinski, A. R., Machuy, N., Karlas, A., Wehrens, A., Siedler, F., Brinkmann, V., and Meyer, T. F. (2009) Chlamydia causes fragmentation of the Golgi compartment to ensure reproduction. *Nature* **457**, 731-U738
104. Carabeo, R. A., Mead, D. J., and Hackstadt, T. (2003) Golgi-dependent transport of cholesterol to the Chlamydia trachomatis inclusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 6771-6776
105. Hackstadt, T., Rockey, D. D., Heinzen, R. A., and Scidmore, M. A. (1996) Chlamydia trachomatis interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane. *Embo J* **15**, 964-977
106. Robertson, D. K., Gu, L., Rowe, R. K., and Beatty, W. L. (2009) Inclusion Biogenesis and Reactivation of Persistent Chlamydia trachomatis Requires Host Cell Sphingolipid Biosynthesis. *PLoS pathogens* **5**
107. Cocchiario, J. L., Kumar, Y., Fischer, E. R., Hackstadt, T., and Valdivia, R. H. (2008) Cytoplasmic lipid droplets are translocated into the lumen of the Chlamydia trachomatis parasitophorous vacuole. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 9379-9384
108. Beatty, W. L. (2006) Trafficking from CD63-positive late endocytic multivesicular bodies is essential for intracellular development of Chlamydia trachomatis. *J Cell Sci* **119**, 350-359
109. Bastidas, R. J., Elwell, C. A., Engel, J. N., and Valdivia, R. H. (2013) Chlamydial Intracellular Survival Strategies. *Csh Perspect Med* **3**
110. Lad, S. P., Li, J. L., Correia, J. D., Pan, Q. L., Gadwal, S., Ulevitch, R. J., and Li, E. G. (2007) Cleavage of p65/RelA of the NF-kappa B pathway by Chlamydia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 2933-2938
111. Hogan, R. J., Mathews, S. A., Mukhopadhyay, S., Summersgill, J. T., and Timms, P. (2004) Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infection and immunity* **72**, 1843-1855
112. Wyrick, P. B. (2000) Intracellular survival by Chlamydia. *Cellular microbiology* **2**, 275-282
113. Miyairi, I., Mahdi, O. S., Ouellette, S. P., Belland, R. J., and Byrne, G. I. (2006) Different growth rates of Chlamydia trachomatis biovars reflect pathotype. *J Infect Dis* **194**, 350-357
114. Everett, K. D. E., and Hatch, T. P. (1995) Architecture of the Cell-Envelope of Chlamydia-Psittaci 6bc. *Journal of bacteriology* **177**, 877-882

115. Barbour, A. G., Amano, K. I., Hackstadt, T., Perry, L., and Caldwell, H. D. (1982) Chlamydia-Trachomatis Has Penicillin-Binding Proteins but Not Detectable Muramic Acid. *Journal of bacteriology* **151**, 420-428
116. Fox, A., Rogers, J. C., Gilbert, J., Morgan, S., Davis, C. H., Knight, S., and Wyrick, P. B. (1990) Muramic Acid Is Not Detectable in Chlamydia-Psittaci or Chlamydia-Trachomatis by Gas-Chromatography Mass-Spectrometry. *Infection and immunity* **58**, 835-837
117. Belland, R. J., Zhong, G. M., Crane, D. D., Hogan, D., Sturdevant, D., Sharma, J., Beatty, W. L., and Caldwell, H. D. (2003) Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of Chlamydia trachomatis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 8478-8483
118. McCoy, A. J., and Maurelli, A. T. (2006) Building the invisible wall: updating the chlamydial peptidoglycan anomaly. *Trends in microbiology* **14**, 70-77
119. Pilhofer, M., Aistleitner, K., Biboy, J., Gray, J., Kuru, E., Hall, E., Brun, Y. V., VanNieuwenhze, M. S., Vollmer, W., Horn, M., and Jensen, G. J. (2013) Discovery of chlamydial peptidoglycan reveals bacteria with murein sacculi but without FtsZ. *Nat Commun* **4**
120. Storz, J. P., L.A. (1971) Taxonomy of the Chlamydiae: Reasons for Classifying Organisms of the Genus Chlamydia. *Int J Syst Bacteriol* **21**, 332-334
121. Hatch, T. P. (1996) Disulfide cross-linked envelope proteins: The functional equivalent of peptidoglycan in chlamydiae? *Journal of bacteriology* **178**, 1-5
122. Bavoil, P., Ohlin, A., and Schachter, J. (1984) Role of Disulfide Bonding in Outer-Membrane Structure and Permeability in Chlamydia-Trachomatis. *Infection and immunity* **44**, 479-485
123. Hatch, T. P., Vance, D. W., and Alhossainy, E. (1981) Identification of a Major Envelope Protein in Chlamydia Spp. *Journal of bacteriology* **146**, 426-429
124. Everett, K. D. E., and Hatch, T. P. (1991) Sequence-Analysis and Lipid Modification of the Cysteine-Rich Envelope Proteins of Chlamydia-Psittaci-6bc. *Journal of bacteriology* **173**, 3821-3830
125. Kubo, A., and Stephens, R. S. (2000) Characterization and functional analysis of PorB, a Chlamydia porin and neutralizing target. *Molecular microbiology* **38**, 772-780
126. Crane, D. D., Carlson, J. H., Fischer, E. R., Bavoil, P., Hsia, R. C., Tan, C., Kuo, C. C., and Caldwell, H. D. (2006) Chlamydia trachomatis polymorphic membrane protein D is a species-common pan-neutralizing antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 1894-1899
127. Swanson, K. A., Taylor, L. D., Frank, S. D., Sturdevant, G. L., Fischer, E. R., Carlson, J. H., Whitmire, W. M., and Caldwell, H. D. (2009) Chlamydia trachomatis Polymorphic Membrane Protein D Is an Oligomeric Autotransporter with a Higher-Order Structure. *Infection and immunity* **77**, 508-516
128. Brade, H., Brade, L., and Nano, F. E. (1987) Chemical and Serological Investigations on the Genus-Specific Lipopolysaccharide Epitope of Chlamydia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 2508-2512
129. Heine, H., Muller-Loennies, S., Brade, L., Lindner, B., and Brade, H. (2003) Endotoxic activity and chemical structure of lipopolysaccharides from Chlamydia trachomatis serotypes E and L-2 and Chlamydia psittaci 6BC. *Eur J Biochem* **270**, 440-450
130. Osaka, I., and Hefty, P. S. (2014) Lipopolysaccharide-Binding Alkylpolyamine DS-96 Inhibits Chlamydia trachomatis Infection by Blocking Attachment and Entry. *Antimicrob Agents Ch* **58**, 3245-3254
131. Ajonuma, L. C., Fok, K. L., Ho, L. S., Chan, P. K. S., Chow, P. H., Tsang, L. L., Wong, C. H. Y., Chen, J., Li, S., Rowlands, D. K., Chung, Y. W., and Chan, H. C. (2010) CFTR is required for cellular entry and internalization of Chlamydia trachomatis. *Cell Biol Int* **34**, 593-600
132. Nelson, A. (2012) The chlamydial cell envelope. in *Intracellular Pathogens I: Chlamydiales* (Tan, M. B., P.M. ed.), Washington D.C.: ASM Press. pp 74-96

133. Caldwell, H. D., Kromhout, J., and Schachter, J. (1981) Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infection and immunity* **31**, 1161-1176
134. Salari, S. H., and Ward, M. E. (1981) Polypeptide Composition of *Chlamydia-Trachomatis*. *J Gen Microbiol* **123**, 197-207
135. Caldwell, H. D., and Perry, L. J. (1982) Neutralization of *Chlamydia-Trachomatis* Infectivity with Antibodies to the Major Outer-Membrane Protein. *Infection and immunity* **38**, 745-754
136. Stephens, R. S., Tam, M. R., Kuo, C. C., and Nowinski, R. C. (1982) Monoclonal-Antibodies to *Chlamydia-Trachomatis* - Antibody Specificities and Antigen Characterization. *Journal of Immunology* **128**, 1083-1090
137. Feher, V. A., Randall, A., Baldi, P., Bush, R. M., de la Maza, L. M., and Amaro, R. E. (2013) A 3-Dimensional Trimeric beta-Barrel Model for *Chlamydia* MOMP Contains Conserved and Novel Elements of Gram-Negative Bacterial Porins. *PLoS one* **8**
138. Su, H., Watkins, N. G., Zhang, Y. X., and Caldwell, H. D. (1990) *Chlamydia-Trachomatis* Host-Cell Interactions - Role of the Chlamydial Major Outer-Membrane Protein as an Adhesin. *Infection and immunity* **58**, 1017-1025
139. Campbell LA, K. C. (2006) Interactions of *Chlamydia* with the host cells that mediate attachment and uptake. *Chlamydia Genomics and Pathogenesis*. **Norfolk: Horizon Bioscience** 505–522
140. Puolakkainen, M., Lee, A., Nosaka, T., Fukushi, H., Kuo, C. C., and Campbell, L. A. (2008) Retinoic acid inhibits the infectivity and growth of *Chlamydia pneumoniae* in epithelial and endothelial cells through different receptors. *Microb Pathogenesis* **44**, 410-416
141. Hatch, T. P., Allan, I., and Pearce, J. H. (1984) Structural and Polypeptide Differences between Envelopes of Infective and Reproductive Life-Cycle Forms of *Chlamydia* Spp. *Journal of bacteriology* **157**, 13-20
142. Allen, J. E., Cerrone, M. C., Beatty, P. R., and Stephens, R. S. (1990) Cysteine-Rich Outer-Membrane Proteins of *Chlamydia-Trachomatis* Display Compensatory Sequence Changes between Biovariants. *Molecular microbiology* **4**, 1543-1550
143. Lambden, P. R., Everson, J. S., Ward, M. E., and Clarke, I. N. (1990) Sulfur-Rich Proteins of *Chlamydia-Trachomatis* - Developmentally Regulated Transcription of Polycistronic Messenger-Rna from Tandem Promoters. *Gene* **87**, 105-112
144. Clarke, I. N., Ward, M. E., and Lambden, P. R. (1988) Molecular-Cloning and Sequence-Analysis of a Developmentally Regulated Cysteine-Rich Outer-Membrane Protein from *Chlamydia-Trachomatis*. *Gene* **71**, 307-314
145. Watson, M. W., Lambden, P. R., Ward, M. E., and Clarke, I. N. (1989) *Chlamydia-Trachomatis* 60 Kda Cysteine Rich Outer-Membrane Protein - Sequence Homology between Trachoma and Lgv Biovars. *FEMS microbiology letters* **65**, 293-298
146. Hsia, R. C., and Bavoil, P. M. (1996) Sequence analysis of the omp2 region of *Chlamydia psittaci* strain GPIC: Structural and functional implications. *Gene* **176**, 155-162
147. Mygind, T., Birkelund, S., and Christiansen, G. (1998) DNA sequencing reveals limited heterogeneity in the 16S rRNA gene from the rrnB operon among five *Mycoplasma hominis* isolates. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 1067-1071
148. Zhang, J. P., and Stephens, R. S. (1992) Mechanism of C-*Trachomatis* Attachment to Eukaryotic Host-Cells. *Cell* **69**, 861-869
149. Ting, L. M., Hsia, R. C., Haidaris, C. G., and Bavoil, P. M. (1995) Interaction of Outer Envelope Proteins of *Chlamydia-Psittaci* Gpic with the Hela-Cell Surface. *Infection and immunity* **63**, 3600-3608
150. Chen, J. C. R., and Stephens, R. S. (1997) *Chlamydia trachomatis* glycosaminoglycan-dependent and independent attachment to eukaryotic cells. *Microb Pathogenesis* **22**, 23-30
151. Grimwood, J., Olinger, L., and Stephens, R. S. (2001) Expression of *Chlamydia pneumoniae* polymorphic membrane protein family genes. *Infection and immunity* **69**, 2383-2389

152. Grimwood, J., and Stephens, R. S. (1999) Computational analysis of the polymorphic membrane protein superfamily of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*. *Microb Comp Genomics* **4**, 187-201
153. Henderson, I. R., and Lam, A. C. (2001) Polymorphic proteins of *Chlamydia* spp. - autotransporters beyond the Proteobacteria. *Trends in microbiology* **9**, 573-578
154. Carrasco, J. A., Tan, C., Rank, R. G., Hsia, R. C., and Bavoil, P. M. (2011) Altered developmental expression of polymorphic membrane proteins in penicillin-stressed *Chlamydia trachomatis*. *Cellular microbiology* **13**, 1014-1025
155. Nunes, A., Gomes, J. P., Mead, S., Florindo, C., Correia, H., Borrego, M. J., and Dean, D. (2007) Comparative Expression Profiling of the *Chlamydia trachomatis* pmp Gene Family for Clinical and Reference Strains. *PloS one* **2**
156. Tan, C., Hsia, R. C., Shou, H. Z., Carrasco, J. A., Rank, R. G., and Bavoil, P. M. (2010) Variable expression of surface-exposed polymorphic membrane proteins in in vitro-grown *Chlamydia trachomatis*. *Cellular microbiology* **12**, 174-187
157. Vandahl, B. B., Pedersen, A. S., Gevaert, K., Holm, A., Vandekerckhove, J., Christiansen, G., and Birkelund, S. (2002) The expression, processing and localization of polymorphic membrane proteins in *Chlamydia pneumoniae* strain CWL029. *BMC microbiology* **2**
158. Read, T. D., Myers, G. S. A., Brunham, R. C., Nelson, W. C., Paulsen, I. T., Heidelberg, J., Holtzapple, E., Khouri, H., Federova, N. B., Carty, H. A., Umayam, L. A., Haft, D. H., Peterson, J., Beanan, M. J., White, O., Salzberg, S. L., Hsia, R. C., McClarty, G., Rank, R. G., Bavoil, P. M., and Fraser, C. M. (2003) Genome sequence of *Chlamydophila caviae* (*Chlamydia psittaci* GPIC): examining the role of niche-specific genes in the evolution of the Chlamydiaceae. *Nucleic Acids Res* **31**, 2134-2147
159. Mygind, P. H., Christiansen, G., Roepstorff, P., and Birkelund, S. (2000) Membrane proteins PmpG and PmpH are major constituents of *Chlamydia trachomatis* L2 outer membrane complex. *FEMS microbiology letters* **186**, 163-169
160. Shaw, A. C., Gevaert, K., Demol, H., Hoorelbeke, B., Vandekerckhove, J., Larsen, M. R., Roepstorff, P., Holm, A., Christiansen, G., and Birkelund, S. (2002) Comparative proteome analysis of *Chlamydia trachomatis* serovar A, D and L2. *Proteomics* **2**, 164-186
161. Skipp, P., Robinson, J., O'Connor, C. D., and Clarke, I. N. (2005) Shotgun proteomic analysis of *Chlamydia trachomatis*. *Proteomics* **5**, 1558-1573
162. Tanzer, R. J., and Hatch, T. P. (2001) Characterization of outer membrane proteins in *Chlamydia trachomatis* LGV serovar L2. *Journal of bacteriology* **183**, 2686-2690
163. Montigiani, S., Falugi, F., Scarselli, M., Finco, O., Petracca, R., Galli, G., Mariani, M., Manetti, R., Agnusdei, M., Cevenini, R., Donati, M., Nogarotto, R., Norais, N., Garaguso, I., Nuti, S., Saletti, G., Rosa, D., Ratti, G., and Grandi, G. (2002) Genomic approach for analysis of surface proteins in *Chlamydia pneumoniae*. *Infection and immunity* **70**, 368-379
164. Bunk, S., Susnea, I., Rupp, J., Summersgill, J. T., Maass, M., Stegmann, W., Schratzenholz, A., Wendel, A., Przybylski, M., and Hermann, C. (2008) Immunoproteomic identification and serological responses to novel *Chlamydia pneumoniae* antigens that are associated with persistent *C. pneumoniae* infections. *Journal of Immunology* **180**, 5490-5498
165. Tan, C., Hsia, R. C., Shou, H. Z., Haggerty, C. L., Ness, R. B., Gaydos, C. A., Dean, D., Scurlock, A. M., Wilson, D. P., and Bavoil, P. M. (2009) *Chlamydia trachomatis*-Infected Patients Display Variable Antibody Profiles against the Nine-Member Polymorphic Membrane Protein Family. *Infection and immunity* **77**, 3218-3226
166. Niessner, A., Kaun, C., Zorn, G., Speidl, W., Turel, Z., Christiansen, G., Pedersen, A. S., Birkelund, S., Simon, S., Georgopoulos, A., Graninger, W., de Martin, R., Lipp, J., Binder, B. R., Maurer, G., Huber, K., and Wojta, J. (2003) Polymorphic membrane protein (PMP) 20 and PMP 21 of *Chlamydia pneumoniae* induce proinflammatory mediators in human endothelial cells in vitro by activation of the nuclear Factor-kappa B pathway. *J Infect Dis* **188**, 108-113

167. Wehrl, W., Brinkmann, V., Jungblut, P. R., Meyer, T. F., and Szczepek, A. J. (2004) From the inside out - processing of the Chlamydial autotransporter PmpD and its role in bacterial adhesion and activation of human host cells. *Molecular microbiology* **51**, 319-334
168. Cevenini, R., Donati, M., Brocchi, E., De Simone, F., and La Placa, M. (1991) Partial characterization of an 89-kDa highly immunoreactive protein from Chlamydia psittaci A/22 causing ovine abortion. *FEMS microbiology letters* **65**, 111-115
169. Kari, L., Southern, T. R., Downey, C. J., Watkins, H. S., Randall, L. B., Taylor, L. D., Sturdevant, G. L., Whitmire, W. M., and Caldwell, H. D. (2014) Chlamydia trachomatis Polymorphic Membrane Protein D Is a Virulence Factor Involved in Early Host-Cell Interactions. *Infection and immunity* **82**, 2756-2762
170. Borges, V., Nunes, A., Ferreira, R., Borrego, M. J., and Gomes, J. P. (2012) Directional Evolution of Chlamydia trachomatis towards Niche-Specific Adaptation. *Journal of bacteriology* **194**, 6143-6153
171. Carlson, J. H., Porcella, S. F., McClarty, G., and Caldwell, H. D. (2005) Comparative genomic analysis of Chlamydia trachomatis oculotropic and genitotropic strains. *Infection and immunity* **73**, 6407-6418
172. Gomes, J. P., Nunes, A., Bruno, W. J., Borrego, M. J., Florindo, C., and Dean, D. (2006) Polymorphisms in the nine polymorphic membrane proteins of Chlamydia trachomatis across all serovars: Evidence for serovar Da recombination and correlation with tissue tropism. *Journal of bacteriology* **188**, 275-286
173. Stothard, D. R., Toth, G. A., and Batteiger, B. E. (2003) Polymorphic membrane protein H has evolved in parallel with the three disease-causing groups of Chlamydia trachomatis. *Infection and immunity* **71**, 1200-1208
174. Yen, M. R., Peabody, C. R., Partovi, S. M., Zhai, Y. F., Tseng, Y. H., and Saier, M. H. (2002) Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria. *Bba-Biomembranes* **1562**, 6-31
175. Dautin, N., and Bernstein, H. D. (2007) Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu Rev Microbiol* **61**, 89-112
176. Wells, T. J., Tree, J. J., Ulett, G. C., and Schembri, M. A. (2007) Autotransporter proteins: novel targets at the bacterial cell surface. *FEMS microbiology letters* **274**, 163-172
177. Tian, W. D., and Skolnick, J. (2003) How well is enzyme function conserved as a function of pairwise sequence identity? *Journal of molecular biology* **333**, 863-882
178. Henderson, I. R., and Nataro, J. P. (2001) Virulence functions of autotransporter proteins. *Infection and immunity* **69**, 1231-1243
179. Schmidt, E. (2009) *Charakterisierung des C. pneumoniae Adhäsins und Invasins Pmp21*Doktorarbeit, Heinrich-Heine-Universität
180. Li, H., and Walker, D. H. (1998) rOmpA is a critical protein for the adhesion of Rickettsia rickettsii to host cells. *Microb Pathogenesis* **24**, 289-298
181. Riley, S. P., Goh, K. C., Hermanas, T. M., Cardwell, M. M., Chan, Y. G. Y., and Martinez, J. J. (2010) The Rickettsia conorii Autotransporter Protein Sca1 Promotes Adherence to Nonphagocytic Mammalian Cells. *Infection and immunity* **78**, 1895-1904
182. Perez-Vilar, J., and Hill, R. L. (1999) The structure and assembly of secreted mucins. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 31751-31754
183. Sheehan, J. K., Kirkham, S., Howard, M., Woodman, P., Kutay, S., Brazeau, C., Buckley, J., and Thornton, D. J. (2004) Identification of molecular intermediates in the assembly pathway of the MUC5AC mucin. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 15698-15705
184. Roux, A., Beloin, C., and Ghigo, J. M. (2005) Combined inactivation and expression strategy to study gene function under physiological conditions: Application to identification of new Escherichia coli adhesins. *Journal of bacteriology* **187**, 1001-1013
185. Wells, T. J., Totsika, M., and Schembri, M. A. (2010) Autotransporters of Escherichia coli: a sequence-based characterization. *Microbiol-Sgm* **156**, 2459-2469

186. van den Berg, B. M., Beekhuizen, H., Willems, R. J. L., Mooi, F. R., and van Furth, R. (1999) Role of Bordetella pertussis virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tract. *Infection and immunity* **67**, 1056-1062
187. Tardif, S., Wilson, M. D., Wagner, R., Hunt, P., Gertsenstein, M., Nagy, A., Lobe, C., Koop, B. F., and Hardy, D. M. (2010) Zonadhesin Is Essential for Species Specificity of Sperm Adhesion to the Egg Zona Pellucida. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 24863-24870
188. Kiselev, A. O., Stamm, W. E., Yates, J. R., and Lampe, M. F. (2007) Expression, Processing, and Localization of PmpD of Chlamydia trachomatis Serovar L2 during the Chlamydial Developmental Cycle. *PLoS one* **2**
189. Saka, H. A., Thompson, J. W., Chen, Y. S., Kumar, Y., Dubois, L. G., Moseley, M. A., and Valdivia, R. H. (2011) Quantitative proteomics reveals metabolic and pathogenic properties of Chlamydia trachomatis developmental forms. *Molecular microbiology* **82**, 1185-1203
190. Wheelhouse, N. M., Sait, M., Aitchison, K., Livingstone, M., Wright, F., McLean, K., Inglis, N. F., Smith, D. G. E., and Longbottom, D. (2012) Processing of Chlamydia abortus Polymorphic Membrane Protein 18D during the Chlamydial Developmental Cycle. *PLoS one* **7**
191. Wehrl, W. (2004) Funktionelle Proteomanalyse von Chlamydophila pneumoniae. *Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)*
192. Bradley, P., Cowen, L., Menke, M., King, J., and Berger, B. (2001) BETAWRAP: Successful prediction of parallel beta-helices from primary sequence reveals an association with many microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 14819-14824
193. Cowen, L., Bradley, P., Menke, M., King, J., and Berger, B. (2002) Predicting the beta-helix fold from protein sequence data. *J Comput Biol* **9**, 261-276
194. Hegemann, J. H. M., K. (2012) Chlamydial adhesin and adhesins. in *Intracellular Pathogens I: Chlamydiales* (Tan M, B. P. ed.), Washington D.C.: ASM Press. pp 97-125.
195. Andreeva, A., Howorth, D., Brenner, S. E., Hubbard, T. J. P., Chothia, C., and Murzin, A. G. (2004) SCOP database in 2004: refinements integrate structure and sequence family data. *Nucleic Acids Res* **32**, D226-D229
196. Junker, M., Schuster, C. C., McDonnell, A. V., Sorg, K. A., Finn, M. C., Berger, B., and Clark, P. L. (2006) Pertactin beta-helix folding mechanism suggests common themes for the secretion and folding of autotransporter proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 4918-4923
197. Yoder, M. D., Lietzke, S. E., and Jurnak, F. (1993) Unusual Structural Features in the Parallel Beta-Helix in Pectate Lyases. *Structure* **1**, 241-251
198. Jenkins, J., and Pickersgill, R. (2001) The architecture of parallel beta-helices and related folds. *Prog Biophys Mol Bio* **77**, 111-175
199. Bryan, A. W., Starner-Kreinbrink, J. L., Hosur, R., Clark, P. L., and Berger, B. (2011) Structure-based prediction reveals capping motifs that inhibit beta-helix aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 11099-11104
200. Clantin, B., Hodak, H., Willery, E., Loch, C., Jacob-Dubuisson, F., and Villeret, V. (2004) The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 6194-6199
201. Emsley, P., Charles, I. G., Fairweather, N. F., and Isaacs, N. W. (1996) Structure of Bordetella pertussis virulence factor P.69 pertactin. *Nature* **381**, 90-92
202. Gangwer, K. A., Mushrush, D. J., Stauff, D. L., Spiller, B., McClain, M. S., Cover, T. L., and Lacy, D. B. (2007) Crystal structure of the Helicobacter pylori vacuolating toxin p55 domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 16293-16298
203. Otto, B. R., Sijbrandi, R., Luirink, J., Oudega, B., Heddle, J. G., Mizutani, K., Park, S. Y., and Tame, J. R. H. (2005) Crystal structure of hemoglobin protease, a heme binding

- autotransporter protein from pathogenic Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 17339-17345
204. Weaver, T. M., Hocking, J. M., Bailey, L. J., Wawrzyn, G. T., Howard, D. R., Sikkink, L. A., Ramirez-Alvarado, M., and Thompson, J. R. (2009) Structural and Functional Studies of Truncated Hemolysin A from *Proteus mirabilis*. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 22297-22309
205. Yeo, H. J., Yokoyama, T., Walkiewicz, K., Kim, Y., Grass, S., and Geme, J. W. (2007) The structure of the *Haemophilus influenzae* HMW1 pro-piece reveals a structural domain essential for bacterial two-partner secretion. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 31076-31084
206. Jacob-Dubuisson, F., Fernandez, R., and Coutte, L. (2004) Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Bba-Mol Cell Res* **1694**, 235-257
207. Kajava, A. V., and Steven, A. C. (2006) beta-rolls, beta-helices, and other beta-solenoid proteins. *Adv Protein Chem* **73**, 55-+
208. Heras, B., Totsika, M., Peters, K. M., Paxman, J. J., Gee, C. L., Jarrott, R. J., Perugini, M. A., Whitten, A. E., and Schembri, M. A. (2014) The antigen 43 structure reveals a molecular Velcro-like mechanism of autotransporter-mediated bacterial clumping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 457-462
209. Alsteens, D., Martinez, N., Jamin, M., and Jacob-Dubuisson, F. (2013) Sequential Unfolding of Beta Helical Protein by Single-Molecule Atomic Force Microscopy. *PLoS one* **8**
210. King, J. (2015) Folding and Misfolding of Parallel Beta-Helix Proteins. *NIH Award #GM17980*
211. Khan, S., Mian, H. S., Sandercock, L. E., Chirgadze, N. Y., and Pai, E. F. (2011) Crystal Structure of the Passenger Domain of the Escherichia coli Autotransporter EspP. *Journal of molecular biology* **413**, 985-1000
212. Wasmer, C., Lange, A., Van Melckebeke, H., Siemer, A. B., Riek, R., and Meier, B. H. (2008) Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core. *Science* **319**, 1523-1526
213. Cover, T. L., Hanson, P. I., and Heuser, J. E. (1997) Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. *J Cell Biol* **138**, 759-769
214. Gregory, W. W., Gardner, M., Byrne, G. I., and Moulder, J. W. (1979) Arrays of Hemispheric Surface Projections on *Chlamydia-Psittaci* and *Chlamydia-Trachomatis* Observed by Scanning Electron-Microscopy. *Journal of bacteriology* **138**, 241-244
215. Matsumoto, A. (1982) Electron-Microscopic Observations of Surface Projections on *Chlamydia-Psittaci* Reticulate Bodies. *Journal of bacteriology* **150**, 358-364
216. Miyashita, N., Kanamoto, Y., and Matsumoto, A. (1993) The Morphology of *Chlamydia-Pneumoniae*. *Journal of medical microbiology* **38**, 418-425
217. Schwarz, P. (1970) *Amyloidosis: Cause and manifestations of senile deterioration.*, Charles C. Thomas Verlag, Springfield, Illinois
218. Virchow, R. (1854) Ueber eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefundenene Substanz mit der chemischen Reaction der Cellulose. in *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histology.*, Springer-Verlag, Berlin; New York. pp 135-138
219. Virchow, R. (1854) Weitere Mitteilungen über das Vorkommen der pflanzlichen Cellulose beim Menschen. in *Virchows Archiv. A, Pathology Pathological anatomy and histology*, Springer-Verlag, Berlin; New York. pp 268-271
220. Friedreich, N. K., A. (1859) Zur Amyloidfrage. in *Virchows Archiv. A, Pathology Pathological anatomy and histology*, Springer-Verlag, Berlin; New York. pp 50-65
221. Bennhold, H. (1922) Eine spezifische Amyloidfärbung mit Kongorot. *Münchener Medizinische Wochenschrift* **69**
222. Romhányi, G. (1942) Az amyloid submikroskopos szerkezetéről (About the submicroscopic structure of amyloid). in *XI. Verhandlungen der Ungarischen Pathologen in Budapest 2-3*

- Oktober 1942. Bethlen Gábor irodalmi és nyomdai Rt, Nyomása Budapest* (Bézi, I. ed.). pp 102-104 und 178
223. Cohen, A. S., and Calkins, E. (1959) Electron Microscopic Observations on a Fibrous Component in Amyloid of Diverse Origins. *Nature* **183**, 1202-1203
224. Eanes, E. D., and Glenner, G. G. (1968) X-Ray Diffraction Studies on Amyloid Filaments. *J Histochem Cytochem* **16**, 673-&
225. Jahn, T. R., Makin, O. S., Morris, K. L., Marshall, K. E., Tian, P., Sikorski, P., and Serpell, L. C. (2010) The Common Architecture of Cross-beta Amyloid. *Journal of molecular biology* **395**, 717-727
226. Van Melckebeke, H., Wasmer, C., Lange, A., AB, E., Loquet, A., Bockmann, A., and Meier, B. H. (2010) Atomic-Resolution Three-Dimensional Structure of HET-s(218-289) Amyloid Fibrils by Solid-State NMR Spectroscopy. *J Am Chem Soc* **132**, 13765-13775
227. Westermark, P., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Cohen, A. S., Frangione, B., Ikeda, S. I., Masters, C. L., Merlini, G., Saraiva, M. J., and Sipe, J. D. (2005) Amyloid: Toward terminology clarification - Report from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid-Journal of Protein Folding Disorders* **12**, 1-4
228. Fandrich, M. (2012) Oligomeric Intermediates in Amyloid Formation: Structure Determination and Mechanisms of Toxicity. *Journal of molecular biology* **421**, 427-440
229. Fernandez-Escamilla, A. M., Rousseau, F., Schymkowitz, J., and Serrano, L. (2004) Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nature biotechnology* **22**, 1302-1306
230. Maurer-Stroh, S., Debulpaep, M., Kuemmerer, N., de la Paz, M. L., Martins, I. C., Reumers, J., Morris, K. L., Copland, A., Serpell, L., Serrano, L., Schymkowitz, J. W. H., and Rousseau, F. (2010) Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices (vol 7, pg 237, 2010). *Nat Methods* **7**, 855-857
231. Pawar, A. P., DuBay, K. F., Zurdo, J., Chiti, F., Vendruscolo, M., and Dobson, C. M. (2005) Prediction of "aggregation-prone" and "aggregation-susceptible" regions in proteins associated with neurodegenerative diseases. *Journal of molecular biology* **350**, 379-392
232. Zibae, S., Jakes, R., Fraser, G., Serpell, L. C., Crowther, R. A., and Goedert, M. (2007) Sequence determinants for amyloid fibrillogenesis of human alpha-synuclein. *Journal of molecular biology* **374**, 454-464
233. Thompson, M. J., Sievers, S. A., Karanicolas, J., Ivanova, M. I., Baker, D., and Eisenberg, D. (2006) The 3D profile method for identifying fibril-forming segments of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 4074-4078
234. Sunde, M., Serpell, L. C., Bartlam, M., Fraser, P. E., Pepys, M. B., and Blake, C. C. F. (1997) Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *Journal of molecular biology* **273**, 729-739
235. Sawaya, M. R., Sambashivan, S., Nelson, R., Ivanova, M. I., Sievers, S. A., Apostol, M. I., Thompson, M. J., Balbirnie, M., Wiltzius, J. J. W., McFarlane, H. T., Madsen, A. O., Riek, C., and Eisenberg, D. (2007) Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature* **447**, 453-457
236. Makin, O. S., Atkins, E., Sikorski, P., Johansson, J., and Serpell, L. C. (2005) Molecular basis for amyloid fibril formation and stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 315-320
237. Morris, K. L., Rodger, A., Hicks, M. R., Debulpaep, M., Schymkowitz, J., Rousseau, F., and Serpell, L. C. (2013) Exploring the sequence-structure relationship for amyloid peptides. *Biochemical Journal* **450**, 275-283
238. Fitzpatrick, A. W. P., Debelouchina, G. T., Bayro, M. J., Clare, D. K., Caporini, M. A., Bajaj, V. S., Jaroniec, C. P., Wang, L. C., Ladizhansky, V., Muller, S. A., MacPhee, C. E., Waudby, C. A., Mott, H. R., De Simone, A., Knowles, T. P. J., Saibil, H. R., Vendruscolo, M., Orlova, E. V., Griffin, R. G., and Dobson, C. M. (2013) Atomic structure and hierarchical assembly of a cross-

- beta amyloid fibril. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 5468-5473
239. Lu, J. X., Qiang, W., Yau, W. M., Schwieters, C. D., Meredith, S. C., and Tycko, R. (2013) Molecular Structure of beta-Amyloid Fibrils in Alzheimer's Disease Brain Tissue. *Cell* **154**, 1257-1268
240. Jimenez, J. L., Nettleton, E. J., Bouchard, M., Robinson, C. V., Dobson, C. M., and Saibil, H. R. (2002) The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 9196-9201
241. Chiti, F., and Dobson, C. M. (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* **75**, 333-366
242. Harper, J. D., Wong, S. S., Lieber, C. M., and Lansbury, P. T. (1997) Observation of metastable A beta amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem Biol* **4**, 119-125
243. Walsh, D. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Condron, M. M., and Teplow, D. B. (1997) Amyloid beta-protein fibrillogenesis - Detection of a protofibrillar intermediate. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 22364-22372
244. Meinhardt, J., Sachse, C., Hortschansky, P., Grigorieff, N., and Fandrich, M. (2009) A beta(1-40) Fibril Polymorphism Implies Diverse Interaction Patterns in Amyloid Fibrils. *Journal of molecular biology* **386**, 869-877
245. Crowther, R. A., and Goedert, M. (2000) Abnormal tau-containing filaments in neurodegenerative diseases. *Journal of structural biology* **130**, 271-279
246. Klement, K., Wieligmann, K., Meinhardt, J., Hortschansky, P., Richter, W., and Fandrich, M. (2007) Effect of different salt ions on the propensity of aggregation and on the structure of Alzheimer's A beta(1-40) amyloid fibrils. *Journal of molecular biology* **373**, 1321-1333
247. Makarava, N., and Baskakov, I. V. (2008) The same primary structure of the prion protein yields two distinct self-propagating states. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 15988-15996
248. Pedersen, J. S., Dikov, D., Flink, J. L., Hjuler, H. A., Christiansen, G., and Otzen, D. E. (2006) The changing face of glucagon fibrillation: Structural polymorphism and conformational imprinting. *Journal of molecular biology* **355**, 501-523
249. Petkova, A. T., Leapman, R. D., Guo, Z. H., Yau, W. M., Mattson, M. P., and Tycko, R. (2005) Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Science* **307**, 262-265
250. Toyama, B. H., Kelly, M. J. S., Gross, J. D., and Weissman, J. S. (2007) The structural basis of yeast prion strain variants. *Nature* **449**, 233-U238
251. Verel, R., Tomka, I. T., Bertozzi, C., Cadalbert, R., Kammerer, R. A., Steinmetz, M. O., and Meier, B. H. (2008) Polymorphism in an amyloid-like fibril-forming model peptide. *Angew Chem Int Edit* **47**, 5842-5845
252. Westermark, G. T., Johnson, K. H., and Westermark, P. (1999) Staining methods for identification of amyloid in tissue. *Method Enzymol* **309**, 3-25
253. Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J. S., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C. M., and Stefani, M. (2002) Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* **416**, 507-511
254. Finder, V. H., and Glockshuber, R. (2007) Amyloid-beta aggregation. *Neurodegener Dis* **4**, 13-27
255. Pepys, M. B., Hawkins, P. N., Booth, D. R., Vigushin, D. M., Tennent, G. A., Soutar, A. K., Totty, N., Nguyen, O., Blake, C. C. F., Terry, C. J., Feast, T. G., Zalin, A. M., and Hsuan, J. J. (1993) Human Lysozyme Gene-Mutations Cause Hereditary Systemic Amyloidosis. *Nature* **362**, 553-557
256. Irvine, G. B., El-Agnaf, O. M., Shankar, G. M., and Walsh, D. M. (2008) Protein aggregation in the brain: The molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mol Med* **14**, 451-464

257. Relini, A., Torrassa, S., Ferrando, R., Rolandi, R., Campioni, S., Chiti, F., and Gliozzi, A. (2010) Detection of Populations of Amyloid-Like Protofibrils with Different Physical Properties. *Biophys J* **98**, 1277-1284
258. Olzscha, H., Schermann, S. M., Woerner, A. C., Pinkert, S., Hecht, M. H., Tartaglia, G. G., Vendruscolo, M., Hayer-Hartl, M., Hartl, F. U., and Vabulas, R. M. (2011) Amyloid-like Aggregates Sequester Numerous Metastable Proteins with Essential Cellular Functions. *Cell* **144**, 67-78
259. Williams, T. L., Day, I. J., and Serpell, L. C. (2010) The Effect of Alzheimer's A beta Aggregation State on the Permeation of Biomimetic Lipid Vesicles. *Langmuir* **26**, 17260-17268
260. Xue, W. F., Hellewell, A. L., Gosal, W. S., Homans, S. W., Hewitt, E. W., and Radford, S. E. (2009) Fibril Fragmentation Enhances Amyloid Cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 34272-34282
261. Egge, N., Muthusubramanian, A., and Cornwall, G. A. (2015) Amyloid Properties of the Mouse Egg Zona Pellucida. *PLoS one* **10**
262. Fowler, D. M., Koulov, A. V., Alory-Jost, C., Marks, M. S., Balch, W. E., and Kelly, J. W. (2006) Functional amyloid formation within mammalian tissue. *Plos Biol* **4**, 100-107
263. Fowler, D. M., Koulov, A. V., Balch, W. E., and Kelly, J. W. (2007) Functional amyloid - from bacteria to humans. *Trends in biochemical sciences* **32**, 217-224
264. Iconomidou, V. A., Chryssikos, G. D., Gionis, V., Galanis, A. S., Cordopatis, P., Hoenger, A., and Hamodrakas, S. J. (2006) Amyloid fibril formation propensity is inherent into the hexapeptide tandemly repeating sequence of the central domain of silkworm chorion proteins of the A-family. *Journal of structural biology* **156**, 480-488
265. Berson, J. F., Theos, A. C., Harper, D. C., Tenza, D., Raposo, G., and Marks, M. S. (2003) Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. *J Cell Biol* **161**, 521-533
266. Marks, M. S., and Seabra, M. C. (2001) The melanosome: Membrane dynamics in black and white. *Nat Rev Mol Cell Bio* **2**, 738-748
267. Maji, S. K., Perrin, M. H., Sawaya, M. R., Jessberger, S., Vadodaria, K., Rissman, R. A., Singru, P. S., Nilsson, K. P. R., Simon, R., Schubert, D., Eisenberg, D., Rivier, J., Sawchenko, P., Vale, W., and Riek, R. (2009) Functional Amyloids As Natural Storage of Peptide Hormones in Pituitary Secretory Granules. *Science* **325**, 328-332
268. Gilchrist, K. B., Garcia, M. C., Sobonya, R., Lipke, P. N., and Klotz, S. A. (2012) New Features of Invasive Candidiasis in Humans: Amyloid Formation by Fungi and Deposition of Serum Amyloid P Component by the Host. *J Infect Dis* **206**, 1473-1478
269. Chien, P., Weissman, J. S., and DePace, A. H. (2004) Emerging principles of conformation based prion inheritance. *Annu Rev Biochem* **73**, 617-656
270. Claessen, D., Rink, R., de Jong, W., Siebring, J., de Vreugd, P., Boersma, F. G. H., Dijkhuizen, L., and Wosten, H. A. B. (2003) A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Gene Dev* **17**, 1714-1726
271. Barnhart, M. M., and Chapman, M. R. (2006) Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol* **60**, 131-147
272. Romling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W. D., and Normark, S. (1998) Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *Journal of bacteriology* **180**, 722-731
273. Chapman, M. R., Robinson, L. S., Pinkner, J. S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., Normark, S., and Hultgren, S. J. (2002) Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* **295**, 851-855
274. Collinson, S. K., Parker, J. M. R., Hodges, R. S., and Kay, W. W. (1999) Structural predictions of AgfA, the insoluble fimbrial subunit of *Salmonella* thin aggregative fimbriae. *Journal of molecular biology* **290**, 741-756

275. White, A. P., Collinson, S. K., Banser, P. A., Gibson, D. L., Paetzel, M., Strynadka, N. C. J., and Kay, W. W. (2001) Structure and characterization of AgfB from *Salmonella enteritidis* thin aggregative fimbriae. *Journal of molecular biology* **311**, 735-749
276. Cherny, I., Rockah, L., Levy-Nissenbau, O., Gophna, U., Ron, E. Z., and Gazit, E. (2005) The formation of *Escherichia coli* curli amyloid fibrils is mediated by prion-like peptide repeats. *Journal of molecular biology* **352**, 245-252
277. Wang, X., Smith, D. R., Jones, J. W., and Chapman, M. R. (2007) In vitro polymerization of a functional *Escherichia coli* amyloid protein. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 3713-3719
278. Collinson, S. K., Emody, L., Muller, K. H., Trust, T. J., and Kay, W. W. (1991) Purification and Characterization of Thin, Aggregative Fimbriae from *Salmonella-Enteritidis*. *Journal of bacteriology* **173**, 4773-4781
279. Butko, P., Buford, J. P., Goodwin, J. S., Stroud, P. A., McCormick, C. L., and Cannon, G. C. (2001) Spectroscopic evidence for amyloid-like interfacial self-assembly of hydrophobin Sc3. *Biochem Bioph Res Co* **280**, 212-215
280. de Vocht, M. L., Reviakine, I., Wosten, H. A. B., Brisson, A., Wessels, J. G. H., and Robillard, G. T. (2000) Structural and functional role of the disulfide bridges in the hydrophobin SC3. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 28428-28432
281. Gebbink, M. F. B. G., Claessen, D., Bouma, B., Dijkhuizen, L., and Wosten, H. A. B. (2005) Amyloids - A functional coat for microorganisms. *Nature Reviews Microbiology* **3**, 333-341
282. Kwan, A. H. Y., Winefield, R. D., Sunde, M., Matthews, J. M., Haverkamp, R. G., Templeton, M. D., and Mackay, J. P. (2006) Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 3621-3626
283. Mackay, J. P., Matthews, J. M., Winefield, R. D., Mackay, L. G., Haverkamp, R. G., and Templeton, M. D. (2001) The hydrophobin EAS is largely unstructured in solution and functions by forming amyloid-like structures. *Structure* **9**, 83-91
284. Otoo, H. N., Lee, K. G., Qiu, W. G., and Lipke, P. N. (2008) *Candida albicans* Als adhesins have conserved amyloid-forming sequences. *Eukaryotic cell* **7**, 776-782
285. Lipke, P. N., Garcia, M. C., Alsteens, D., Ramsook, C. B., Klotz, S. A., and Dufrene, Y. F. (2012) Strengthening relationships: amyloids create adhesion nanodomains in yeasts. *Trends in microbiology* **20**, 59-65
286. Garcia, M. C., Lee, J. T., Ramsook, C. B., Alsteens, D., Dufrene, Y. F., and Lipke, P. N. (2011) A Role for Amyloid in Cell Aggregation and Biofilm Formation. *PLoS one* **6**
287. Mostaert, A. S., Higgins, M. J., Fukuma, T., Rindi, F., and Jarvis, S. P. (2006) Nanoscale mechanical characterisation of amyloid fibrils discovered in a natural adhesive. *J Biol Phys* **32**, 393-401
288. Barlow, D. E., Dickinson, G. H., Orihuela, B., Kulp, J. L., Rittschof, D., and Wahl, K. J. (2010) Characterization of the Adhesive Plaque of the Barnacle *Balanus amphitrite*: Amyloid-Like Nanofibrils Are a Major Component. *Langmuir* **26**, 6549-6556
289. Sullan, R. M. A., Gunari, N., Tanur, A. E., Yuri, C., Dickinson, G. H., Orihuela, B., Rittschof, D., and Walker, G. C. (2009) Nanoscale structures and mechanics of barnacle cement. *Biofouling* **25**, 263-275
290. Jacob, R. S., George, E., Singh, P. K., Salot, S., Anoop, A., Jha, N. N., Sen, S., and Maji, S. K. (2016) Cell Adhesion on Amyloid Fibrils Lacking Integrin Recognition Motif. *The Journal of biological chemistry*
291. Costa, T. R. D., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M. S., Redzej, A., Trokter, M., and Waksman, G. (2015) Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology* **13**, 343-359
292. Rockey, D. D., Lenart, J., and Stephens, R. S. (2000) Genome sequencing and our understanding of chlamydiae. *Infection and immunity* **68**, 5473-5479
293. Desvaux, M., Parham, N. J., and Henderson, I. R. (2004) Type V protein secretion: Simplicity gone awry? *Curr Issues Mol Biol* **6**, 111-124

294. Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C., and Ala'Aldeen, D. (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol R* **68**, 692+
295. Leo, J. C., Grin, I., and Linke, D. (2012) Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philos T R Soc B* **367**, 1088-1101
296. Braselmann, E., and Clark, P. L. (2012) Autotransporters: The Cellular Environment Reshapes a Folding Mechanism to Promote Protein Transport. *J Phys Chem Lett* **3**, 1063-1071
297. Oomen, C. J., van Ulsen, P., Van Gelder, P., Feijen, M., Tommassen, J., and Gros, P. (2004) Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *Embo J* **23**, 1257-1266
298. Gawarzewski, I. (2013) *Determination of the AIDA-I Beta-Barrel crystal structure: getting the clue to the Autotransporter secretion pathway* Doktorarbeit, Heinrich-Heine-Universität
299. Junker, M., Besingi, R. N., and Clark, P. L. (2009) Vectorial transport and folding of an autotransporter virulence protein during outer membrane secretion. *Molecular microbiology* **71**, 1323-1332
300. Nishimura, K., Tajima, N., Yoon, Y. H., Park, S. Y., and Tame, J. R. H. (2010) Autotransporter passenger proteins: virulence factors with common structural themes. *J Mol Med* **88**, 451-458
301. Renn, J. P., and Clark, P. L. (2011) Disulfide Bond-Mediated Passenger Domain Stalling as a Structural Probe of Autotransporter Outer Membrane Secretion in Vivo. *Methods in Enzymology: Biothermodynamics, Vol 492, Pt D* **492**, 233-251
302. May, K. L., Grabowicz, M., Polyak, S. W., and Morona, R. (2012) Self-association of the Shigella flexneri IcsA autotransporter protein. *Microbiol-Sgm* **158**, 1874-1883
303. Oliver, D. C., Huang, G., Nodel, E., Pleasance, S., and Fernandez, R. C. (2003) A conserved region within the Bordetella pertussis autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain. *Molecular microbiology* **47**, 1367-1383
304. Drobnak, I., Braselmann, E., Chaney, J. L., Leyton, D. L., Bernstein, H. D., Lithgow, T., Luirink, J., Nataro, J. P., and Clark, P. L. (2015) Of linkers and autochaperones: an unambiguous nomenclature to identify common and uncommon themes for autotransporter secretion. *Molecular microbiology* **95**, 1-16
305. Ieva, R., and Bernstein, H. D. (2009) Interaction of an autotransporter passenger domain with BamA during its translocation across the bacterial outer membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 19120-19125
306. Ruiz-Perez, F., Henderson, I. R., Leyton, D. L., Rossiter, A. E., Zhang, Y. H., and Nataro, J. P. (2009) Roles of Periplasmic Chaperone Proteins in the Biogenesis of Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae. *Journal of bacteriology* **191**, 6571-6583
307. Sauri, A., Soprova, Z., Wickstrom, D., de Gier, J. W., Van der Schors, R. C., Smit, A. B., Jong, W. S. P., and Luirink, J. (2009) The Bam (Omp85) complex is involved in secretion of the autotransporter haemoglobin protease. *Microbiol-Sgm* **155**, 3982-3991
308. Provencher, S. W., and Glockner, J. (1981) Estimation of Globular Protein Secondary Structure from Circular-Dichroism. *Biochemistry* **20**, 33-37
309. van Stokkum, I. H., Spoelder, H. J., Bloemendal, M., van Grondelle, R., and Groen, F. C. (1990) Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. *Analytical biochemistry* **191**, 110-118
310. Neander, C. (2014) *Expressions- und Funktionsstudien zum Chlamydia pneumoniae Invasin Pmp21* Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
311. Engel, A. C. (2015) *Funktionelle Charakterisierung der Chlamydia pneumoniae Effektorproteine CPn0809 und CPn0147* Doktorarbeit, Heinrich-Heine-Universität
312. Jantos, C. A., Heck, S., Roggendorf, R., SenGupta, M., and Hegemann, J. H. (1997) Antigenic and molecular analyses of different Chlamydia pneumoniae strains. *J Clin Microbiol* **35**, 620-623
313. Entian, K. D., Schuster, T., Hegemann, J. H., Becher, D., Feldmann, H., Guldener, U., Gotz, R., Hansen, M., Hollenberg, C. P., Jansen, G., Kramer, W., Klein, S., Kotter, P., Kricke, J., Launhardt, H., Mannhaupt, G., Maierl, A., Meyer, P., Mewes, W., Munder, T., Niedenthal, R.

- K., Rad, M. R., Rohmer, A., Romer, A., Rose, M., Schafer, B., Siegler, M. L., Vetter, J., Wilhelm, N., Wolf, K., Zimmermann, F. K., Zollner, A., and Hinnen, A. (1999) Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol Gen Genet* **262**, 683-702
314. Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., and Woods, R. A. (1995) Studies on the Transformation of Intact Yeast-Cells by the Liac/S-DNA/Peg Procedure. *Yeast* **11**, 355-360
315. Fink, G. R., Hicks, J.B., Sherman, F. (1983) *Methods in yeast genetics*, New York
316. Sambrook, J., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual.*, New York
317. Erdner, J. M., Barth, H. G., Foley, J. P., and Payne, W. G. (2006) Size-exclusion chromatography using deuterated mobile phases. *Journal of Chromatography A* **1129**, 41-46
318. Kunji, E. R. S., Harding, M., Butler, P. J. G., and Akamine, P. (2008) Determination of the molecular mass and dimensions of membrane proteins by size exclusion chromatography. *Methods* **46**, 62-72
319. Stulik, K., Pacakova, V., and Ticha, M. (2003) Some potentialities and drawbacks of contemporary size-exclusion chromatography. *J Biochem Bioph Meth* **56**, 1-13
320. Dersch, P., and Isberg, R. R. (1999) A region of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasion protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self-association. *Embo J* **18**, 1199-1213
321. Kogoy, J. M. (2003) Protein crystallization. Department of Biology, Davidson College, Davidson, NC 28035
322. Biancalana, M., and Koide, S. (2010) Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Bba-Proteins Proteom* **1804**, 1405-1412
323. Puchtler, H., Sweat, F., and Levine, M. (1962) On Binding of Congo Red by Amyloid. *J Histochem Cytochem* **10**, 355-&
324. Groenning, M. (2010) Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status. *J Chem Biol* **3**, 1-18
325. Glenner, G. G., Eanes, E. D., and Page, D. L. (1972) Relation of Properties of Congo Red-Stained Amyloid Fibrils to Beta-Conformation. *J Histochem Cytochem* **20**, 821-&
326. Klunk, W. E., Jacob, R. F., and Mason, R. P. (1999) Quantifying amyloid beta-peptide (A beta) aggregation using the Congo red A beta (CR-A beta) spectrophotometric assay. *Analytical biochemistry* **266**, 66-76
327. Klunk, W. E., Jacob, R. F., and Mason, R. P. (1999) Quantifying amyloid by Congo red spectral shift assay. *Method Enzymol* **309**, 285-305
328. Lobley, A., Whitmore, L., and Wallace, B. A. (2002) DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics* **18**, 211-212
329. Whitmore, L., and Wallace, B. A. (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* **32**, W668-673
330. Whitmore, L., and Wallace, B. A. (2008) Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* **89**, 392-400
331. Maechtle, W. B., L. (2006) *Analytical Ultracentrifugation of Polymers and Nanoparticles*, Springer-Verlag
332. Curth, U. U., C. (2007) Analytische Ultrazentrifugation: Quantitative Charakterisierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen. *Biospektrum* **13**
333. Dos Reis, S., Couлары-Salin, B., Forge, V., Lascu, I., Begueret, J., and Saupe, S. J. (2002) The HET-s prion protein of the filamentous fungus *Podospora anserina* aggregates in vitro into amyloid-like fibrils. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 5703-5706
334. Maurer-Stroh, S., Debulpaep, M., Kuemmerer, N., de la Paz, M. L., Martins, I. C., Reumers, J., Morris, K. L., Copland, A., Serpell, L., Serrano, L., Schymkowitz, J. W. H., and Rousseau, F. (2010) Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices. *Nat Methods* **7**, 237-U109

335. Gabrielson, J. P., Brader, M. L., Pekar, A. H., Mathis, K. B., Winter, G., Carpenter, J. F., and Randolph, T. W. (2007) Quantitation of aggregate levels in a recombinant humanized monoclonal antibody formulation by size-exclusion chromatography, asymmetrical flow field flow fractionation, and sedimentation velocity. *Journal of pharmaceutical sciences* **96**, 268-279
336. Smith, C. A. (1988) Estimation of Sedimentation Coefficients and Frictional Ratios of Globular-Proteins. *Biochem Educ* **16**, 104-106
337. Levine, H. (1993) Thioflavine-T Interaction with Synthetic Alzheimers-Disease Beta-Amyloid Peptides - Detection of Amyloid Aggregation in Solution. *Protein Science* **2**, 404-410
338. Klunk, W. E., Pettegrew, J. W., and Abraham, D. J. (1989) Quantitative-Evaluation of Congo Red Binding to Amyloid-Like Proteins with a Beta-Pleated Sheet Conformation. *J Histochem Cytochem* **37**, 1273-1281
339. Zhuang, Z. P., Kung, M. P., Hou, C., Skovronsky, D. M., Gur, T. L., Plossl, K., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Y., and Kung, H. F. (2001) Radioiodinated styrylbenzenes and thioflavins as probes for amyloid aggregates. *J Med Chem* **44**, 1905-1914
340. Sulatskaya, A., Irina, K., and Konstantin, T. (2012) A new trend in the experimental methodology of amyloid fibril structural investigation with the use of thioflavin T. *Febs Journal* **279**, 416-416
341. Sulatskaya, A. I., Kuznetsova, I. M., and Turoverov, K. K. (2012) Interaction of Thioflavin T with Amyloid Fibrils: Fluorescence Quantum Yield of Bound Dye. *J Phys Chem B* **116**, 2538-2544
342. Wu, C., Wang, Z. X., Lei, H. X., Duan, Y., Bowers, M. T., and Shea, J. E. (2008) The Binding of Thioflavin T and Its Neutral Analog BTA-1 to Protofibrils of the Alzheimer's Disease A beta(16-22) Peptide Probed by Molecular Dynamics Simulations. *Journal of molecular biology* **384**, 718-729
343. Delellis, R. A., Glenner, G. G., and Ram, J. S. (1968) Histochemical Observations on Amyloid with Reference to Polarization Microscopy. *J Histochem Cytochem* **16**, 663-&
344. Ladewig, P. (1945) Double-Refringence of the Amyloid-Congo-Red-Complex in Histological Sections. *Nature* **156**, 81-82
345. Harada, T., and Kuroda, R. (2011) CD Measurements of beta-Amyloid (1-40) and (1-42) in the Condensed Phase. *Biopolymers* **95**, 127-134
346. Michnik, A. (2003) Thermal stability of bovine serum albumin DSC study. *J Therm Anal Calorim* **71**, 509-519
347. Takeda, K., Wada, A., Yamamoto, K., Moriyama, Y., and Aoki, K. (1989) Conformational Change of Bovine Serum-Albumin by Heat-Treatment. *J Protein Chem* **8**, 653-659
348. Stallmann, S., and Hegemann, J. H. (2016) The Chlamydia trachomatis Ctd1 invasin exploits the human integrin beta 1 receptor for host cell entry. *Cellular microbiology* **18**, 761-775
349. Lei, S. P., Lin, H. C., Wang, S. S., Callaway, J., and Wilcox, G. (1987) Characterization of the Erwinia-Carotovora Pelb Gene and Its Product Pectate Lyase. *Journal of bacteriology* **169**, 4379-4383
350. Driessen, A. J. M., Manting, E. H., and van der Does, C. (2001) The structural basis of protein targeting and translocation in bacteria. *Nat Struct Biol* **8**, 492-498
351. Pollock, M. R., and Richmond, M. H. (1962) Low Cyst(E)Ine Content of Bacterial Extracellular Proteins - Its Possible Physiological Significance. *Nature* **194**, 446-+
352. Jose, J., Kramer, J., Klauser, T., Pohlner, J., and Meyer, T. F. (1996) Absence of periplasmic DsbA oxidoreductase facilitates export of cysteine-containing passenger proteins to the Escherichia coli cell surface via the Iga(beta) autotransporter pathway. *Gene* **178**, 107-110
353. Schein, C. H. (1989) Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Biotechnology* **7**, 1141-1148
354. Agilent Technologies, I. (2009) ArcticExpress RIL Competent Cells and ArcticExpress RP Competent Cells. *Instruction Manual*

355. Maurer, J., Jose, J., and Meyer, T. F. (1999) Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. *Journal of bacteriology* **181**, 7014-7020
356. Sugawara, E., Steiert, M., Rouhani, S., and Nikaido, H. (1996) Secondary structure of the outer membrane proteins OmpA of *Escherichia coli* and OprF of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* **178**, 6067-6069
357. deCock, H., vanBlokland, S., and Tommassen, J. (1996) In vitro insertion and assembly of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli* K-12 into the outer membrane - Role of Triton X-100. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 12885-12890
358. Pavlova, O., Peterson, J. H., Ieva, R., and Bernstein, H. D. (2013) Mechanistic link between beta barrel assembly and the initiation of autotransporter secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, E938-E947
359. Suhr, M., Benz, I., and Schmidt, M. A. (1996) Processing of the AIDA-I precursor: Removal of AIDA(c) and evidence for the outer membrane anchoring as a beta-barrel structure. *Molecular microbiology* **22**, 31-42
360. Garavito, R. M., and Ferguson-Miller, S. (2001) Detergents as tools in membrane biochemistry. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 32403-32406
361. Newby, Z. E. R., O'Connell, J. D., Gruswitz, F., Hays, F. A., Harries, W. E. C., Harwood, I. M., Ho, J. D., Lee, J. K., Savage, D. F., Miercke, L. J. W., and Stroud, R. M. (2009) A general protocol for the crystallization of membrane proteins for X-ray structural investigation. *Nature protocols* **4**, 619-637
362. Anatrice. (2016) Detergents and their uses in membrane protein science.
363. (2007) *Purifying Challenging Proteins. Principles and Methods*, GE Healthcare
364. Bondos, S. E., and Bicknell, A. (2003) Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. *Analytical biochemistry* **316**, 223-231
365. Surrey, T., and Jahnig, F. (1992) Refolding and Oriented Insertion of a Membrane-Protein into a Lipid Bilayer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 7457-7461
366. Surrey, T., and Jahnig, F. (1995) Kinetics of Folding and Membrane Insertion of a Beta-Barrel Membrane-Protein. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 28199-28203
367. Louis-Jeune, C., Andrade-Navarro, M. A., and Perez-Iratxeta, C. (2012) Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **80**, 374-381
368. Lai, J. Y., Poon, Y. S., Kaiser, J. T., and Rees, D. C. (2013) Open and shut: Crystal structures of the dodecylmaltoside solubilized mechanosensitive channel of small conductance from *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori* at 4.4 angstrom and 4.1 angstrom resolutions. *Protein Science* **22**, 502-509
369. Kuhnelt, K., and Diezmann, D. (2011) Crystal Structure of the Autochaperone Region from the *Shigella flexneri* Autotransporter IcsA. *Journal of bacteriology* **193**, 2042-2045
370. Tanzer, R. J., Longbottom, D., and Hatch, T. P. (2001) Identification of polymorphic outer membrane proteins of *Chlamydia psittaci* 6BC. *Infection and immunity* **69**, 2428-2434
371. Lazo, N. D., and Downing, D. T. (1997) beta-helical fibrils from a model peptide. *Biochem Biophys Res Co* **235**, 675-679
372. Dutta, P. R., Sui, B. Q., and Nataro, J. P. (2003) Structure-function analysis of the enteroaggregative *Escherichia coli* plasmid-encoded toxin autotransporter using scanning linker mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 39912-39920
373. Ohnishi, Y., Nishiyama, M., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1994) Involvement of the CooH-Terminal Pro-Sequence of *Serratia-Marcescens* Serine-Protease in the Folding of the Mature Enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 32800-32806
374. Erickson, H. P. (2009) Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. *Biological procedures online* **11**, 32-51

375. Haass, C., and Selkoe, D. J. (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Bio* **8**, 101-112
376. Shankar, G. M., Li, S. M., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., Brett, F. M., Farrell, M. A., Rowan, M. J., Lemere, C. A., Regan, C. M., Walsh, D. M., Sabatini, B. L., and Selkoe, D. J. (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* **14**, 837-842
377. Bitan, G., Lomakin, A., and Teplow, D. B. (2001) Amyloid beta-protein oligomerization - Prenucleation interactions revealed by photo-induced cross-linking of unmodified proteins. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 35176-35184
378. O'Malley, T. T., Oktaviani, N. A., Zhang, D. N., Lomakin, A., O'Nuallain, B., Linse, S., Benedek, G. B., Rowan, M. J., Mulder, F. A. A., and Walsh, D. M. (2014) A beta dimers differ from monomers in structural propensity, aggregation paths and population of synaptotoxic assemblies. *Biochemical Journal* **461**, 413-426
379. Bitan, G., Fradinger, E. A., Spring, S. M., and Teplow, D. B. (2005) Neurotoxic protein oligomers - what you see is not always what you get. *Amyloid-Journal of Protein Folding Disorders* **12**, 88-95
380. Hepler, R. W., Grimm, K. M., Nahas, D. D., Breese, R., Dodson, E. C., Acton, P., Keller, P. M., Yeager, M., Wang, H., Shughrue, P., Kinney, G., and Joyce, J. G. (2006) Solution state characterization of amyloid beta-derived diffusible ligands. *Biochemistry* **45**, 15157-15167
381. Epstein, E. A., Reizian, M. A., and Chapman, M. R. (2009) Spatial Clustering of the Curlin Secretion Lipoprotein Requires Curli Fiber Assembly. *Journal of bacteriology* **191**, 608-615
382. Podlisny, M. B., Ostaszewski, B. L., Squazzo, S. L., Koo, E. H., Rydell, R. E., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1995) Aggregation of Secreted Amyloid Beta-Protein into Sodium Dodecyl Sulfate-Stable Oligomers in Cell-Culture. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 9564-9570
383. Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Rowan, M. J., and Selkoe, D. J. (2002) Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. *Biochem Soc T* **30**, 552-557
384. Stranks, S. D., Ecroyd, H., Van Sluyter, S., Waters, E. J., Carver, J. A., and von Smekal, L. (2009) Model for amorphous aggregation processes. *Phys Rev E* **80**
385. Schimmel, C. (1980) *Biophysical chemistry - part I: The conformation of biological macromolecules*, W.H. Freeman and Company
386. Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W., and Kabsch, W. (1990) Atomic Model of the Actin Filament. *Nature* **347**, 44-49
387. Kollman, J. M., Pandi, L., Sawaya, M. R., Riley, M., and Doolittle, R. F. (2009) Crystal Structure of Human Fibrinogen. *Biochemistry* **48**, 3877-3886
388. Li, X. C., Holmes, K. C., Lehman, W., Jung, H., and Fischer, S. (2010) The Shape and Flexibility of Tropomyosin Coiled Coils: Implications for Actin Filament Assembly and Regulation. *Journal of molecular biology* **395**, 327-339
389. Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C. E., Krafft, G. A., and Klein, W. L. (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A beta(1-42) are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 6448-6453
390. Lesne, S., Koh, M. T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C. G., Yang, A., Gallagher, M., and Ashe, K. H. (2006) A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* **440**, 352-357
391. McLaurin, J., Yang, D., Yip, C. M., and Fraser, P. E. (2000) Review: modulating factors in amyloid-beta fibril formation. *Journal of structural biology* **130**, 259-270
392. Lin, Y. X., Kardos, J., Imai, M., Ikenoue, T., Kinoshita, M., Sugiki, T., Ishimori, K., Goto, Y., and Lee, Y. H. (2016) Amorphous Aggregation of Cytochrome c with Inherently Low Amyloidogenicity Is Characterized by the Metastability of Supersaturation and the Phase Diagram. *Langmuir* **32**, 2010-2022

393. Yoshimura, Y., Lin, Y. X., Yagi, H., Lee, Y. H., Kitayama, H., Sakurai, K., So, M., Ogi, H., Naiki, H., and Goto, Y. (2012) Distinguishing crystal-like amyloid fibrils and glass-like amorphous aggregates from their kinetics of formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 14446-14451
394. Dueholm, M. S., Nielsen, S. B., Hein, K. L., Nissen, P., Chapman, M., Christiansen, G., Nielsen, P. H., and Otzen, D. E. (2011) Fibrillation of the Major Curli Subunit CsgA under a Wide Range of Conditions Implies a Robust Design of Aggregation. *Biochemistry* **50**, 8281-8290
395. Kaye, R., Head, E., Sarsoza, F., Saing, T., Cotman, C. W., Necula, M., Margol, L., Wu, J., Breydo, L., Thompson, J. L., Rasool, S., Gurlo, T., Butler, P., and Glabe, C. G. (2007) Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers. *Mol Neurodegener* **2**
396. Kaye, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W., and Glabe, C. G. (2003) Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* **300**, 486-489
397. Tsumoto, K., Umetsu, M., Kumagai, I., Ejima, D., Philo, J. S., and Arakawa, T. (2004) Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnol Progr* **20**, 1301-1308
398. Arakawa, T., Ejima, D., Tsumoto, K., Obeyama, N., Tanaka, Y., Kita, Y., and Timasheff, S. N. (2007) Suppression of protein interactions by arginine: A proposed mechanism of the arginine effects. *Biophys Chem* **127**, 1-8
399. Lee, J., Culyba, E. K., Powers, E. T., and Kelly, J. W. (2011) Amyloid-beta forms fibrils by nucleated conformational conversion of oligomers. *Nature chemical biology* **7**, 602-609
400. de Jong, W., Wosten, H. A. B., Dijkhuizen, L., and Claessen, D. (2009) Attachment of *Streptomyces coelicolor* is mediated by amyloidal fimbriae that are anchored to the cell surface via cellulose. *Molecular microbiology* **73**, 1128-1140
401. Aimanianda, V., and Latge, J. P. (2010) Fungal hydrophobins form a sheath preventing immune recognition of airborne conidia. *Virulence* **1**, 185-187
402. Wosten, H. A. B., and de Vocht, M. L. (2000) Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Bba-Rev Biomembranes* **1469**, 79-86
403. Wessels, J. G. H. (2000) Hydrophobins, unique fungal proteins. *Mycologist* **14**, 153-159
404. de Vocht, M. L., Reviakine, I., Wösten, H.A.B, Brisson, A., Wessels, J.G.H. and Robillard, G.T. (2000) Hydrophobins are functional amyloid proteins. *Current Biology* **submitted**
405. Kuperstein, I., Broersen, K., Benilova, I., Rozenski, J., Jonekheere, W., Debulpaep, M., Vandersteen, A., Segers-Nolten, I., Van der Werf, K., Subramaniam, V., Braeken, D., Callewaert, G., Bartic, C., D'Hooge, R., Martins, I. C., Rousseau, F., Schymkowitz, J., and De Strooper, B. (2010) Neurotoxicity of Alzheimer's disease A beta peptides is induced by small changes in the A beta(42) to A beta(40) ratio. *Embo J* **29**, 3408-3420
406. Nichols, M. R., Moss, M. A., Reed, D. K., Cratic-McDaniel, S., Hoh, J. H., and Rosenberry, T. L. (2005) Amyloid-beta protofibrils differ from amyloid-beta aggregates induced in dilute hexafluoroisopropanol in stability and morphology. *The Journal of biological chemistry* **280**, 2471-2480
407. D'Amico, M., Di Carlo, M. G., Groenning, M., Militello, V., Vetri, V., and Leone, M. (2012) Thioflavin T Promotes A beta(1-40) Amyloid Fibrils Formation. *J Phys Chem Lett* **3**, 1596-1601
408. Birk, J., Friberg, M. A., Prescianotto-Baschong, C., Spiess, M., and Rutishauser, J. (2009) Dominant pro-vasopressin mutants that cause diabetes insipidus form disulfide-linked fibrillar aggregates in the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* **122**, 3994-4002
409. Baldwin, R. L. (1996) How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophys J* **71**, 2056-2063
410. Kunz, W., Henle, J., and Ninham, B. W. (2004) 'Zur Lehre von der Wirkung der Salze' (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister's historical papers. *Curr Opin Colloid In* **9**, 19-37

411. Inouye, K., Kuzuya, K., and Tonomura, B. (1998) Effect of salts on the solubility of thermolysin: A remarkable increase in the solubility as well as the activity by the addition of salts without aggregation or dispersion of thermolysin. *J Biochem-Tokyo* **123**, 847-852
412. Marek, P. J., Patsalo, V., Green, D. F., and Raleigh, D. P. (2012) Ionic Strength Effects on Amyloid Formation by Amylin Are a Complicated Interplay among Debye Screening, Ion Selectivity, and Hofmeister Effects. *Biochemistry* **51**, 8478-8490
413. Pace, N. C. S., B.A., Thomson, J.A. . (1990) Measuring the conformational stability of a protein. in *Protein Structures: A Practical approach* (Creighton, T. E. ed.). pp 311-330
414. Arora, A., Ha, C., and Park, C. B. (2004) Insulin amyloid fibrillation at above 100 degrees C: New insights into protein folding under extreme temperatures. *Protein Science* **13**, 2429-2436
415. Baxa, U., Ross, P. D., Wickner, R. B., and Steven, A. C. (2004) The N-terminal prion domain of Ure2p converts from an unfolded to a thermally resistant conformation upon filament formation. *Journal of molecular biology* **339**, 259-264
416. Bousset, L., Briki, F., Doucet, J., and Melki, R. (2003) The native-like conformation of Ure2p in fibrils assembled under physiologically relevant conditions switches to an amyloid-like conformation upon heat-treatment of the fibrils. *Journal of structural biology* **141**, 132-142
417. Dubois, J., Ismail, A. A., Chan, S. L., and Ali-Khan, Z. (1999) Fourier transform infrared spectroscopic investigation of temperature- and pressure-induced disaggregation of amyloid A. *Scand J Immunol* **49**, 376-380
418. Litvinovich, S. V., Brew, S. A., Aota, S., Akiyama, S. K., Haudenschild, C., and Ingham, K. C. (1998) Formation of amyloid-like fibrils by self-association of a partially unfolded fibronectin type III module. *Journal of molecular biology* **280**, 245-258
419. Morel, B., Varela, L., and Conejero-Lara, F. (2010) The Thermodynamic Stability of Amyloid Fibrils Studied by Differential Scanning Calorimetry. *J Phys Chem B* **114**, 4010-4019
420. Sasahara, K., Naiki, H., and Goto, Y. (2005) Kinetically controlled thermal response of beta(2)-microglobulin amyloid fibrils. *Journal of molecular biology* **352**, 700-711
421. Kardos, J., Micsonai, A., Pal-Gabor, H., Petrik, E., Graf, L., Kovacs, J., Lee, Y. H., Naiki, H., and Goto, Y. (2011) Reversible Heat-Induced Dissociation of beta(2)-Microglobulin Amyloid Fibrils. *Biochemistry* **50**, 3211-3220
422. Oh, J., Kim, J. G., Jeon, E., Yoo, C. H., Moon, J. S., Rhee, S., and Hwang, I. (2007) Amyloidogenesis of type III-dependent harpins from plant pathogenic bacteria. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 13601-13609
423. Huveneers, S., and Danen, E. H. J. (2009) Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci* **122**, 1059-1069
424. Deshpande, A., Mina, E., Glabe, C., and Busciglio, J. (2006) Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons. *J Neurosci* **26**, 6011-6018
425. Epstein, E. A., and Chapman, M. R. (2008) Polymerizing the fibre between bacteria and host cells: the biogenesis of functional amyloid fibres. *Cellular microbiology* **10**, 1413-1420
426. Fernandez, L. A., and Berenguer, J. (2000) Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *Fems Microbiol Rev* **24**, 21-44
427. Jonson, A. B., Normark, S., and Rhen, M. (2005) Fimbriae, pili, flagella and bacterial virulence. *Contrib Microbiol* **12**, 67-89
428. Evans, M. L., and Chapman, M. R. (2014) Curli biogenesis: Order out of disorder. *Bba-Mol Cell Res* **1843**, 1551-1558
429. Cota, E., and Hoyer, L. L. (2015) The *Candida albicans* agglutinin-like sequence family of adhesins: functional insights gained from structural analysis. *Future Microbiol* **10**, 1635-1648
430. Hoyer, L. L., and Cota, E. (2016) *Candida albicans* Agglutinin-Like Sequence (Als) Family Vignettes: A Review of Als Protein Structure and Function. *Front Microbiol* **7**

431. Appelt, D. M., Roupas, M., Hammond, C. J., Little, C. S., and Balin, B. J. (2004) The effects of the Chlamydia pneumoniae infectious process on neuronal cells: Implications for Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* **25**, S409-S409
432. Little, C. S., Hammond, C. J., Appelt, D. M., and Balin, B. J. (2004) The induction of Alzheimer's disease-like pathology and recovery of viable organism from the brains of BALB/C mice following infection with chlamydia pneumoniae. *Neurobiology of Aging* **25**, S227-S228
433. Little, C. S., Hammond, C. J., MacIntyre, A., Balin, B. J., and Appelt, D. M. (2004) Chlamydia pneumoniae induces Alzheimer-like amyloid plaques in brains of BALB/c mice. *Neurobiology of Aging* **25**, 419-429
434. Longbottom, D., Russell, M., Dunbar, S. M., Jones, G. E., and Herring, A. J. (1998) Molecular cloning and characterization of the genes coding for the highly immunogenic cluster of 90-kilodalton envelope proteins from the Chlamydia psittaci subtype that causes abortion in sheep. *Infection and immunity* **66**, 1317-1324
435. Wolf, M. (2014) Charakterisierung der Oligomerisierung des Amyloid-Beta-Peptids. *Dissertation der Heinrich-Heine-Universität*
436. Fezoui, Y., Hartley, D. M., Harper, J. D., Khurana, R., Walsh, D. M., Condron, M. M., Selkoe, D. J., Lansbury, P. T., Fink, A. L., and Teplow, D. B. (2000) An improved method of preparing the amyloid beta-protein for fibrillogenesis and neurotoxicity experiments. *Amyloid-International Journal of Experimental and Clinical Investigation* **7**, 166-178
437. Schramm, N., Bagnell, C. R., and Wyrick, P. B. (1996) Vesicles containing Chlamydia trachomatis serovar L2 remain above pH 6 within HEC-1B cells. *Infection and immunity* **64**, 1208-1214
438. Kiselev, A. O., Skinner, M. C., and Lampe, M. F. (2009) Analysis of pmpD Expression and PmpD Post-Translational Processing during the Life Cycle of Chlamydia trachomatis Serovars A, D, and L2. *PloS one* **4**
439. Liu, X. Y., Afrane, M., Clemmer, D. E., Zhong, G. M., and Nelson, D. E. (2010) Identification of Chlamydia trachomatis Outer Membrane Complex Proteins by Differential Proteomics. *Journal of bacteriology* **192**, 2852-2860
440. Zoonens, M. a. M., B. (2010) Expression of Membrane Proteins at the *Escherichia coli* Membrane for Structural Studies. *Heterologous Expression of Membrane Proteins, Methods in molecular Biology* **601**, 49-66
441. Oberhettinger, P., Leo, J. C., Linke, D., Autenrieth, I. B., and Schutz, M. S. (2015) The Inverse Autotransporter Intimin Exports Its Passenger Domain via a Hairpin Intermediate. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 1837-1849
442. Palmer, I., and Wingfield, P. T. (2004) Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from Escherichia coli. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.] Chapter 6*, Unit 6 3
443. Palmer, I., and Wingfield, P. T. (2012) Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from Escherichia coli. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.] Chapter 6*, Unit6 3
444. Evanics, F., Hwang, P. M., Cheng, Y., Kay, L. E., and Prosser, R. S. (2006) Topology of an outer-membrane enzyme: Measuring oxygen and water contacts in solution NMR studies of PagP. *J Am Chem Soc* **128**, 8256-8264
445. Hwang, P. M., Choy, W. Y., Lo, E. I., Chen, L., Forman-Kay, J. D., Raetz, C. R. H., Prive, G. G., Bishop, R. E., and Kay, L. E. (2002) Solution structure and dynamics of the outer membrane enzyme PagP by NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 13560-13565
446. Oxenoid, K., and Chou, J. J. (2005) The structure of phospholamban pentamer reveals a channel-like architecture in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 10870-10875
447. Blattmann, B. S., P. (2009) Growing crystals from protein.

448. Cudney, B. (1999) Protein Crystallization Phase Diagrams and the Importance of Temperature. *Rigaku Journal* **16**
449. Matsuo, K., Sakurada, Y., Yonehara, R., Kataoka, M., and Gekko, K. (2007) Secondary-structure analysis of denatured proteins by vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy. *Biophys J* **92**, 4088-4096
450. Goldschmidt, L., Teng, P. K., Riek, R., and Eisenberg, D. (2010) Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid-like fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 3487-3492
451. Teng, P. K., and Eisenberg, D. (2009) Short protein segments can drive a non-fibrillizing protein into the amyloid state. *Protein Eng Des Sel* **22**, 531-536
452. Teng, P. K., Anderson, N. J., Goldschmidt, L., Sawaya, M. R., Sambashivan, S., and Eisenberg, D. (2012) Ribonuclease A suggests how proteins self-chaperone against amyloid fiber formation. *Protein Science* **21**, 26-+

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Taxonomische Darstellung der Chlamydiae mit ihren typischen Wirten.	20
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von <i>C. pneumoniae</i>	23
Abbildung 1.3: Die chlamydialen Membranen mit wichtigen Vertretern des COMC.	29
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der translatierten <i>C. pneumoniae</i> GiD Pmps.	36
Abbildung 1.5: Pmp21 und seine prozessierten Formen.	37
Abbildung 1.6: Zwei Beispiele für β -helikale Proteine mit unterschiedlichem Aufbau.	40
Abbildung 1.7: Pmp-Fragmente können miteinander interagieren.	42
Abbildung 1.8: Elektronenmikroskopische Aufnahme der β -Amyloidmorphologie und Strukturmodelle von cross- β und α -helicalen Amyloiden.	44
Abbildung 1.9: Übersicht des Typ-V Mechanismus und der AT Struktur.	52
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung einer Sitting drop-Platte (verändert nach (321)).	95
Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau einer AUZ-Messzelle (verändert nach (331)).	102
Abbildung 2.3: Aufbau eines Absorptionsphotometers in der AUZ (332).	103
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der repräsentativen Pmp-Kandidaten und der analysierten Fragmente.	107
Abbildung 3.2: N-M-Pmp21 bildet Proteinspezies unterschiedlicher Größe aus.	111
Abbildung 3.3: M-Pmp21 bildet Proteinspezies unterschiedlicher Größe aus.	113
Abbildung 3.4: D-Wt bildet Proteinspezies unterschiedlicher Größe aus.	116
Abbildung 3.5: D-Mt bildet Proteinspezies unterschiedlicher Größe aus.	118
Abbildung 3.6: A-Wt bildet Proteinspezies unterschiedlicher Größe aus.	121
Abbildung 3.7: A-Mt bildet Proteinspezies unterschiedlicher Größe aus.	123
Abbildung 3.8: Analyse von D-Wt mittels AUZ zur Validierung der SEC und erster Hinweise zur Form.	127
Abbildung 3.9: Analyse von D-Mt mittels AUZ zur Validierung der SEC und erster Hinweise zur Form.	129
Abbildung 3.10: Überprüfung der Reinheit von PmpA und PmpC aus <i>C. trachomatis</i> E.	132
Abbildung 3.11: Pmp21 bildet protofibrillären und globulären Strukturen aus.	134
Abbildung 3.12: Pmps bilden protofibrilläre und globuläre Strukturen vergleichbarer Größen aus.	135
Abbildung 3.13: Die ThT-Fluoreszenz hat nach 22 h ihr Maximum erreicht.	137
Abbildung 3.14: Die ThT-Fluoreszenz von Pmp21 zeigt ein eindeutiges Signal amyloider Proteine.	138
Abbildung 3.15: Die CR-Färbung von Pmp21 zeigt ein Signal amyloider Proteine.	140
Abbildung 3.16: Das FxxN Motiv führt zu einer bemerkenswert erhöhten Ausbildung von D-Wt-O.	141
Abbildung 3.17: Die Oligomere unterscheiden sich durch eine β -sheet reichere Sekundärstruktur von den Monomeren.	143
Abbildung 3.18: Die Oligomere können durch Lösen der Disulfidbrücken nur in geringem Maße aufgelöst werden.	145
Abbildung 3.19: D-Wt-O ₁ hat eine sehr hohe Temperaturstabilität, die durch Lösen der Disulfidbrücken verringert wird.	147

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.20: Sowohl das FxxN Motiv als auch die gleichzeitige Ausbildung von Oligomeren waren essentiell für die Adhäsion an HEp-2-Zellen.	148
Abbildung 3.21: Die oligomere Form von D-Wt ist wichtig für die Bindung an den EGFR.	150
Abbildung 3.22: Sowohl das FxxN Motiv als auch die gleichzeitige Ausbildung von Oligomeren waren essentiell für die Inhibition der <i>C. pneumoniae</i> Infektion.	152
Abbildung 3.23: Schematische Darstellung der analysierten Pmp21 Fragmente.	154
Abbildung 3.24: Die maximale OD ₆₀₀ von C-Pmp21 unterscheidet sich nicht nach Expression in BL21 ±10 mM β-ME oder in ArcticExpress Zellen.	158
Abbildung 3.25: C-Pmp21 wurde sowohl in BL21 als auch in ArcticExpress Zellen exprimiert.	159
Abbildung 3.26: C-Pmp21 zeigte in Abhängigkeit von der Expressionsbedingung ein typisches Laufverhalten für einen β-barrel in der SDS-PAGE.	161
Abbildung 3.27: Bis zu 50% des exprimierten C-Pmp21 wird auf die Oberfläche von <i>E. coli</i> transportiert.	163
Abbildung 3.28: C-Pmp21 konnte erfolgreich mitsamt Membran isoliert werden.	164
Abbildung 3.29: C-Pmp21 konnte durch FC-16 und Fos MEA 12 am besten solubilisiert werden.	166
Abbildung 3.30: Aufgrund der geringen Löslichkeit in den anderen Detergenzien bleibt FC-16 am besten geeignete zur Solubilisierung von C-Pmp21.	167
Abbildung 3.31: C-Pmp21 wird am effizientesten bei einer Membrankonzentration von 2 mg ml ⁻¹ solubilisiert.	168
Abbildung 3.32: Aufreinigung von C-Pmp21 aus 1 L Expressionskultur mittels IMAC.	169
Abbildung 3.33: C-Pmp21 bildet Aggregate und Proteinspezies unterschiedlicher Größe.	171
Abbildung 3.34: Aufkonzentrierung von C-Pmp21 führte zu Aggregation.	173
Abbildung 3.35: Eine geringere FC-16 Konzentration im Laufpuffer, sowie β-ME verringern die Ausbildung von C-Pmp21-Aggregaten.	174
Abbildung 3.36: Finale Aufreinigung von C-Pmp21 aus dem Pellet von 12 L Expressionskultur.	175
Abbildung 3.37: Alle C-Pmp21 Proteinspezies bilden zu ähnlichen Verhältnissen β-sheet-reiche Strukturen aus.	177
Abbildung 3.38: C-Pmp21 führt bei einer Konzentration von 3.5 und 14 mg ml ⁻¹ zu einer geringen Präzipitation.	179
Abbildung 3.39: Der Sequenzabschnitt pAC bildet große ungefaltete Oligomere und kleinere random coil gefaltete Oligomere oder Monomere.	182
Abbildung 4.1: Modell der Fibrillogene von Aβ (243).	192
Abbildung 4.2: CD-Spektroskopie von löslichem und fibrillärem HET-s (333).	197
Abbildung 4.3: In vitro Polymerisierungsprozess von CsgA analysiert mittels CD-Spektroskopie über mehrere Tage (277).	197
Abbildung 4.4: Adhäsine mit amyloiden Anteilen unterschiedlicher Ausprägung.	203
Abbildung 4.5: Exemplarische Darstellung des Laufverhaltens verschiedener β-barrel (298,441).	207
Abbildung 4.6: Exemplarische Darstellung reiner Sekundärstrukturen und eines β-barrels im CD-Spektrometer (356).	210

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 4.7: Allgemeines Phasendiagramm der Proteinkristallisation.</i>	<i>212</i>
<i>Abbildung 5.1: Plasmidkarte von pIG101 (Kapitel 2.1.11).</i>	<i>215</i>
<i>Abbildung 5.2: Plasmidkarte von pIG501 (Kapitel 2.1.11).</i>	<i>215</i>

8 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 2.1: Verwendete Verbrauchsartikel</i>	54
<i>Tabelle 2.2: Verwendete Geräte und Maschinen</i>	55
<i>Tabelle 2.3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien</i>	56
<i>Tabelle 2.4: Verwendete Software</i>	59
<i>Tabelle 2.5: Verwendete Lösungen und Puffer</i>	60
<i>Tabelle 2.6: Weitere verwendete Enzyme</i>	62
<i>Tabelle 2.7: Verwendete Primärantikörper</i>	63
<i>Tabelle 2.8: Verwendete Sekundärantikörper</i>	63
<i>Tabelle 2.9: Verwendete Kits</i>	63
<i>Tabelle 2.10: Verwendete Größenstandards für Gelelektrophoresen</i>	63
<i>Tabelle 2.11: Verwendete Oligonukleotide zur Klonierung</i>	64
<i>Tabelle 2.12: Verwendete Oligonukleotide zur Sequenzierung</i>	65
<i>Tabelle 2.13: Verwendete und neu klonierte Plasmide</i>	66
<i>Tabelle 2.14: Verwendete Detergenzien, sowie deren Stock- und Endkonzentration</i>	81
<i>Tabelle 2.15: Programm zum OCR von löslichen Proteinen</i>	83
<i>Tabelle 2.16: Programm zur denaturierten Aufreinigung von löslichen Proteinen</i>	84
<i>Tabelle 2.17: Programm zur Affinitätschromatographischen Aufreinigung von Membranproteinen</i>	85
<i>Tabelle 2.18: Programm zur präparativen SEC von rekombinanten löslichen Proteinen</i>	87
<i>Tabelle 2.19: Programm zur semipräparativen SEC von rekombinanten Membran- und löslichen Proteinen</i>	88
<i>Tabelle 2.20: Komponenten für Trenn- und Sammelgel</i>	91

9 Publikationen

Sören E.T. Luczak, Sander H.J. Smits, Christina Decker, Luitgard Nagel-Steger, Lutz Schmitt und Johannes H. Hegemann (2016) The *Chlamydia pneumoniae* Adhesin Pmp21 forms Oligomers with Adhesive Properties. *Journal of Biological Chemistry* **43**, 22806-22818

Sukumar Pal, Alison Favaroni, Delia F. Tifrea, Phillip T. Hanisch, Sören E.T. Luczak, Johannes H. Hegemann, Luis M. de la Maza (in Press) *Comparison of the nine polymorphic membrane proteins of Chlamydia trachomatis for their ability to induce protective immune responses in mice against a C. muridarum challenge.*

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die mich auf ihre eigene Art unterstützt haben. Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Johannes H. Hegemann für das mir entgegen gebrachte Vertrauen beim Überlassen des vielseitigen und interessanten Themas dieser Doktorarbeit bedanken. Durch seine Ratschläge und Anregungen in gemeinsamen Gesprächen trug er zum Gelingen dieser Arbeit bei. Er verhalf mir stets zu wissenschaftlicher Denkweise und gab mir die Freiheit auch Probleme aus einer anderen Perspektive zu betrachten und letztendlich zu lösen. Des Weiteren bedanke ich mich für die vielen Gelegenheiten, des akademischen Austausches mit nationalen und internationalen Kollegen, die er mir ermöglichte und die die Grenzen meines wissenschaftlichen Denkens erweiterten.

Besonderer Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. Lutz Schmitt für die bereitwillige Übernahme des Koreferats und der Diskussionsbereitschaft, die besonders zum Gelingen der gemeinsamen Publikation beitrug.

Ein großer Dank gilt Dr. Sander Smits, der mir mit seiner Gelassenheit und Diskussionsbereitschaft insbesondere zu Anfang der Promotionszeit und während dem Schreiben der Publikation half meinen Blick auf das Wesentliche zu richten.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. Luitgard Nagel-Steger, Christina Decker und Martin Wolf ohne deren Hilfe mir die biophysikalischen Analysemethoden und die Eigenschaften amyloider Proteine fremd geblieben wären.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Dr. Astrid Höppner, Michael Lenders, Sven Reimann, Marcel Lagedroste und Stefanie Kobus, für eine entspannte Arbeitsatmosphäre in einem mir fremden Institut und Diskussion über alles, was Proteinaufreinigung und Kristallographie betrifft.

Desweiteren bedanke ich mich bei Frau apl. Prof. Dr. Ursula Fleig für die kritischen und dadurch sehr hilfreichen Kommentare und Verbesserungsvorschläge zu meinen wissenschaftlichen Präsentationen.

Danksagung

Weiterhin möchte ich mich bei meinen aktuellen und ehemaligen Laborkollegen für ein fantastisches Arbeitsklima bedanken, das in Zukunft schwer zu toppen sein wird: Alison, Anand, Astrid, Christian, Corinna, Elli, Eva, Gabi, Irina, Jan, Katja, Marina, Natascha, Philipp, Seb, Sonja, Susi, Tim und Visnja.

Auch neben der Forschung gilt einigen Menschen mein gebührender Dank. Meinen Freunden aus der Kindheit, Basti und Torge möchte ich dafür danken, dass wir uns aufeinander verlassen können und freue mich, dass ich mich bei euch auch nach langer Zeit der Abwesenheit immer wieder zu Hause fühlen kann.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, dafür dass sie mir auch in schweren Zeiten Zuversicht gelehrt und durch eine Heimat den nötigen Rückhalt gegeben hat.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Freundin Anna, die auch in ungemütlichen Zeiten Verständnis hatte und mir die fehlende Gelassenheit vermitteln konnte.

11 Eidesstattliche Erklärung

Düsseldorf, 15. Dezember 2016

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.

Sören Luczak