

Die Rolle des LIPP Proteins in einer Chlamydia pneumoniae Infektion

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität

vorgelegt von

Jan Niklas Galle

aus Remscheid

Düsseldorf, November 2017

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

Berichterstatter:

- 1. Prof. Dr. Johannes H. Hegemann
- 2. Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Dezember2017

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS					
1	ZUSAMMENFASSUNG 10				
2	SUN	IMARY			
3	EINL	EITUNG 12			
3.1	Die H	lumane Plasmamembran			
3.	1.1	Lipid Transporter15			
3.	1.2	Lipid Bindedomänen 19			
3.	1.3	Membranveränderungen			
3.	1.4	Phosphatidylserin			
3.2	Angri	iffsziel humaner Pathogene			
3.3	Die h	umane Endozytose			
3.4	Das P	Phylum Chlamydiae			
3.	4.1	Gattung Chlamydia/Chlamydophila			
3.	4.2	Der chlamydiale Infektionszyklus			
3.	4.3	Das Humanpathogen C. pneumoniae			
3.5	Zielse	etzung			
4	MAT	-ERIAL			
4.1	Gebr	auchsmaterialien			
4.2	Gerä	te und Maschinen			
4.3	Chemikalien				
4.4	Lösungen und Puffer				
4.5	Enzyme				
4.6	Agarosen				
4.7	Färbemittel				
4.8	Antik	örper			
4.	8.1	Primäre Antikörper53			
4.	8.2	Sekundäre Antikörper			
4.9	Kits				

4.10) (Größenstandards	54
4.11	. (Oligonukleotide	55
4	.11.1	Amplifikations-Oligonukleotide	55
4	.11.2	Real-Time PCR-Oligonukleotide	56
4	.11.3	Sequenzierungs-Oligonukleotide	57
4.12	2 1	Plasmide	57
4	.12.1	Verwendete Plasmide.	57
4	.12.2	Neu-generierte Plasmide	58
4.13	3	Zellen und Zelllinien	58
4	.13.1	Prokaryotische Zellen und Zelllinien	58
4	.13.2	Eukaryotische Zelllinien	59
4.14	L I	Medien:	60
4	.14.1	Medien für Escherichia coli	60
4	.14.2	Medien für Saccharomyces cerevisiae:	60
4	.14.3	Zellkulturmedium	61
4	.14.4	Chlamydien-Zellkulturmedium	62
5	ME	ETHODEN	63
5 5.1	ME Kul	ETHODEN	63 63
5 5.1 5	ME Kul	THODEN	63 63
5 5.1 5	ME Kul .1.1	tivierung von Zellen Kultivierung von Escherichia coli Kultivierung von Saccharomyces cerevisiae	63 63 64
5 5.1 5 5 5	ME Kul .1.1 .1.2 .1.3	THODEN	63 63 64 64
5 5.1 5 5 5 5	Kul .1.1 .1.2 .1.3 .1.4	tivierung von Zellen Kultivierung von Escherichia coli Kultivierung von Saccharomyces cerevisiae Kultivierung eukaryotischer Epithelzellen Kultivierung von C. pneumoniae und C. trachomatis	63 63 64 64 64
5 5.1 5 5 5 5.2	ME Kul .1.1 .1.2 .1.3 .1.4 Mo	ETHODEN	63 63 64 64 64
5 5.1 5 5 5 5.2	ME .1.1 .1.2 .1.3 .1.4 Mo .2.1	THODEN	63 63 64 64 67
5 5.1 5 5 5.2 5 5	ME Kul .1.1 .1.2 .1.3 .1.4 Mo .2.1 .2.2	ETHODEN	63 63 64 64 67
5 5.1 5 5 5 5.2 5 5 5	ME Kul .1.1 .1.2 .1.3 .1.4 Mo .2.1 .2.2 .2.3	ETHODEN	63 63 64 64 67 70 71 72
5 5.1 5 5 5.2 5 5 5 5 5	ME Kul .1.1 .1.2 .1.3 .1.4 Mo .2.1 .2.2 .2.3 .2.4	ETHODEN	63 63 64 64 64 67 70 71 72 72
5 5.1 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	ME Kul .1.1 .1.2 .1.3 .1.4 Mo .2.1 .2.2 .2.3 .2.4 .2.5	ETHODEN	63 63 64 64 67 70 71 72 72 73
5 5.1 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	ME Kul .1.1 .1.2 .1.3 .1.4 Mo .2.1 .2.2 .2.3 .2.4 .2.5 .2.6	ETHODEN Image: Constraint of the second	63 63 64 64 67 70 70 71 72 72 73 74
5 5.1 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	ME Kul .1.1 .1.2 .1.3 .1.4 Mo .2.1 .2.2 .2.3 .2.4 .2.5 .2.6 .2.7	ETHODEN	63 63 64 64 67 70 71 72 72 72 74 74 75

!	5.2.9	DNA-Konzentrationsbestimmung per Spektralphotometer	78
5.3	Sequ	enzierung von DNA-Sequenzen	
5.4	Bioc	hemische Methoden	
!	5.4.1	Induktion der Genexpression in E. coli	78
!	5.4.2	Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen	79
	1.1.1	Dialyse von Proteinen	
ļ	5.4.3	Proteinmengenbestimmung mittels Bradford Reagenz	82
!	5.4.4	Proteinmengenbestimmung mittels Nanodrop	83
!	5.4.5	MALS (Multi-angle-light scattering)	
!	5.4.6	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	83
!	5.4.7	Native Gelelektrophorese (NATIVE PAGE)	
!	5.4.8	Westernblotanalyse	
!	5.4.9	Biotinylierung von rekombinantem Protein	
!	5.4.10	Fluoreszenz-Markierung von rekombinant-hergestellten Proteinen	
5.5	Prot	ein-Lipid-Bindestudien	90
!	5.5.1	Bindungsstudie von Proteinen an Lipid-Streifen	91
!	5.5.2	Liposom-Pulldown Assay	91
!	5.5.3	Interaktionsstudie von rekombinanten Proteinen mit GUVs	92
!	5.5.4	Lipid-Scrambling Assay an asymmetrischen GUVs	94
1.2	Zellb	iologische Methoden	95
	1.2.1	Transfektion von Epithelzellen	95
!	5.5.5	Ko-Immunopräzipitation	95
1	5.5.6	Infektion durch Chlamydien	96
1	5.5.7	Oberflächenbiotinylierung chlamydialer, infektiöser EBs	
!	5.5.8	Protein Bindungsstudie an humanen Zellen	
!	5.5.9	PS Scrambling Assays	
!	5.5.10	Proteinanalysen an Humanzellen in Gegenwart chemischer Inhibitoren	
!	5.5.11	Apoptose Assay	
5.6	Mikr	oskopie	105
!	5.6.1	Fixierung und Permeabilisierung von epithelialen Zellen	
!	5.6.2	Differentielle Permeabilisierung von epithelialen Zellen	
ļ	5.6.3	Färbung für die Mikroskopie	

6	ERG	EBNISSE	. 108				
6.1	CPn0473 ist ein chlamydiales Oberflächenprotein108						
6.2	2 CPn0473 adhäriert an ein humanes Protein-haltiges Zelloberflächenmolekül mittels einer 50 AS langen						
Bind	Bindedomäne111						
6.	.2.1	Die CPn0473 Bindung erfolgt in Cholesterin-reichen Domänen	115				
6.3	LIPP	bindet das negativ-geladene Phospholipid Phosphatidylserin	116				
6.4	Die o	hlamydiale Internalisierung ist PS abhängig	120				
6.	.4.1	Chlamydia pneumoniae induziert die Externalisierung von PS an der Wirtszelle					
6.5	CPnC	1473 induziert PS-Externalisierung	127				
6.	5.1	Die rCPn0473-spezifische PS-Externalisierung ist kein Signal für Apoptose	131				
6.	5.2	Die rCPn0473-induzierte PS-Externalisierung wird durch dessen N-Terminus vermittelt	132				
6.6	C. pr	eumoniae induziert PS-Externalisierung durch Oberflächenlokalisiertes CPn0473	136				
6.7	CPnC	0473 interagiert mit der humanen Plasmamembran	138				
6.	.7.1	CPn0473 und die humane Scramblasen	138				
6.	7.2	CPn0473 penetriert die humane Zellmembran	141				
6.	7.3	LIPP transloziert PS von der intra- auf die extrazelluläre Membranseite	149				
7	DISK	KUSSION	. 153				
7.1	Die E	Bindung des chlamydialen Adhäsins LIPP	154				
7.	1.1	LIPP bindet initial einen proteinösen humanen Interaktionspartner	154				
7.	1.2	LIPP bindet das Negativ-geladene Phospholipid Phosphatidylserin	155				
7.2	Phos	phatidylserin, ein Lipid essentiell in der chlamydialen Infektion	160				
7.	.2.1	Die chlamydiale Infektion ist Phosphatidylserin-abhängig	160				
7.	.2.2	Chlamydien externalisieren Phosphatidylserin in der Wirtszell-Membran früh in der Infektio	on 161				
7.3	Aufo	den Spuren des Mechanismus von LIPP	164				
7.	3.1	LIPP induziert die Externalisierung von Phosphatidylserin	164				
7.	3.2	LIPP penetriert die humane Plasmamembran um Phosphatidylserin zu externalisieren	168				
7.	.3.3	LIPP externalisiert Phosphatidylserin	174				
7.4	LIPP,	die chlamydiale Phosphatidylserin-Translokase	177				

LITE	RATURVERZEICHNIS	181	
8	ANHANG	195	
Zusät	zliche Abbildungen		195
Manı	ıskripte:		198
		244	
ARRI	LDUNGSVERZEICHNIS	211	
DAN	KSAGUNG	213	
EIDE	SSTATTLICHE ERKLÄRUNG	215	

Abkürzungsverzeichnis

- °C Grad Celsius
- μg Mikrogramm
- μl Mikroliter
- µm Mikromolar
- AP Alkalische Phosphatase
- AS Aminosäure
- ATP Adenosintriphosphat
- BCIP 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
- BD Bindedomäne
- Bp Basenpaar
- BSA Kälberserum Albumin
- CFSE Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
- cm² Quadratzentimeter
- cOMC chlamydialer Außenmembrankomplex (chlamydia outer membrane complex)
- dd deionisiert
- DNA Desoxyribonukleinsäure
- dNTP Desoxynukleosid-5`-Triphosphat
- DOPA Phosphatidsäure
- DOPC Phosphatidylcholin
- DOPE Phosphatidylethalonamin
- DOPS Phosphatidylserin
- dRI Brechungsindex
- EB Elementarkörperchen (elementary body)

- et al. und andere
- FM Lichtstreuung
- FKS Fötales Kälberserum
- g Gramm
- GAG Glykosaminoglykan
- GST Glutathion-S-Transferase
- GUV Giant unilamellar vesicle
- h Stunde(n) (hour)
- hpi Stunde(n) nach Infektionsbeginn (hours post infection)
- IED Infektionserhöhende Domäne
- IFU Einschluss-bildende Einheit (inclusion forming unit)
- IPTG Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
- Kb Kilobase
- kDa Kilodalton
- l Liter
- lo Membranphase hoher Ordnung (Lipid Raft)
- ld Memembranphase niedriger Ordnung
- LGV Lymphogranuloma venereum
- LPS Lipopolysaccharid
- M molar
- mg Milligramm
- Min Minute(n)
- ml Milliliter
- mM millimolar
- MOI Multiplizität der Infektion (multiplicity of infetion)

- MβCD Methyl-□-Cyclodextrin
- NBT Nitro Blue Tetrazolium
- ng Nanogramm
- OD Optische Dichte
- OmcB Außenmembran Komplex Protein B
- PBS Physiologischer Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
- PA Phosphatidsäure
- PC Phosphatidylcholin
- PCR Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
- PE Phosphatidylethalonamin
- PIP Phosphatidylinositol
- Pmp Polymorphes Membran Protein
- PS Phosphatidylserin
- RB Retikularkörperchen (reticulate body)
- RT Raumtemperatur
- SDS Sodeumdodecylsulfat
- SID Selbstinteraktionsdomäne
- Sek Sekunde
- TM Transmembrandomäne
- U Einheiten (Units)
- ü/N über Nacht
- Upm Umdrehungen pro Minute
- UV Ultraviolettes Licht
- x g x-fache Erdbeschleunigung

1 Zusammenfassung

Für das Gram-negative, obligat intrazelluläre Pathogen *Chlamydia pneumoniae* (*C. pn.*) sind Adhäsion und die darauffolgende Internalisierung die ersten essentiellen Schritte im Infektionszyklus. Neben dem Außenmembran-Protein OmcB, welches an Glykosaminoglykane bindet, und dem Polymorphen Membran-Protein 21 (Pmp21), welches mit dem humanen EGF-Rezeptor (EGFR) interagiert, konnte CPn0473 als weiteres *C. pn.*-spezifisches Adhäsin identifiziert werden. Interessanterweise stimuliert rekombinantes CPn0473 (rCPn0473) Dosis-abhängig die chlamydiale Internalisierung über einen unbekannten Mechanismus. Die Bindung des Proteins an die Humanzelle erfolgt über eine 50 Aminosäuren (AS) lange Bindedomäne im C-Terminus, während die Stimulation der Internalisierung durch eine 150 AS lange Domäne im N-Terminus vermittelt wird. In dieser Arbeit sollte das Protein CPn0473 im Detail studiert und seine Rolle während der Adhäsion und Internalisierung von *C. pn.* aufgeklärt werden.

Bindeassays an Proteinase K-vorbehandelten Humanzellen zeigten, dass der erste Kontakt von rCPn0473 mit Oberflächenproteinen der Wirtszelle erfolgt. Das Protein integriert daraufhin über eine Transmembrandomäne (TM) im C-Terminus (AS 396-426) in die humane Plasmamembran (PM). Diese Domäne ist auch für die Interaktion des Proteins mit anderen rCPn0473-Proteinen essentiell. Durch konfokale Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass sowohl Chlamydien als auch rCPn0473 das negativ-geladene Lipid Phosphatidylserin (PS), welches auf der inneren Seite der humanen PM lokalisiert ist, in Cholesterin-reichen Regionen zu externalisieren. Die Humanzellen zeigten dabei kein Anzeichen einer Induktion der Apoptose. CPn0473 bindet spezifisch an PS-haltige Giant unilamellar vesicles (GUVs). Die PS-Translokation an der humanen Zelle und die Bindung des Lipids werden dabei durch die gleiche CPn0473Domäne vermittelt, die auch für die Stimulation der chlamydialen Internalisierung verantwortlich ist. Eine Erhöhung der CPn0473-Moleküle auf der chlamydialen EB Oberfläche durch mit rCPn0473 erhöhte in der folgenden Infektion die PS-Translokation an der humanen PM. Darüber hinaus konnte in Experimenten mit asymmetrischen GUVs gezeigt werden, dass die Bindung von rCPn0473 die PS-Translokation vermittelt.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein neuer Mechanismus der chlamydialen Internalisierung identifiziert werden. CPn0473 ist dabei das erste Protein, welches von der extrazellulären Seite an die PM einer Wirtszelle bindet und die Translokation eines Lipids induziert.

2 Summary

For the Gram-negative, obligate intracellular pathogen *Chlamydia pneumoniae* (*C. pn.*) adhesion and subsequent internalization into the host cell is essential for the progression of the infection cycle. *C. pn.* adheres via the OmcB to heparan sulfate moieties, while Pmp21 binds and activates the human EGF receptor. Recently, CPn0473 was identified as an additional *C. pn.*-specific adhesin located on the surface of infectious EBs. In contrast to classical adhesins, pre-incubation of human cells with recombinant CPn0473 (rCPn0473) prior to an infection does not lead to a reduced infectivity but rather boosts chlamydial internalization. Binding to the host cell is realized by a 50 aa long binding-domain in the C-Terminus, while the infection boost is accomplished by a 150 aa long N-terminal CPn0473 domain. This study aimed to investigate the protein CPn0473 in more detail and elucidate its role in the chlamydial adhesion and internalization processes.

Binding assays with Proteinase K-treated human cells suggested that the first contact of CPn0473 with the human cell is fulfilled by binding to a protein or protein-associated molecule on the human cell surface. Bound to the host PM, rCPn0473 penetrates the host plasma membrane (PM) via a C-terminal transmembrane domain (TM). The same domain is essential for an observed self-interaction of the protein. Microscopic analysis showed that rCPn0473 then induces externalization of the negatively-charged phospholipid phosphatidylserine (PS) in cholesterol-enriched liquid ordered phases of the PM. Classical apoptotic markers in the host cell were not activated during this process. In GUV binding assays, lipid binding by rCPn0473 occurred via the infection-enhancing, N-terminal CPn0473 domain. PS, usually restricted to the inner leaflet of the PM, became externalized within minutes after adhesion of *C. pn.* An increase of accessible CPn0473 by coating of chlamydial EBs with rCPn0473 prior to an infection increased infectivity and the rate of externalization dose-dependently. A reduced level of PS in the host cell diminished rCPn0473 with asymmetric GUVs indicated, that CPn0473 itself is able to externalize PS without help of additional proteins.

Overall, the data show that CPn0473 is able to bind and externalize PS in the host PM in order to promote the uptakes of *C. pn*. By that, CPn0473 is the first bacterial protein which binds to the extracellular leaflet of the host cell in order to translocate host cell phospholipids.

3 Einleitung

3.1 Die Humane Plasmamembran

Membranen bestehen zu etwa gleichen Teilen aus Proteinen und Lipiden. Ihre spontane Assemblierung verdanken die Membranen dabei der Eigenschaft der partiell hydrophoben Phospholipide. Phospholipide sind amphipathisch, das heißt sie besitzen sowohl hydrophile, als auch hydrophobe Eigenschaften. Sie bestehen aus einem hydrophilen Kopf und sind über eine Phosphatgruppe mit zwei hydrophoben Fettsäureschwänzen verbunden. Die Länge der Fettsäureschwänze ist dabei variabel. Aufgrund des wasserabweisenden Charakters der Fettsäuren bilden die Lipide in wässrigen Lösungen eigenständig komplexe Strukturen, wobei sie sich dabei so orientieren, dass ihre Fettsäureschwänze vor der wässrigen Lösung verborgen sind. Dabei können sich drei unterschiedliche Strukturen ergeben (Abb. 3.1A): Die Mizellen sind runde, einlagige Membranstrukturen mit einem Durchmesser von wenigen Nanometern. Die Fettsäureschwänze der Lipide interagieren dabei sehr eng miteinander, sodass kein Volumen durch die Lipide eingeschlossen wird. Die Liposomen, oder Vesikel, sind ebenfalls rund bestehen aber aus einer Lipiddoppelschicht. Aufgrund der Anordnung der Lipide in zwei Schichten sind diese Konstrukte deutlich größer und in der Lage, ein größeres Volumen einzuschließen. Sie variieren von Größen zwischen einigen Nanometern bis hin zu mehreren Mikrometern im Durchmesser. Diese Art der Lipid-Assemblierung wird in der Forschung häufig für experimentelle Zwecke künstlich hergestellt, um Protein-Lipid Wechselwirkungen zu untersuchen (Pautot, Frisken et al. 2003, Weinberger, Tsai et al. 2013). Zusätzlich können sich Lipide in einer großen, planaren Form anordnen, welche ebenfalls aus zwei sich gegenüberstehenden Schichten besteht und die Grundlage der biologischen Membranen, wie der Plasmamembran und den Endomembranen, darstellt. Auf diese Weise schaffen Membranstrukturen distinkte Räume mit unterschiedlichen physiologischen Parametern, um diverse enzymatische Prozesse zu erlauben. Integrale Membranproteine durchdringen die Phospholipidmembran und regulieren den Transport über diese hinweg. Periphere Membranproteine durchdringen die Membran nicht sondern lagern sich nur an diese an. Dort lokalisiert führen diese Proteine diverse Funktionen wie enzymatische Prozesse oder Signalweiterleitung aus. So trennt beispielsweise die mitochondriale Membran das Zytosol der Wirtszelle vom Intermembranraum und der Mito-Matrix und ermöglicht über einen Protonengradienten die Produktion von Energie in Form von ATP. Die Kernmembran isoliert die DNA und die ER- und Golgi-Membranen schaffen Räume für vielfältige Modifikation von Proteinen. In Vesikeln wie Lysosomen begrenzen Membranen Räume mit harschen Bedingungen, wie einem niedrigen pH zum Abbau von zelleigenen Komponenten oder Pathogenen. Neben der Separierung intrazellulärer Kompartimente, dient die Membran aber auch dem Schutz und der Abgrenzung des Zellinneren vom extrazellulären Raum. Diese Membranstruktur wird Plasmamembran genannt und ist nicht nur einfach eine Barriere, sondern auch eine hochkomplexe Kommunikationsplattform. Die Membranen der Pro- und Eukaryoten sind asymmetrisch aufgebaut und setzen sich aus vier Haupt-Phospholipid-Klassen zusammen: Cholin-haltige Lipide wie das Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SM) bilden das Lipid-Rückgrat der äußeren Membranseite, während die Aminophospholipide Phosphatidylethalonamin (PE) und Phosphatidylserine (PS) in gesunden Zellen auf der inneren Membranseite lokalisiert sind. Die Asymmetrie ist von fundamentaler Bedeutung für diverse Funktionen in der Zelle, wie dem endosomalen Transport oder der Rekrutierung von peripheren Membranproteinen. Zusätzlich finden sich auf der inneren Seite auch noch diverse Mitglieder der Gruppe der Phosphatidylinositole (PIPs) (Abb. 3.1B). Je nach Phosphorylierungsgrad unterscheidet man bei den PIPs zwischen den einfach phosphorylierten Phosphatidylinositol-3-phosphat Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI3P), (PI4P), Phosphatidylinositol-5-phosphat (PI5P), den zweifach-phosphorylierten Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat $(PI(3,5)P_{2})$ Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat $(PI(3,4)P_2),$ Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ($PI(4,5)P_2$) und den dreifach phosphorylierten Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃). Während PI3P und PI(4,5)P₂ Bestandteile der Plasmamembran darstellen, sind die anderen Mitglieder der PIP-Familie in den Membranen des endosomalen Netzwerks lokalisiert. Die PIPs spielen daher für den Vesikeltransport innerhalb der Zelle eine wichtige Rolle (Jean and Kiger 2012). Die bakterielle und die eukaryotische Plasmamembran unterscheidet sich insbesondere durch die höhere Komplexität der eukaryotischen Membran (Tab.: 3.1). Während sich die Membran der Eukaryotischen Zellen aus der Vielzahl der oben aufgezählten Lipide zusammen setzt, besteht die bakterielle Plasmamembran, am Beispiel von E. coli, vornehmlich aus Phosphatidylethalonamin (PE) (etwa 80 % der totalen Lipidmasse), (Yeagle 1993). Auch die chlamydiale Membran besteht hauptsächlich aus dem Phospholipid PE. Interessanterweise zeigt die chlamydiale Membran, bezogen auf die Lipidkomposition, aber auch Ähnlichkeiten zu eukaryotische Membranen (Hatch and McClarty 1998). Chlamydien sind in der Lage, die Bakterien-typischen Phospholipide PE, Phosphatidylglycerin (PG) und PS selbständig zu synthetisieren. Die Eukaryoten-typischen Lipide PC, PIPs und Cholesterin werden aus der Wirtszelle akquiriert und dienen den Bakterien wahrscheinlich zur Nachahmung eukaryotischer Zellen (Hatch and McClarty 1998, Carabeo, Mead et al. 2003).

Tab.: 3.1: Lipidzusammensetzung verschiedener Phospholipid Membranen.

Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethalonamin (PE), Phosphatidylinositol (PIPs), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidsäure (PA), Phosphatidylglycerin Sphingomyelin (SM), Cholesterin (Chol)

(17), Thosphalayigiyeenn sphiligennyenn (swi), cholesterni (chol)								
Membrantyp	PC	PE	PIPs	PS	PA	PG	SM	Chol
Plasmamembran von Fibroblasten	43,2 %	16,1 %	7,6 %	6,4 %	1,5 %		12,2 %	13 %
(Pankov, Markovska et al. 2006)								
Plasmamembran von S. cerevisiae	16,8 %	20,3 %	17,7 %	33,6 %	3,9 %			
(Zinser, Sperka-Gottlieb et al. 1991)								
mitochondriale Membran S. cerevisiae	45,6 %	32,6 %	10,2 %	1,2 %	4,4 %			
(Zinser, Sperka-Gottlieb et al. 1991)								
ER-Membran S. cerevisiae (Zinser,	51,3 %	33,4 %	7,5 %	6,6 %	0,2 %			
Sperka-Gottlieb et al. 1991)								
Innere und äußere Membran von E.		75 %				25 %		
coli (Morein, Andersson et al. 1996)								
Membran aufgereinigter chlamydialer	30 %	50 %	5 %	<1%		12, 5 %	2,5 %	
EBs (Hatch and McClarty 1998)								
Membranhülle von HIV (Brugger, Glass	16 %	35,2 %		15,5 %			33,1 %	
et al. 2006)								

In eukaryotischen Membranen machen die Phospholipide etwa 50 - 60 % der Lipidmasse aus. Der Rest der Lipide besteht aus den Zucker-modifizierten Lipiden, Glykolipide genannt, und Cholesterin. Neben den Lipiden bilden Proteine die zweite wichtige Komponente in Membranen. Sie dienen, dem Zell-Zell-Kontakt, der Signalweiterleitung über die Membran hinweg und dem Transport von kleinen und größeren Molekülen. Außerdem dienen sie der Verankerung des kortikalen Aktin Zytoskeletts auf der inneren, zytosolischen Membranseite, sowie dem Aufbau der Glykokalyx (Abb. 3.1B). Die Glykokalyx umfasst alle Lipid- und Proteinassoziierten Zuckermoleküle auf der äußeren, extrazellulären Membranseite. Beide Komponenten dienen der Stabilität der Membran und beschränken die Bewegungen innerhalb dieser auf distinkte Bereiche. Denn die Lipide und Proteine in der Plasmamembran sind nicht starr verankert, sondern können sich lateral bewegen (Singer and Nicolson 1972). Dabei ist die Beweglichkeit der Membrankomponenten direkt von der Fluidität der Membran abhängig. Diese wird durch die Zusammensetzung der Membran selbst definiert. So bewirkt die Anwesenheit von Cholesterin in tierischen Membranen eine lokale Versteifung. Dies ist darin begründet, dass Cholesterin einen rigiden Carbonring aufweist, welcher mit den Fettsäureschwänzen der angrenzenden Lipide interagiert. Dem gegenüber sorgt die Anwesenheit von Lipiden mit kurzkettigen Fettsäureschwänzen für eine fluidere Membranregion (Cooper 2000). Man unterscheidet in der Plasmamembran zwei Hauptphasen: Die geordneten Phasen (*Liquid-ordered*-Phasen, Lo-Phasen), manchmal auch mit dem Begriff Lipid Raft beschrieben und den ungeordneten Phasen (*Liquid-disordered*-Phasen, Ld-Phasen). Die Lo-Phasen zeichnen sich durch eine erhöhte Cholesterin- und Sphingolipid-Dichte, sowie eine Akkumulation von Glycosylphosphatidylinositol-verankerten Proteinen (GPI-Proteinen) aus. Sie sind gegenüber den Ld-Phasen deutlich dichter gepackt und weniger fluid (Simons and Ikonen 1997)). Innerhalb dieser Lo-Phasen akkumulieren viele Proteine, welche an Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind, sodass Lo-Phasen als Interaktionsplattform und zur lokalen Maximierung von Signalen dienen (Simons and Toomre 2000, Owen, Magenau et al. 2012)

3.1.1 Lipid Transporter

In die Phospholipidmembranen der Zelle eingebettet sind diverse Proteine. Unter den Membranproteinen wird zwischen den folgenden Klassen unterschieden: Rezeptoren sorgen für die Signalweiterleitung, während Transporter dem Austausch von kleinen Molekülen über die Membran hinweg dienen. Für die Aufrechterhaltung der im vorigen Kapitel beschriebenen Lipid Asymmetrie sorgen spezielle Lipid-Transporter. In humanen Zellen sind drei unterschiedliche Klassen von Proteinen beschrieben, die am Transport der Lipide beteiligt sein sollen (Abb. 3.1B). So unterscheidet man einmal zwischen Proteinen, die Lipide ausschließlich auf die zytoplasmatische Seite transportieren können, sogenannten Flippasen, und jenen Proteinen, die Lipide auf die Zytosol abgewandte Seite der Membrane transportieren können, den Floppasen. Die dritte Gruppe der Lipid Transporter, genannt die Scramblasen, sind in der Lage Lipide bidirektional zu transportieren (Bevers and Williamson 2010).



Abb. 3.1: Aufbau einer Phospholipidmembran. A: Schematische Darstellung einer Phospholipidstruktur (links) und möglicher Ausrichtungen dieser in Membranen. Von links nach rechts: eine Micelle, ein Liposom und eine planare Membran im Querschnitt. B: Schematische Darstellung der Lipidzusammensetzung der inneren und äußeren Seiter einer humanen Plasmamembran und der darin integrierten Lipid Transporter. Die Transportrichtung der Lipide und eine eventuelle Energie-Abhängigkeit sind in der Abbildung eingezeichnet.

Im Folgenden werden die drei Klassen der Lipid Transporter anhand einiger Beispiele genauer erläutert. Die bisher identifizierten und verifizierten humanen Flippasen, die Lipide von der extrazellulären auf die intrazelluläre Seite transportieren können, sind in der Gruppe der Typ-4 ATPasen zusammengefasst. Gemeinsam mit Ionen- und Metall-Transportern bilden sie die Gruppe der membranständigen P-Typ ATPasen und konnten sowohl in Bakterien als auch Archaeen und eukaryotischen Zellen identifiziert werden (Tang, Halleck et al. 1996, Yabas, Teh et al. 2011, Sebastian, Baldridge et al. 2012). Allen Mitgliedern der Typ-4 ATPasen Familie ist gemein, dass ihre Aktivität sowohl ATP- als auch Calcium-abhängig ist. Des Weiteren benötigen sie für ihre korrekte Lokalisierung in der Membran und ihre Funktionalität eine Reihe weiterer Proteine, insbesondere Proteine der CDC50 Familie (Saito, Fujimura-Kamada et al. 2004, Lenoir, Williamson et al. 2009), sowie auch ein Netzwerk verschiedener Kinasen (Nakano, Yamamoto et al. 2008, Roelants, Baltz et al. 2010)). Mehr als 100 Mitglieder der CDC50Familie sind in eukaryotischen Zellen bereits identifiziert, wobei unbekannt ist, ob alle an der Verteilung der Lipide tatsächlich beteiligt sind (Halleck, Lawler et al. 1999). ATP11C ist ein Mitglied der Typ-4 ATPasen und wird in Zellen jeden Gewebes exprimiert. Das Protein lokalisiert, unterstützt durch das Chaperon CDC50A, in der Plasmamembran und in endosomalen Membranen und ist in der Lage, PS entgegen des Konzentrationsgefälles auf die zytoplasmatische Membranseite zu transportieren (Leventis and Grinstein 2010, Segawa, Kurata et al. 2014). Auch in apoptotischen Zellen und aktivierten Blutzellen soll ATP11C eine Rolle spielen (siehe Kapitel 3.1.3.1). Die humanen Proteine ATP8A und B, sowie die Hefe-Proteine Drs2p und Dnf3p sind weitere bereits untersuchte Typ-4 ATPasen, denen eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Lipid-Asymmetrie und dem endosomalen Transport zugeschrieben werden konnte (Alder-Baerens, Lisman et al. 2006, Paterson, Renkema et al. 2006).

Der direkte Counterpart der Flippase, Floppase genannt, bezeichnet einen Transporter, der in der Lage ist, Lipide von der inneren auf die äußere Membranseite zu transportieren. Es sind bis heute nur wenige Floppasen beschrieben. Initial identifiziert als Transporter für kleine Moleküle konnte in weiteren Studien gezeigt werden, dass einige Mitglieder der Multidrug resistance Protein (MDR) Familie die Fähigkeit haben, Lipide über die Membran hinweg zu transportieren. So konnte gezeigt werden, dass MDR4 Phosphatidylcholin (PC) von der inneren auf die äußere Membranseite externalisiert. Dabei scheint die Aktivität von MDR4 einen direkten Einfluss auf die Aktivität der Flippase ATP8B1 zu haben (van Helvoort, Smith et al. 1996, Groen, Romero et al. 2011). Das Multidrug Resistance-Related Protein 1 (MRP1) hingegen transportiert die Lipide PC und PS auf die äußere Membranseite. Ein Knockout von MRP1 resultiert in einem Verlust der Translokation der beiden Lipide in Mäusezellen (Dekkers, Comfurius et al. 1998, Huang, Chang et al. 2004). Diese Prozesse sind, wie auch bei den Flippasen, ATP-abhängig. Gleichzeitig zeigt sich im Falle von MRP1 auch eine Magnesium-Abhängigkeit.

Bei den bidirektionalen Lipid-Transportern unterscheidet man zwischen den ATP-abhängigen ABC Transportern und den ATP-unabhängigen Scramblasen. ABC Transporter durchspannen die Membrane mit Hilfe von sechs transmembranen Helices und besitzen zwei Nukleotid Bindedomänen auf der inneren Membranseite. Sie transportieren neben Phospholipiden auch Sterole wie das Cholesterin. Die ABC Transporter werden aufgrund ihres Vorkommens und ihrer Lipid-Spezifität in verschiedene Unterklassen unterteilt. So können Mitglieder der ABCAA Familie PS von einer Membranseite auf die gegenüberliegende Seite transportieren. Sie können gleichmäßig in der Plasmamembran verteilt und in allen Zelltypen gefunden werden (Hamon, Broccardo et al. 2000, Smith, Waelde et al. 2002). Mitglieder der ABC B Familie hingegen sitzen an den apikalen Enden polarisierter Zellen und sind PC-spezifisch (van Helvoort, Smith et al. 1996). PC wird auch von Mitgliedern der ABCC und G Familie transportiert. Zusätzlich transportieren diese Transporter aber auch noch Sphingolipide (ABC C Familie) oder PS im Falle der ABC G Transporter (Kamp and Haest 1998, Raggers, van Helvoort et al. 1999, Dekkers, Comfurius et al. 2000, Woehlecke, Pohl et al. 2003). ABC Transporter sind auch in Prokaryoten vertreten. So transportiert der MsbA Transporter in Gram-negativen Bakterien das Lipid A, ein essentielles Glykolipid der äußeren Membran (Davidson and Chen 2004, Reyes and Chang 2005). Auch Scramblasen transportieren Lipide bidirektional, allerdings ATP-unabhängig von einer Seite der Membran auf die andere. Eine Gruppe konstitutiv aktiver Scramblasen reguliert die Verteilung von neu synthetisierten Lipiden in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Eine weitere Gruppe von Scramblasen lokalisiert in der Plasmamembran der Zellen und ist in gesunden Zellen inaktiv. Erst nach Induktion durch einen spezifischen Stimulus werden die Scramblasen aktiviert. Als erstes identifiziert worden ist die Familie der PLSCR (Phospholipid Scramblasen) mit insgesamt fünf Mitgliedern. Auch wenn ihre Scramblase Aktivität an Liposomen in Abhängigkeit von Calcium gezeigt werden konnte, ist ihre Rolle in der Zelle bis jetzt noch immer nicht aufgeklärt (Basse, Stout et al. 1996, Zhou, Zhao et al. 1997). Weitere beschriebene Scramblasen sind die beiden Proteine TMEM16F und Xkr8, welche PS in der humanen Plasmamembran externalisieren können (Kodigepalli, Bowers et al. 2015). Beide Scramblasen wurden erst in den letzten Jahren identifiziert, sind aber die am besten charakterisierten Scramblasen. Beiden konnte bereits eine physiologische Rolle in der Zelle nachgewiesen werden. TMEM16F induziert die PS Externalisierung in differenzierenden Blutzellen bei der Blutgerinnung, während Xkr8 die PS Externalisierung in apoptotischen Zellen induziert. Beide Scramblasen werden in Kapitel 3.1.3 im Detail vorgestellt.

Interessanterweise ist weder geklärt, wie die Lipid-Transporter mit den Lipiden interagieren, noch der Mechanismus, mit dem das jeweilige Lipid auf die andere Membranseite transportiert wird. Auch ist deren tatsächliche Rolle in der Verteilung der Lipide und der Aufrechterhaltung der Lipid-Asymmetrie teilweise nicht zweifelsfrei bewiesen. So finden sich wiedersprechende Publikationen, wie beispielsweise im Falle der Flippasen Dnf1p und Dnf2p aus der Hefe *S. cerevisiae*. Zunächst als potentielle Phosphatidylserin (PS)-Flippasen beschrieben (Pomorski, Lombardi et al. 2003), wurden in weiterführenden Studien ein nennenswerter Effekt auf die Translokation von PS wieder revidiert (Stevens, Malone et al. 2008). Ein ähnliches Beispiel zeigt die Studie an der Phospholipid-Scramblase 1 (PLSCR1), welche zunächst in Liposomen-Experimenten als Lipid-Transporter für die PS Externalisierung in apoptotischen Zellen vorgeschlagen wurde (Basse, Stout et al. 1996), dessen Rolle in der Apoptose in nachfolgenden Knock-out Experimenten allerdings wieder ausgeschlossen wurde (Zhou, Zhao et al. 1997).

3.1.2 Lipid Bindedomänen

Die Bindung von Proteinen an Lipide geschieht über definierte Regionen der Proteine. Auch wenn die Bindedomänen der Lipidtransporter aus dem vorangegangenen Kapitel noch nicht identifiziert werden konnten, sind dennoch bereits zahlreiche Lipid-Bindedomänen anderer Proteine in Pro- und Eukaryoten beschrieben. Fast alle diese Domänen besitzen eine kationische Region innerhalb der Bindedomäne, um mit den meist anionischen oder negativgeladenen lipidösen Interaktionspartnern zu interagieren. Einige zeigen eine hohe Selektivität, andere binden die Membran unspezifisch, ausgelöst beispielsweise durch Membrankrümmungen oder Ladung der Membran.

Die ersten Lipidbindedomänen wurden an der Protein-Kinase C identifiziert und werden C1 und C2 Domäne genannt (Takai, Kishimoto et al. 1979). Die C1 Domäne besteht aus etwa 50 Aminosäuren, ist Cystein-reich und zeichnet sich durch fünf β -Helices, fünf α -Helices, sowie zwei Zink-Ionen aus (Arkhipov, Yin et al. 2008, Blumberg, Kedei et al. 2008). Über aromatische und hydrophobe Aminosäurereste interagiert und penetriert die C1 Domäne die Membran. Diese Protein-Lipid Interaktion dient als Vorbereitung zu nachfolgenden Interaktionen mit membranständigen Proteinen, wie dem Diacylglycerin (DAG) (Medkova and Cho 1999) Die C2 Domänen umfassen etwa 130 Aminosäuren, die in acht antiparallelen Strängen eine β-Sandwich-Struktur ausbilden. Innerhalb dieser Struktur interagieren Aminosäuren einer kationischen β-Furche mit der Membran, entweder mit dem Sphingolipid Ceramid-1-Phosphat oder mit dem Phosphatidylinositol PI(4,5)P2, (Corbalan-Garcia, Garcia-Garcia et al. 2003, Cho and Stahelin 2006, Stahelin, Subramanian et al. 2007). Die C2-Domänen binden Lipide ausschließlich in Anwesenheit von Calcium und wurden zumeist bei peripheren und nur selten bei integralen Membranproteinen identifiziert (Davis, Doherty et al. 2002). Die C2 Domäne ist die zweithäufigste Lipid-Bindedomäne (Stahelin 2009). Auch die Annexin-Proteinfamilie bindet Lipide über eine C2-Domäne. Sie sind beteiligt an der Membrankrümmung, sowie der Endound Exozytose von Vesikeln. Annexin V5 wird darüber hinaus auch in der Forschung als Marker Protein für externalisiertes PS verwendet. Leicht zu verwechseln, aber gänzlich verschieden ist die Klasse der diskoiden C2-ähnlichen Lipidbindedomänen, wie sie bei dem Milchprotein Lactadherin oder dem Blutgerinnungsfaktor 8 gefunden wurde. Die diskoide C2 Domäne besteht meist aus einer einfachen α -Helix und ermöglicht dem Protein die Bindung von Phosphatidylserin in Abwesenheit von Calcium (Shi, Heegaard et al. 2004).

Die häufigste Lipid-Bindedomäne ist die Pleckstrin Homologie (PH) Domäne. Sie wurde als allererstes im Protein Pleckstrin identifiziert und war damals die erste nachgewiesene Phosphatidylinositol-Bindedomäne (Ferguson, Lemmon et al. 1995, Stahelin 2009). Die Bindung an die Membran erfolgt zunächst unspezifisch durch elektrostatische Wechselwirkungen über aliphatische Aminosäuren. Dies sind Aminosäuren, wie Alanin, Valin, Leucin und Isoleucin mit mehreren offenen, hydrophoben und kettenförmigen Kohlenwasserstoffketten. Daraufhin erfolgt die spezifische Bindung an PIP3, PI(4,5)P₂, oder PI(3,4)P2 über das basische Aminosäuremotiv [K-Xn-(K/R)-X-R], wobei K für Lysin und R für Arginin steht. Beide Aminosäuren scheinen eine zentrale Rolle bei der Interaktion der Domäne mit der Kopfgruppe der Phosphatidylinositole über Wasserstoffbrückenbindungen zu spielen (Lemmon 2007, Manna, Albanese et al. 2007).

Viele der Signal- und Transportproteine im endosomalen Netzwerk besitzen eine FYVE-Domäne (Eab1, YOTB, Vac1 und EEA1) zur Interaktion mit dem Phosphatidylinositol PI(3)P in der endosomalen Membran. Die Bindung erfolgt durch ein etwa 70 Aminosäure langes Zink-Finger-Motiv (Burd and Emr 1998, Gaullier, Simonsen et al. 1998). Die Bindung wird darüber hinaus durch elektrostatische Wechselwirkungen mit negativ-geladenen Lipiden, sowie der Penetration der Membran durch das Protein verstärkt (Patki, Lawe et al. 1998, Diraviyam, Stahelin et al. 2003). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Interaktion der FYFE-Domäne mit der endosomalen Membran ausschließlich bei saurem pH erfolgt (Lee, Eyeson et al. 2005). Eine weitere PI(3)P-spezifische Bindedomäne ist die etwa 130 Aminosäure lange PX Domäne. Viele der PX-Domänen-Proteine sind an der Vesikel-Sortierung, der Exozytose und der Endozytose beteiligt. Die PX-Domäne bindet PI(3)P allerdings pH-unabhängig durch das Zusammenspiel einer Prolin-reichen Region (PxxP) und einer SH 3 Domäne (Kutateladze 2007). Zusätzliche hydrophobe Proteinabschnitte sorgen für die Insertion des Proteins in die Membran (Malkova, Stahelin et al. 2006). Die Proteine mit ENTH (Epsin N-terminale Homologie)-, ANTH- oder BAR (Bin–Amphiphysin– Rvs)-Domänen zeichnen sich weniger durch Lipid-Spezifität als durch das Erkennen von spontanen oder induzierten Membrankrümmungen aus. Die Domänen adhärieren über amphipathische Helices an die gekrümmte Membran und induzieren daraufhin weitere Membranverformungen (Itoh and De Camilli 2006). BAR Domänen fungieren auch als Verbindung zwischen der Plasmamembran und dem Zytoskelett und sind in der Lage, die Polymerisation von Aktinfilamenten zu initiieren. Die ENTH Domänen hingegen induzieren die Polymerisation von Clathrin an der Membraninnenseite.

3.1.3 Membranveränderungen

Eine Membran kann auf vielfältige Weise verändert werden. So verändert die Anwesenheit von Cholesterin beispielsweise die Steifheit der Membran und induziert geordnete Membranphasen (lo-Phasen). Dessen Abwesenheit, sowie die Ansammlung von Lipiden mit kurzkettigen Fettsäureresten lockert die Membran und schafft ungeordnete Phasen (ld-Phasen). Die Identität Membran kann darüber hinaus auch durch die einer Phosphorylierung von Phosphatidylinositolen (PIPs) und die Rekrutierung von Membran-bindenden Proteinen verändert werden. In diesem Kapitel soll allerdings die Veränderung der Membranzusammensetzung durch Lipidtranslokation und dessen Auswirkungen auf die Zelle erläutert werden. So können Bindestellen für (Signal-) Proteine entstehen oder wegfallen, oder die Membranspannung verändert werden, was zu einer Membranverformung führen kann. Die am besten untersuchte Membranmodulation ist der Transport von Phosphatidylserin auf die extrazelluläre Seite. Auf der Oberfläche apoptotischer Zellen dient das PS als "Eat me"-Signal für Makrophagen. Während der Blutgerinnung ist die PS Externalisierung auf der Blutzelloberfläche eine essentielle Voraussetzung für deren Differenzierung. Beiden Prozessen gemein ist die Aktivierung von Scramblasen zur PS Externalisierung bei zeitgleicher Deaktivierung von Flippasen, um den Rücktransport von PS auf die intrazelluläre Membranseite zu verhindern. Sie unterscheiden sich allerdings darin, dass die PS Externalisierung in aktivierten Blutzellen Calcium-abhängig ist, während der apoptotische Signalweg unabhängig vom intrazellulären Calcium Level reguliert wird.

Es gibt darüber hinaus einige Anhaltspunkte, dass die Insertion von Proteinen in die Plasmamembran eine Lipid-Translokation auslösen kann. So induziert das Toxin Adenylatcyclase von *Bordetella pertussis* nach Insertion in eine Membran dessen Permeabilisierung, was zu einem unspezifischen Transport von Lipiden führt (Martin, Requero et al. 2004). Auch das Toxin Melittin der Biene (*Apis mellifera*), ein 2850 Dalton großes natürliches Peptid, inseriert über eine hydrophobe, teils kationische α -Helix in artifizielle Phospholipid-Membranen und induziert darüber einen unspezifischen Transport von Lipiden (Smith, Separovic et al. 1994, Anglin, Brown et al. 2009). Ähnlich verhält es sich mit speziell angefertigten synthetischen Peptiden, bei denen nach Insertion in artifizielle Membranen ein unspezifischer Transport von Lipiden aufgezeigt werden konnte (Boon and Smith 2001, Boon and Smith 2002). Ob in diesen Fällen eine direkte Interaktion zwischen Protein und Lipid notwendig ist, wurde bis jetzt nicht untersucht.

Bei der Differenzierung von Blutzellen während der Blutgerinnung spielt die Externalisierung von PS eine wichtige Rolle (Bevers, Comfurius et al. 1983). Für diese Membranveränderung konnte dem Protein TMEM16F, einem Mitglied der TMEM16 Familie, eine Rolle nachgewiesen werden (Suzuki, Umeda et al. 2010). Die TMEM16 (Anoctamin) Familie umschreibt eine Gruppe von Chlorid-Kanälen. Diese sind über alle Zelltypen, von Epithel-, über Muskel bis hin zu Nervenzellen, verteilt, wobei bislang nur für TMEM16A und B tatsächlich eine Chlorid Kanalfunktion nachgewiesen werden konnte. Die Proteine lokalisieren über acht Transmembrandomänen in der Plasmamembran, wobei sowohl der N- als auch C-Terminus zytosolisch lokalisiert ist (Galietta 2009). Eine Scramblase-Aktivität konnte für die TMEM16 Proteine C, D, F, G und J nachgewiesen werden. Dabei transportieren sie neben PS auch die Phospholipide Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethalonamin (PE) (Suzuki, Fujii et al. 2013). Eine Funktion bei der PS Externalisierung in Blutzellen konnte allerdings nur für TMEM16F aufgezeigt werden (Abb. 3.2). TMEM16F wird dabei durch einen Anstieg des intrazellulären Calciums aktiviert (Suzuki, Umeda et al. 2010).



Abb. 3.2: PS Externalisierung in apoptotischen Zellen und differenzierten Blutzellen.

Schematische Darstellung der Lipidzusammensetzung einer humanen Plasmamembran in ruhenden und in apoptotischen Zellen sowie in Blutzellen. Die für die Externalisierung von Phosphatidylserin verantwortlich gemachten Transporter, der jeweilige Stimulus, sowie die Transportrichtung der Lipide sind in der Abbildung eingezeichnet.

3.1.3.1 Membranveränderung während der Apoptose

Der programmierte Zelltod, auch Apoptose genannt, zeichnet sich durch eine Reihe von Veränderungen innerhalb der Zelle und auf deren Membranoberfläche aus. Ausgelöst werden diese Prozesse durch die Aktivierung von Proteasen, sogenannter Caspasen (Cystein-Aspartatspezifische Proteasen). Diese Caspasen sind in der Lage, weitere Caspasen spezifisch durch Abspaltung einer inhibitorischen Sequenz zu aktivieren, was schlussendlich zur Initiation einer großen Caspase-Kaskade führt. So deaktivieren die Caspasen3 und 7 durch proteolytische Spaltung das Protein PARP. Das daraus resultierende 89 kDa große Fragment diffundiert ins Zytosol der Zelle, während das 24 kDa-lange zweite Fragment im Zellkern gebunden an der DNA verbleibt. In gesunden Zellen rekrutiert PARP DNA-Reparaturproteine. Das an der DNA zurückbleibende PARP Fragment hingegen wirkt als Inhibitor des Volllängen-PARP und verhindert somit die DNA Reparatur. Dies führt dazu, dass sich DNA-Strangbrüche häufen und resultiert schlussendlich in der Fragmentierung der DNA. Zeitgleich schrumpft die Zelle. Ein weiteres Ereignis der Apoptose ist die Externalisierung von Phosphatidylserin (PS). Auch wenn der exakte Mechanismus der Lipid-Translokation bis jetzt nicht aufgeklärt werden konnte, so konnte zumindest gezeigt werden, dass für den Transport von PS auf die extrazelluläre Seite der Plasmamembran das Protein Xkr8 (Xk-related Protein 8) essentiell ist. Xkr8 gehört zur XKR Familie, welche im Menschen neun Proteine umfasst. Neben Xkr8 konnte auch für die Proteine Xkr4 und 9 eine Scramblase-Aktivität nach Stimulation der Apoptose nachgewiesen werden. Die drei Mitglieder der Xkr8 Familie besitzen acht Transmembrandomänen und lokalisieren in der Plasmamembran, wobei ausschließlich Xkr8 in allen Zelltypen exprimiert wird (Suzuki, Imanishi et al. 2014). Auch die Xkr8-Homologe CED-8 in *Caenorhanditis elegans* und mXkr8 in der Maus sind in der Lage, PS in apoptotischen Zellen PS zu externalisieren. Aktiviert wird die Scramblase durch Spaltung einer C-terminalen Sequenz durch die Caspasen3, 7 und 8 was die Externalisierung von PS auf die äußere Seite der Membran induziert (Suzuki, Denning et al. 2013). Die Externalisierung erfolgt dabei erst Stunden nach der Stimulation der Apoptose und damit deutlich langsamer als bei der PS Externalisierung in Blutzellen (Schlegel and Williamson 2001). Zeitgleich spalten die Caspasen3, 6 und 7 die Flippase ATP11C an 3 Stellen in der Nukleotid-Binderegion, wodurch diese kein ATP mehr binden kann und somit inaktiviert wird. Auf diese Weise wird verhindert, dass die Flippase das externalisierte PS wieder auf die zytosolische Membranseite zurück transportieren kann (Segawa, Kurata et al. 2014). Die PS- externalisierenden Zellen werden daraufhin von Makrophagen erkannt, gebunden und aufgenommen. Hierbei spielen Rezeptoren und sekretierte Proteine eine Rolle. Der Milchfettkügelchen EGF Faktor 8 (MFG-E8), auch bekannt unter dem Namen Lactadherin, wird von Makrophagen sekretiert und bindet externalisiertes PS über zwei repetitive, diskoide C2ähnliche Domänen im C-terminus und stimuliert die Aufnahme der apoptotischen Zellen durch die Makrophagen (Hanayama, Tanaka et al. 2002). Welche Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen das externalisierte PS erkennen und binden, ist derzeit noch unklar. So wurde zunächst angenommen, dass der Phosphatidylserin-Rezeptor (PSR) für die Erkennung von PS auf den apoptotischen Zellen essentiell ist (Fadok, Bratton et al. 2000). Dies wurde jedoch von anderen Gruppen wieder revidiert (Bose, Gruber et al. 2004). Der T-Zellen-Immunoglobulinund Mucin-Domänen-Rezeptor (Tim), insbesondere Tim-1 und -4, sollen als Phosphatidylserin-Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen dienen. Sie binden PS über eine Immunoglobulin V (IgV) Domäne und induzieren daraufhin die Aufnahme der apoptotischen Zellen durch die Makrophagen (Miyanishi, Tada et al. 2007).

3.1.4 Phosphatidylserin

Phosphatidylserin (PS) macht in der Gesamtheit der Lipide nur einen geringen Anteil aus, ist aber physiologisch sehr wichtig. Mit 12 % der totalen Lipidmasse ist es hinter Phosphatidylcholin (PC, 42 %) und Phosphatidylethalonamin (PE, 25 %) nur das dritthäufigste Phospholipid und ist 8-mal geringer konzentriert als Cholesterin. Es ist auf der zytoplasmatischen Membranseite vom ER, vom Golgi-Apparat, den Endosomen, der Plasmamembran und der äußeren Membranseite der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert. Dabei zeigt die Plasmamembran die höchste PS-Dichte, gefolgt von den Endosomen. Die mitochondriale Membran hingegen zeigt die geringste Menge an PS (Leventis and Grinstein 2010). Die Asymmetrie wird durch die in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Translokatoren aufrechterhalten.

PS wird in Bakterien und Hefen durch Anknüpfen eines Serins an Cytidindiphosphat-Diacylglycerin (CDP-Diacylglycerin), einem reaktiven Produkt aus der Phosphatidsäure (PA), durch die Phosphatidylserin-Synthase gebildet (Vance 2008). In Säugerzellen hingegen wird PS auf zwei unabhängigen Wegen auf der zytoplasmatischen Seite der ER-Membran gebildet. Dabei wird die Kopfgruppe der Phospholipide PC oder PE durch eine Serin-Kopfgruppe ausgetauscht. Der Austausch von Cholin gegen Serin wird hierbei durch die Phosphatidylserin Synthase 1, der Austausch von Ethalonamin durch die Phosphatidylserin-Synthase 2 katalysiert (Vance 2008). Mit Hilfe von Decarboxylasen kann PS wieder zurück zu PE degradiert werden. Während Säugerzellen nur für eine Decarboxylase kodieren, besitzen Hefen und Bakterien derweil zwei Decarboxylasen. Die Decarboxylasen sind auf der äußeren Seite der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert, was vielleicht auch den geringen Anteil an PS innerhalb dieser Membranen erklärt.

Eine wichtige Besonderheit von PS ist dessen anionischer Charakter. Im Vergleich zu Cholin oder Ethalonamin, welche positiv geladen sind und auf Grund dessen PE und PC einen zwitterionischen Charakter aufweisen, ist Serin neutral geladen (Leventis and Grinstein 2010). Phosphatidylserin ist das häufigste negativ-geladene, anionische Lipid in der eukaryotischen Zelle. Die negative Ladung ermöglicht es Proteinen mit kationischen Regionen an PS zu binden und dort zu clustern.

Markiert werden kann Phosphatidylserin durch die PS-bindenden Proben Annexin-V und Lactadherin. Während Annexin-V PS Calcium-abhängig über eine C2-Domäne bindet, adhäriert Lactadherin auch in Abwesenheit von Calcium über eine diskoide C2-ähnliche Domäne an PS (Tait and Gibson 1992, Yeung, Gilbert et al. 2008, Kay and Grinstein 2013).

3.2 Angriffsziel humaner Pathogene

Für jedes Pathogen bildet die Wirtszell-Plasmamembran die erste Interaktionsplattform. Im Falle der obligat intrazellulären Pathogene, wie Viren und bestimmte Bakterien, wie Chlamydien, stellt sie auch die erste Barriere dar, die es zu überwinden gilt. Dafür haben Pathogene eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen entwickelt. So können sie mit eigenen oberflächenlokalisierten Strukturen an die Proteine, Zucker oder Lipide der Humanzelle binden oder aber durch Sekretionsnadeln Proteine über die Wirtsmembran hinweg in das Zytosol der Humanzelle injizieren. Diese injizierten Proteine sind dann in der Lage, mit Komponenten der inneren Membranseite zu interagieren. Die Adhäsion an die Wirtszelle und die Sekretion von Proteinen dient vorrangig der Aufnahme des Pathogens. Man unterscheidet hierbei zwischen dem Trigger- und dem Zipper-Mechanismus. Der Trigger Mechanismus wird primär durch Proteine ausgelöst, die über das T3SS des Pathogens in die Wirtszelle sekretiert werden. Dort binden die Proteine meist direkt an das Aktin Zytoskelett und induzieren dessen Polymerisierung, was schlussendlich zur Aufnahme des Pathogens führt (Cossart and Sansonetti 2004). Der Zipper Mechanismus wird auch Rezeptor-vermittelte Internalisierung genannt. Hierbei binden Adhäsine des Pathogens an Rezeptoren der Wirtszelle, was zu einer Polymerisierung des Aktin Zytoskelett und der Aufnahme des Pathogens in die Wirtszelle führt (Cossart and Sansonetti 2004). Während der Trigger Mechanismus von *Salmonella spp.* oder *Shigella spp.* genutzt wird, liegt der Internalisierung durch Chlamydien wahrscheinlich der Zipper Mechanismus zu Grunde.

Auch Listeria monocytogenes nutzt den Zipper-Mechanismus zur Invasion der Wirtszelle. L. monocytogenes bindet über die Proteine Internalin A (InlA) und InlB an E-Cadherin und aktiviert die Endozytose des Bakteriums in die Wirtszelle. Mit Hilfe des Poren-bildende Toxins Listeriolysin O (LLO), welches in die Membran des Endosoms integriert wird und dieses zerstört, gelangt das Bakterium danach ins Zytosol der Wirtszelle und kann sich dort replizieren (Tilney and Portnoy 1989, Shen, Naujokas et al. 2000). Das Protein Invasin von Yersinia spp. ist ein integrales Oberflächenprotein, welches über das Typ-I-Sekretionssystem in die äußere bakterielle Membran transportiert wird und über eine C-Typ Lektin Domäne die Adhäsion des Bakteriums an Integrin- β 1, einem integralen Glykoprotein in der Wirtszellmembran, vermittelt. Diese Interaktion initiiert daraufhin die Aufnahme des Bakteriums in die Wirtszelle. Ein strukturell ähnliches Adhäsin findet man bei E. coli EHEC/EPEC. Das Protein Intimin besitzt drei Domänen der Ig Superfamilie und eine C-Typ Lektin Domäne, wobei die Bindung der Bakterien an die Wirtszelle durch die dritte Ig Domäne und die C-Typ Lektin Domäne vermittelt wird. Dabei interagiert das Protein mit dem bakteriellen Protein Tir (Translocated Intimin Rezeptor), welches durch das Bakterium selbst über das Typ III Sekretionssystem in die Wirtszelle transloziert und daraufhin in die Wirtszellmembran integriert wird. Die Intimin-Tir Interaktion induziert schlussendlich die Polymerisation von Aktin und die Bildung eines F-Aktin Sockels zur stabilen Adhäsion des Bakteriums an der Wirtszelle (Pizarro-Cerda and Cossart 2006, Gerlach and Hensel 2007). Neben Protein-Protein Interaktionen könnten Pathogene bei der Adhäsion an ihre Wirtszelle auch mit den Wirtszell-Phospholipiden interagieren. Interessanterweise ist allerdings nur ein pathogenes Protein bekannt, welches an Phospholipide in der äußeren Membranseite bindet. Das Multivalent Adhäsion Molekül 7 (MAM7) von Vibrio parabaemolyticus vermittelt die Adhäsion des Bakteriums an die Wirtszelle durch Interaktion mit Fibronectinen, sowie der Interaktion mit dem Phospholipid Phosphatidsäure (PA) (Krachler, Ham et al. 2011, Krachler and Orth 2011). Für *Helicobacter pylori* konnte ebenfalls eine, allerdings wenig verstandene, Interaktion mit Phospholipiden der Wirtszelle aufgezeigt werden. Das Protein CagA, transloziert über das Typ-IV-Sekretionssystem auf der Bakterienoberfläche und ist in der Lage mit Phosphatidylserin (PS) zu interagieren. Eine Rolle bei dieser Interaktion spielt wahrscheinlich ein K-Xn-R-X-R-Motiv im Protein, welches auch konserviert in einigen PH Lipid-Bindedomänen identifiziert werden konnte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass für den erfolgreichen Transport ins Wirtszellzytosol und die Funktion von CagA an der inneren Membranseite eine Externalisierung von PS, induziert durch das Bakterium, erfolgen muss (Murata-Kamiya, Kikuchi et al. 2010).

Auch die obligat intrazellulären Chlamydien interagieren mit der Plasmamembran und induzieren dabei eine PS Externalisierung an der Wirtszellmembran. Der Mechanismus hinter dieser Lipidtranslokation, sowie dessen Einfluss auf die Infektion der Chlamydien ist allerdings noch nicht bekannt (Goth and Stephens 2001). Dabei erfolgt die PS Externalisierung an der Wirtszelle bereits in den ersten Stunden der Infektion und damit deutlich schneller als in apoptotischen Zellen. Außerdem nutzen Chlamydien diverse Mechanismen während der Infektion um eine Induktion der Apoptose zu verhindern. Es ist daher naheliegend, dass es sich um zwei unterschiedliche Mechanismen der PS Translokation handelt (Goth and Stephens 2001, Sarkar, Moller et al. 2015). Ein Molekül auf der chlamydialen Oberfläche, oder ein sekretiertes Protein, welches für die Translokation des Phosphatidylserin verantwortlich ist, konnte allerdings bislang nicht identifiziert werden. Auch ist unklar, zu welchem Punkt während der Adhäsion oder Internalisierung die PS Externalisierung induziert wird. Der exakte Ablauf der Adhäsion und Internalisierung von *C. pneumoniae* wird in Kapitel 3.4.3.1erläutert.

3.3 Die humane Endozytose

Über die beiden Prozesse der Endo- und Exozytose können humane Zellen Stoffe aus dem extrazellulären Raum aufnehmen, bzw. aus dem Zytosol abgeben. Sie dienen auch dem Abschnüren von Membranteilen, sowie dem Einbringen von neuen Membranbestandteilen, wie Lipiden, oder Proteinen. Aufgrund der Akkumulation von Rezeptoren spielen die bereits erwähnten Lo-Phasen, Phasen in der humanen Plasmamembran mit erhöhter Ordnung, als Signal- und Interaktionsplattform eine große Rolle in der Initiation von Endo- und Exozytose (Owen, Magenau et al. 2012).

Im Allgemeinen wird bei der Endozytose zwischen Clathrin-abhängiger und Clathrinunabhängiger Endozytose unterscheiden. Die Clathrin-abhängige Endozytose ist ein rein Rezeptor-vermittelte Prozess. Das Namen-gebende Protein Clathrin akkumuliert dabei an PI(4,5)P₂-reichen Regionen der Plasmamembran Innenseite über Clathrin Adapter Proteinen. Diese PI(4,5)P₂-reichen Regionen markieren den Beginn endozytotischer Events. Im Zuge der Krümmung der Membran während der Vesikel-Formation, assembliert ein Clathrin-Geflecht um den Vesikel herum. Bei der Rekrutierung des Cargos durch spezifische Rezeptoren stellt das Adapter-Protein-Komplex AP2 eine zentrale Rolle dar. Abgeschlossen wird die Formierung des Vesikels durch Abschnürung durch die mechanochemische GTPase Dynamin. Nach Abschnürung des Vesikels wird der Clathrin Mantel aufgelöst und der Vesikel im endosomalen Netzwerk transportiert (McMahon and Boucrot 2011, Avinoam, Schorb et al. 2015).

Dem gegenüber steht die Clathrin-unabhängige Endozytose, die Rezeptor-vermittelt sein kann, aber auch durch Akkumulation von Lipiden und daraus resultierender Membrankrümmung initiiert wird. Weitere Proteinen wie Dynamin, die GTPasen oder die Sorting Nexine sind sowohl an der Vesikelformierung und dessen Abschnürung involviert. Die Clathrinunabhängigen Endozytose ist direkt abhängig von den physikalischen Membrangegebenheiten. So erfolgt die Rezeptor-induzierte, Chlathrin-unabhängige Aufnahme vorwiegend innerhalb der Ld-Membranphasen ab, während die durch Lipid-Akkumulierung ausgelöste Aufnahme Lo-Membranphasen bevorzugen (Doherty and McMahon 2009, Sandvig, Pust et al. 2011).

Neben den bereits angesprochenen Proteinen spielen auch die Phospholipide Phosphatidylserin (PS) und Mitglieder der Phosphatidylinositole (PIPs) eine wichtige Rolle bei der humanen Endozytose. Die Phospholipide sind aufgrund ihrer Ladungen und der Lipidform in der Lage, Membranen lokal zu krümmen und regulieren darüber vermutlich die Endozytose. Außerdem sind die Lipide auch an der Rekrutierung von Endozytose-relevanten Proteinen mit kationischen Lipid-Bindedomänen beteiligt. Im Falle der PIPs konnte abhängig des Zeitraums der Endozytose eine Veränderung in der Phosphorylierung des Lipids beobachtet werden. Von der Plasmamembran an über frühe Endosomen bis zu den späten Endosomen wird PI(4,5)P₂ zunächst zu PI(3,4,5)P3 phosphoryliert und anschließend zu PI(3)P dephosphoryliert. Abhängig vom Phosphorylierungsgrad des Lipids werden unterschiedliche Proteine rekrutiert, die das Schicksal des Endosoms bestimmen (Haucke 2005, Alder-Baerens, Lisman et al. 2006, Yeung, Gilbert et al. 2008). Sowohl PS, als auch PI(4,5)P2 akkumulieren in der Nähe endozytotischer Events an der Plasmamembran, und ein Verlust der Lipide hat einen massiven Einfluss auf die generelle Endozytose (Huang, Chang et al. 2004, Fujita, Cheng et al. 2009). Für PI(4,5)P2 sind des Weiteren bereits einige Endozytose-relevante Proteine mit spezifischen PI-bindenden Domänen bekannt (Haucke 2005).

Im Falle der obligat intrazellulären Bakterien stellt die Manipulation dieser endozytotischen Prozesse einen effizienten Mechanismus zum Eintritt in die Wirtszelle dar (Hartlova, Cerveny et al. 2010). Aufgrund des potentiell deutlich größeren Umfangs der Clathrin-unabhängigen Vesikel ist eine Aufnahme von Bakterien auf diesem Weg wahrscheinlicher, während Cargo und kleine Pathogene, wie Viren, auch über den Clathrin abhängigen Transport endozytiert werden können (Cureton, Massol et al. 2010, McMahon and Boucrot 2011).

3.4 Das Phylum Chlamydiae

Chlamydien werden aufgrund ihrer Einzigartigkeit in ein eigenes Phylum, *Chlamydiae* eingeordnet, mit nur einer einzigen Ordnung, *Chlamydiales*. Die Ordnung *Chlamydiales* umfasst vier Familien, wobei alle "echten" Chlamydien in der Familie *Chlamydiaceae* eingeordnet sind. Chlamydien-verwandte Spezies bilden die drei Familien *Parachlamydiaceae*, *Waddliaceae* und *Simkaniaceae* und wurden aufgrund des gemeinsamen Infektionszyklus und einer 80 % - 90 % Identität in der 16S rRNA erst später der Ordnung Chlamydiales hinzugefügt (Abb. 3.3) (Everett, Bush et al. 1999, Rurangirwa, Dilbeck et al. 1999). Chlamydien sind obligatintrazelluläre, Gram-negative Bakterien mit einem großen Wirtszellspektrum, einem gemeinsamen biphasischen Lebenszyklus (siehe Kapitel 3.4.2) und einem besonderen, Cysteinreichen starren Außenmembrankomplex. Neben Wirbeltieren, wie Amphibien, Reptilien, Säugetieren und Vögel zählen auch Fische, Insekten, Krustentieren, und Amöben zu ihren Wirten (Horn 2008). Eine chlamydiale Infektion ist zwar mit Antibiotika behandelbar, dennoch ist trotz intensiver Erforschung bis heute kein Impfstoff verfügbar. Die Erforschung der chlamydialen Proteine, welche an der Adhäsion an die Wirtszelle, sowie auch an der Internalisierung beteiligt sind, ist ein wichtiger Schritt bei der Entwicklung eines geeigneten Impfstoffs.



Abb. 3.3: Taxonomie des Phylum Chlamydia.

Taxonomische Anordnung der Mitglieder des Phylum Chlamydia nach (Horn 2008). In Prozent angegeben sind die die 16S rRNA Identitäten nach Everett, Bush (1999). Mit (*) markiert sind die beiden humanpathogenen Spezies. Die Länge der Linien repräsentieren nicht den phylogenetischen Abstand der verschiedenen Spezies.

3.4.1 Gattung Chlamydia/Chlamydophila

Über die Zeit wurden die Mitglieder der Familie *Chlamydiaceae*, der einzigen Familie in der Ordnung *Chlamydiales*, von zunächst einer Gattung, aufgrund von 16S rRNA Analysen in zwei Gattungen unterteilt: Der Gattung *Chlamydia* und der Gattung *Chlamydophila* (Everett, Bush et al. 1999). Die Gattung *Chlamydia* sollte die Spezies *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*), *C. muridarum*, und *C suis* umfassen, während die Gattung *Chlamydophila* die sechs Spezies *C. pneumoniae*, *C. felis*, *C. psittaci*, *C. abortus*. *C. caviae* und *C. pecorum* beinhalten sollte (Horn 2008). Neuere Daten aus vergleichenden Genomanalysen über die ribosomalen RNA Sequenzen hinaus führten jedoch zu einem Umdenken und dem erneuten Zusammenführen aller neun Spezies in eine Gattung, *Chlamydia* (Abb. 3.3) (Stephens, Myers et al. 2009, Wheelhouse, Sait et al. 2012).

Die Vertreter der Gattung *Chlamydia* sind weltweit verbreitet und decken als Gruppe ein breites Wirtsspektrum ab. Jede Spezies alleine jedoch ist sehr Wirts-spezifisch. Einzig die beiden Spezies *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* sind humane Pathogene. Alle anderen Vertreter sind tierpathogene Erreger. Im Falle von *C. psittaci*, einem Vogel-Pathogen, sind allerdings auch Fälle beschrieben worden, bei denen das Pathogen auf den Menschen überspringen konnte und dort Grippe-ähnlich Symptome auslöste (Beeckman and Vanrompay 2009). Auch *C. arbortus* kann von Schafen oder Ziegen auf den Menschen überspringen und dort in seltenen Fällen zu Fehlgeburten bei schwangeren Frauen führen (Pospischil, Thoma et al. 2002). Interessanterweise besitzen die einzelnen Spezies untereinander trotz ihrer unterschiedlichen Wirtsspezifität eine mit rund 95 % sehr hohe genomische Ähnlichkeit (Stephens, Myers et al. 2009). Die Genome der Chlamydien-Spezies unterschieden sich zum Teil sehr und weisen eine Reihe von Rekombinationsevents auf, welche zu einer massiven Reduktion im Genom, aber auch zu Duplikationen einzelner Genabschnitte geführt hat. Dies erlaubt es der Gattung *Chlamydia*, ein so großes Wirts- und Gewebespektrum infizieren zu können (Harris, Clarke et al. 2012, Nunes and Gomes 2014). Die Genome der beiden Humanpathogen *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* sind mit 1,23 x 10⁶ Bp, kodierend für etwa 1029 Proteinen, respektive 1,04 x 10⁶ Bp und rund 880 Proteinen ähnlich groß (NCBI).

Die beiden humanpathogenen Erreger zeichnen sich durch eine hohe Gewebe-Spezifität aus. Im Falle von *C. trachomatis* verläuft die Infektion allerdings häufig asymptotisch, weswegen diese häufig nicht oder erst sehr spät diagnostiziert und behandelt wird (Bebear and de Barbeyrac 2009). *C. trachomatis* infiziert Serovar-abhängig entweder die Augen (Serovar A – C), was zur Blindheit der Patienten führen kann, oder infiziert den Urogenitaltrakt (Serovare D – K und LGV), was bei Frauen, aufgrund von Vernarbung des infizierten Eileiter-Gewebes zur Unfruchtbarkeit führen kann. Des Weiteren wird eine Infektion mit *C. trachomatis* Serovar D-K auch mit Entzündungen des Gebärmutterhalses und der Gebärmutterschleimhaut in Verbindung gebracht (Peeling and Brunham 1996, Bebear and de Barbeyrac 2009). Chlamydien des Serovars LGV (L1, L2, L2a und L3) zeichnen sich darüber hinaus durch die Möglichkeit des invasiven Wachstums aus, was es dem Erreger ermöglicht, sich über den das lymphatische System des Wirts zu verteilen (White 2009). *C. pneumoniae*, der zweite humane Erreger, infiziert die Lunge und die oberen Atemwege und wird mit einer Reihe von Respirationserkrankung, sowie chronischen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Die Biologie von *C. pneumoniae* wird im Kapitel 3.4.3 noch detaillierter erläutert.

3.4.2 Der chlamydiale Infektionszyklus

Allen Chlamydien-Spezies gemein ist der biphasische Infektionszyklus (Abb. 3.4). Dabei unterscheidet man zwischen den infektiösen, aber metabolisch inaktiven Elementarkörperchen (EBs) mit einer Größe von durchschnittlich 0,3 µm und den metabolisch aktiven, aber nicht mehr infektiösen Retikularkörperchen (RBs) mit einer Größer von rund 1 μm (Chi, Kuo et al. 1987, Popov, Shatkin et al. 1991, Wolf, Fischer et al. 2000). Als Gram-negatives Bakterium zeichnen sich Chlamydien außerdem durch eine innere und eine äußere Membran aus. Interessanterweise weisen chlamydiale EBs kein typisches Peptidoglykan im Periplasma auf, auch wenn sie alle zur Produktion essentiellen Enzyme kodieren. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die sich teilendenden chlamydialen RBs Peptidoglykan während der Replikation synthetisieren (Barbour, Amano et al. 1982, McCoy and Maurelli 2006, Klockner, Otten et al. 2014, Liechti, Kuru et al. 2014). Anstelle stützenden Peptidoglykans nutzen die chlamydialen EBs eine Reihe von Proteinen, lokalisiert in der äußeren Membran, um den Verlust an Stabilität zu kompensieren. Diese Cystein-reichen Proteine sind über Disulfidbrücken guervernetzt und werden als chlamydialer Außenmembrankomplex (cOMC) zusammengefasst (Hatch 1996). Mit einem Anteil von etwa 60 % bildet das Außenmembranprotein MOMP (OmpA) den Hauptteil des cOMCs (Feher, Randall et al. 2013). Zunächst als Porin identifiziert, zeigt MOMP aus C. trachomatis auch einige Charakteristika eines Adhäsin (Confer and Ayalew 2013). Die weiteren Bausteine des cOMCs bestehen aus dem Außenmembrankomplex-Protein A (OmcA), einem Lipoprotein, welches von der Außenmembran ins Periplasma des Chlamydiums ragt und dem Außenmembrankomplex-Protein B (OmcB), welches mit dem N-Terminus in den extrazellulären Raum ragt (Hatch 1996). Beide Proteine sind Cystein-reich. Das Protein OmcB auf der chlamydialen Oberfläche bindet über den N-Terminus Heparansulfat-ähnliche Glykosaminglykane (GAGs) auf der humanen Zelloberfläche (Moelleken and Hegemann 2008, Fechtner, Stallmann et al. 2013). Des Weiteren wird vermutetet, dass eine große Anzahl weiterer Proteine, wie die Pmps, oder der Typ-III-Sekretionsapparat mit dem cOMC auf der Oberfläche der Chlamydien über Cysteine quervernetzt sind (Birkelund, Morgan-Fisher et al. 2009, Liu, Afrane et al. 2010, Moelleken, Schmidt et al. 2010, Molleken, Becker et al. 2013).

Auch wenn sich der Infektionszyklus je nach Spezies leicht unterscheidet, folgt er doch immer demselben Ablauf (Abb. 3.4). Die im Folgenden angegebenen Zeiten repräsentieren den Infektionszyklus von *C. pneumoniae* (Wolf, Fischer et al. 2000). Ein Zyklus beginnt mit der

Adhäsion des Bakteriums über Adhäsine auf der chlamydialen Oberfläche, gefolgt von der Internalisierung in die Wirtszelle. Die beteiligten Proteine werden im Kapitel 3.4.3.1 im Detail erläutert. Kurz nach dem Kontakt des EBs mit der Wirtszelle werden Effektorproteine durch das Typ-III-Sekretionssystem ins Zytosol der Wirtszelle transportiert. Gemeinsam lösen die Typ-III-sekretierten Proteine und die Adhäsine die Internalisierung des Bakteriums durch die Wirtszelle aus. Im Rahmen der Adhäsion und Internalisierung induzieren Chlamydien die Externalisierung des Phospholipids Phosphatidylserin über einen unbekannten Mechanismus (Kapitel 3.2). Nach der Aufnahme des Chlamydiums, 2 Stunden nach Infektionsbeginn (hpi) durch die Wirtszelle bleibt das Bakterium eingeschlossen in einem Membrankompartiment, genannt Inklusion. Die Inklusion wird im Folgenden über Mikrotubuli innerhalb der Wirtszelle in die Nähe des Zellkerns transportiert (Grieshaber, Grieshaber et al. 2003). Durch Interaktion membranständige der Inklusionsmembran, über Proteine in sowie sekretierten Effektorproteinen regulieren Chlamydien die Immunantwort der Wirtszelle und akquirieren notwendige Nährstoffe (Valdivia 2008). Nach etwa 12 Stunden differenzieren sich die infektiöse EBs in die metabolisch-aktiven RBs, welche sich in den folgenden 36 Stunden bis zu 10-mal replizieren und teilen (Van Ooij, Homola et al. 1998, Peters, Wilson et al. 2007). Sind die äußeren Umstände ungenügend, beispielsweise durch Nährstoffmangel, dem Einsatz von Antibiotika oder eine zu starke Immunantwort der Wirtszelle, insbesondere IFNy, können Chlamydien in eine Persistenz fallen. Persistierende Chlamydien replizieren zwar weiterhin ihr Genom, teilen sich aber nicht mehr. Verbessern sich die Umstände wieder, redifferenzieren sich Chlamydien wieder zu RBs (Beatty, Byrne et al. 1993). Nach etwa 48 Stunden redifferenzieren sich die RBs in die infektiösen EBs zurück (Wolf, Fischer et al. 2000). Dieser Prozess vollzieht sich vermutlich nach dem Kontaktverlust des RBs von der Inklusionsmembran und der Kondensation der chlamydialen DNA, ausgelöst durch die Histon-ähnlichen Proteine Hc1 und Hc2 (Grieshaber, Grieshaber et al. 2006, Niehus, Cheng et al. 2008). Nach 72 Stunden erfolgt die Freisetzung der Chlamydien entweder durch Lyse der Wirtszelle, oder durch Extrusion, einem Prozess, bei dem die EBs in kleineren Vesikeln abgegeben werden und die Wirtszelle intakt bleibt. Die auf diese Weise freigesetzten chlamydialen EBs sind im Folgenden in der Lage eine neue Wirtszelle zu infizieren und den Zyklus erneut zu durchlaufen (Hybiske and Stephens 2007).



Replikation

Abb. 3.4: Der chlamydiale Infektionszyklus.

Repräsentative Darstellung eines chlamydialen, biphasischen Lebenszyklus. In Stunden (h) sind die Zeitangaben einer Infektion mit *C. pneumoniae* angegeben (Wolf, Fischer et al. 2000). N = Nukleus, EB: infektiöse Elementarkörperchen, RB: metabolisch aktive Retikularkörperchen.

3.4.3 Das Humanpathogen C. pneumoniae

Chlamydia pneumoniae (*C. pneumoniae*) ist, neben *C. trachomatis*, das zweite wichtige Humanpathogen in der Familie *Chlamydiaceae* und infiziert die oberen Atemwege und die Lunge. Die Durchseuchung der Bevölkerung mit *C. pneumoniae* bis zum Rentenalter liegt weltweit bei etwa 70 %. *C. pneumoniae* wird durch Tröpfcheninfektion übertragen und kann bei den Betroffenen zur Rachenentzündung, Entzündung der Bronchen oder zur Lungenentzündung führen. So lassen sich 5 % der Entzündungen der Bronchen auf eine *C. pneumoniae* zurückzuführen. Im Falle der Lungenentzündung schwankt die Zahl zwischen 6 % und 20 % (Blasi, Tarsia et al. 2009, Vila-Corcoles, Ochoa-Gondar et al. 2009). Eine Infektion
mit *C. pneumoniae* wird auch mit Alzheimer, Arteriosklerose, Asthma, Multipler Sklerose und Lungenkrebs in Verbindung gebracht. Fraglich ist allerdings bis heute, welchen Einfluss eine *C. pneumoniae* Infektion auf das Ausbrechen der Krankheit hat, oder ob sie lediglich als Sekundärinfektion in den immunsuppressiven Patienten auftritt.

Während *C. trachomatis* seit 2013 genetisch manipulierbar ist, zeigten ähnliche Experimente in *C. pneumoniae* noch keinen Erfolg (Wang, Kahane et al. 2011). Als Grundlage der Manipulation dient ein aus *C. trachomatis* isoliertes Plasmid. Dieses konnte allerdings bisher nicht in *C. pneumoniae* transformiert werden (McClure, Chavez et al. 2017). Aufgrund des Fehlens von Knockout-Chlamydien oder Mutanten wird daher zu Analysezwecken auf alternative Methoden, wie z.B. die Verwendung von in *E. coli* rekombinant hergestellten Proteinvarianten, oder die Transfektion chlamydialer Gene in humane Zellen, zurückgegriffen. Diese Einschränkungen sind ein Grund dafür, dass der Adhäsions- wie auch der Internalisierungsprozess trotz langjähriger Studien immer noch größtenteils ungeklärt ist. Im Folgenden sind die Prozesse der Adhäsion und Internalisierung für *C. pneumoniae* zusammengefasst.

3.4.3.1 Adhäsion und Internalisierung

Der erste reversible Kontakt der chlamydialen EBs erfolgt über die Interaktion des Außenmembrankomplex-Protein В (OmcB) mit Glykosaminoglykanen (GAGs), Zuckerstrukturen auf der Wirtszell-Oberfläche (Carabeo and Hackstadt 2001, Fudyk, Olinger et al. 2002, Hegemann and Moelleken 2012) (Abb. 3.5). GAGs finden sich auf allen eukaryotischen Zellmembranen. Zumeist kovalent an ein Kernprotein gebunden, bilden sie einen Teil der Glykokalyx (Bernfield, Gotte et al. 1999, Linhardt and Toida 2004). Weitere Bindestudien konnten zeigen, dass OmcB mit Heparin-ähnlichen GAGs, eine spezielle Klasse von Glykosaminoglykanen, über zwei konservierte XBBXBX Heparinbindemotiven interagiert, wobei X für eine hydropathische und B für eine basische Aminosäure steht (Wuppermann, Hegemann et al. 2001, Beswick, Travelstead et al. 2003, Moelleken and Hegemann 2008, Fechtner, Stallmann et al. 2013).

Es wird vermutet, dass diese erste Bindung relativ schwach und reversibel ist, bis das Bakterium an einem für den Eintritt in die Zelle günstigen Platz durch Interaktion weiterer Adhäsine stabil adhäriert. Eine ganze Reihe weiterer Proteine mit adhäsiven Eigenschaften wurde bereits beschrieben, wobei manchen dieser Kandidaten noch immer keine endgültige Rolle im Adhäsionsprozess zugewiesen werden konnte. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass das Major Outer Membrane Protein (MOMP) von C. trachomatis ebenfalls an Heparansulfat binden kann, das MOMP von C. pneumoniae hingegen nicht (Su, Raymond et al. 1996, Moelleken, Schmidt et al. 2010). Das chlamydiale Lipopolysaccharid (LPS) stellt einen weiteren Adhäsin-Kandidaten dar. Sowohl Antikörper, gerichtet gegen das LPS, als auch rekombinant hergestelltes LPS, reduzieren eine Infektion mit C. pneumoniae (Peterson, de la Maza et al. 1998, Fadel and Eley 2008). LPS interagiert dabei mit dem Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) auf der humanen Zelloberfläche und ist an der Internalisierung der Chlamydien beteiligt (Ajonuma, Fok et al. 2010). Das chlamydiale Protein GroEL1 kann als rekombinantes Protein an humane Zellen adhärieren und eine nachfolgende Infektion mit C. pneumoniae inhibieren. GroEL1 ist des Weiteren auf der Oberfläche der Chlamydien detektierbar und erfüllt damit einige Charakteristika eines Adhäsins (Wuppermann, Molleken et al. 2008). Ein weiterer Kandidat, Cpn0482 (Art]), kann ebenfalls auf der chlamydialen Oberfläche detektiert werden. Als rekombinantes Protein adhäriert es auch an humane Zellen und in Antikörper-Experimenten zeigten CPn0482-spezifische Antikörper eine Neutralisierung der Infektion (Montigiani, Falugi et al. 2002, Finco, Bonci et al. 2005, Soriani, Petit et al. 2010). Einen Interaktionspartner für die beiden Proteine konnte aber bisher nicht identifiziert werden.

Die Familie der Polymorphen Membranproteine (Pmps) stellt eine weitere Gruppe an Adhäsinen dar. *C. pneumoniae* kodiert für 21 Pmps, die in sechs phylogenetische Gruppen unterteilt werden (Grimwood and Stephens 1999, Grimwood, Olinger et al. 2001). Dabei werden alle Pmps, mit Ausnahme der Pmps 3-5, 12 und 17, alle Pmps durch *C. pneumoniae* erfolgreich exprimiert. Eine Oberflächenpräsentation konnte dabei für die Pmps 6, 8, 10, 11, 20 und 21 gezeigt werden (Grimwood, Olinger et al. 2001). Die gebildeten Pmps bilden homo- und heteromere Strukturen und adhärieren über die zwei Motive GGA (I, L, V) oder FxxN an die humanen Zellen (Moelleken, Schmidt et al. 2010, Becker 2013, Luczak 2016). Die Pmps gehören zur Familie der Typ-V-Autotransporter, mit einer N-terminalen Signalsequenz, einer Passagierdomäne und einer C-terminalen β -Barrel-Domäne. Über die Sec-abhängige Translokation gelangt das ungefaltete Protein ins Periplasma des Chlamydiums, von wo aus die β -Barrel-Domäne eine hydrophile Pore in der äußeren Membran bildet und die Passagierdomäne auf diese Weise auf die Außenseite des Bakteriums transportiert und verankert (Grimwood and Stephens 1999, Rockey, Lenart et al. 2000). Bis jetzt konnte ausschließlich der Pmp21 Interaktionspartner, der humane Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) identifiziert werden (Abb. 3.5) (Molleken, Becker et al. 2013). Die Bindung von Pmp21 an den EGFR führt zur Dimerisierung und Aktivierung des Rezeptors. Die Aktivierung des Rezeptors induziert intrazelluläre Signalkaskaden, welche im folgenden Abschnitt genauer beschrieben werden (Molleken, Becker et al. 2013, Molleken and Hegemann 2017). Auch das zuletzt identifizierte potentielle Adhäsin CPn0473, welches im Rahmen dieser Arbeit detaillierter charakterisiert werden soll, ist an der Adhäsion und der Internalisierung chlamydialer EBs beteiligt (Abb. 3.5). Die bisher erzielten Ergebnisse sind im folgenden Kapitel 3.4.3.2 zusammengefasst.



Abb. 3.5: Adhäsion und Internalisierung von *C. pneumoniae*.

Schematische Darstellung der an der Adhäsion und der Internalisierung beteiligten chlamydialen und humanen Proteine. In grün dargestellt ist ein infektiösen Elementarkörperchen (EB), in schwarz die beteiligten Proteine. Grün umrandet sind die Proteine, die während des jeweiligen Prozesses beteiligt sind. Pfeile markieren die Interaktionspartner. Mit einem Fragezeichen sind Proteine markiert die eine Rolle während der Adhäsion spielen könnten, deren Rolle allerdings noch nicht belegt wurde (GAG: Glykosaminglykane, T3SS: Typ-III-Sekretionssystem).

39

Essentiell für die Aufnahme des Bakteriums durch die Wirtszelle sind auch sekretierte Effektorproteine. So konnte gezeigt werden, dass die chlamydialen Proteine CPn0677 und CPn0678 mit Hilfe amphipathischer Helices Membrankrümmung auf der Membraninnenseite induzieren und das humane Proteine Sorting Nexin 9 (SNX9) rekrutieren (Abb. 3.5) (Murra 2009, Hänsch 2016). Gemeinsam induzieren die Proteine entweder die Invagination der Membran und damit die Aufnahme des Vesikels, oder die Dynamin-abhängige Abschnürung des Vesikels zum Ende der Endozytose des Bakteriums. Es konnte gezeigt werden, das aktiviertes SNX9 die Phosphoinositid-3-Kinasen PI3K und PI5K rekrutieren kann (Badour, McGavin et al. 2007, Yarar, Surka et al. 2008). Die Aktivierung des EGF-Rezeptors durch die Adhäsion von Pmp21, induziert, wie oben beschrieben, intrazelluläre Signalkaskaden, darunter den Akt und ERK Signalweg. Die Aktivierung der Signalwege induziert die Polymerisierung des kortikalen Aktin Zytoskelett und rekrutiert, sowie aktiviert die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase). Diese Kinase phosphoryliert das Phosphatidylinositol $PI(4,5)P_2$ zu $PI(3,4,5)P_3$, was in Verbindung mit dem kortikalen Aktin die Aufnahme des Bakteriums in die Wirtszelle initiiert. Durch die Wirtsprotein-Rekrutierungen und der Aktivierung des Akt-Signalwegs wird der Vesikel, auch Inklusion genannt, in den perinuklearen Raum transportiert. Dabei durchläuft die Inklusion die Stadien eines frühen Endosoms, gefolgt von dem Stadium eines Recycling Endosoms. Dabei werden die Rab-GTPasen 4, 5, 7, 11 und 14 zur Inklusion rekrutiert. Nacheinander werden Rab 4 und Rab 7 von der Inklusion wieder entfernt, um den Abbau durch Lysosomen zu entgehen. In der Nähe des Zellkerns angekommen verbleibt die Inklusion für den Rest der Infektion im Stadium eines Recycling Endosoms (Molleken and Hegemann 2017).

3.4.3.2 CPn0473

CPn0473, auch bekannt unter dem Name Yaa1 (*Yet another adhesin*) ist ein *C. pneumoniae*spezifisches Protein (Abb. 3.6) (Fechtner 2013). Einige der in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse wurden bereits im Rahmen einer Publikation veröffentlich (Fechtner, Galle et al. 2016). Das Protein weist interessanterweise weder ein Homolog in der nahe-verwandten Spezies *C. trachomatis*, noch in einer anderen chlamydialen Spezies auf und ist damit ein weiteres Beispiel für die Vielfältigkeit im Reich *Chlamydiae*. Das Protein wird 48 Stunden nach Infektionsbeginn und damit kurz vor der Redifferenzierung der metabolisch aktiven Retikularkörperchen (RBs) in die infektiösen chlamydialen Elementarkörperchen EBs, exprimiert (Fechtner, Galle et al. 2016). Wann und auf welche Weise es auf der chlamydialen Oberfläche transportiert und verankert wird ist nicht geklärt. Mikroskopisch kann CPn0473 kolokalisiert mit anderen Oberflächenproteinen, wie OmcB, an den infektiösen EBs, aber nicht an den RBs detektiert werden. Das Protein ist für Antiköper auf der chlamydialen Oberfläche direkt zugänglich und kann von Oberfläche der chlamydialen EBs, neben Sarkosyl, auch durch Triton X-100 gelöst werden. Erstaunlicherweise weist Triton X-100-solubilisiertes CPn0473 kein Volllängenprotein auf, sondern kleinere Fragmente (Fechtner, Galle et al. 2016). Ob dies physiologisch relevant ist, lässt sich bislang nur spekulieren, allerding nutzen manche Pathogene Mechanismen, um ihr Adhäsine unter proteolytischer Spaltung von ihrer Oberfläche zu lösen um daraufhin ihre Funktion an der Humanzelle zu erfüllen (Gerlach and Hensel 2007). Des Weiteren konnten CPn0473-spezifische Antikörper im Blut von *C. pneumoniae*-positiven Patienten detektiert werden. Antikörper gerichtet gegen CPn0473 sind außerdem in der Lage eine chlamydiale Infektion teilweise zu blockieren.



Abb. 3.6: Das C. pneumoniae Protein CPn0473.

Schematische Darstellung des *C. pneumoniae* Proteins CPn0473 (Yaa1). Aminosäurepositionen sind angegeben. (IED: Infektionserhöhende Domäne, BD: Bindedomäne, SID: Selbstinteraktionsdomäne).

In Adhäsionsstudien mit rekombinantem Protein, löslich und an Latexkügelchen gekoppelt, sowie mit Hilfe des Hefe-Oberflächenpräsentationssystems zeigt das Protein eine schnelle Bindung an humane Zellen (unter 1 Minute), die sich über die Zeit steigert. Eine Domäne essentiell für die Bindung an die Wirtszelle (Bindedomäne, BD) liegt zwischen den Aminosäuren 307 und356 im C-Terminus des Proteins (Abb. 3.6) (Galle 2012, Fechtner 2013, Fechtner, Galle et al. 2016). CPn0473 folgt damit dem Muster eines früh benötigten Proteins auf der chlamydialen Oberfläche und erfüllt bis hier alle Kriterien eines Adhäsins. Der Interaktionspartner auf der humanen Zelloberfläche konnte bislang aber nicht identifiziert werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass CPn0473 mit Phospholipiden in Form von Liposomen und immobilisiert auf Membranen interagieren kann. Dabei zeigt das Protein eine Präferenz für negativ-geladene Phosphatidsäure, große Lipide, wie diverse Phosphatidylinositole und Phosphatidylserin. Ob diese Interaktion auch für die Bindung und die Funktion von CPn0473 an der Humanzelle Relevanz hat ist bisher allerdings nicht bekannt. Auch nicht, ob CPn0473 negativ-geladene Lipide per se bindet, oder eine Präferenz für eines der Lipide zeigt, müssen weiterführende Studien zeigen. Neben der Bindung an Humanzellen und der Interaktion mit Lipiden ist CPn0473 auch in der Lage mit sich selbst zu interagieren. Die Selbstinteraktion erfolgt über eine Domäne im C-Terminus von Aminosäure 357 bis 456 (Selbstinteraktionsdomäne, SID) (Abb. 3.6) (Fechtner 2013, Galle 2013). Eine biologische Funktion hinter dieser Interaktion ist bisher nicht beschrieben.

Interessanterweise ist es, anders als mit klassischen Adhäsinen, nicht möglich, eine chlamydiale Infektion mit rekombinantem CPn0473 (rCPn0473) in Blockierungsexperimenten zu inhibieren. Im Gegenteil, die Vorbehandlung sowie die gleichzeitige Stimulation von Humanzellen mit rCPn0473 und chlamydialen EBs steigerte die Infektion Dosis-abhängig. Dabei steigert das Protein nicht die Adhäsion der EBs an die Wirtszelle, sondern die Internalisierung der EBs. Dieser Boost der Internalisierung wird induziert durch eine 150 Aminosäuren-lange Domäne im N-Terminus (Infektionserhöhende Domäne, IED, AS 1-150) und ist abhängig von der Verfügbarkeit von Cholesterin in der humanen Plasmamembran und der Polymerisation von Aktin unterhalb der Membran (Abb. 3.6). Dies korreliert mit Beobachtungen, dass sowohl CPn0473, als auch die chlamydialen EBs, an Cholesterin-reichen Regionen an der Plasmamembran der Wirtszelle adhärieren (Fechtner 2013, Fechtner, Galle et al. 2016). Wie das Protein CPn0473 die chlamydiale Internalisierung stimuliert, ist bisher allerdings unbekannt und sollte auch im Rahmen dieser Arbeit weiter aufgeklärt werden.

3.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, das chlamydiale Adhäsin näher zu charakterisieren und offene Fragen bezüglich der Funktion von CPn0473 und dem dahinterliegenden Mechanismus zu klären. So sollte die Bindung von CPn0473 an die Wirtszelle untersucht werden um, wenn möglich, den humanen Interaktionspartner zu identifizieren. Außerdem sollte untersucht werden wann und wie das Protein auf die Oberfläche der Chlamydien transportiert wird. CPn0473 ist an der Stimulation der chlamydialen Internalisierung beteiligt. In dieser Arbeit sollte analysiert werden, wie das Protein die Aufnahme der EBs durch die Wirtszelle stimuliert. CPn0473 interagiert mit Phospholipiden und auch mit sich selbst. Mit Hilfe biochemischer Assays sollte geprüft werden ob diese Interaktionen eine biologische-Relevanz haben. Des Weiteren sollte untersucht werden, wie Cpn0473 mit verschiedenen Lipiden interagieren kann. Im Falle einer positiven Interaktion von CPn0473 mit einem Lipid oder einem anderen Interaktionspartner sollte deren Bedeutung im Anschluss in einer chlamydialen Infektion ermittelt werden.

4 Material

4.1 Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterialien	Hersteller
1,5 ml Reaktionsgefäß	Eppendorf
2,0 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt
2 ml Mikroschraubenröhrchen	Sarstedt
Dialyseklammern	Pierce
Dialyseschlauche (Ausschlussgröße 12-14 kDa)	Serva
Einmalspritzen Luer-Gewinde (50 ml)	Braun
Elektroporations-Küvetten	Bio-Rad
FACS Röhre (5 ml, 75x12 mm)	Sarstedt
Falcon (15 ml)	Sarstedt
Falcon (50 ml)	Sarstedt
Fernbachkolben (1 L)	DURAN Group GmbH
Filtereinheit mit Luer-Gewinde (0,2 μM), steril	Whatman
Filterpapiere Blotting PAD 707	VWR International
Glaskolben (5 L, 350 ml, 100 ml)	Duran
Glasflaschen (1 L, 500 ml, 250 ml, 100 ml)	Duran
Glasplättchen für Zellkultur (Deckgläschen ø 12 mm)	Roth
HiTrap™ 5 ml Chelating HP	GE Healthcare
Küvette, Polystyrol	Sarstedt
Latexhandschuhe	Meditrade
Latexkügelchen Fluoesbrite (YG, BB) (1 μM)	Polysciences
Glasbecher (1L)	DURAN Group GmbH
Glasperlen (ø ~0,5 mm)	Braun
Membran Lipid Strips	Echelon
Mikro-Schraubröhre (2ml)	Sarstedt
Native PAGE Novex Bis Tris Gele	Life Technologies
PCR Reaktionsgefäß	Sarstedt
PD-10-Säule	GE Healthcare
Petri-Schalen (ø 9 cm) [klein]	Sarstedt
pH-Indikatorstreifen	Matchery-Nagel
Pipettenspitzen (1-10 μl)	Sarstedt
Pipettenspitzen (2-200 μl)	Sarstedt
Pipettenspitzen (200-1000 μl)	Sarstedt
Protein–Säulen/Polyethylen Filterstopfen	Thermo Scientific
PPTube (14 ml(Greiner biocare
PVDF Transfer Membran	Millipore
Reagenzglas	DURAN Group GmbH
Sterilfilter 0,2 μm	Nalgene
Superdex 200 Increase 10/300 GL Säule	GE Healthcare

Gebrauchsmaterialien	Hersteller
Ultrazentrifugationsröhrchen	Beckmann
Zellkulturflasche (25 cm ²)	Thermo Scientific
Zellkulturflasche (75 cm ²)	Thermo Scientific
Zellkulturplatte (24-Well)	Thermo Scientific
Zellkulturplatte (6-Well)	Thermo Scientific
Zellkultur-Zentrifugationsröhrchen (12 ml)	Greiner
Zellscharber	Nunc
Zentrifugationsröhrchen	Korex

4.2 Geräte und Maschinen

Geräte/Maschinen	Hersteller
- 80 °C Freezer Modell 720	Thermo Electron Corporation
ABI PRISM 7000 Sequence Detektion System	Applied Biosystems
ÄKTA Prime plus	GE Healthcare
Analysenwaage Cubis H110	Satorius
Bio Photometer-plis	Eppendorf
Blotapparatur G2 Fast Blotter	Pierce
Brutschrank HEPA-Class 100	ThermoEleectron Corporatior
Brutschrank HEPA Class 100	Thermo Electron Corporation
differenzieller refraktorischer Index Detektor (PTILab T-rEX)	Wyatt Technology
Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Biosciences
Electrophoresis Power Supply EPS 601	Amersham Biosciences
Elektroporationsapparatur Gene Pulser	Bio Rad
FACSAria	BD
Feinwaage	Scaltec
Gene Controller	Biorad
Gene Pulser	Biorad
Geldokumentationssystem	Bio-Rad
Heiz-/Magnetrührer RH basic 2	IKA-Werke GmbH & CO. KG
High Performance Liquid Chromatography (HPLC)-System	Agilent
Homogenisator Preccellys 24	Bertin technologies
Inkubator (37 °C)	Heraeus
Inkubator (30 °C)	Memmert
Laborwaage TE3102S	Satorius
Magnetrührer KMO 2 basic	IKA-Werke GmbH & CO. KG
Mikropipette Pipetman (0,-2 µl)	Gilson
Mikropipette Pipetman (2-20 μl)	Gilson
Mikropipette Pipetman (20-200 μl)	Gilson
Mikropipette Pipetman (200-1000 μl)	Gilson
Mikroskop Axiovert 25C	Zeiss

Geräte/Maschinen	Hersteller
Mikroskop Eclipse Ti-E mit A1R confocal laser	Nikon
Mikrowelle	Bosch
NanoDrop ND-2000C Spektrophotometer	PeqLab
PCR-Thermocycler PTC-200	MJ Research
pH-Meter WTW pH720	inoLab
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Photometer DU-800 Spectrophotometer	Beckmann
Power Supply EPS301, EPS601	Amersham Biosciences
Proteingelsystem Mighty Small II SE260	Hoefer
Schüttler Unitron	Infors
Sicherheitswerkbank Herasafe	Heraeus
Speed-Vac Vacuum-Konzentrator SC110	Savant
Thermoblock West 6100	West Instruments
Ultraschallstab Sonoplus HD2200	Bandelin
Ultraschallwasserbad RK102H	Bandelin
Vibrax VXR	IKA
Vortex-Genie 2	Scientific industries
Winkel Lichtstreuungsdetektor (miniDAWN TREOS)	Wyatt Technology
XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System	Thermo
Zangenschweißgerät 100GE	Polystar
Zentrifuge Avanti J-25, Rotoren: JLA10.500, JA25-50	Beckmann
Zentrifuge Beckmann J2-21, Rotoren: JA10, JA20	Beckmann
Zentrifuge Biofuge pico, Rotor #3324	Heraeus
Zentrifuge Biofuge Primo R, Rotor #7593	Heraeus
Zentrifuge Megafuge 1.0R, Rotor #3360	Heraeus
Zentrifuge Multifuge 3SR+	Heraeus
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich

4.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)	Sigma
Acrylamid (Rodiphorese Gel 30)	Roth
Adenin	Roth
Agar	Difco
Agarose	Biozym
Alanin	Merck
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck
Ammoniumsulfat	Roth
Ampicillin	Sigma
Arginin	Fluka

Chemikalie	Hersteller
Asparagin	Merck
Asparaginsäure	Merck
Biofreeze	Biochrom
Borsäure	AppliChem
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva
Bradford-Reagenz	Biorad
Bromphenolblau	Fluka
Calciumchlorid	Riedel-deHaën
Chloramphenicol	Merck
Ciprofloxacin	SantaCruz
Coomasssie Brilliant Blau G250	Merck
Cycloheximid	Sigma
Cystein	Merck
Cytochalasin D	Thermo Fischer
D (+) -Galaktose	AppliChem
D (+) -Glucose	Roth
D (+) -Raffinose	Sigma
Desoxynucleosid-5`-Triphosphate (dNTPs)	Fermentas
Dimethylformamid (DMF)	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem
DMEM GlutaMAX™	Invitrogen
Essigsäure	Roth
Ethanol (96 %)	VWR
Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)	Roth
Ethylendiamintetraacetat (Na ₂ -EDTA)	AppliChem
Ficoll	GE Healthcare
Fötales Kälberserum (FKS)	Invitrogen
Fungizone (Amphotericin B)	Invitrogen
Gastrographin	Schering
Gentamycin	Invitrogen
Glutamin	Merck
Glutaminsäure	Sigma
Glycerin	Roth
Glycin	AppliChem
Glutathion-Agarose	Sigma
Guanidin/HCl	Serva
Hanks' Salzlösung (HBSS)	Invitrogen
Harnstoff	Sigma
Hefe Stickstoff (Basis) (YNB)	Difco
Hefeextrakt	Bacto
Heparin	Sigma
Histidin	Roth

Chemikalie	Hersteller
Imidazol	AppliChem
Inositol	Sigma
Isoleucin	Roth
Isopropanol	Roth
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Thermo Scientific
Kaliumacetat	Grüssing
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
L (+) -Arabinose	Sigma
Lachssperma-DNA (Carrier-DNA)	Sigma
Leucin	Roth
Lithiumacetat	Roth
Lysin	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
MEM Vitaminlösung	Invitrogen
MEM Nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen
Methanol	Riedel-deHaën
Methionin	Merck
Methyl-β-cyclodextrin	Sigma
Milchpulver	Roth
N-Lauroylsarcosine (Sarkosyl)	Sigma
Natriumacetat (NaAc)	
Natriumchlorid	VWR
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem
Natriumdodecylsulphat (SDS)	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Riedel-deHaën
Natriumhydroxid	VWR
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma
Nocodazol	Sigma
Para-Aminobenzoesäure	Fluka
Para-Formaldehyd (PFA)	Fluka
Pepton	Bacto
Phenylalanin	Acros
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Phospholipid Phosphatidsäure	Life Technologies
Phospholipid 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	Life Technologies
Phospholipid TexasRed-1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-	Life Technologies
Phosphoethanolamine	-
Phospholipid L-a-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate	Life Technologies
Phospholipid 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine	Life Technologies
Plasmocyin	InvivoGen
Polyethylenglycol 3350 (PEG)	Roth
Poly-L-Lysin	Sigma

Chemikalie	Hersteller
Prolin	Merck
Proteaseinhibitor-Cocktail (EDTA frei)	Roche
Puffer für Restriktionsenzyme (diverse)	Fermentas
Reduziertes L-Glutathion	Sigma
Roti-Phenol	Roth
Salzsäure (HCl)	Roth
Serin	Merck
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva
Tetracyclin	Sigma
Threonin	Merck
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Merck
Trypton	Difco
Tryptophan	AppliChem
TurboFect™	Thermo Scientific
Tween 20	Merck
Tyrosin	AppliChem
Uracil	Roth
Valin	AppliChem
Vectashield (Anti-fade, mountig fluid)	Linaris
Vitaminlösung	Invitrogen
Xylencyanol	Serva
Zell-Dissoziation Lösung	Sigma

4.4 Lösungen und Puffer

ösungen/Puffer	Zusammensetzung
x Sammelgelpuffer (für Protein-Gele)	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
	0,4 % (w/v) SDS
Trenngelpuffer (für Protein-Gele)	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
	0,4 % (w/v) SDS
nexin Puffer (10 x)	100 mM Hepes/NaOH pH 7,4
	1,4 M NaCl
	5 mM CaCl ₂
ckierungs-Lösung	3 % Milchpulver
	0,05 % Tween 20
	in PBS

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
Coomassie-Lösung	0,008 % (w/v) CBB-G-250
	35 mM HCl
	in ddH2O
Detektionspuffer (Westernblot)	0,1 M Tris/HCl pH9,5
	0,1 M NaCl
	50 mM MgCl₂
	in ddH ₂ O
DNA-Blaumarker	0,1 % Bromphenolblau
	0,1 % Xylen-Cyanol FF
	15 % Ficoll
	10 mM Tris/HCl
	10 mM EDTA
Farbsubstratpuffer	0,33 % BCIP
	0,33 % NBT
	in Detektionspuffer
FSB-Puffer	10 mM Kaliumacetat
	45 mM MnCl2-H ₂ O
	10 mMCaCl2-H ₂ O
	100 mM KCl
	3 mM Hexaminkobaltchlorid
	10 % Glycerol
	ad H ₂ O
	mit 0,1 N HCl auf pH6,4 einstellen
	steril filtriert bei 4 C lagern
Kopplungspuffer	0,5 M NaCl
	0,2 M NaHCO ₃
	in Wasser pH 8,6
Laufpuffer	0,05 M Tris
	0,2 M Glycin
	in ddH2O
Lithiumacetat	1M Lithiumacetate pH 8,4-8,9
	in ddH ₂ O
Liposom-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 7,8

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
	120 mM NaCl
Lysepuffer	1 mM PMSF
	0.2 mg/ml Lysozym
	0.4 % Sarkosvl
	0.4 % Triton X100
	0.01 % Protease Inhibitor
	in PBS
Native PAGE	10 ml 20x Native PAGE Laufpuffer
Anoden Puffer	1 ml Kathoden Additive
	ad 200 ml ddH ₂ O
Native PAGE	50 mM Bis Tris
Laufpuffer (20 x)	50 mM Tricine
	pH 6.8
Native PAGE	50 ml 20x Native PAGE Laufpuffer
Kathoden Puffer	ad 1 L ddH ₂ O
Native PAGE	6 N HCl
Proben Puffer (4 x)	50 mM NaCl
	10 % Glycerol
	0.001 % Ponceau S
	50 mM Bis Tris pH 7,2
NBT-Lösung	5 % (w/v)
	in 70 % DMF
PEG (Polyethylenglykol)	50 % (w/v) PEG
	in ddH ₂ O
Phosphate Buffered Saline (PBS)	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	10 mM Na2HPO4
	1,8 mM KH2PO4
	in ddH ₂ O
PhosphoLysis Puffer	1 % Triton X100
	1 % NP40
	40 mM EDTA
	1 mMNaVO ₄
	20 mM TrisHCl pH 7,5
PFA Stocklösung	30 % (w/v) PFA

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
	60 mM NaOH
	in PBS
Protein-Ladepuffer (4-fach)	200 mM Tris/HCl pH 6,9
	8 % SDS
	0,2 % Bromphenolblau
	20 % Glycerin
Puffer P1	50 mM Tris/HCl pH 8,0
	10 mM EDTA pH 8,0
	100 μg/ml RNase
	in ddH ₂ O
Puffer P2	200 mM NaOH
	1 %SDS
	in ddH ₂ O
Puffer P3	2,55 M KOAc
	in ddH_2O
SPG-Puffer (Saccharose-Phosphat-Glutaminsäure) (1 L)	75 g Saccharose
	0,52 g KH₂PO4
	1,53 g Na₂HPO4
	0,72 g Glutaminsäure pH 7,5
TBE-Puffer	89 mM Tris/HCl
(TRIS-Borat-EDTA-Puffer,	89 mM Borsäure
pH 7,5, pH7,8 pH8; pH9,5;)	2 mM EDTA
Transferpuffer (Westernblot)	25 mM Tris
	150 mM Glycin
	10 % MeOH
	0,05 % SDS
	in ddH ₂ O
Zellkulturmedium (500 ml)	DMEM GlutaMAX™ (500 ml)
	10 % hitzeinaktiviertes FKS
	1 x Amphotericin
	1 x Vitamine
	1 x nicht-essentielle Aminosäuren
	50 μg/ml Gentamicin
Zellkulturmedium, chlamydiales	Zellkulturmedium
	1,2 μg/ml Cyclohexamid

4.5 Enzyme

Enzym	Hersteller	
Lysozym	Sigma	
Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Scientific	
Proteinase K	Roche	
Restriktionsenzyme (Accl (Xmil), Aval (Eco88I), BstBl	Thermo Scientific	
(BspII9I, Asull), EcoRI, HinclI, Smal, XagI (EcoNI))		
RNase A	Qiagen	
Trypsin/EDTA	Invitrogen	

4.6 Agarosen

Hersteller	
Sigma	
Qiagen	
Pierce	
	Hersteller Sigma Qiagen Pierce

4.7 Färbemittel

Färbemittel	Hersteller	
5(6) -Carboxyfluorescein	Sigma	
Annexin V Fluos	Roche	
DAPI	Sigma	
DyLight 488 NHS Ester	Thermo Scientific	
DyLight 594 NHS Ester	Thermo Scientific	
EZ-Link HPDP-Biotin	Thermo Scientific	
FITC-Choleratoxin Untereinheit B (CTxB)	Sigma	
NHS- Fluorescein	Thermo Scientific	
Rhodamine Phalloidin	Invitrogen	
Streptavidin-AP	Sigma	

4.8 Antikörper

4.8.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezifität	Ursprung	Verdünnung	Referenz
Anti- α -Tubulin	Humanes Tubulin	Maus	1:100 (IF)	Acris
Anti-β-Aktin	Humanes Aktin	Maus	1:1000 (WB)	Sigma
Anti Caspase 3	Humane Caspase 3	Maus	1:100 (WB)	Oncogen/Merck Millipore
Anti-CPn0473	Chlamydiales CPn0473	Hase	1:25 (IF) 1:500 (WB)	Tim Fechtner 2013
Anti-DnaK	Chlamydiales DnaK	Maus	1:500 (WB) 1:50 (IF)	Birkelund
Anti-EFTu	Chlamydiales EFTu	Ziege	1:100 (WB)	Sonja Stallmann 2015
Anti-EGFR-C	Humaner EGFR Rezeptor (Oberflächenpräsentiert)	Maus	1:200 (WB) 1:50 (IF)	Santa Cruz
Anti-EpHA2	Humaner Ephrin Rezeptor	Hase	1:1000 (WB)	Santa Cruz
Anti-GST	Glutathion-S-Transferase	Hase	1:1000 (WB)	Santa Cruz
Anti-hTfr	Humaner Transferrin Rezeptor	Maus	1:100 (IF)	Santa Cruz
Anti. PARP	Humane Poly(ADP-ribose) - Polymerase 1	Maus	1:100 (WB)	Enzo Lifesciences
Anti-Penta-His	6x und 10x Histidin	Maus	1:2500 (WB)	Quiagen
Anti-Pmp21	Chlamydiales Pmp21	Hase	1::200 (WB) 1:20 (IF)	Elisabeth Becker 2014
Anti-TMEM16F	Humanes Transmembranprotein 16	Hase	1:300 (WB 1:25 (IF)	Santa Cruz
Anti-Xkr8	Humanes Xk-related Protein 8	Ziege	1:300 (WB 1:25 (IF)	Santa Cruz
Pathfinder	Chlamydiales LPS	Maus	1:6 (IF)	Biorad

IF=Immunofluoreszenz, WB=Westernblot

Antikörper	Spezifität	Ursprung	Verdünnung	Referenz
Anti-Maus-AP	Maus	Kaninchen	1:7500 (WB)	Promega
Anti-Kaninchen-AP	Kaninchen	Ziege	1:7500 (WB)	Promega
Anti-Ziege-AP	Ziege	Maus	1:1000 (WB)	Santa Cruz
Alexa488-anti-Maus	Maus	Ziege	1:200 (IF)	Invitrogen
Alexa594-anti-Maus	Maus	Ziege	1:200 (IF)	Invitrogen
Alexa594-anti-Maus	Maus	Esel	1:200 (IF)	Invitrogen
Alexa488-anti-Kaninchen	Kaninchen	Ziege	1:200 (IF)	Invitrogen
Alexa594-anti-Kaninchen	Kaninchen	Ziege	1:200 (IF)	Invitrogen
Alexa594-anti-Kaninchen	Kaninchen	Esel	1:200 (IF)	Invitrogen
Alexa488-anti-Ziege	Ziege	Esel	1:200 (IF)	Invitrogen

4.8.2 Sekundäre Antikörper

IF=Immunofluoreszenz, WB=Westernblot

4.9 Kits

Kit	Hersteller
Plasmid MIDI Kit	Quiagen
SYBR Green PCR Mastermix	Applied Biosystems

4.10 Größenstandards

DNA Größenstandard	Fragment-/Protein-Größen
1 KB DNA-Ladder Mix	10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 3.000 , 2.500,
	2.000, 1.500, 1.200, 1.000 , 900, 800, 700, 600, 500 , 400, 300,
	200, 100 [bp]

Protein Größenstandards	Fragment-/Protein-Größen
PageRuler [™] Prestained	170, 130, 100, 70 , 55, 40, 35, 25, 15, 10 [kDa]
PageRuler™ Prestained Plus	250, 130, 95, 72 , 55, 36, 28 , 17, 11 [kDa]
NativeMark Unstained Protein	1.236, 1.048, 720, 480, 242, 146, 66, 20 [kDa]
Standard	

4.11 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide, wurden von Firma Biomers.net GmbH geliefert. Sie wurden nach Ankunft in sterilem ddH₂O gelöst, sodass sie eine Konzentration von 50 pmol besitzen.

4.11.1 Amplifikations-Oligonukleotide

Die 60 Nukleotid langen Oligonukleotide zur Amplifikation von DNA-Sequenzen für die Klonierung mittels Homologer Rekombination in Hefe (5.2.5) besitzen eine 18 – 20 Nukleotidlange Homologie zur DNA-Sequenz (schwarz) und eine 40 Nukleotid-lange Homologie zum Zielvektor(rot). Während der Amplifikation mittels PCR werden so jeweils 40 Nukleotide an das 3` und an das 5`-Ende der DNA-Sequenz addiert, die für die Insertion des PCR-Produkts durch Homologe Rekombination in einen linearisierten Vektor benötigt werden.

Interne Nr.	Name	Sequenz (5`→3`)
C-1212	Cpn0498 in 10er hin	ATTCATTAAAGAGGAGAAATTAACTGGATCCCCCGGGATGAAATC
		AAGATGTTCTATTGATAA
C-1313	Cpn0473 pFT25 hin neu	ATTTCACACAGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAACT
		ATGGCAGTTGGTGGCGTAGG
C-1507	pFT25-Cpn0473-N hin	ACAATTTCACACAGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAACT
		ATGGCAGTTGGTGGCGTAGG
C-2006	25_473-rev	CAGGAGTTCAATGGTGATGGTGATGGTGGTGGTGGTGGTG
		CTGTCCCTCTGGAGCAAATG
C-2635	473_Cys_N_fwd	ATTTCACACAGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAACT ATG TGT
		GCAGTTGGTGGCGTAGG
C-2636	473_Cys_C_rev	GAGTTCAATGGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGGTG ACA
		CTGTCCCTCTGGAGCAAATG
C-2637	473_Cys_int_fwd	ATAAAGCAGCAAAACATCTG TGT CGTAAGGCTTTAGAAAA
C-2638	473_Cys_int_rev	TTTTCTAAAGCCTTAC ACA CAGATGTTTTGCTGCTTTAT
C-2731	LIPP_pAE67_fwd	CGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG
		ATGGCAGTTGGTGGCGTAGG
C-2732	LIPP_pAE67_tev	CTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATCAGTTATCTA
		CTGTCCCTCTGGAGCAAATG
C-2733	LIPP_mCherry_fwd	GCTCAAGCTTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCC
		ATGGCAGTTGGTGGCGTAGG
C-2734	LIPP_mCherry_rev	TGATGATGGCCATGTTATCCTCCTCGCCCTTGCTCACCAT
		CTGTCCCTCTGGAGCAAATG
C-2735	LIPP_pAE66_fwd	GGGCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAG
		ATGGCAGTTGGTGGCGTAGG

C-2736	LIPP_pAE66_rev	CTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATCAGTTATCTA
		CTGTCCCTCTGGAGCAAATG
C-2766	473-N_OmcB-BD rev	TAGGAACAGGTGCTGGCTTTGTTTCCGCACTGGATCCCAG
		CTGAACTGTAGACGTCGCTC
C-2767	OmcB-BD_473-N fwd	TTTTTTATCAGGAGTTCGAGGAGCGACGTCTACAGTTCAG
		CTGGGATCCAGTGCGGAAAC
C-2768	OmcB-BD_pFT25 rev	CAGGAGTTCAATGGTGATGGTGATGATGGTGGTGATGGTG
		TCTTCCGTAGCAAGACTCTT
C-1819	473-N527_OmcB-BD rev	TAGGAACAGGTGCTGGCTTTGTTTCCGCACT
		GGATCCCAGAGGCTCTCCTTCAGAAC
C-2821	LIPP-BD_GST_40_hin	TCGTCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCCTGGGATCCCCC <mark>GCGTT</mark>
		CGGAGAGCAGGCTGC
C-2822	LIPP-BD_GST_40_her	GCAGATCGTCAGTCAGTCAATGGTGATGGTGATGGTGCCC
		TCCCTGCGCTGCAGATCCCT
C-2823	LIPP-SID_GST her	CAGATCGTCAGTCAGTCAATGGTGATGGTGATGGTGCCC
		TGCAGCCGATGGATTTGAAAC
C-2988	LIPP_176_pFT9 fwd	GTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGTATTCATG
		GCAGTTGGTGGCGTAGGCGG
C-2989	LIPP_176_pFT9 rev	GCACAAGGCCCTTAATTTTCCAATAACCTAGTATAGGGGA
		AGGCTCTCCTTCAGAAC
C-2990	LIPP_pET24_fwd	TAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT
		ATGGCAGTTGGTGGCGTAGG
C-2991	LIPP_pET24_rev	CTTTGTTAGCAGCCGGATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTG
		CTGTCCCTCTGGAGCAAATG
C-3096	LIPP Bp 1-1068 rev	CAGCTCTACGAGCGATCTCTTCCGCAAAAGATAAGCTAGG
		GGATTCTACGAAAGTAATAA
C-3097	LIPP Bp 1369-1524 fwd	ACCTCCTACTGTGGAGGATCTTATTACTTTCGTAGAATCC
		CCTAGCTTATCTTTTGCGGA
C-3098	LIPP Bp 1-1173 rev	ATTGTGTATTACTTTCTGATGCAAGATCATCTACAGCTGA
		TCCCTCTACCCCACCTGTTT
C-3099	LIPP Bp 1288-1524 fwd	AGAGACTGCGGAAGCTCCCGAAACAGGTGGGGTAGAGGGA
		TCAGCTGTAGATGATCTTGC

4.11.2 Real-Time PCR-Oligonukleotide

Interne Nr.	Name	Sequenz (5`→3`)
C-2019	16S hin	CCAACACCTCACGGCACGAG
C-2020	16S her	CGCCTGAGGAGTACACTCGC
C-3035	GAPDH CHO fwd	TGGCTACAGCAACAGAGTGG
C-3036	GAPDH CHO rev	GTGAGGGAGATGATCGGTGT

4.11.3 Sequenzierungs-Oligonukleotide

Nr.	Name	Sequenz (5`→3`)
C-795	seq pKM32 tim hin	TTTCGTCTTCACCTCGAGAAA
C-1292	pFT25 seq-rev	CAATAAAAAACGCCCGGCGG
C-1490	Seq hin mCherry	TTTAGTGAACCGTCAGATCC
C-1491	Seq her mCherry	GCCATGTTATCCTCCTCGCC
C-2992	pAE67_seq	CAAAGACCCCAACGAGAAGC

4.12 Plasmide

4.12.1 Verwendete Plasmide.

Interne Nr.	Name	Vektor	Konstruktion
# 1612	pFT8	pKM32	Expressionsvektor mit GST-Tag und C-terminalem 6x Histidin-
			Tag für <i>E. coli</i> (T. Fechtner)
# 1720	mCherry	mCherry	Humaner Transfektionsvektor mit C-terminalem mCherry (A.
	CEN		Engel)
# 1895	pKM55	pEYFP-	Humaner Transfektionsvektor mit C-terminalem EYFP (K.
		EGFR	Mölleken)
# 1924	pFT25	pKM32	Expressionsvektor mit C-terminalem 10x Histidin-Tag für
			<i>E. coli</i> (T. Fechtner)
# 2101	pJG9	pFT25	Expressionsvektor mit CPn0473 mit deletierter
			Infektionserhöhenden Domäne (AS 1-170) und C-terminalem
			10x Histidin-Tag für <i>E. coli</i> (T. Fechtner)
# 2138	pFT34	pFT25	Expressionsvektor mit CPn0473 und C-terminalem 10x
			Histidin-Tag für <i>E. coli</i> (T. Fechtner)
# 2150	pFT46	pKM55	Humaner Transfektionsvektor für LIPP mit C-terminalem EYFP
			(K. Mölleken)
# 2272	pJG14	pFT25	Expressionsvektor mit CPn0473 mit deletierter Bindedomäne
			(AS 307-356) und C-terminalem 10x Histidin-Tag für <i>E. coli</i> (T.
			Fechtner)
# 2301	pAE67	pEGFP-	Humaner Transfektionsvektor mit N-terminalem EGFP (A.
		FYVE	Engel)
# 2302	pAE66	pAE67	Humaner Transfektionsvektor mit N-terminalem mCherry (A.
			Engel)
# 2493	pHA1	pFT34	Cpn0473 mit einem Einzelcystein, integriert am N-Terminus H.
			Ahlert
# 2494	pHA2	pFT34	Cpn0473 mit einem Einzelcystein, integriert am C-Terminus
			(H. Ahlert)

Interne Nr.	Name	Vektor	Konstruktion
# 2496	pJG28	pFT25	Integration des cpn0473-Gens mit einem zusätzlichen
			Basentriplett kodierend für ein einzelnes Cystein, integriert an
			Position 1033 (AS 307). pFT25 linearisiert mit Smal.
# 2435	pJG23	mCherry	Integration des cpn0473-Gens von C. pneumoniae. mCherry
		CEN	CEN linearisiert mit Smal.
# 2436	pJG24	pAE66	Integration des cpn0473-Gens von C. pneumoniae. pAE66
			linearisiert mit Smal.
# 2437	pJG25	pAE67	Integration des cpn0473-Gens von C. pneumoniae. pAE67
			linearisiert mit Smal.
# 2438	pJG26	pFT25	Integration des cpn0473-Genabschnitt (Bp 1-765, AS 1-255)
			und des omcb-Genabschnitt, kodierend für die OmcB-
			Bindedomäne. pFT25 linearisiert mit Smal.
# 2562	pJG31	pFT9	Integration des cpn0473-Genabschnitt (Bp 1-528, AS 1-176).
			pFT9 linearisiert mit <i>XagI (EcoNI).</i>
# 2732	pJG32	pFT8	Integration des cpn0473-Genabschnitt (Bp 1-528, AS 1-176).
			pFT8 linearisiert mit <i>Smal.</i>
# 2735	pJG33	pFT25	Integration des cpn0473-Gens ohne Selbstinteraktionsdomäne
			(SID, Bp1069-1368 AS 357-456). pFT25 linearisiert mit Smal.
# 2736	pJG34	pFT25	Integration des cpn0473-Gens ohne Transmembrandomäne
			(TM, Bp1174-1287, AS 392-429). pFT25 linearisiert mit Smal.
# 2737	pJG35	pET24	Integration des cpn0473-Gens von C. pneumoniae. pET24
			linearisiert mit <i>EcoRI.</i>

4.12.2 Neu-generierte Plasmide

4.13 Zellen und Zelllinien

4.13.1 Prokaryotische Zellen und Zelllinien

Escherichia coli:	
Origami (DE3):	Δara-leu 7697 ΔlacX74 ΔphoAPvull phoR araD139 galE galK rpsLF`[lac+ (laclq)pro] gor522::Tn10(TcR) trxB::kan (DE3) (Novagen)
Rosettta	<i>F-ompT</i> hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) pRARE (Camr) (Novagen)
XL ₁ -blue:	supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac-[F' proAB laclq ZM15 Tn10(tetr)] (Stratagene)

Chlamydia spp.:

Chlamydia pneumoniae GID	Herkunft: Giessener Isolat eines Patienten (Jantos et al 1997)
Chlamydia trachomatis Serovar E	DK-20 (Institute of Ophthalmology, London), bereitgestellt durch K. Mölleken
Chlamydia trachomatis Serovar L2/434/Bu	ATCC Nr. VR-902B, bereitgestellt durch K. Mölleken

4.13.2 Eukaryotische Zelllinien

Epithelzellen:

CHO K1	Ovarien-Zelllinie, chinesischer Hamster (<i>Cricetulus griseus</i>), Epitheliale Morphologie, 22 Chromosomen (ATCC Nr.: CCL-61)
CHO PSA 3	Ovarien-Zelllinie, chinesischer Hamster (<i>Cricetulus griseus</i>), Epitheliale Morphologie, 22 Chromosomen mit einer Mutation im <i>pssl</i> -Gen
HEp-2 Zelllinie:	epitheliales Larynxkarzinom-Zelllinie menschlichen Ursprungs,
	HeLa-Morphologie, 46 Chromosomen (ATCC Nr.: CCL-23)

Saccharomyces cerevisiae:

CEN.PK2_1C: MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8C SUC2 (Entian, Schuster et al. 1999)

4.14 Medien:

4.14.1 Medien für Escherichia coli

LB-Medium

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

In 1 Liter deionisiertem Wasser lösen und autoklavieren.

Die Selektion erfolgt durch Zugabe der Antibiotika Ampicillin (50 μg/ml) oder Kanamycin (15 μg/ml) nach abkühlen des Mediums.

4.14.2 Medien für Saccharomyces cerevisiae:

YPD⁺-Medium	10	g	Hefeextrakt
	20	g	Casein Hydrolysat (Peptone)
	20	g	Glucose
	2	ml	Adeninstocklösung (2mg/ml)
	4	ml	Tryptonstocklösung (4 mg/ml)
	13,5	g	Agar (nur bei Festmedium)

SD-Medium

20	g	Glucose
1,7	g	Hefe Stickstoff (Basis) (YNB)
5	g	Ammoniumsulfat
2	g	Aminosäuremix
15	g	Agar (nur bei Festmedium)

In einem Liter deionisiertem Wasser lösen und autoklavieren. Das SD-Minimal-Festmedium wird vor dem Autoklavieren durch Zugabe von 1 M NaOH auf pH 6 eingestellt.

Der Aminosäuremix besteht aus einer Kombination von Aminosäuren, Chemikalien und Nukleo-Basen (Tab. AS-Mix). Der Mix wird für 15 Minuten mit sterilen Mahlkugeln gemischt. Die Selektion im SD-Medium erfolgt durch Ausschluss der Nukleo-Base Uracil im Aminosäuremix.

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

4.14.3 Zellkulturmedium

DMEM-basiertes Zellkulturmedium wurde für die Kultivierung und während der Experimente mit den HEp-2 Zellen, F-12K-basiertes Zellkulturmedium für die CHO Zelllinien verwendet.

DMEM und F-12K Zellkulturmedium (+5)

500 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GlutaMAX)

F-12K Medium (Kaighn's Modification of Ham's F-

	12 Medium)	
50 ml	FKS (hitzeinaktiviert)	Endkonzentration: 10 %
5 ml	MEM nicht essentielle Aminosäuren (100 x)	Endkonzentration: 1 x
5 ml	MEM Vitamine (100 x)	Endkonzentration: 1 x
5 ml	Amphotericin (200 mM)	Endkonzentration 2 mM
500 µl	Gentamicin (50 mg/ml)	Endkonzentration 50 μg/ml

Alle Komponenten wurden unter sterilen Bedingungen zusammen pipettiert, gemischt und bei 4°C gelagert. Zellkulturzusätze wurden von der Firma Invitrogen bezogen. Die Zugabe von 25 µg/ml Plasmocyin beim Passagieren und Auftauen von Epithelzellen verhinderte eine mögliche Mykoplasmen Kontaminationen.

4.14.4 Chlamydien-Zellkulturmedium

Um die Infektion durch chlamydiale Partikel zu erleichtern, wurde beim Medienwechsel 2 Stunden nach Infektion $1,2 \mu g/ml$ Cyclohexamid beigegeben. Cyclohexamid hemmt die Wirtszelleigene Proteinsynthese und erhöht die ATP-Synthese, was zur Verbesserung der Infektion führt.

5 Methoden

5.1 Kultivierung von Zellen

5.1.1 Kultivierung von Escherichia coli

Die Kultivierung der *E. coli* Stämme erfolgt unter aeroben Bedingungen bei 37 °C unter ständigem Schütteln in LB-Medium. Die Selektion von Transformanten erfolgt durch Zugabe von 50 μ g/ml Ampicillin oder 15 μ g/ml Kanamycin.

5.1.1.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Die Transformation von Plasmiden aus *S. cerevisiae* Lysaten (5.2.7.2) erfolgte in elektrokompetente XL₁-blue Zellen. Die elektrokompetenten Zellen besitzen eine um 100-fach höhere Transformationseffizienz als die chemisch kompetenten Zellen (5.1.1.2). Die Stabilität der transformierten Vektoren wird durch eine Mutation in der EndonukleaseR (*hsdR*) verbessert, welche den Abbau der Vektoren durch das *EcoK*-Endonuklease System verhindert.

- Die *E. coli*-Zellen aus der Stammsammlung werden auf einer Tetracyclin-haltige (30 µg/ml)
 LB-Platte ausgestrichen und ü/N bei 37 °C inkubiert.
- Zwei 5 ml ü/N-Kulturen werden angesetzt, aus denen am darauffolgenden Tag je eine 1 Liter Kultur in LB-Medium angeimpft wird (Start OD=0,1).
- Nach Inkubation bei 37 °C unter ständigem Schütteln erfolgt die Ernte der Zellen bei einer OD₆₀₀ von 0,7 – 0,8.
- Die Kulturen werden auf Eis gekühlt und bei 4 °C und 4000 Upm 15 Minuten (Beckmann J2-21) abzentrifugiert.
- Die Kulturen werden zweimal mit 1000 ml sterilem ddH₂O gewaschen und anschließend in 20 ml sterilem, eiskalten 10 %igem Glycerin resuspendiert und erneut bei 4000 Upm und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert (Beckmann J2-21).
- Die Kulturen werden in je 3 ml 10 %igem Glycerin resuspendiert und nach Aliquotierung (45 μl) für 1 Minute in flüssigem Stickstoff eingefroren.
- > Die elektrokompetenten Zellen werden bei -80 °C gelagert.

5.1.1.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Die Transformation durch Hitze (5.2.7.1) bedarf chemisch kompetenter *E. coli* Zellen. Die re-Transformation von Plasmiden in XL₁-blue-Zellen dient der Präparation größerer Mengen Plasmid DNA. Sie besitzen die gleiche Mutation in der EndonukleaseR, wie die elektrokompetenten XL₁-blue-Zellen. Die Transformation in die Expressionsstämme, BL21, Origami(DE3) und Rosetta dient der Proteininduktion.

- Die *E. coli* Zellen aus der Stammsammlung in 5 ml SOB-Medium inokulieren und bei 37 °C unter ständigem Schütteln ü/N inkubieren.
- 50 ml des SOB-Mediums werden mit 1 ml der ü/N-Kultur angeimpft und bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert.
- Die Ernte der Zellen erfolgt bei OD=0,5.
- Die Kultur wird auf Eis gekühlt und dann bei 4 °C und 5.000 Upm für 10 Minuten zentrifugiert.
- > Das Zellpellet wird in 4 ml eiskaltem FSB-Puffer und 140 μl DMSO resuspendiert.
- > Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wird erneut 140 μl DMSO hinzugegeben.
- Die Zellen werden aliquotiert (10 μl), in flüssigem Stickstoff gefroren und bei 80 °C gelagert.

5.1.2 Kultivierung von Saccharomyces cerevisiae

Die Kultivierung der *S. cerevisiae* Stämme erfolgt in YPD+-Medium unter aeroben Bedingungen bei 30 °C. Die *S. cerevisiae* Transformanten werden in SD-Selektionsmedium unter Ausschluss der Aminosäure(n) angezogen, deren Synthesegen im transformierten Plasmid integriert ist.

5.1.3 Kultivierung eukaryotischer Epithelzellen

5.1.3.1 Herstellung der Lösungen und Medien für die Zellkultur

Fötales Kälber-Serum (FKS) enthält eine Vielzahl verschiedener Proteine. Darunter befinden sich Wachstumsfaktoren, die für erfolgreiches Kultivieren von Zellen in einer Zellkultur essentiell sind. Das Enzym Trypsin ist eine Sequenz-unspezifische Protease. Sie dient, bei kurzer Anwendung, der Ablösung von humanen Zellen von der Oberfläche der Zellkulturflaschen. Nach der Zell-Ablösung durch Trypsin bietet FKS alternative Substrate für die Reaktion und stoppt diese damit.

- > Das Kälberserum wird bei Raumtemperatur wird aufgetaut.
- Das Serum wird bei 56 °C für 60 Minuten im Wasserbad, unter gelegentlichem Schütteln, hitzeinaktiviert.
- > Das hitzeinaktivierte Serum wird steril aliquotieren (50 ml) und bei -20 °C lagern.
- ▶ Vitamine werden steril aliquotiert (5 ml) und bei -20 °C gelagert.
- > 10 x Trypsin/EDTA (Invitrogen) in 5 ml Aliquots bei -20 °C lagern.
- ▶ Bei Bedarf auftauen und in 95 ml Hank`s-Lösung ohne CaCl₂ und MgCl₂ (HBSS) verdünnen.
- Lagerung der 0,5 x Trypsin/EDTA-Lösung bei 4 °C.

5.1.3.2 Herstellung des Zellkulturmediums

Die Epithelzell-Linie HEp-2 (Mensch), wird in Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM + GlutaMAX) kultiviert, die Epithelzell-Linie CHO-K1 (Hamster) in F12K Medium. Zu 500 ml des entsprechenden Mediums werden folgende Zusätze hinzugegeben:

\triangleright	50 ml hitzeinaktiviertes FKS	(Endkonzentration:10 %)
	5 ml Amphotericin	(Endkonzentration: 2 mM)
\triangleright	5 ml Vitamine	(Endkonzentration: 1x)
	5 ml nicht essentielle Aminosäuren	(Endkonzentration: 1x)
\triangleright	500 μl Gentamicin(50 mg/ml)	(Endkonzentration 50 µg/ml)

5.1.3.3 Trypsin Behandlung von Epithelzellen

Die adhärenten Zelllinien HEp-2 und CHO-K1 werden mit der Proteinase Trypsin von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgelöst. Die Inkubationsdauer sollte hierbei 10 Minuten bei Raumtemperatur nicht überschreiten um Schädigungen der epithelialen Zellen zu vermeiden.

- Das Zellkulturmedium wird aus einer 75 cm² abgenommen und mit 10 ml Hank's Lösung (HBSS) gewaschen.
- 5 ml der 0,5 x Trypsin-Lösung wird in die Zellkulturflasche gegeben und die Zellen unter gelegentlichem Schwenken gelöst.
- > Die Reaktion wird durch Zugabe von 5 ml Zellkulturmedium abgestoppt.

- Die Zellsuspension wird abgenommen, in ein 12 ml Zentrifugations-Röhrchen überführt und für 10 min bei 43.3 g (500 Upm/Rotanta 460R) bei 25 °C zentrifugiert.
- > Das Zellpellet wird in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert.

5.1.3.4 Auftauen von Epithelzellen

CHO und Hep-2 Zellen, abgelöst durch die Trypsin-Behandlung (5.1.3.3), können in *Biofreeze* resuspendiert und anschließend bei -80 °C weggefroren und gelagert werden. Sie können bei Bedarf wieder aufgetaut und rekultiviert werden.

- Aliquot bei RT auftauen.
- > Zellen in F12K-Medium in eine 75 cm² Zellkulturflasche geben.
- ▶ Die Zellkulturflasche bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubieren.

5.1.3.5 Passagieren von Epithelzellen in große Flaschen (75 cm²)

Die Kultivierung von HEp-2- und CHO-K1-Zellen erfolgt in 75 cm² großen Zellkulturflaschen. In einer 75 cm² Zellkulturflasche befinden sich bei konfluentem Wachstum etwa 7,5 x 10^7 Epithelzellen. Um einer Kontamination durch Mykoplasmen vorzubeugen wird, dem Zellkulturmedium bei jeder Passage Plasmocyin (5 µg/ml) zugesetzt.

- > 15 ml Zellkulturmedium wird in die Zellkulturflasche pipettiert.
- > 500 μl der Trypsin-behandelte HEp-2 Zellen bzw. 200μl Trypsin-behandelte CHO Zellen (5.1.3.3) werden ins Medium überführt.
- > Die Flasche wird leicht geschwenkt, um die Zellen gleichmäßig zu verteilen.
- Im Falle der PS-defizienten CHO Zelllinie PSA-3 werden bei jeder Passage 30 µm PS-Liposomen zum Medium hinzugefügt
- Inkubation f
 ür 2 Tage bei 37 °C und 6 % CO₂.

5.1.3.6 Passagieren von Epithelzellen in kleine Flaschen (25 cm²)

Die Infektion von HEp-2 Zellen mit Chlamydien zur Herstellung Gradienten-gereinigter Chlamydien (5.1.4) erfolgt in 25 cm^2 Zellkulturflaschen. In einer 25 cm^2 Zellkulturflasche befinden sich bei konfluentem Wachstum etwa 2,5 x 10⁷ Epithelzellen.

> 5 ml Zellkulturmedium wird in die Zellkulturflasche pipettiert.

- 250 µl der Trypsin-behandelten HEp-2 Zellen (5.1.3.3) werden ins Medium überführt und die Flasche leicht geschwenkt um die Zellen gleichmäßig zu verteilen.
- Inkubation f
 ür 2 Tage bei 37 °C und 6 % CO².

5.1.3.7 Passagieren von Epithelzellen in 24-Well Platten

Für die Bindungsstudien (5.5), die Infektions-Studien (5.5.6) die Transfektionsexperimente (1.2.1), sowie die Lipid-Scrambling Experimente (5.5.9) werden die Epithelzellen in einer 24-Well Platten ausgesät. Im Falle nachfolgender Mikroskopie, werden diese zuvor mit Deckgläschen (\emptyset 12mm) ausgelegt. In einem Well befinden sich bei konfluentem Wachstum etwa 1 x 10⁶ Epithelzellen.

- Die Trypsin-behandelten Zellen (5.1.3.3) werden je nach Bedarf in Zellkulturmedium verdünnt.
- > 1 ml der verdünnten Suspension wird in jedes Well pipettiert.
- Mögliche Luftbläschen unter den Glasplättchen werden mit einer sterilen Spitze entfernt.
- Die 24-Well Platte wird f
 ür 1-2 Tage bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert.

5.1.3.8 Passagieren von Epithelzellen in 6-Well Platten

Für die Ko-Immunopräzipitationsexperimente (5.5.5) und die Protein-Lokalisierungsstudien (5.5.8.1) werden die Epithelzellen in 6-Well Platten ausgesät. In einem Well befinden sich bei konfluentem Wachstum etwa $4 \ge 10^6$ Epithelzellen.

- Die Trypsin-behandelten Zellen (5.1.3.3) werden je nach Bedarf in Zellkulturmedium verdünnt.
- > 1ml der verdünnten Suspension wird in jedes Well pipettiert.
- Die 6-Well Platte wird f
 ür 1 2 Tage bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert.

5.1.4 Kultivierung von C. pneumoniae und C. trachomatis

Chlamydien sind obligat intrazelluläre Pathogene. Sie vermehren sich ausschließlich innerhalb ihrer Wirtszelle. Zur Verbesserung der Infektion werden sie auf die humanen HEp-2 Wirtszellen zentrifugiert. Ein Medienwechsel mit Zellkulturmedium inklusive Cyclohexamid verbessert die Infektion durch Hemmung der wirtszelleigenen Proteinbiosynthese bei gleichzeitiger Erhöhung der ATP-Synthese. Aliquots von hochinfektiösen (Gradienten-gereinigten) *C. trachomatis* wurden freundlicherweise durch Katja Mölleken zur Verfügung gestellt.

5.1.4.1 Primärinfektion von Chlamydien

Chlamydien werden in konfluent gewachsen HEp-2 Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Eine eingefrorene Chlamydien-Suspensionen (Pool) wurden freundlicherweise durch Katja Mölleken zur Verfügung gestellt.

- Eine Chlamydien-Suspension aus dem -80 °C-Schrank wird bei 37 °C im Brutschrank erwärmt.
- Mit 1 ml aufgetauter Chlamydiensuspension können bis zu vier konfluent bewachsene 25 cm² Zellkulturflaschen infiziert werden.
- Die aufgetaute Suspension wird durch Zugabe von Zellkulturmedium auf ein Volumen von 5 ml pro 25 cm² Zellkulturflasche aufgefüllt.
- ▶ 8 konfluent bewachsenen Zellkulturflaschen werden einmal mit HBSS gewaschen.
- > Die Medium mit infektiösen Chlamydien wird vorsichtig in die Flaschen pipettiert.
- Die Flaschen werden für 60 Minuten bei 30 °C und 1560 x g (2920 Upm/Rotanta 460R) zentrifugiert und für 1 Stunde bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert.
- Das Medium wird vorsichtig abgenommen und die infizierten Zellen mit 5 ml Chlamydienkultur-Medium (Zellkulturmedium + 1,2 μg/ml Cyclohexamid) überschichtet.
- ▶ Die Flaschen werden erneut bei 37 °C und 6 % CO₂ für 72 Stunden inkubiert.
- > Die infizierten Zellen wird mit einem sterilen Zellschaber vom Flaschenboden gelöst.
- Die Suspension (40 ml), vereint in einem Falcon-Röhrchen, wird für 45 Sekunden bei 40 % Leistung mit dem Ultraschallstab (Sonoplus HD2200) sonifiziert.
- Die Suspension wird f
 ür 10 Minuten bei 2670 Upm (Rotanta 460R) und 20 °C zentrifugiert (Differentialzentrifugation).
- > Der Überstand wird in ein neues Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert.
- Der Überstand des zweiten Zentrifugationsschrittes kann zur weiteren Infektion neuer konfluent bewachsener 25 cm² Zellkulturflaschen verwendet oder eingefroren werden.

5.1.4.2 Sekundär-Infektion von Chlamydien

Die Sekundär-Infektion dient der Erhöhung infektiöser chlamydialer Partikel. Sie wird ebenfalls auf HEp-2 Zellen in 25 cm² Zellkulturfalschen durchgeführt.

- Der Überstand einer primären Chlamydien-Infektion (5.1.4.1) wird mit 5 ml Zellkulturmedium pro 25 cm² Zellkulturflasche gemischt.
- Das Medium mitsamt der infektiösen Chlamydien wird auf 32 konfluent bewachsenen 25 cm² Zellkulturflaschen verteilt.
- Die Flaschen wird für 60 Minuten bei 30 °C und 1560 x g (2920 Upm/Rotanta 460R) zentrifugiert und für 1 Stunde bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert.
- Das Medium wird vorsichtig abgenommen und die infizierten Zellen mit 6 ml Chlamydienkultur-Medium (Zellkulturmedium + 1,2 μg/ml Cyclohexamid) überschichtet.
- Die Flaschenwird erneut bei 37 °C und 6 % CO₂ für 72 Stunden inkubiert.
- Die infizierten Zellen werden mit einem sterilen Zellschaber vom Flaschenboden gelöst.
- Die Suspension wird in 50 ml Falcon-Röhrchen für 45 Sekunden bei 40 % Leistung mit dem Ultraschallstab (Sonoplus HD2200) sonifiziert.
- Die Suspension wird f
 ür 10 Minuten bei 2670 Upm (Rotanta 460R) und 20 °C zentrifugiert (Differentialzentrifugation).
- > Der Überstand wird in ein neues Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert.
- Der Überstand des zweiten Zentrifugationsschrittes kann anschließend mittels Dichtegradientenzentrifugation gereinigt werden.

5.1.4.3 Reinigung von Chlamydien durch Dichtegradientenzentrifugation

Durch die Dichtegradientenzentrifugation werden Chlamydien von eukaryotischen Zelltrümmern gereinigt. Die Gradienten-gereinigten Chlamydien können dann für Infektionsstudien verwendet werden (5.5.6).

- Den Überstand einer sekundären Infektion (5.1.4.2) wird in ein steriles Ultrazentrifugationsröhrchen überführt.
- ➤ Zentrifugation für 30 Minuten bei 4 °C und 30.000 x g (15.000 Upm/Beckmann Avanti J-25).
- Das Pellet wird in 1 ml HBSS resuspendiert und f
 ür 30 Minuten bei 4 °C und 21885 x g (15.000 Upm/Heraeus Biofuge Primo R) zentrifugiert.
- Das Pellet wird in 1 ml HBSS im Ultraschallwasserbad vollständig resuspendiert.
- Ein steriles Zentrifugationsröhrchen wird mit 9 ml 30 % Gastrographin in sterilem ddH₂O befüllt.
- Der Gastrographin-Gradienten wird mit der Chlamydiensuspension überschichtet und 1 Stunde bei 4 °C und 30.000 x g (15.000 Upm/Beckmann J2-21) zentrifugiert.

- Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das Chlamydienpellet in 1 ml HBSS resuspendiert.
- Zentrifugation f
 ür 30 Minuten bei 4 °C und 21885 x g (15.000 Upm/Heraeus Biofuge Primo R).
- > Das Pellet wird erneut in 1 ml HBSS resuspendiert und erneut zentrifugiert.
- Das Chlamydienpellet wird in 200 μl SPG-Puffer vollständig resuspendiert (Ultraschallwasserbad) und auf 1 ml mit SPG-Puffer aufgefüllt.
- \blacktriangleright Die Gradienten-gereinigten Chlamydien können in 200 µl Aliquots bei -80 °C gelagert werden.
- Die Infektiösität wird bei 63-facher Vergrößerung in einer 96 Well Platte durch Auszählen aller Zellen und darin eingeschlossener Inklusionen ermittelt.

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der Amplifikation von DNA-Sequenz. In einem Zyklus, bestehend aus der Denaturierung der Matrize, der Anlagerung der Primer (4.11) und der Synthese und Elongation des neuen DNA-Strangs durch eine Polymerase, wird die Kopienzahl einer DNA-Sequenz verdoppelt. Die Amplifikation erfolgt durch die Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase.

2	μl	Template-DNA (25 ng/μl)
1	μl	Oligonukleotid hin (50 pmol)
1	μl	Oligonukleotid her (50 pmol)
0,5	μl	Polymerase (1U/µl)
10	μl	Puffer (5 x)
34,5	μl	ddH ₂ O

Die Berechnung der Temperatur zur Anlagerung der Oligonukleotide erfolgt nach folgender Formel: 3 x A + 2 x B [°C]

A: Anzahl der Guanin- und Cytosinbasen des Oligonukleotids komplementär zur MatrizeB: Anzahl der Adenin- und Thyminbasen des Oligonukleotids komplementär zur Matrize

Die optimale Elongationstemperatur der Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase beträgt 72 °C. Die Zeit des Elongationsschritts wird durch die Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz definiert. Die Polymerase benötigen 30 Sekunden für 1000 Nukleotide.

Schritt	Temperatur	Zeit	
Erste Denaturierung	95 °C	1 min	
Denaturierung	95 °C	15 sek	
Annealing	x °C	15 sek	34 x
Elongation	72 °C	x min	
Finale Elongation	72 °C	7 min	
Abkühlung	16 °C	∞	

Die PCR erfolgt im Thermocycler (Biorad) unter folgenden Bedingungen:

Die Reaktion wird anschließend mittels Agarose-Gel Elektrophorese (5.2.4) überprüft.

5.2.2 Quantitative Real-Time PCR

Die Quantitative Real-Time PCR beruht auf dem Prinzip der Polymerase Kettenreaktion (5.2.1) und dient der Quantifizierung zuvor isolierter DNA über den DNA interkalierenden Farbstoff SYBR Green. Die Messung des Farbstoffs erfolgt dabei während der Elongationsphase der PCR. Erreicht diese Messung einen festgesetzten Schwellenwert (Threshold) wird dieser Zyklus als CT-Wert (Cycle Threshold) vermerkt. Je mehr DNA in der Probe enthalten ist, desto schneller ist der CT-Wert erreicht. Zur Analyse der Anzahl pathogener Partikel in einer eukaryotischen Zelle werden die Genome des Pathogens und des Wirts mit spezifischen 16S rRNA, respektive GAPDH Primern amplifiziert.

10	μl	Totale DNA-DNA (20 ng/µl)
4	μl	Oligonukleotid Mix (500nmol)
15	μl	SYBR Green Master Mix
1	μl	ddH ₂ O

Die PCR erfolgt im ABI PRISM 7000 Sequence Detektion System (Applied Biosystems) unter folgenden Bedingungen:

|--|
UDP Aktivierung	50 °C	2 min		
Denaturierung	95 °C	2 min		
Denaturierung	95 °C	15 sek	60 %	
Elongation (Messung)	60 °C	1 min	00 X	

Die abschließende Quantifizierung der Infektiösität erfolgt nach der $\Delta\Delta$ CT-Methode.

5.2.3 Restriktion von DNA-Sequenzen

DNA-Sequenzen lassen sich durch Restriktionenzyme (4.5) spalten. Auf diese Weise lassen sich Plasmide linearisieren, Gene isolieren oder aber DNA-Insertionen in Plasmiden nachweisen. Die Reaktion erfolgt für mindestens 2 Stunden oder aber ü/N bei 30 °C respektive 37 °C in vom Hersteller mitgelieferten Puffern.

х	μl	DNA
0,1	Unit	Restriktionsenzym
2	μl	Puffer (10x)
17-x	μl	ddH ₂ O

Die Reaktion wird anschließend mittels Agarose-Gel Elektrophorese (5.2.4) überprüft.

5.2.4 Agarose-Gel Elektrophorese

DNA Fragmente lassen sich ihrer Größe nach in einem Agarose-Gel auftrennen. Die negative Ladung des Zucker-Phosphat Rückgrat lässt die DNA in einem elektrischen Feld in Richtung des positiven Pols wandern. Die Laufgeschwindigkeit großer DNA Fragmente ist dabei geringer als die der kleineren Fragmente.

- 700 mg Agarose werden in 100 ml Wasser durch Erhitzen in der Mikrowelle bei 900 Watt gelöst.
- 10 µl der Ethidiumbromid-Stocklösung (10 mg/ml) werden zur Agaroselösung gegeben und in eine Gelkammer gegossen.
- Das ausgekühlte Gel wird in die Elektrophorese Kammer gesetzt und mit TBE-Puffer bedeckt.
- > Die DNA-Probe wird mit DNA-Ladepuffer (6x) gemischt und in die Gel-Tasche überführt.

- Die Elektrophorese-Kammer wird an ein Stromgerät (Electrophoresis Power Supply EPS 301) angeschlossen.
- Die Elektrophorese verläuft bei 140 V. Anschließend wird das Gel mittels UV Licht dokumentiert (Geldokumentationssystem).

5.2.5 Transformation in S. cerevisiae CenPK2

Die Integration von DNA-Sequenzen erfolgt in der Hefe *S.* cerevisiae durch Homologe Rekombination. Kompetente Hefezellen werden durch die Lithiumacetat-Methode (Gietz, Schiestl et al. 1995) hergestellt.

- Eine 5 ml Übernachtkultur wird in YPD+-Medium angesetzt.
- Die Zellzahl der ü/N-Kultur wird mittels OD Messung ermittelt, um eine 50 ml Kultur auf 5 x 10⁶ Zellen/ml (OD=0,1) anzuimpfen.
- Die Kultur wird bei 30°C unter ständigem Rotieren inkubiert.
- Bei einer Zellzahl von 2 x 10⁷ Zellen/ml (OD=0,3) werden die Zellen geerntet.
- Die Kultur wird bei 3500 Upm, bei RT (Heraeus Megafuge 1.0R) für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend mit 25 ml ddH₂0 gewaschen.
- Das Zellpellet wird in 1 ml 100 mM LiAc pH 8,4 8,9 resuspendiert und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.
- Die Zellen werden für 5 Sekunden bei 13.000 Upm, bei RT (Heraeus Biofuge pico) sedimentiert und in 100 mM LiAc pH 8,4 8,9 (Zellmenge 2 x 10⁹ Zellen/ml) resuspendiert.
- Die Zellen werden in 50 μl Aliquots aufgeteilt und erneut sedimentiert
- Die Carrier DNA (2 mg/ml) wird währenddessen für 10 Minuten bei 100 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt.
- Die Zellen werden in folgendem "Transformationsmix" resuspendiert:

36	μl	1 M LiAc pH 8,4-8,9
50	μl	Carrier DNA
x	μl	zu transformierende DNA (0,1 – 1 μg)
		lin. Plasmid und PCR Produkt (1:3)
34-x	ul	ddH ₂ 0

- Zum Mix werden 240 μl PEG (50 % w/v) hinzugegeben und anschließend gut gemischt (Vortex Genie).
- Nach 30 Minuten Inkubation bei 30 °C erfolgt der Hitzeschock für 30 Minuten bei 42 °C.
- Der Transformationsansatz wird für 5 Sekunden bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge pico) bei RT sedimentiert und in 100 μl ddH₂O resuspendiert.
- 90 % und 10 % des Ansatzes wird auf Selektionsplatten ausgestrichen und bei 30 °C für 2 Tage inkubiert.

5.2.5.1 Integration von DNA Fragmenten über Homologe in vivo Rekombination

Mit Hilfe der Hefe-eigenen Homologen Rekombination können DNA-Sequenzen in Plasmide erfolgreich inseriert werden. Hierzu wird das Gen zunächst per PCR (5.2.1) mit einer 40 Basenpaar langen Homologie zum späteren Zielvektor amplifiziert. Der Zielvektor wird währenddessen durch ein Restriktionsenzym an der gewünschten Insertions-Stelle linearisiert. Das PCR-Produkt sowie der linearisierte Vektor wird anschließend mittels Hefetransformation (5.2.5) in S. cerevisiae transformiert und durch die Hefe rekombiniert.

5.2.6 DNA Isolation aus S. cerevisiae

Die in *S.* cerevisiae rekombinierten Plasmide tragen eine CEN6/ARS4-Sequenz, eine Chromosomen-Zentromer-Region die es einer Hefezelle ermöglicht das Plasmid einmal pro Zelle zu tragen. Zur weiteren Vervielfältigung muss das Plasmid aus der Hefe isoliert werden.

- Die S. cerevisiae Zellen werden in 5 ml SD-Medium angeimpft und bei 30 °C ü/N rotierend inkubiert.
- > 2 ml der Kultur werden für 5 Min bei 3500 Upm (Megafuge 1.0R) zentrifugiert.
- ➢ Das Zellpellet wird einmal mit 1 ml ddH₂O gewaschen.
- Die Zellen werden in 400 μl, 4 °C kaltem Puffer P1 mit RNase (100 μg/ml) resuspendiert und mit 400 μl Puffer P2 vorsichtig gemischt.
- Die Zellsuspension wird mit Glasperlen (etwa 1/3 des Suspensions-Volumen) in ein 2 ml Mikroschraubenröhrchen überführt.
- > Der Zellaufschluss erfolgt für 2 x 20 Sekunden im Homogenisator (Precellys24).
- > Die Glasperlen werden für 2 min bei 2000 Upm bei RT sedimentiert.
- 700 μl des Überstands werden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 350 μl kaltem Puffer P3 auf Eis für 10 Minuten inkubiert.

- > Die Suspension wird für 15 Min bei 13.000 Upm zentrifugiert.
- > 750 μl des Überstands werden mit 750 μl Isopropanol gemischt und für 30 Min bei 13.000 Upm zentrifugiert.
- Das DNA-Präzipitat wird mit 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend im Vakuum-Konzentrator (SpeedVac) getrocknet.
- > Die DNA wird in 20 μ l ddH₂O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

5.2.7 Transformation in E. coli

Die Transformation in *E. coli*-Zellen dient der Vervielfältigung der Plasmid-DNA (XL₁-blue) mit anschließender Präparation (5.2.8) oder der Expression der auf den Plasmiden kodierten Proteinen (Origami, BL21, Rosetta) (5.4.1).

5.2.7.1 Ein-Minuten-Transformation

Plasmide können durch die Ein-Minuten-Transformation in *E. coli*-Zellen transformiert werden. Aufgrund der geringen Transformationseffizienz ($10^{6}-10^{7}$ KbE/µg) ist diese Methode aber nur für aufgereinigte Plasmid-DNA geeignet.

- > DMSO kompetente *E. coli*-Zellen (5.1.1.2) werden auf Eis aufgetaut.
- 1 μl Plasmid-DNA (10-100 ng/μl) wird mit den Zellen auf Eis gemischt.
- > Der Hitzeschock erfolgt für 1 Min bei 42 °C.
- Die Zellen werden in 100 μl LB-Medium aufgenommen und auf LB-Platten mit entsprechender Antibiotika-Selektion ausgestrichen.
- Die Platten werden ü/N bei 37 °C inkubiert.

5.2.7.2 Transformation durch Elektroporation

Bei der Transformation mittels Elektroporation werden die kompetenten Zellen (5.1.1.1) elektrischer Spannung ausgesetzt, um sie für die Aufnahme von DNA empfänglich zu machen. Die Transformationseffizienz beträgt bei dieser Methode 10⁸ - 10⁹ KbE/µg. Somit ist diese Methode auch für Transformationen von nicht-aufgereinigter Plasmid-DNA, beispielsweise nach der Isolation aus Hefezellen geeignet.

- > Die Elektroporationsküvetten werden auf Eis vorgekühlt.
- > 10 μl der elektrokompetente *E. coli*-Zellen werden auf Eis aufgetaut.

- > 5 μ l der Plasmid-DNA, isoliert aus einer Hefekultur, bzw. 1 μ l aufgereinigte Plasmid-DNA (10 ng/ μ l) werden mit 90 μ l ddH₂O und den *E. coli* Zellen auf Eis gemischt.
- Der Elektroporationsansatz wird in die Küvette überführt und im Gene Pulser elektroporiert (Geräteparameter: Spannung 2,1 kV, 100 Ohm, 25 μF).
- 1 ml LB-Medium wird zum Ansatz hinzugegeben, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend für 1 Stunde bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert.
- Die Zellen werden für 5 Sekunden bei 13.000 Upm zentrifugiert.
- Der Überstand wird bis auf 100 μl abgenommen, das Zell-Pellet in diesen restlichen 100 μl resuspendiert und auf LB- Platten mit entsprechender Antibiotika-Selektion ausgestrichen.
- ➢ Die Platten werden ü/N bei 37 ℃ inkubiert.

5.2.8 Plasmid-DNA Präparation aus E. coli

Plasmide, transformiert und multipliziert in *E. coli*-Zellen, müssen für weitere experimentelle Anwendungen aus diesen wieder isoliert werden. Die Isolierung der Plasmide erfolgt nach einer modifizierten Methode der alkalischen Lyse nach Maniatis (Sambrook, Maniatis et al. 1989).

5.2.8.1 Plasmid Minipräparation

Die Minipräparation ist eine Präparation von Plasmiden aus einer kleinen Kultur (bis zu 3 ml).

- Die Kultur wird in 3 ml LB-Medium mit entsprechender Antibiotika Selektion ü/N bei 37 °C schüttelnd angezogen.
- Die Zellen werden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 13.000 Upm für 5 Sekunden (Heraeus Biofuge pico) sedimentiert.
- Das Pellet wird in 100 μl eiskaltem Puffer P1 mit RNase (100 μg/ml) resuspendiert.
- Zur Zellsuspension werden 100 μl Puffer P2 hinzugeben, fünfmal invertiert und bei RT für 5 Minuten inkubiert.
- Die Lyse der Zellen wird durch Zugabe des gekühlten Puffer P3 und fünfmaligen Invertieren gestoppt.
- > Das Lysat wird 5 Minuten bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert.
- Der Überstand, ohne Zellreste und chromosomale DNA, wird in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit Isopropanol aufgefüllt.
- > Die anschließende Zentrifugation erfolgt für 15 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge pico).

- Das DNA Präzipitat wird mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und daraufhin im Vakuum-Konzentrator (SpeedVac) getrocknet.
- > Das getrocknete Pellet wird in 50 μ l ddH₂O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

5.2.8.2 Plasmid-Midipräparation

Die Midipräparation dient der Plasmid-Gewinnung aus einer mittleren *E. coli* Kultur (25 - 100 ml). Puffer und Gebrauchsmaterialen stammen aus dem Qiagen Plasmid MIDI-Kit. Die Zentrifugation-Schritte erfolgen bei 4 °C (Megafuge 1.0R).

- Eine *E.* coli-Kultur wird in 50 ml LB-Medium mit entsprechender Antibiotika Selektion inokuliert und ü/N bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert.
- Die Kultur wird in ein 50 ml Falcon überführt und für 15 Minuten bei 6.000 Upm sedimentiert.
- > Das Pellet wird in 4 ml eiskaltem Puffer P1 mit RNase (100 μ g/ml) resuspendiert.
- Zur Zellsuspension wird 4 ml Puffer P2 hinzugefügt, sechsmal vorsichtig invertiert und 5 Minuten bei RT inkubiert.
- ➢ 4 ml Puffer P3 wird zum Ansatz gegeben, 6-mal invertiert und 15 min auf Eis inkubiert.
- Die Probe wird erneut invertiert und anschließend für 30 Minuten bei 6.000 Upm zentrifugiert.
- > Der Überstand wird in ein 15 ml Falcon überführt und erneut für 15 Minuten zentrifugiert.
- Ein Qiagen tip100-Röhrchen wird mit 4 ml Puffer QBT equilibriert.
- > Der Überstand wird in das tip100-Röhrchen gegeben.
- Nach Durchlaufen des Überstands wird das Röhrchen zweimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen.
- Die DNA im tip100-Röhrchen wird durch Zugabe von 5 ml Puffer QF in ein 15 ml Falcon eluiert.
- > 3,5 ml Isopropanol werden hinzugeben, gevortext (Vortex Genie) und für 15 Min bei
- ► -20 °C inkubiert.
- Die DNA wird bei 13.000 Upm und RT 30 Min zentrifugiert
- Das DNA-Präzipitat wird mit 70 %igem Ethanol gewaschen und im Vakuum-Konzentrator (SpeedVac) getrocknet.
- > Die DNA wird in 200 μ l ddH₂O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

5.2.9 DNA-Konzentrationsbestimmung per Spektralphotometer

Die Konzentrationsbestimmung am Spektralphotometer (NanoDrop 2000c) erfolgt durch die Bestimmung der Adsorption bei 260 nm, dem Adsorptionsmaximum der DNA. Die Reinheit der DNA Präparation wird durch zusätzliche Messungen bei 230 nm (RNA) und 280 nm (Proteine) ermittelt. Als Referenz dient eine vorangehende Messung von 1 μ l ddH₂O. Gemessen wird 1 μ l einer DNA-Präparation.

5.3 Sequenzierung von DNA-Sequenzen

Die Sequenzierung erfolgt durch die Firma GATC-Biotech. Für die Sequenzierung werden 5 μ l der Plasmid-Präparation (100 ng/ μ l), sowie 5 μ l Oligonukleotide (4.11) mit einer Konzentration von 5 pmol benötigt.

5.4 Biochemische Methoden

5.4.1 Induktion der Genexpression in E. coli

Die Gene auf den Expressionsvektoren, transformiert in die *E. coli*-Stämme BL21, Origami und Rosetta stehen unter der Kontrolle eines lac-Operators. Die Induktion der Expression erfolgt durch die Zugabe von IPTG, einem Laktose-Analog. Dieser bindet einen Repressor an der Operator-Region und erlaubt somit die Genexpression. Zur Isolierung der Proteine müssen die *E. coli*-Zellen im Anschluss lysiert werden.

- > Die Zellzahl einer 50 ml ü/N-Kultur wird photometrisch bestimmt (Eppendorf Photometer).
- Eine 1 L Induktionskultur wird mit einer OD₆₀₀=0,1 in LB-Medium mit entsprechender Antibiotika-Selektion angeimpft und bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert.
- Die Induktion mit 1 mM IPTG erfolgt bei einer OD von 0,4 0,6.
- Die Kultur wird im Falle des Proteins Lactadherin f
 ür 3 Stunden bei 30 °C und ansonsten f
 ür 4 Stunden bei 37 °C sch
 üttelnd inkubiert.
- > Die Ernte der Zellen erfolgt durch Zentrifugation bei 5.000 Upm und 4 °C für 10 Min.
- Das Zellpellet wird mit 40 ml PBS gewaschen und erneut f
 ür 5 Minuten bei 4.600 Upm und 4 °C zentrifugiert.

- Das Pellet wird in 1 ml PBS resuspendiert und die Zellen lysiert (5.4.2.1) oder bei -20 °C gelagert.
- > Die Expression kann mittels SDS- Gelelektrophorese (5.4.6) analysiert werden.

5.4.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen

Durch die Affinitätschromatographie ist es möglich, Proteine spezifisch aus einem Zelllysat zu isolieren. Voraussetzung ist die Fusion des Zielproteins mit einem Tag, der eine Affinität zu einem Trägermaterial besitzt. Auf diese Weise wird das Zielprotein von Proteinen und anderen Molekülen getrennt und kann schlussendlich durch Zugabe eines spezifischen Kompetitors vom Trägermaterial gelöst werden. Die Aufreinigung erfolgt unter nativen Bedingungen, um die natürliche Konformation und Funktionalität der Proteine nicht zu gefährden.

5.4.2.1 Lyse der E. coli-Zellen und Aufarbeitung der Proben

Die rekombinant-hergestellten Proteine müssen vor der Affinitätschromatographie zunächst aus den *E. coli*-Zellen in den Überstand gebracht werden. Die Lyse der *E. coli*-Zellen erfolgt durch eine Lysozym-Behandlung mit anschließender Sonifikation.

- Das Zellpellet einer Induktionskultur (5.4.1) wird in 50 ml Lysepuffer resuspendiert und ü/N auf Eis inkubiert.
- Das Lysat wird 3-mal für 10 Sekunden auf Eis sonifiziert, wobei zwischen den einzelnen Sonifikationen ausreichend Zeit zum Abkühlen gegeben wird.
- > Zentrifugation bei 4 °C und 15.000 Upm (Avanti J-25) für 30 Minuten.
- > Der geklärte Überstand kann für die Aufreinigung verwendet werden.

5.4.2.2 Manuelle Reinigung unter nativen Bedingungen über den His10-Tag

Oligohistidine können in einem Chelatkomplex eine Bindung mit zweiwertigen Nickel-Ionen eingehen. Diese Affinität wird bei der Aufreinigung von Deca-His-getaggten Proteinen genutzt. Die Ni²⁺-Ionen sind über Nitrilotriessigsäure (NTA) an eine Agarose gebunden. Die Bindung durch die Histidine geschieht im Austausch mit Wassermolekülen, angelagert an die Ionen. Durch Zugabe des Kompetitors Imidazol wird die Bindung der HIS-getaggten Proteine mit der Nickel-NTA gestört und die Proteine somit eluiert. Die Aufreinigung wird bei 4 °C, sowie mit vorgekühlten Puffern durchgeführt.

- > 1 ml Nickel-NTA-Agarose wird 2 x mit 10 ml PBS gewaschen.
- Der geklärte Überstand einer lysierten Induktionskultur (5.4.2.1) wird für 2 Stunden bei 4 °C mit der Agarose rotierend inkubiert.
- Eine Proteinsäule wird mit einem Gazestopfen und einem Stopfen versehen.
- > Das Protein-Nickel-NTA-Gemisch wird auf die Säule gegeben und durchlaufen gelassen.
- Proteine, fusioniert mit einem Oligo-Histidin-Tag und gebunden an die Nickel-NTA, verbleiben vor dem Gazestopfen.
- Die Säule wird mit 10 ml Waschpuffer I (PBS, 20 mM Imidazol, Protease Inhibitor (1:100)) und 10 ml Waschpuffer II (PBS, 40 mM Imidazol, Protease Inhibitor (1:100)) gewaschen.
- Die Elution der getaggten Proteine erfolgt mit 4 x 1 ml Elutionspuffer (PBS, 500 mM Imidazol Protease Inhibitor (1:100)).
- Jede Elution wird dabei 10 Minuten auf der Säule inkubiert.

5.4.2.3 Manuelle Reinigung unter nativen Bedingungen über den GST-Tag

Proteine, fusioniert mit GST (Glutathion-S-Transferase), können ebenfalls über die Affinitätschromatographie aus einem Zell-Lysat eluiert werden. Dabei bedient man sich der Affinität der Glutathion-S-Transferase zu Glutathion, gebunden an eine Agarose. Als Kompetitor zur Elution der Fusionsproteine verwendet man reduziertes Glutathion. Die Aufreinigung wird bei 4 °C, sowie mit vorgekühlten Puffern durchgeführt.

- ▶ 0,5 ml Glutathion-Agarose wird 2 x mit 10 ml PBS gewaschen.
- Der Überstand eines Zelllysat (5.4.2.1) wird mit der Agarose für 2 Stunden unter ständigem Rotieren bei 4 °C inkubiert.
- Eine Proteinsäule wird mit einem Gazestopfen und mit einem Stopfen versehen.
- > Das Protein-Agarose-Gemisch wird auf die Säule geben.
- > Die Säule wird dreimal mit 10 ml PBS gewaschen.
- Die Fusionsproteine wird mit 5 x 1 ml TrisHCl (pH 8) mit 150 mM NaCl und 10 mM red. Glutathion eluiert. Der pH sollte nach Zugabe des Glutathions kontrolliert werden.
- > Die Elutionsfraktionen werden jeweils 10 Minuten auf der Säule inkubiert.

5.4.2.4 Automatisiert Reinigung unter nativen Bedingungen mittels ÄKTAprime Plus

Mit Hilfe automatisierter Verfahren kann der Ertrag von rekombinant-hergestellten Protein aus *E. coli* Lysaten signifikant gesteigert werden. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe der ÄKTAprime Plus.

- > Eine 5 ml "HiTrap-Chelating" Nickel-NTA-Säule wird in den ÄKTA eingespannt.
- > Die Säule, wie auch das gesamte System wird zunächst mit ddH₂O gewaschen.
- > Die Equilibrierung des Systems erfolgt durch Priming mit Lysepuffer über das Ventil A1
- Die Waschfraktionen beinhalten (I) 20 bzw. (II) 40 mM Imidazol und erfolgen über die Ventile A2 und A3
- > Die Elution erfolgt mit 500 mM Imidazol
- > Die Aufreinigung der Proteine erfolgt durch das nachfolgend aufgeführte Programm:

	Vol. [ml]	Fließgeschw. [ml/min]	Fraktion [ml]	Injektion	Anmerkung
Equilibrierung mit Lysepuffer	0	40	0	Abfall	
Equilibrierung der Säule	25	2	0	Beladen	
Proben Auftragung	35	2	0	Beladen	IMPORTANT, Order: "Auto Zero"
Waschen mit Lysepuffer	75	2	0	Beladen	
Equilibrierung mit A2 (20mM Imidazol)	115,1	40	0	Abfall	
20 mM Imidazol Elution	140	2	1	Beladen	21 Fraktionen
Equilibrierung mit A3 (40mM Imidazol)	160,1	40	0	Abfall	
40 mM Imidazol Elution	185	2	1	Beladen	21 Fraktionen
Equilibrierung mit B 100%	205,1	40	0	Abfall	
100 % Elution	230	2	1	Beladen	21 Fraktionen

Die eluierten Proben werden auf Anwesenheit von Proteinen mittel Bradford Reagenz getestet.

> Das System wird im Anschluss zunächst mit ddH₂O, dann mit 20 % Ethanol gewaschen.

1.1.1 Dialyse von Proteinen

Während der Dialyse werden die Kompetitoren aus den aufgereinigten Proteinlösungen entfernt, um nachfolgende Experimente nicht zu beeinflussen.

- Pro Elutionsfraktion wird ein 5 cm langer Dialyseschlauch für 10 Minuten in einem Glasbecher in deionisiertem Wasser bei 100 °C auf einem Heizrührer (RH basic 2) erhitzt.
- > Die Dialyseschläuche werden zunächst bei RT, anschließend auf Eis abgekühlt.
- Eine Seite des abgekühlten Dialyseschlauches wird mit einer Klemme verschlossen.
- Die Proteinlösung wird mit einer Pipette in den Dialyseschlauch überführt und an der zweiten Seite mit einer Klemme verschlossen.
- ▶ Die Proteinlösungen wird ü/N in 1 L PBS bei 4 °C dialysiert.
- Die Lösungen werden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Protease Inhibitor 1:25) gemischt.
- Die Reinheit der Proteinlösung kann mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (5.4.6) bestimmt werden.
- Die Proteinlösungen können bei 4 °C auf Eis gelagert werden.

5.4.3 Proteinmengenbestimmung mittels Bradford Reagenz

Der Konzentrationsbestimmung durch das Bradford Reagenz liegt einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Coomassie Brilliant Blau zugrunde. In seiner ungebundenen, kationischen roten Form hat der Farbstoff sein Absorptionsmaximum bei 470 nm. Durch eine Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff hingegen in seiner unprotonierten, anionischen Sulfonatform stabilisiert und das Absorptionsmaximum verschiebt sich auf 595 nm. Die Proteinkonzentration in einer Lösung lässt sich daher aus der optischen Dichte bei einer Wellenglänge von 595 nm berechnen.

- 780 μl Wasser werden mit 20 μl Proteinlösung und 200 μl Bradford Reagenz gemischt und für 10 Minuten bei RT inkubiert.
- Als Leer-Kontrolle dient ein Mix aus 800 μl Wasser und 200 μl Bradford Reagenz.
- Die Absorption wird bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch bestimmt (Eppendorf Spektrometer).
- Aus einer Eichkurve mit 0,5 10 μg BSA kann ein Faktor für die folgende Formel zur Berechnung der Konzentration einer Proteinlösung aufgestellt werden:

Konz. = <u>Abs. 595 nm</u> <u>Faktor * Verdünnungsfaktor</u>

5.4.4 Proteinmengenbestimmung mittels Nanodrop

Die Proteinkonzentration einer Lösung kann auch ohne Zugabe von Reagenzien am Spektralphotometer (NanoDrop 2000c) durchgeführt werden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt hierbei durch die Bestimmung der Adsorption bei 280 nm, dem Adsorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren in Proteinen. Voraussetzung für diese Messung ist daher das Vorhandensein aromatischer Aminosäuren. Diese Art der Messung bietet eine genauere Messung, als die mittels Bradford Reagenz. Als Referenz dient eine vorangehende Messung von $2 \mu l ddH_2O$. Die Berechnung der Konzentration erfolgt daraufhin durch folgende Formel:

Abs. 280nm
$$*\left(\frac{\varepsilon}{MW}\right)^{-1}$$

MW= Molekulargewicht [Da] (CPn0473: 55.116,32 Da)

ε= Extinktionskoeffizient (CPn0473: 19.480)

5.4.5 MALS (Multi-angle-light scattering)

Zur Analyse der Masse löslicher, rekombinant hergestellter Proteine wurde in Kooperation mit Olivia Spitz (AG Schmitt, Biochemie I, HHU) Messung der Mehrfachwinkellichtstreuung (*Multiangle-light scattering*, MALS) durchgeführt. Dieser Messung geht eine Größenausschluss-Chromatographie (SEC) mit einer : Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) in einem High Performance Liquid Chromatography (HPLC)- System (Agilent) voraus.

- Die Säule wird vor dem Probenlauf an einen drei Winkel Lichtstreuungsdetektor (miniDAWN TREOS, Wyatt Technology) und einem differenziellen refraktorischem Index Detektor (PTILab T-rEX, Wyatt Technology) angeschlossen.
- Mit einer Flußrate von 0,6 ml/min wird das System zunächst mit PBS equilibriert.
- Etwa 150 μl der Proteinlösung (3 mg/ml) werden auf die analytische SEC-Säule geladen.

5.4.6 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Im Polyacrylamidgel werden Proteine in einem Spannungsfeld nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Das SDS überlagert die Eigenladung der Proteine mit einer konstant negativen Ladung (1,4 g SDS pro 1 g Protein) und lässt sie in Richtung des positiven Pols wandern. Größere Proteine wandern dabei langsamer als kleine Proteine.

5.4.6.1 Proteinproben-Aufarbeitung für SDS Polyacrylamidgele

Zu Analyse der Proteine im Polyacrylamidgel müssen diese zunächst durch Hitze und Dithiothreitol (DTT) denaturiert werden. Die Denaturierung zerstört Disulfidbrücken löst die Tertiärstruktur von Proteinen auf.

- Die Proben werden, wenn nötig, mit ddH₂O verdünnt und mit 100 mM DTT und 4 x Proteinladepuffer vermischt.
- Die Proben werden daraufhin f
 ür mindestens 10 Minuten bei 100 °C gekocht und anschließend sofort auf Eis abgek
 ühlt.
- Die Proteinprobe kann daraufhin auf ein SDS-PAGE-Gel geladen werden oder bei -20° gelagert werden.

5.4.6.2 Herstellung des SDS-Polyacrylamidgel

Ein SDS-Polyacrylamidgel setzt sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammen. Neben der Konzentration an Tris, unterscheiden sich beide Gel-Teile deutlich im pH und haben auf die geladenen Proteinlösungen unterschiedlichen Einfluss. Im Sammelgel werden die Proteine vor dem Trenngel aufkonzentriert, bevor sie im Trenngel ihrer Größe nach aufgetrennt werden.

Sammelgel (Ansatz für 6 Gele):

Acrylamidlösung Wasser		4x Sammelgelpuffer	APS	TEMED
1,5 ml	6 ml	2,5 ml	200 µl	50 µl

Trenngel (Ansatz für 4 Gele):

Prozentigkeit	Acrylamidlösung	Wasser	4x Trenngelpuffer	APS	TEMED
10 %	6,7 ml	8,4 ml	5 ml	200 µl	70 µl

Eine Glasplatte wird, getrennt durch zwei Abstandshaltern, auf eine Teflonplatte gelegt und in die Gießapparatur geklemmt.

- Das Trenngel wird zusammen pipettiert, TEMED zuletzt, und in die vorgesehene Kammer zwischen Glasplatte und Teflonplatte gegossen.
- Sofort Isopropanol aufs Trenngel geben, um mögliche Luftblasen zu entfernen.

- Ist das Gel auspolymerisiert, kann das Isopropanol abgenommen und dreimal mit ddH₂O gewaschen werden.
- > Das Sammelgel wird zusammen pipettiert, TEMED zuletzt, und auf das Trenngel gegossen.
- > Sofort einen Kamm in das Sammelgel drücken.
- > Das Gel kann verwendet werden, sobald das Sammelgel auspolymerisiert ist.

5.4.6.3 SDS-Gelelektrophorese

Das komplett auspolymerisierte Gel kann nun für die Gelelektrophorese verwendet werden.

- > Das Gel wird in die SDS-PAGE-Apparatur eingespannt und mit Laufpuffer aufgefüllt.
- > Die Proteinproben (5.4.6.1) werden in die vorgesehenen Taschen überführt.
- Die Elektrophorese wird bei 200 V und etwa 50 mA für 1 Stunde und 20 Minuten durchgeführt (Power Supplies Electrophoresis).

5.4.6.4 Färbung von Proteingelen mit Coomassie-Blau

Die Proteine, aufgetrennt im SDS-Gel, sind selbst nicht sichtbar. Durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G-250 kann man Proteinbanden bis zu einer Minimalkonzentration von 500 ng sichtbar machen. Coomassie lagert sich an die Seitenketten basischer Aminosäuren und färbt damit Proteine an.

- Das Proteingel wird dreimal in Wasser f
 ür 30 Sekunden bei 360 Watt in der Mikrowelle erhitzt und f
 ür 10 Minuten auf einem Sch
 üttler gewaschen.
- Die Coomassie-F\u00e4rbel\u00f6sung wird auf das Gel gegeben und erneut f\u00fcr 30 Sekunden bei 360 Watt in der Mikrowelle erhitzt.
- Die F\u00e4rbung in der Coomassie-L\u00f6sung erfolgt f\u00fcr 1 Stunde unter leichtem Schwenken bei RT.
- ▶ Im Anschluss wird die Coomassie Lösung abgenommen, und das Gel in Wasser gewaschen.
- > Das Gel kann im Anschluss dokumentiert werden (Geldokumentationssystem).

5.4.7 Native Gelelektrophorese (NATIVE PAGE)

Die Native Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von native Proteinen oder Proteinkomplexen. Auf diese Weise werden die Proben nicht nur nach ihrer Größe, sondern auch nach ihrer Konformation aufgetrennt. Die verwendeten Gele, NativePAGE Novex Bis Tris Gele (Life technologies), weisen entlang ihrer Laufrichtung einem Acrylamid Gradient von 3 % bis 12 % auf.

- Die Proteinprobe (2 μg) wird mit Native PAGE Probenpuffer (4x) auf Eis gemischt.
- Das NativePAGE Novex Bis Tris Gel wird entpackt, der Klebestreifen entfernt und in die Native PAGE Apparatur geklemmt.
- Der Bereich hinter dem Gel wird mit Native PAGE Kathoden Puffer gefüllt.
- > Der Bereich vor dem Gel wird mit Native PAGE Anoden Puffer gefüllt.
- > Die Proteinproben (maximal 20 μl) werden in die Taschen überführt.
- > 5 μl des NativeMark Unstained Protein Standard wird in eine freie Tasche geladen.
- > Die Native PAGE Apparatur wird geschlossen.
- Die Elektrophorese erfolgt bei 4 °C für 60 Min bei 150 V (8-10 mA) und 60 Min bei 250 V (2-4 mA).
- ▶ Das Gel wird im Anschluss mit Coomassie-Blau (5.4.6.4) gefärbt und geblottet (5.4.8).

5.4.8 Westernblotanalyse

Proteine, aufgetrennt per SDS-Gelelektrophorese (5.4.6) können auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert und dort immobilisiert werden. Die Proteine sind daraufhin durch sekundäre Antikörperfärbung nachweisbar.

5.4.8.1 Proteintransfer auf eine PVDF Membran

Für den Transfer der Proteine muss die hydrophobe PVDF-Membran zunächst aktiviert werden. Dies geschieht durch Inkubation in Methanol, dem kurzkettigsten aller Alkohole. Dank des amphipathischen Charakters von Methanol besitzt die PVDF-Membran dann eine hydrophile Oberfläche und ist für den Proteintransfer empfänglich.

- Zwei Filterpapiere (Blotting PADs) mit den Maßen 7 x 10 cm und eine PVDF Transfermembran mit den Maßen 7 x 9 cm wird zurechtgeschnitten.
- Die Filterpapiere werden f
 ür 10 Minuten in Transferpuffer eingelegt.
- Die Transfermembran wird zunächst für 10 Sek. in Methanol aktiviert und dann für 10 Minuten in Transferpuffer equilibriert.

- Das erste Filterpapier wird auf dem unteren Metall Platte einer G2 Fast Blotter Apparatur (Pierce) gelegt.
- Der Reihe nach werden dann die Transfermembran, das SDS-Gel und das zweite Filterpapier aufgelegt.
- Mit Hilfe einer Rolle lassen sich Luftblasen aus den Zwischenräumen herausdrücken.
- > Die Blotapparatur wird geschlossen und in die Dockingstation gesetzt.
- > Der Transfer der Proteine erfolgt bei 25 V und 1 A für 30 min.
- Die PVDF-Membran wird für 1 Stunde unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur in Blockierlösung inkubieren.

5.4.8.2 Proteintransfer von einem Coomassie gefärbten Gel auf eine PVDF Membran

Beim Transfer von Proteinen von einem bereits gefärbten Proteingel wird neben den Proteinen auch die Coomassie Färbung auf die Membran übertragen. Diese muss entfernt werden, bevor die Proteine mittels sekundärer Antikörperfärbung markiert werden können.

- > Die gefärbten Proteingele werden wie zuvor (5.4.8.1) zunächst geblottet.
- Die immobilisierten Proteine auf der PVDF Membran werden für 10 Min mit 8 %iger Essigsäure fixiert.
- > Die PVDF Membran wird daraufhin mit Methanol von der Coomassie Färbung befreit.
- Die PVDF-Membran wird f
 ür 1 Stunde unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur in Blockierlösung inkubieren.

5.4.8.3 Antikörperreaktion auf der PVDF-Membran

Proteine, immobilisiert auf der PVDF-Membran lassen sich mit Hilfe spezifischer Antikörper nachweisen. Bei der Methode der sekundären Antikörperfärbung werden zwei verschiedene Antikörper nacheinander eingesetzt (4.8). Der primäre Antikörper besitzt eine Affinität zu einer spezifischen Aminosäuresequenz des Zielproteins, beispielsweise einem Histidin-Tag. Der sekundäre Antikörper, ein Enzym-gekoppelter Antikörper, bindet an die konstante Region von primären Antikörpern einer Spezies. Das gekoppelte Enzym, eine Alkalische Phosphatase wird im Anschluss (5.4.8.4) für die Farbentwicklung gebraucht.

Die blockierte Membran wird mit dem primären Antikörper in Blockierlösung für 1 Stunde bei RT oder ü/N bei 4 °C inkubieren.

- Die Membran wird 3-mal f
 ür 10 Min bei RT in PBS waschen.
- Die Membran wird mit dem sekundären Antikörper in Blockierlösung für 30 Minuten bei RT oder ü/N bei 4 °C inkubiert.
- > Die Membran 3-mal für 10 Minuten bei RT in PBS waschen.

5.4.8.4 Farbentwicklung mittels Alkalischer Phosphatase

Eine alkalische Phosphatase (AP) spaltet Phosphate von ihrem Substrat. Der Alkalischen Phosphatase des sekundären Antikörpers werden die organischen Phosphatverbindungen BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat) und NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) als Substrat angeboten. Die AP spaltet die Phosphate von den Substraten ab woraufhin BCIP und NBT miteinander reagieren. NBT oxidiert BCIP zu einem wasserunlöslichen blauen Indigo-Farbstoff, während NBT zu einem wasserunlöslichen blauen Formazan-Farbstoff reduziert wird. Beide Farbstoffe fallen auf der Membran an der Position nieder, wo der AP-konjugiert Antikörper am Protein gebunden ist.

- Die mit den Antikörpern behandelte Membran wird für 10 Minuten bei RT in Detektionspuffer equilibriert.
- Die Membran wird im Farbsubstratpuffer inkubiert, bis die Färbung eintritt.
- > Die Farbreaktion wird durch mehrmaliges Waschen mit Wasser abgestoppt.
- > Die Membran wird getrocknet und kann dokumentiert werden (Geldokumentationssystem).

5.4.9 Biotinylierung von rekombinantem Protein

Proteine können mit EZ-Link-Sulfo-NHS-Biotin markiert werden. Dabei reagiert der N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ester mit primären Aminogruppen und formt eine stabile Amidbindung mit den Proteinen. Primäre Aminogruppen sitzen am freien N-Terminus eines Proteins sowie in jeder Seitenkette der Aminosäure Lysin.

- > 1,1 mg EZ-Link-Sulfo-NHS-Biotin wird in 250 μl PBS gelöst.
- > Das Biotin wird in 20-fachem Überschuss zur Proteinlösung geben.

MW=Molekulargewicht; x=Überschuss NHS-Biotin

Die Biotinylierung erfolgt f
ür 1 Stunde auf Eis.

- Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 M Tris/HCl pH8 in einer finalen Konzentration von 50 mM für 2 Stunden abgestoppt (Quenching).
- ▶ Überschüssiges Biotin wird mittels Dialyse in 1 L PBS ü/N entfernen.
- > Die Biotinylierung kann im Westernblot überprüft werden.

5.4.9.1 Cystein-spezifische Biotinylierung

Mit HDPD lassen sich Proteinabschnitte spezifisch biotinylieren. Die Interaktion mit dem Protein erfolgt hierbei durch die Interaktion der 2-Pyridyldithio-Gruppe des HDPD Biotin mit der Sulfhydryl-Gruppe der Aminosäure Cystein. Unter Abspaltung einer Pyridine-2-Thion-Gruppe bildet das Biotin eine stabile Disulfidbrücke mit dem Protein, die durch Zugabe von reduzierenden Chemikalien, wie DTT oder β -Mercaptoethanol, wieder gelöst werden kann.

- 2,2 mg EZ-Link-HDPD-Biotin wird in 1 ml DMSO gelöst (4 mM Stocklösung). Das gelöste Biotin kann bei -20 °C gelagert werden
- ➢ 25 µl der Biotinlösung werden mit 1 ml Proteinlösung (0,5 mg/ml) auf Eis 4 Stunden inkubiert.
- ▶ Überschüssiges Biotin wird mittels Dialyse in 1 L PBS ü/N entfernen.
- Die Biotinylierung kann im Westernblot überprüft werden. Bei der Proteinproben-Aufarbeitung für SDS Polyacrylamidgele darf in diesem Falle kein DTT hinzugegeben werden.

5.4.10 Fluoreszenz-Markierung von rekombinant-hergestellten Proteinen

5.4.10.1 Markierung mit Fluorescein

Protein können mittels N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ester, wie im NHS-Fluorescein, für die Mikroskopie fluoreszenzmarkiert werden. Der Ester interagiert dabei mit primären Aminogruppen und formt eine stabile Amidbindung zwischen dem Protein und dem Fluorescein unter Abspaltung des NHS. Fluorescein-markierte Proteine können bei einer Wellenlänge von 494 nm mikroskopiert werden.

- > 1 mg NHS-Fluorescein wird in 100 μl DMSO gelöst.
- > Das Fluorescein wird in 20-fachem Überschuss zur Proteinlösung gegeben.

 $\frac{mg \text{ Protein}}{MW \text{ Protein [Da]}} *x*47.340=\mu l \text{ Fluorescein Lösung}$

MW=Molekulargewicht; x=Überschuss NHS-Fluorescein

- Die Markierung erfolgt f
 ür mindestens 2 Stunden auf Eis.
- Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 M Tris/HCl pH8 in einer finalen Konzentration von 50 mM für 1 Stunden abgestoppt (Quenching).
- ▶ Überschüssiges NHS-Fluorescein wird mittels Dialyse in 1 L PBS ü/N entfernt.
- Die Fluorescein-Markierung kann mittels UV-Licht nach Auftrennung in einem SDS-Gel (5.4.6) überprüft werden.

5.4.10.2 Markierung mit DyLight

Die DyLight Farbstoffen (hier: Amine Reactive Dyes 488 und 594) haben, wie das NHS-Fluorescein ebenfalls N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ester gebunden, die in einer Reaktion mit den primären Aminogruppen des Proteins eine Amidbindung ausbilden können. Der Farbstoff ist gegenüber dem Fluorescein allerdings intensiver und die Markierung stabiler. Fluoreszenzmarkierte Proteine können bei einer Wellenlänge von 488 nm, respektive 594 nm mikroskopiert werden.

- Die 50 µg DyLight Farbstoff-Aliquots werden mit den aufgereinigten Proteinlösungen für 2 Stunden auf Eis inkubieren.
- Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 M Tris/HCl pH8 in einer finalen Konzentration von 50 mM für 1 Stunden abgestoppt (Quenching).
- Überschüssiger Farbstoff wird mittels Dialyse in 1 L PBS ü/N entfernt.
- Die DyLight-Markierung kann mittels UV-Licht nach Auftrennung in einem SDS-Gel (5.4.6) überprüft werden.

5.5 Protein-Lipid-Bindestudien

Das Adhäsionsvermögen von rekombinant hergestellten Proteinen (5.4.2) lässt sich durch eine Vielzahl von Assays testen. Die Adhäsion an humane Zellen kann mit löslichem Protein untersucht werden (5.5.8). Die Adhäsion mit Lipiden kann durch Inkubation von löslichem Protein mit Liposomen oder Giant unilamellar vesicles (GUVs) aufgezeigt werden.

5.5.1 Bindungsstudie von Proteinen an Lipid-Streifen

Durch Auswertung des Bindungsverhaltes eines Proteins an immobilisierten Lipidtropfen auf einem Lipid-Streifen kann die Interaktion mit Phospholipiden nachgewiesen werden.

- Die Membran wird mit 5 ml PBS-T (0,1 % Tween20) +3 % BSA für 1 Stunde bei RT inkubiert.
- Die Membran wird mit 5 ml PBS-T + 1 μg Proteinlösung für 1 Stunde bei RT inkubiert.
- Die Membran wird dreimal mit 1 ml PBS gewaschen und kann anschließend mittels sekundärer Antikörperfärbung analysiert werden (5.4.8.3).

5.5.2 Liposom-Pulldown Assay

Liposomen sind Doppelmembran-Strukturen, die nur aus Lipiden bestehen. Mit Hilfe des Liposom Pulldown Assays kann die Interaktion von Proteinen mit Membranen untersucht werden. Hierbei kann die Konstellation der in den Liposomen vorkommenden Lipide variiert werden. Die Liposomen wurde durch die *Freeze-Thaw-Sonification*-Methode hergestellt und freundlicherweise von der AG Weber zur Verfügung gestellt.

- Eine PD-10-Entsalzungs-Säule wird mit 2 x 5 ml Liposom-Puffer equilibriert.
- 1 ml der eingefrorenen Liposomen werden aufgetaut und 20-mal f
 ür 3 Sekunden im Wasserbad sonifiziert.
- > Die Liposomen werden auf die Säule gegeben.
- Sind die Liposomen in das Gelbett eingelaufen, werden 3 ml Liposom-Puffer auf die Säule gegeben und die Liposomen eluiert.
- 5 μg Protein werden mit 50 μl der eluierten Liposomen, respektive 50 μl HBSS, gemischt und auf 100 μl mit HBSS aufgefüllt.
- Inkubation für 20 Minuten bei RT.
- Die Proben werden für 15 Minuten bei 16.000 Upm (Thermo Biofuge pico17) zentrifugieren.
- Der Überstand wird in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Pellets in 100 μl HBSS resuspendiert.

- Zur Überprüfung der Adhäsion von Proteinen an die Liposomen werden je 32,5 μl der Proben mit 12,5 μl Protein-Ladpuffer und 5 μl 1 M DTT gemischt und für 10 Minuten bei 100 °C erhitzt.
- Die Proben werden im Westernblot (5.4.8) analysieren.

5.5.3 Interaktionsstudie von rekombinanten Proteinen mit GUVs

Giant unilamellar vesicles (GUVs) sind 10-100 µm große Doppelmembran-Liposomen. Die Interaktion rekombinanter Proteine mit den GUVs wurde zunächst in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Junior-Prof. Dr. Winfried Römer in Freiburg, dann gemeinsam mit Dr. Thorsten Eierhoff an der HHU (Düsseldorf) untersucht. Die GUVs werden dabei durch ein *Texas-Red*-markiertes Lipid rot gefärbt, während die Proteine mit DyLight 488 grün markiert sind. Die Herstellung der GUVs erfolgt dabei per Elektroformation (Meleard, Bagatolli et al. 2009).

- Je 2 x10 µl der Lipidmischungen, gelöst in Chloroform, werden in der vorgesehenen Kombination auf einem ITO-Objektträger verteilt.
 - 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC)
 - Phosphatic Acid (PA)
 - 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (DOPS)
 - L-a-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2)
- - DOPC/Texas Red-DHPE: 99,75/0,25 mol%
 - DOPC/TR-DHPE/Cholesterin: 74,75/0,25/25 mol%
 - DOPC/TR-DHPE/Cholesterin/DOPS 74,75/0,25/20/5 mol%
 - DOPC/TR-DHPE/Cholesterin/DOPS 59,75/0,25/20/20 mol%
 - DOPC/TR-DHPE/Cholesterin/PA 74,75/0,25/20/5 mol%
 - DOPC/TR-DHPE/Cholesterin/PIP2 74,75/0,25/20/5 mol%
 - DOPC/TR-DHPE/Cholesterin/PIP3 74,75/0,25/20/5 mol%
- Nachdem das Chloroform verdampft ist wird Vitrex um die Ausstrich-Stelle gelegt und ein zweiter ITO-Objektträger auf den ersten gelegen.

- Die Kammer zwischen den beiden Objektträgern wird mit 1 ml 10 % Saccharose-Lösung gefüllt und mit Vitrex verschlossen.
- Die GUVs wachsen bei Raumtemperatur und steigender Spannung von 20 mV bis 1 V für 3 Stunden.
- Eine Beobachtungskammer wird mit 2 mg/ml Kaseinlösung für 10 Minuten inkubiert.
- Die Kammer wird einmal mit PBS gewaschen und mit 10 μg Proteinlösung (100 ng/μl) in 100 μl Volumen (PBS) gefüllt.
- 2-10 µl GUV-Lösung werden hinzugeben und sofort mikroskopiert (Nikon Eclipse Ti-E mit A1R confocal laser scanner).
- Die Auswertung der Mikroskopie wird mit dem Programm NIS-Elements (Nikon) durchgeführt.

5.5.3.1 GUV Permeabilisierungsstudien

Die Bindung von Proteinen an GUVs kann zu einer erhöhten Permeabilität der Membran führen. Um dies zu studieren, wurden GUVs bei der Herstellung mit dem fluoreszenten Farbstoff Carboxyfluorescein (CF) gefüllt. Die Formierung der GUVs erfolgte hierbei nach der "Swelling"-Methode statt (Weinberger, Tsai et al. 2013).

- Vitrex wird kreisförmig auf ein Glasträger gedrückt
- **CF** (final 20 μM) wird in 100μl einer 5 %igen Polyvinylalkohol in ddH₂O Lösung gelöst.
- Die Lösung wird gleichmäßig innerhalb der Vitrex-Kammer verteilt und bei 100mB für 30 Min im Vakuumofen im Dunkeln getrocknet.
- 20 µl der folgenden Lipidlösung wird anschließend aufgetragen und 15 Min bei RT im Dunkeln getrocknet: DOPC/Cholesterin/DOPS 60/20/20 mol%
- Die Lipide werden mit einer 10 %igen Saccharose Lösung in ddH₂O überschichtet und für 1,5 h im Dunkeln inkubiert.
- Die Zuckerlösung mit den darin befindlichen GUVs wird zum Schluss in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und kann für die mikroskopische Analyse verwendet werden
- Eine Beobachtungskammer wird mit 2 mg/ml Kaseinlösung für 10 Minuten inkubiert.
- Die Kammer wird einmal mit PBS gewaschen und mit 10 μg Proteinlösung (100 ng/μl) in 100 μl Volumen (PBS) gefüllt.
- 5 μl GUV-Lösung werden hinzugeben und sofort mikroskopiert (Nikon Eclipse Ti-E mit A1R confocal laser scanner).

Die Auswertung der Mikroskopie wird mit dem Programm NIS-Elements (Nikon) durchgeführt.

5.5.4 Lipid-Scrambling Assay an asymmetrischen GUVs

Asymmetrische GUVs besitzen zwei Membranschichten mit unterschiedlichen Lipidkompositionen. Eine Störung in der Lipidasymmetrie nach Inkubation mit einem Protein deutet auf einen Lipidtransport zwischen den beiden Lipidseiten hin. Die Generierung der Asymmetrischen Lipide folgt dabei einem abgeänderten Protokoll von Pautot (Pautot, Frisken et al. 2003).

- > Verwendete Lipidmischungen, gelöst in Chloroform:
 - DOPC/Cholesterin 80/20 mol%
 - DOPC/Cholesterin/DOPS 60/20/20 mol%
- 230 μl der Lipidmischungen (115 μg Lipidmasse) werden im Vakuum Ofen getrocknet und in Mineralöl wieder gelöst.
- > Am nächsten Tag werden zwei 2 ml Reaktionsgefäße vorbereitet
- Ein 2 ml Reaktionsgefäß (äußere Membranschicht) wird mit 500 μl Glukose-Lösung (1 M) befüllt und vorsichtig mit 500 μl Mineralöl-Lipid Mischung überschichtet.
- Ein zweites 2 ml Reaktionsgefäß (innere Membranschicht) wird mit 50 µl Saccharose-Lösung (1 M) befüllt, mit 500 µl Mineralöl-Lipid Mischung überschichtet und durch vortexen gemischt.
- Nach wenigen Minuten Inkubation bei RT wird das Gemisch des ersten Reaktionsgefäßes (Äußere Membranschicht) vorsichtig mit dem Gemisch aus dem zweiten Reaktionsgefäß (Innere Membranschicht) überschichtet.
- > Zentrifugation für 3 Min. bei 2000 G (Thermo Biofuge pico17).
- > Das Pellet wird vorsichtig mit 1M Glukose Lösung gewaschen und erneut zentrifugiert.
- Die GUVs werden in 1 M Glukose Lösung resuspendiert und können sofort mikroskopiert werden (Nikon Eclipse Ti-E mit A1R confocal laser scanner).
- Eine Beobachtungskammer wird mit 2 mg/ml Kaseinlösung für 10 Minuten inkubiert.
- Die Kammer wird einmal mit PBS gewaschen und mit 10 μg Proteinlösung (100 ng/μl) in 100 μl Volumen (PBS) und den GUVs gefüllt.
- > Die Auswertung der Mikroskopie wird mit dem Programm ImageJ durchgeführt.

1.2 Zellbiologische Methoden

1.2.1 Transfektion von Epithelzellen

Die in dieser Arbeit verwendete transiente Transfektion beschreibt die Injektion von DNA, in Form von Plasmiden, in tierische Zellen. Dem gegenüber steht die stabile Transfektion, die Integration in deren Genom. TuboFect[™] ist ein Reagenz, bestehend aus Kationen, die polymerisieren und mit der DNA einen positiv geladenen Komplex bilden. Die DNA wird dabei stabilisiert, vor Degradation geschützt und in eukaryotische Zelle transportiert.

- HEp-2 Zellen werden 24 Stunden vor dem Start des Experiments in eine 24-Well Platte mit Deckgläschen ausgesät, sodass sie zum Transfektionsstart 70 % konfluent sind und bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert (HEPA Class 100).
- ▶ 1 µg Plasmid-DNA wird in 100µl Serumfreiem Zellkulturmedium mit 2 µl TurboFect[™] gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
- Die Epithelzellen in den Wells werden einmal mit HBSS gewaschen und mit 500 μl Serumfreiem Zellkulturmedium bedeckt.
- Unter leichtem Schwenken wird die DNA-Suspension auf das Serumfreie Medium in den Wells getropft.
- ▶ Die Platte wird bei 37 °C und 6 CO₂ für bis zu 24 Stunden inkubiert.
- > Die Wells werden zweimal mit HBSS gewaschen.
- Die Zellen können nun entweder für weitere Experimente verwendet werden oder mit 300 µl PFA (3 %) für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert werden.
- Die Zellen werden zweimal mit HBSS gewaschen und bei 4 °C gelagert.
- Bei Bedarf können die Zellen noch nun gefärbt werden (5.6.3).
- Die Glasplatten werden an der Luft getrocknet und anschließend verkehrt herum auf 2 μl Vectashield auf einem Objektträger gelegt und mit Nagellack versiegelt.
- > Die Zellen können anschließend mikroskopiert werden.

5.5.5 Ko-Immunopräzipitation

Die Ko-Immunopräzipitation beruht auf der Aufreinigung eines Proteins gemeinsam mit interagierenden Proteinen über magnetischen Kügelchen oder anderen Trägermaterialien. Die Magnetkügelchen sind gekoppelt mit Antikörpern gerichtet gegen das zu untersuchende Protein.

- HEp-2 Zellen werden 24 Stunden vor dem Start des Experiments in eine 25 cm² Flasche ausgesät und bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert (HEPA Class 100).
- Die Kopplung der μMacs Beads (Miltenyi) mit den Antikörpern (2 μg) erfolgt auf Eis für 30 Min.
- Die Zellen werden mit HBSS gewaschen und 1 h mit 100 ng/μl Proteinlösung in 2 ml Zellkulturmedium bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert.
- Die Zellen werden dreimal mit HBSS gewaschen und 30 Min mit DTSSP Crosslinker (2 mg/ml) bei RT inkubiert.
- > Die Reaktion wird durch dreimaliges Waschen mit 50 mM TrisHCl pH8 abgestoppt.
- Die Zellen werden mit PhosphoLysis Puffer lysiert (700 μl) und für 10 Min. bei 10.000 Upm. (Thermo Biofuge pico17) bei 4 °C zentrifugiert.
- Die geklärten Lysate werden ü/N bei 4 °C mit den Antikörper-beschichteten Beads rotierend inkubiert.
- Die magnetischen Beads werden an einem Magneten auf eine Säule gegeben und einmal mit PhosphoLysis und einmal mit PBS gewaschen.
- Die Elution erfolgt durch 100 °C vorgeheizten Proteinpuffer (ddH₂O, 4x Ladepuffer und 100mM DTT)
- Die Proben werden im Westernblot (5.4.8) analysieren.

5.5.6 Infektion durch Chlamydien

Für Studien am Infektionszyklus von *Chlamydia pneumoniae* wurden 70 - 90 % konfluent bewachsene Wells mit Gradienten-gereinigten Chlamydien (5.1.4.3) infiziert (MOI=1).

- HEp-2 oder CHO Zellen werden 24 Stunden vor dem Start des Experiments in eine 24-Well Platte mit Deckgläschen ausgesät und bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert (HEPA Class 100).
- Die Zellen werden mit HBSS gewaschen und mit 250 µl frischen Zellkulturmedium bedecken.
- Die Gradienten-gereinigte Chlamydien (5.1.4.3) werden aufgetaut, vorsichtig gevortext und kurz im Wasserbad sonifiziert.
- Die Chlamydien werden in das Zellkulturmedium der Wells gegeben und unter leichtem Schwenken im Well gleichmäßig verteilt.
- ▶ Die Inkubation der Platte erfolgt bei 37 °C und 6 % CO₂ für bis zu 96 Stunden.

- Die Zellen werden in Methanol f
 ür 5 Minuten fixiert und anschließend zweimal mit HBSS waschen.
- ▶ Die Zellen können in 1 ml HBSS bei 4 °C bis zur Färbung (5.6.3) gelagert werden.

5.5.6.1 Neutralisierungs-/Infektionsboost-Assay

Die Wirkung eines bakteriellen oberflächenpräsentierten Proteins in den ersten Schritten einer chlamydialen Infektion kann durch die Zugabe von rekombinant-hergestellten Proteinen vor Infektionsstart untersucht werden. Handelt es sich bei dem rekombinanten Protein um ein Adhäsin verringert die Zugabe des Proteins die Infektionsrate in der Regel, da mögliche Bindestellen für die chlamydialen EBs durch das rekombinante Protein bereits blockiert werden. Ein Protein mit anderweitiger Funktion als Bindung an Wirtszellen, zeigen in diesem Assay hiervon abweichende Phänotypen.

- HEp-2 oder CHO Zellen werden 24 Stunden vor dem Start des Experiments in eine 24-Well Platte mit Deckgläschen ausgesät und bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert (HEPA Class 100).
- Die Zellen werden mit HBSS gewaschen und mit 100 μg/ml des rekombinanten Proteins in 250 μl Zellkulturmedium für 1 Stunde bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert.
- Die Gradienten-gereinigten Chlamydien (5.1.4.3) werden aufgetaut, vorsichtig gevortext und kurz im Wasserbad sonifiziert.
- Die Chlamydien werden in die Protein-Medium-Suspension der Wells gegeben und unter leichtem Schwenken im Well gleichmäßig verteilen (HEp-2 MOI=1; CHO MOI=10).
- Inkubation der Platte f
 ür 50 Stunden bei 37 °C und 6 % CO₂.
- Die Zellen werden in Methanol f
 ür 5 Minuten fixiert und anschließend zweimal mit HBSS waschen.
- ▶ Die Zellen können in 1 ml HBSS bei 4 °C bis zur Färbung (5.6.3) gelagert werden.

5.5.6.2 Analyse der Internalisierung chlamydialer EBs

Zur Bestimmung der Internalisierung chlamydialer EBs und dem Einfluss rekombinanthergestellter Proteine werden Humanzellen zunächst mit den Proteinen inkubiert, bevor sie für wenige Stunden mit Gradienten-gereinigten Chlamydien infiziert werden. Die Auswertung der Internalisierung erfolgt daraufhin per Quantitativer Real-Time PCR (4.11.2).

- HEp-2 oder CHO Zellen werden 24 Stunden vor dem Start des Experiments in eine 24-Well Platte mit Deckgläschen ausgesät und bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert (HEPA Class 100).
- Die Zellen werden mit HBSS gewaschen und mit 100 μg/ml des rekombinanten Proteins in 250 μl Zellkulturmedium für 1 Stunde bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert.
- Die Gradienten-gereinigten Chlamydien (5.1.4.3) werden aufgetaut, vorsichtig gevortext und kurz im Wasserbad sonifiziert.
- Die Chlamydien werden in die Protein-Medium-Suspension der Wells gegeben und unter leichtem Schwenken im Well gleichmäßig verteilen (MOI=10).
- ▶ Inkubation der Platte für 1 Stunden bei 4 °C und für 2 Stunden bei 37 °C und 6 % CO₂.
- Die Zellen werden in200 μl Trypsin gelöst (10 Min) und nach Zugabe von 200 μl DMEM gestoppt in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 250 G für 5 Min. zentrifugiert.
- Das Pellet wird in 50 μl Proteinase K (500 μg/ml) für 60 Min bei 37 °C inkubiert.
- > 240 μl Roti Phenol hinzugeben und bei RT 10 Min inkubieren.
- Zentrifugation bei 13.000 Upm f
 ür 10 Min (Thermo Biofuge pico17).
- > 100 μl des geklärten Überstands in ein neues Reaktionsgefäß überführen, 5 μl RNAse A (25 μg/ml) hinzugeben und für 1 Stunde bei 37 °C inkubieren.
- 13,5 µl 3N NaAc pH 5 (final 0,3 M) und 130 µl Isopropanol hinzugeben und auf Eis 10 Min inkubieren.
- Zentrifugation bei 13.000 Upm f
 ür 10 Min (Thermo Biofuge pico17).
- Das Pellet in 500 μl Ethanol waschen und erneut zentrifugieren
- Das Pellet wird getrocknet in 25 µl ddH₂O resuspendiert und auf 20 ng/ml mit ddH2O eingestellt
- Die DNA kann danach bei 20 °C gelagert oder mittels Quantitativer Real-Time PCR (4.11.2) analysiert werden.

5.5.7 Oberflächenbiotinylierung chlamydialer, infektiöser EBs

Zur Analyse oberflächen-präsentierter Proteine auf chlamydialen EBs können diese biotinyliert werden. Nach Lyse der EBs können biotinylierte Proteine mittels Streptavidin-Agarose aus dem Lysat eluiert und im Westernblot analysiert werden.

- Gradienten-gereinigte Chlamydien (3 x 106 IFU) werden mit 5 mM EZ-Link-Sulfo-NHS-Biotin für 30 Min bei RT inkubiert. Als Kontrolle wird ein gleicher Ansatz ohne Biotin inkubiert.
- Als Ladekontrolle werden 10 μl der behandelten Proben mit 140 μl ddH₂O, 37,5 μl Proteinladepuffer und 15 μl DTT (1 M) bei 100 °C für 10 Min inkubiert.
- Die Biotinylierung wird durch Zugabe von TrisHCl pH 8 mit einer finalen Konzentration von 50 Mm gestoppt (Quenching).
- Die biotinylierten Chlamydien werden mit PhosphoLysis Puffer lysiert und f
 ür 30 Min. bei 15.000 Upm bei 4 °C zentrifugiert.
- Der geklärte Überstand wird auf 1 ml mit HBSS aufgefüllt und für 30 Min mit 200 μl Streptavidin Agarose bei RT inkubiert.
- Eine Proteinsäule wird mit einem Gazestopfen und einem Stopfen versehen.
- > Das Lysat-Agarose-Gemisch wird auf die Säule gegeben und durchlaufen gelassen.
- > Biotinylierte Proteine verbleiben gebunden an das Streptavidin vor dem Gazestopfen.
- Die Säule wird dreimal mit 10 ml PBS gewaschen
- Die Agarose mitsamt der biotinylierten Proteine wird dann in 150 μl PBS, 15 μl DTT und 37,5l Proteinladepuffer gelöst und 10 Min bei 100 °C inkubiert.
- Die Proben können dann im Westernblot analysiert werden.

5.5.8 Protein Bindungsstudie an humanen Zellen

In diesem Assay wird das Adhäsionsverhalten von löslichem, rekombinant-hergestellten Proteinen an humane Zellen untersucht. Hierzu werden die humanen HEp-2 Zellen zunächst mit den Proteinen bei 4 °C inkubiert, um ausschließlich Adhäsion zu erlauben. Das Adhäsionsvermögen der Proteine wird anschließend im Westernblot untersucht.

- HEp-2 Zellen werden 24 Stunden vor dem Start des Experiments in eine 24-Well Platte ausgesät und bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert (HEPA Class 100).
- Die konfluent-gewachsenen Zellen werden auf 4 °C abgekühlt und mit 1 ml HBSS gewaschen.
- > 100 μg/ml der Proteine werden in 250 μl Zellkulturmedium auf die kalten Zellen gegeben.
- > Die Zellen werden bei 4°C mit der Proteinlösung inkubiert.

- Nach definierten Zeitpunkten (5 60 Min) wird die Proteinlösung von den Zellen abgenommen, die Zellen dreimal mit 1 ml HBSS gewaschen und mit 300 µl Zell-Dissoziation Lösung abgelöst.
- Zentrifugation bei 250 g (Thermo Biofuge pico17) für 5 min bei RT.
- Die Zellen werden in 65 μl ddH₂O, 25 μl Protein-Ladepuffer und 10 μl 1 M DTT resuspendiert und für 10 Minuten bei 100 °C erhitzt.
- > Die Adhäsion der Proteine an die HEp2 Zellen wird im Westernblot analysiert (5.4.8).
- Als Ladekontrolle für den Westernblot werden 5 μl der Zellkulturmedium-Proteinlösung mit 27,5 μl ddH₂O, 12,5 μl Proteinladepuffer, 5 μl 1 M DTT gemischt und ebenfalls auf das Gel aufgetragen.

5.5.8.1 Assay zur Lokalisierung biotinylierter Einzelcystein-Proteinvarianten

Zur Analyse der Proteinausrichtung an einer humanen Plasmamembran können Proteinbereiche Cystein-spezifisch biotinyliert werden. Nach Inkubation dieser modifizierten Proteine mit den humanen Zellen werden diese mit reduzierenden Chemikalien, wie β -Mercaptoethanol behandelt, welche sämtliche Biotinylierungen außerhalb der Zelle entfernt, die Zellmembran allerdings nicht überwinden kann. Intrazelluläres Biotin bleibt daher erhalten und kann mittels Westernblot Analysen detektiert werden.

- HEp-2 Zellen werden 24 Stunden vor dem Start des Experiments in eine 6-Well Platte ausgesät und bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert (HEPA Class 100).
- Die konfluent-gewachsenen Zellen werden mit den biotinylierten Proteinen (100 μg/ml) in 1 ml Zellkulturmedium (+ 1 mM EDTA) bei 37 °C inkubiert.
- Nach definierten Zeitpunkten wird die Proteinlösung von den Zellen abgenommen und die Zellen dreimal mit 1 ml HBSS gewaschen
- Die Zellen werden mit 500 μl PBS oder 500 μl PBS (+100 mM β-Mercaptoethanol) für 10 Min bei RT inkubiert.
- Die Zellen werden dreimal mit 1 ml HBSS gewaschen und mit 500 µl Zell-Dissoziation Lösung abgelöst.
- Zentrifugation bei 250 g (Thermo Biofuge pico17) für 5 Min bei RT.
- Die Zellen werden in 150 µl ddH₂O, 50 µl Protein-Ladepuffer resuspendiert (KEIN DTT) und für 10 Minuten bei 100 °C erhitzt.

- Die Adhäsion der Proteine an die HEp2 Zellen, sowie deren Biotinylierung wird im Westernblot analysiert (5.4.8).
- Als Ladekontrolle für den Westernblot werden 5 μl der Zellkulturmedium-Proteinlösung mit 27,5 μl ddH₂O, 12,5 μl Proteinladepuffer gemischt und ebenfalls auf das Gel aufgetragen.

5.5.8.2 Bindestudien an Oberflächenprotein-freien Humanzellen

Die Humane Plasmamembran besteht aus Lipiden und Proteinen. Durch die Behandlung humaner Zellen mit Proteinase K ist es möglich, die oberflächenzugänglichen Bereiche der Membranproteine abzuspalten. Ein Adhäsionsassay mit rekombinant-hergestellten Proteinen folgt daraufhin dem Protokoll des regulären Bindeassays mit löslichem Protein (5.5.8).

- HEp-2 Zellen werden 24 Stunden vor dem Start des Experiments in eine 24-Well Platte ausgesät und bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert (HEPA Class 100).
- Die konfluent-gewachsenen Zellen werden auf Eis abgekühlt und mit kaltem HBSS gewaschen.
- Zur Auswertung der Proteinase K-Effizienz werden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Proteinase K bei 4 °C oder 37 °C inkubiert.
- Zu unterschiedlichen Zeitpunkten werden die Zellen mit HBSSS gewaschen und mit 300 μl Zell-Dissoziation Lösung abgelöst.
- Zentrifugation bei 250 g (Thermo Biofuge pico17) für 5 min bei RT.
- Die Zellen werden in 65 μl ddH₂O, 25 μl Protein-Ladepuffer und 10 μl 1 M DTT resuspendiert und für 10 Minuten bei 100 °C erhitzt.
- Die Anwesenheit oberflächenzugänglicher Proteine, sowie intrazellulärer Proteine kann daraufhin im Westernblot analysiert werden.
- Für die Bindestudien mit rekombinanten Proteinen werden die Zellen werden auf Eis mit 5 ng/µl ProteinaseK inkubiert
- Nach 10 Min werden die Zellen dreimal mit HBSS gewaschen.
- Anschließend erfolgt die Protein Bindestudie (5.5.8)

5.5.9 PS Scrambling Assays

Phosphatidylserin (PS) sitzt in gesunden Zellen auf der Membraninnenseite. In einigen Prozessen erfolgt allerdings eine Externalisierung des Lipids. Dieses ist dann auf der Membran-

Außenseite durch Fluoreszenz-markierten Marker Proteine wie Annexin-V oder Lactadherin anfärbbar.

5.5.9.1 PS Scrambling Assay mit rekombinantem Protein

Die Lipid-translozierenden Eigenschaften eines Proteins kann mit Hilfe von rekombinanthergestellten Proteinen an epithelialen Zellen untersucht werden.

- HEp-2 oder CHO Zellen werden 24 Stunden vor dem Start des Experiments in eine 24-Well Platte ausgesät und bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert, sodass sie zum Start des Experiments 70 % konfluent sind (HEPA Class 100).
- Die Zellen werden mit den rekombinant-hergestellten Proteinen (100 μg/ml) in 250 μl Zellkulturmedium bei 37 °C inkubiert.
- Nach definierten Zeitpunkten (5-60 Min) wird die Proteinlösung von den Zellen abgenommen und die Zellen dreimal mit 1 ml HBSS gewaschen
- Externalisiertes PS an der Zellmembran wird entweder mit Annexin-V-FLUOS (0,6 μl in 30 μl Annexin-Puffer) oder rekombinant-hergestelltem Lactadherin (100 ng/μl in 30 μl PBS) für 30 Min bei 4 °C markiert.
- > Die Zellen werden zum Schluss mit PFA (3 %) für 20 Min fixiert.
- > Die Zellen können in 1 ml HBSS bei 4 °C bis zur Färbung (5.6.3) gelagert werden.

5.5.9.2 PS Scrambling Assay mit infektiösen Chlamydien

Die Lipid-translozierenden Eigenschaften von *Chlamydia pneumoniae* und *C. trachomatis* können in diesem Assay an epithelialen Zellen untersucht werden.

- HEp-2 Zellen werden 24 Stunden vor dem Start des Experiments in eine 6-Well Platte ausgesät und bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert, sodass sie zum Start des Experiments 70 % konfluent sind (HEPA Class 100).
- ➢ Die Zellen werden mit HBSS gewaschen und mit 250 µl frischem Zellkulturmedium bedecken.
- Die Gradienten-gereinigte Chlamydien (5.1.4.3) werden aufgetaut, vorsichtig gevortext und kurz im Wasserbad sonifiziert.
- Die Chlamydien (MOI=10) werden in das Zellkulturmedium der Wells gegeben und unter leichtem Schwenken im Well gleichmäßig verteilt.

- Nach definierten Zeitpunkten (5-60 Min) werden die Zellen dreimal mit 1 ml HBSS gewaschen
- Externalisiertes PS an der Zellmembran wird mit Annexin-V-FLUOS (0,6 μl in 30 μl Annexin-Puffer) für 30 Min bei 4 °C vor der Fixierung mit PFA (3 %) für 30 Min markiert.
- ▶ Die Zellen können in 1 ml HBSS bei 4 °C bis zur Färbung (5.6.3) gelagert werden.

5.5.9.3 PS Scrambling Assay mit vorbehandelten infektiösen Chlamydien

In diesem Assay kann der Einfluss eines chlamydialen oberflächenlokalisierten Proteins an den Lipid-translozierenden Eigenschaften von *C. pneumoniae* untersucht werden. Da *C. pneumoniae* nicht genetisch manipulierbar ist, wird die Proteinmenge durch Vorinkubation mit Antikörpern, zur Maskierung des Proteins, oder mit rekombinantem Protein (rProtein), zur Erhöhung der Proteinmenge auf der Oberfläche, reguliert.

- Im Falle der Antikörper-vorbehandelten EBs werden 3x10⁶ IFU der Gradienten-gereinigten chlamydialen EBs (5.1.4.3) in 50 μl HBSS mit aufgereinigten Antikörpern (1:25, oder 1:100) für 2 Stunden auf Eis inkubiert.
- Im Falle der mit rProteinen-vorbehandelten EBs werden 3x10⁶ IFU der Gradientengereinigten chlamydialen EBs (5.1.4.3) in 50 μl HBSS mit löslichem rProtein (1 μM) für 2 Stunden auf Eis inkubiert.
- > Die Chlamydien werden bei 13.000 Upm und 4 °C für 10 Min zentrifugiert.
- > Das Pellet wird in 50 μ l HBBS resuspendiert.
- 1x10⁶ IFU der behandelten chlamydialen EBs werden mit DTT (100 mM) und 4x Ladepuffer bei 100 °C für 10 Min inkubiert und können im Anschluss für Westernblot Analysen verwendet werden (5.4.8).
- 70 % konfluente HEp-2 Zellen, 24 Stunden vor dem Start des Experiments in eine 24-Well Platte ausgesät und bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert (HEPA Class 100) werden mit HBSS gewaschen und mit 250 µl Zellkulturmedium überschichtet.
- 2x10⁶ IFU der vorbehandelten chlamydialen EBs werden in das Zellkulturmedium der Wells gegeben und unter leichtem Schwenken im Well gleichmäßig verteilt.
- Nach 60 Min Inkubation bei 37 °C und 6 % CO₂ werden die Zellen dreimal mit 1 ml HBSS gewaschen

- Externalisiertes PS an der Zellmembran wird mit Annexin-V-FLUOS (0,6 μl in 30 μl Annexin-Puffer) für 30 Min bei 4 °C vor der Fixierung mit PFA (3 %) für 30 Min markiert.
- ▶ Die Zellen können in 1 ml HBSS bei 4 °C bis zur Färbung (5.6.3) gelagert werden.

5.5.10 Proteinanalysen an Humanzellen in Gegenwart chemischer Inhibitoren

Um den Einfluss verschiedener Zell-Komponenten auf die Funktion rekombinanter Protein zu untersuchen, werden Humanzellen mit verschiedenen Inhibitoren behandelt.

- HEp-2 Zellen werden 24 Stunden vor dem Start des Experiments in eine 24-Well Platte ausgesät und bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert, sodass sie zum Start des Experiments 70 % konfluent sind (HEPA Class 100).
- Die Zellen werden mit den Inhibitoren in 250 μl Serum-freiem Zellkulturmedium bei 37 °C inkubiert.
 - Aktin Depolymerisierung: Cytochalasin D (20 µM, 60 Min)
 - Mikrotubuli Depolymerisierung: Nocodazol (10 µM, 60 Min)
 - Cholesterin Extraktion: Methyl-β-Cyclodextrin (5 mM, 30 Min)
- Die Zellen werden im Anschluss mit den rekombinanten Proteinen (100 ng/μl) in Anwesenheit der Inhibitoren in 250 μl Serum-freiem Zellkulturmedium bei 37 °C inkubiert.
- Nach definierten Zeitpunkten wird die Proteinlösung von den Zellen abgenommen und die Zellen dreimal mit 1 ml HBSS gewaschen
- Die Zellen können nun gefärbt werden (PS Markierung, 5.5.9.1) oder direkt mit PFA (3 %) für 20 Min fixiert und in 1 ml HBSS bei 4 °C bis zur Färbung (5.6.3) gelagert werden.

5.5.11 Apoptose Assay

Der geregelte Zelltod, Apoptose genannt, geht einher mit einer Spaltung von Proteinen, u. a. der Caspase-Familie, und einer Externalisierung von Phosphatidylserin. Die Spaltung von Proteinen kann im Westernblot mit spezifischen Antikörpern aufgezeichnet werden. Die PS Externalisierung kann mit Hilfe von PS Marker Proteinen mikroskopisch dokumentiert werden.

HEp-2 Zellen werden 24 Stunden vor dem Start des Experiments in eine 24-Well Platte ausgesät und bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert, sodass sie zum Start des Experiments 70 % konfluent sind (HEPA Class 100).

- Die Zellen werden mit Staurosporin (2,5 μM) in 250 μl Zellkulturmedium bei 37 °C inkubiert.
- Nach definierten Zeitpunkten wird das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen dreimal mit 1 ml HBSS gewaschen
- Zellen können an diesem Punkt mit 100 µl PhosphoLysis Lösung abgelöst und für Westernblot Analysen verwendet werden.
- Für mikroskopische Analysen wird externalisiertes PS an der Zellmembran entweder mit Annexin-V-FLUOS (0,6 µl in 30 µl Annexin-Puffer) oder rekombinant-hergestelltem Lactadherin (100 ng/µl in 30 µl PBS) für 30 Min bei 4 °C markiert.
- Die Zellen werden zum Schluss mit PFA (3 %) für 20 Min fixiert und können in 1 ml HBSS bei 4 °C bis zur Färbung (5.6.3) gelagert werden.

5.6 Mikroskopie

Die mikroskopischen Untersuchungen wurden entweder am Zeiss Axioskop 50 Mikroskop mit der Software Image Pro Plus (1.2.1 und 5.5.6) oder am Nikon Eclipse Ti-E mit A1R confocal laser scanner mit der Software NIS-Elements (5.5.3) durchgeführt.

5.6.1 Fixierung und Permeabilisierung von epithelialen Zellen

Für die nachfolgenden mikroskopischen Analysen müssen die Zellen zunächst mit Methanol oder PFA fixiert werden. PFA-fixierte Zellen müssen vor der Färbung permeabilisiert werden um intrazelluläre Proteine markieren zu können. Methanol-fixierte Zellen sind bereits für Antikörper permeabel.

- Die Zellen werden dreimal mit HBSS waschen und entweder mit 500 µl Methanol oder 3 % PFA beschichtet.
- > Die Methanol-Fixierung erfolgt für 5 min bei RT, die PFA-Fixierung für 20 Min bei RT.
- Die Fixierungslösung wird anschließend abgenommen und die Zellen dreimal mit HBSS gewaschen.
- ▶ Die Zellen können in HBSS bei 4 °C bis zur Färbung gelagert werden.
- Die PFA-fixierten Zellen werden mit 2 % Saponin oder 0,1 % Triton X-100 für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert.
- Die Anwesenheit von 0,5 % Saponin ist auch während der Färbung nötig.

5.6.2 Differentielle Permeabilisierung von epithelialen Zellen

Die differentielle Permeabilisierung erlaubt eine Analyse der Zugänglichkeit der verwendeten Antikörper. Triton X-100 ist selbst in niedrigen Konzentrationen in der Lage, eine Zellmembran vollständig zu permeabilisieren. Auch bei hohen Konzentrationen von Saponin ist dies der Fall. Bei der differentiellen Permeabilisierung wird daher eine Saponin Konzentration von nur 0,05 % verwendet, welche zwar die humane Zellmembran und die chlamydiale Inklusionsmembran permeabilisiert, die chlamydiale Membran jedoch intakt lässt. Dies konnte bereits erfolgreich bei der Analyse oberflächenzugänglicher chlamydialer Proteine gezeigt werden (Hänsch 2016).

- > Die Fixierung vor der Permeabilisierung erfolgt mit frischem PFA (3 %) bei 4 °C.
- > Die Zellen sollten sofort weiter behandelt und nicht gelagert werden.
- Die Zellen werden mit 0,05 Saponin in PBS-T (0,1 % Tween20) permeabilisiert und können dann sofort mittels Antikörperfärbung markiert werden.

5.6.3 Färbung für die Mikroskopie

5.6.3.1 Antikörperfärbung verschiedener Marker Proteine

Proteine in einer Zelle können mittels sekundärer Antikörperfärbung markiert werden. Der primäre Antikörper ist Protein-spezifisch, der sekundäre vermittelt die Fluoreszenz. Auf diese Weise lassen sich auch Zellkompartimente in einer Zelle markieren. Die Antikörper werden in PBS-T (0,1 % Twenn20) verdünnt.

- > Die fixierten Zellen werden einmal mit PBS gewaschen.
- Die Zellen werden mit 25 µl des Primär-Antikörpers (4.8) überschichtet und für 60 Minuten bei 4 °C inkubiert.
- > Die Wells werden dreimal mit PBS gewaschen.
- Die Zellen werden mit 25 μl des Sekundär-Antikörpers (4.8) überschichtet und für 60 Minuten bei 4 °C inkubiert.
- Die Zellen können noch anderweitig gefärbt werden oder an der Luft getrocknet und auf 2 μl Vectashield "eingedeckelt" werden.

5.6.3.2 Antikörperfärbung von chlamydialen Einschlüssen

Pathfinder basiert auf einem Fluoreszenz-markierten monoklonalen Maus-Antikörper gerichtet gegen Lipopolysaccharide an den chlamydialen Inklusionsmembranen.

- Pathfinder wird 1:6 mit PBS verdünnt und je 25 μl pro Well auf die bewachsenen Deckgläschen getropft.
- > Inkubation der Platte bei 30 °C für 30 Minuten.
- > Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS bei 4 °C gelagert.
- Die Glasplättchen können noch anderweitig gefärbt werden oder auf 2 μl Vectashield auf einem Objektträger "eingedeckelt" werden.

1.2.1.1 Färbung eukaryotischer Zellkerne

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) ist ein fluoreszenter Farbstoff, der an AT-reiche Regionen in der DNA bindet. Bei einer Anregung von Licht im Bereich von 385 nm emittiert DAPI blaues Licht.

- Eine 1 mg/ml Stocklösung DAPI wird 1:1000 in HBSS verdünnt.
- > 25 μl pro Well werden auf die bewachsenen Deckgläschen getropft.
- > Inkubation der Platte bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht für 10 Minuten.
- > Die Zellen werden dreimal mit HBSS gewaschen und in 1 ml PBS bei 4 ° gelagert.
- Die Glasplättchen können werden auf 2 µl Vectashield auf einem Objektträger "eingedeckelt".
6 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es das chlamydiale Adhäsin CPn0473 funktionell zu untersuchen und seine Rolle in der chlamydialen Infektion zu definieren. Hierzu wurden zunächst Lokalisierungsstudien an isolierten chlamydialen EBs vorgenommen. Unter zu Hilfename von artifiziellen Membransystemen konnte eine Interaktion von CPn0473 mit Phospholipiden studiert werden. Parallel wurden funktionelle Tests mit rekombinantem CPn0473 an humanen Zellen und während einer chlamydialen Infektion durchgeführt.

6.1 CPn0473 ist ein chlamydiales Oberflächenprotein

In vorangegangenen Studien konnte CPn0473 in infektiösen chlamydialen EBs 48 Stunden nach Infektionsbeginn (hpi) mittels Westernblot Analysen detektiert werden (Fechtner 2013). Des Weiteren konnte das Protein kolokalisierend mit anderen chlamydialen Marker-Proteinen mikroskopisch angefärbt werden. Das kreisförmige Muster, welches mit dem oberflächenlokalisierten Außenmembrankomplex Protein B (OmcB) kolokalisiert, suggeriert, dass es sich um ein oberflächenpräsentiertes Protein handelt (Fechtner 2013).

Um die Lokalisierung von CPn0473 auf der chlamydialen Zelloberfläche zu bestätigen, wurden humane Zellen mit Gradienten-gereinigten Chlamydien infiziert und zu diversen Zeitpunkten unter verschiedenen Bedingungen fixiert. Die Zugänglichkeit von CPn0473 auf der chlamydialen Oberfläche wurde anschließend mittels Antikörperfärbung getestet. Die Fixierung mit Methanol permeabilisiert sowohl die humane Plasmamembran (PM) als auch die chlamydiale Inklusionsmembran, Zellwand und PM. Dies erlaubt also die Markierung von intraund extrazellulären chlamydialen Proteinen. Im Gegensatz dazu bewirkt die Verwendung von Paraformaldehyd (PFA) in geringer Konzentration zwar eine Fixierung aufgrund der reversiblen Vernetzung von Proteinen, lässt jedoch jegliche Membran intakt. Durch die anschließende Behandlung mit 0,05 % Saponin in Glukose-reichem Puffer werden die PFAfixierten Zellen differentiell permeabilisiert. Hierbei handelt es sich um eine sehr milde Permeabilisierung, welche ausschließlich die humane PM und die chlamydiale Inklusionsmembran für anschließende Antikörperfärbung zugänglich macht, nicht aber die chlamydiale Zellwand. Auf diese Weise ist es möglich, ausschließlich extrazelluläre, nicht aber intrazelluläre chlamydiale Proteine zu identifizieren (Abb. 6.1A). Zur Kontrolle wurde das intrachlamydiale Protein DnaK antikörpergefärbt.



Abb. 6.1: CPn0473 sitzt auf der Oberfläche infektiöser chlamydialer EBs.

A: Lokalisierungsstudie von CPn0473 mit Hilfe unterschiedlicher Fixierungsmethoden. Humane HEp-2 Zellen wurden mit Gradienten-gereinigten, infektiösen *C. pneumoniae* EBs infiziert (MOI=10). Die Infektion wurde zu angegebenen Zeitpunkten durch MeOH oder PFA fixiert. PFA-fixierte Zellen wurden im Anschluss noch durch 0,05 % Saponin permeabilisiert. Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden daraufhin mit anti-DnaK-Antikörpern (1:50) und anti-CPn0473 Antikörpern (1:25), und im zweiten Schritt mit Alexa594-gekoppelten-anti-Maus- und Alexa488-gekoppelten-anti-Kaninchen-Antikörpern (1:200) gefärbt. Die DNA wurde mit DAPI (1:1000) gefärbt. Die Auswertung der Infektionen erfolgte mikroskopisch. Pfeilspitzen markieren den Einschluss. Größenstandard: 10 μm. Publiziert in (Fechtner, Galle et al. 2016).

B: Kolokalisierung von CPn0473 und LPS auf der Oberfläche chlamydialer EBs nach Verlassen der Wirtszelle. Humane HEp-2 Zellen wurden mit Gradienten-gereinigten, infektiösen *C. pneumoniae* EBs infiziert (MOI=10). Die Infektion wurde zu definierten Zeitpunkten durch PFA fixiert. Die fixierten und permeabilisierten infizierten Zellen wurden daraufhin mit anti-LPS-Antikörpern (1:50) und anti-CPn0473 Antikörpern (1:25) und im zweiten Schritt mit Alexa594-gekoppelten-anti-Maus- und Alexa488-gekoppelten-anti-Kaninchen-Antikörpern (1:200) gefärbt. Die DNA wurde mit DAPI (1:1000) gefärbt. Die Auswertung der Färbungen erfolgte mikroskopisch. Größenstandard: 10 μm im Gesamtbild und 1 μm im vergrößerten Ausschnitt. Publiziert in (Fechtner, Galle et al. 2016).

C: Proteinlokalisierung durch Oberflächen-Biotinylierung. Gradienten-gereinigte Chlamydien (3x106 IFU) wurden mit 5 mM Biotin für 30 Min bei RT inkubiert und anschließend mit Phospholyse-Puffer lysiert. Biotinylierte Protein wurden daraufhin

mittels Streptavidin-Agarose aus dem Lysat extrahiert. Die Anwesenheit von potentiell extrazellulären Proteinen wurde mit anti-CPn0473-Antikörpern (1:1000) bzw. anti-Pmp21-Antikörpern (1:1000) und AP-gekoppelten-anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern (1:7500), die der potentiell intrazellulären Proteine mit anti-DnaK-Antikörpern (1:500) und anti-EFTu-Antikörpern (1:500), sowie AP-gekoppelten-anti-Maus- und anti-Ziege-Sekundärantikörpern (1:7500) im Westernblot überprüft. Als Einsatz-Kontrolle wurden parallel unbehandelte Chlamydien (1x106 IFU) geladen. Proteinmarker: PageRuler ist in kDa angegeben. (+) = Biotinylierte Probe, (-) = unbiotinylierte/PBS-Probe. Publiziert in (Fechtner, Galle et al. 2016).

In einer Methanol-fixierten Infektion konnten Chlamydien, wie zu erwarten, zu jedem Zeitpunkt mittels DnaK-Antikörpern markiert werden. Erste schwache Signale von CPn0473 waren hingegen erst 24 Stunden nach Infektionsbeginn (hpi) detektierbar, einem Zeitpunkt, bei dem sich Chlamydien zumeist in ihrer metabolisch-aktiven Form, dem Retikularkörperchen (RB), befinden. Nach weiteren 24 Stunden wurde das CPn0473-Signal deutlich stärker und glich der Intensität des DnaK-Signals. Auch nach 72 hpi und 96 hpi konnten beide Proteine in den chlamydialen EBs detektiert werden (Abb. 6.1A, Pfeile). In den mit PFA differentiell permeabilisierten Zellen konnte DnaK dagegen zu keinem Zeitpunkt markiert werden, was die Wirksamkeit dieser Fixierungsmethode bestätigt. Interessanterweise konnte Cpn0473 unter diesen Bedingungen erst 72 hpi, kolokalisierend mit den DNA-Signalen der Chlamydien, detektiert werden und blieb bis zum Ende des Infektionszyklus detektierbar Abb. 6.1A, Pfeile).

96 Stunden nach Infektionsbeginn verlassen die infektiösen, chlamydialen EBs die humane Wirtszelle mit den Proteinen. Auf ihrer Oberfläche lokalisiert sind alle für die Adhäsion an eine neue Wirtszelle notwendigen Proteine. Das unterschiedliche Lokalisierungsmuster der beiden verwendeten chlamydialen Marker-Proteine DnaK und CPn0473 suggerierte, dass CPn0473 48 hpi translatiert und bis 72 hpi auf die Oberfläche der Chlamydien transportiert wurde. Dort konnte CPn0473 an chlamydialen EBs markiert werden. Gemeinsam mit dem Oberflächenlokalisierten chlamydialen Lipopolysaccharid (LPS) konnte das Protein in Form eines Rings um die chlamydialen EBs detektiert werden (Abb. 6.1B). Um die Oberflächenzugänglichkeit des Proteins auch biochemisch zu verifizieren, sollte CPn0473 an intakten Chlamydien chemisch modifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden isolierte, Gradienten-gereinigte chlamydiale EBs biotinyliert. Biotin ist Membran-impermeabel und sollte daher ausschließlich extrazelluläre Proteine modifizieren können. Nach Lyse der Bakterien wurden die biotinylierten Proteine isoliert und im Westernblot analysiert (Abb. 6.1C). Mittels Antikörperfärbung wurde die Proben auf Anwesenheit von CPn0473 und den intrazellulären chlamydialen Proteinen DnaK und EFTu, sowie dem extrazellulären Adhäsin Pmp21 untersucht (Abb. 6.1C). Ohne vorherige Biotinylierung konnten keine der intrazellulären Proteine und nur geringe Mengen der extrazellulären Proteine aus den Chlamydien isoliert und im Westernblot nachgewiesen werden (Abb. 6.1C). Nach Biotinylierung konnten sowohl CPn0473 als auch das Oberflächenlokalisierte Protein Pmp21 isoliert und detektiert werden. Im Gegensatz dazu war es nicht möglich, die intrazellulären chlamydialen Proteine DnaK und EFTu nachzuweisen (Abb. 6.1C).

Die Daten bestätigen die Anwesenheit des Proteins CPn0473 auf der Oberfläche infektiöser EBs. Dabei wird das Protein erst spät im Infektionszyklus auf die Oberfläche der Chlamydien transportiert. Dort lokalisiert steht es den Chlamydien für die Adhäsion und Internalisierung einer neuen Wirtszelle zur Verfügung.

6.2 CPn0473 adhäriert an ein humanes Protein-haltiges Zelloberflächenmolekül

mittels einer 50 AS langen Bindedomäne

Das Protein CPn0473 ist auf der Oberfläche chlamydialer EBs lokalisiert und ist an der Adhäsion an die humane Wirtszelle beteiligt (Fechtner, Galle et al. 2016). Im Folgenden sollte die Adhäsion des Proteins an humane Hep-2 Zellen studiert werden, um, wenn möglich, einen Interaktionspartner zu identifizieren. Rekombinantes Volllängenprotein CPn0473 (rCPn0473 VL) adhäriert binnen weniger Minuten an humane Zellen und induziert daraufhin die Internalisierung von Chlamydien während der Infektion (Fechtner 2013, Fechtner, Galle et al. 2016). Die Deletion der Aminosäuren (AS) 307 – 356 (Bindedomäne, BD, siehe Kapitel 3.4.3.2) im Volllängenprotein führt zum Verlust des Adhäsionsvermögens (Fechtner, Galle et al. 2016). Um die Funktionalität dieser Domänen zu bestätigen, wurde ein Fusionsprotein aus der CPn0473 Bindedomäne (BD), flankiert beidseitig von jeweils 40 AS, um eine möglicherweise essentielle Faltung der BD nicht zu stören, und dem nicht-adhärentem Protein Glutathion-S-Transferase (GST) kloniert und rekombinant hergestellt. Außerdem wurde ein weiteres Fusionsprotein, bestehend aus der CPn0473-IED (Infektionserhöhende Domäne, AS 1-176, siehe Kapitel 3.4.3.2) und der Bindedomäne des C. pneumoniae Adhäsins OmcB, welche in einem späteren Abschnitt dieser Arbeit weitergehend analysiert wurde (Kapitel 6.3 und 6.5.2), generiert. Im Folgenden wurde das Adhäsionsvermögen in einem Experiment mit löslichem rekombinantem Protein an humanen, epithelialen HEp-2 Zellen getestet (Abb. 6.2A).



Abb. 6.2: Rekombinantes CPn0473 bindet an einen humanen proteinösen Interaktionspartner.

A: Bindungsstudien von rekombinanten CPn0473 (rCPn0473) Fusionsproteinen. Humane HEp-2 Zellen wurden mit rekombinanten Proteinen (rProteinen, 100 ng/µl) bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit HBSS gewaschen und anschließend mit Phospholyse-Puffer lysiert. Die Adhäsion der Proteine wurde im Anschluss im Westernblot mit anti-Histidin-Antikörpern (1:2500) und AP-gekoppelten-anti-Maus-Sekundärantikörpern (1:7500) nachgewiesen. Aktin dient hier als Ladekontrolle (anti-Aktin-Antikörper (1:1000) und AP-gekoppelter-anti-Maus-Sekundärantikörper (1:7500)). Als Einsatz-Kontrolle wurden 200 ng Proteinlösung geladen. Einsatz: Ladekontrolle der BD: Bindedomäne, eingesetzten rProteine. VL: Volllängenprotein, IED: Infektionserhöhende Domäne. OmcB: Außenmembrankomplex Protein B, GST: Glutathion-S-Transferase. Proteinmarker: PageRuler ist in kDa angegeben. B: Entfernung von humanen Oberflächenproteinen durch Proteinase K Behandlung. Humane HEp-2 Zellen wurden ohne (unbehandelt) oder mit Proteinase K (0.5 ng/µl und 5 ng/µl) auf Eis für bis zu 40 Min inkubiert. Die behandelten Zellen wurden im Anschluss mit anti-EGFR-, anti-EpHA2-Antikörpern und AP-gekoppelten-anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern (1:7500) analysiert. Die Integrität der humanen Zellen wurde mittels anti-Aktin-Antikörpern (1:1000) und AP-gekoppelten-anti-Maus-Sekundärantikörpern (1:7500) kontrolliert. Proteinmarker: PageRuler ist in kDa angegeben.

C: Bindung von rCPn0473 an Proteinase K-behandelten HEp-2 Zellen. Humane Zellen wurden für 10 Min auf Eis mit Proteinase K (5 ng/µl) inkubiert, gewaschen und anschließend mit 100 ng/µl rCPn0473 bzw. rPmp21 in DMEM Medium inkubiert. Die Zellen wurden zu angegebenen Zeitpunkten mit HBSS gewaschen und mit Phospholyse-Puffer lysiert. Die Adhäsion der Proteine wurde im Anschluss im Westernblot mit anti-Histidin-Antikörpern (1:2500) und AP-gekoppelten-anti-Maus-Sekundärantikörpern (1:7500) kontrolliert. Aktin dient hier als Ladekontrolle (anti-Aktin-Antikörper (1:1000) und AP-gekoppelter-anti-Maus-Sekundärantikörper (1:7500)). Als Einsatz-Kontrolle wurden 200 ng Proteinlösung geladen. Die Proteinmenge im Blot wurde in abhängig der Ladekontrollen (Einsatz und Aktin) mittels ImageJ Software quantifiziert und sind in Prozent unter dem Blot angegeben. Die Proteinmenge bei 60 Min. ohne Proteinase K-Vorbehandlung wurde auf 100 % Adhäsion gesetzt. Proteinmarker: PageRuler ist in kDa angegeben. (-) = keine Proteinase K, (+) = Proteinase K-Vorbehandlung)

D, **E**: Bindung von rCPn0473 an Zytoskelett-depletierte HEp-2 Zellen. Publiziert in (Fechtner, Galle et al. 2016).Humane Zellen wurden mit (**D**) Cytochalasin D (20 μM) oder (**E**) Nocodazol (10 μM) für 60 Min und anschließend mit rCPn0473 (100 ng/μl) in Anwesenheit der Inhibitoren für 60 Min bei 37 °C inkubiert. Cholesterin-reiche Regionen in der PM wurden mit der FITC-markierten Cholera Toxin Untereinheit B (CTxB, 10 μg/ml), Aktin mit Rhodamin/Phalloidin (1:25), Mikrotubuli mit anti-Alpha-Tubulin-Antikörpern (1:100) und Alexa488-markierten-anti-Maus-Sekundärantikörpern (1:200) gefärbt. Gebundenes rCPn0473 wurde mit anti-CPn0473-Antikörpern (1:25) und Alexa594-sekundären-Kaninchen-Antikärpern (1:200) detektiert. Die DNA wurde mit DAPI (1:1000) gefärbt. Pfeilspitzen markieren Regionen erhöhter Protein-Akkumulationen an der PM.

Die CPn0473 Bindedomäne reichte bereits aus, um Bindung an humane Zellen zu ermöglichen, denn das Protein rCPn0473-BD_GST konnte, ähnlich wie rCPn0473 VL, adhäriert an humanen HEp-2 Zellen bereits nach 15 Min. detektiert werden. Über den Zeitraum von 60 Minuten konnte außerdem eine Steigerung des Adhäsionsvermögens der CPn0473 Variante und des VL Proteins beobachtet werden (Abb. 6.2A). Auch die rCPn0473-IED zeigte, wenn fusioniert mit der Bindedomäne vom OmcB, Adhäsion an die humanen Zellen. Ihr Bindungsverhalten unterschied sich dabei nicht von dem der OmcB-BD alleine (Abb. 6.2A).

Auch wenn dem Protein CPn0473 bereits ein Adhäsionsvermögen an humane Zellen nachgewiesen werden konnte, ist ein direkter Interaktionspartner auf der Oberfläche der humanen Zellen noch nicht identifiziert worden. Daher sollte untersucht werden, ob humane Oberflächenproteine an der Adhäsion von CPn0473 beteiligt sind. Hierzu wurden HEp-2 Zellen vor den Adhäsionsstudien mit Proteinase K inkubiert. Der Abbau der extrazellulären Proteine wurde mittels Westernblot Analyse bestätigt (Abb. 6.2B). Um die Integrität der humanen Zellen zu verifizieren, wurde gleichzeitig die Proteinmenge des intrazellulären Proteins Aktin überwacht. Unter Verwendung unterschiedlicher Proteinase K Konzentrationen und Inkubationszeiten sowie verschiedener Inkubationstemperaturen konnte gezeigt werden, dass die Oberflächenproteine EGFR und EpHA2 nach Inkubation der Humanzellen mit Proteinase K bei einer Konzentration von 5 ng/ μ l für 10 Min auf Eis fast vollständig entfernt werden konnten, während die Menge an Aktin nahezu unverändert blieb (Abb. 6.2B). Eine längere Inkubationszeit (20 Min) resultierte, neben einem vollständigen Verlust der EGFR und EpHA2 Signale auch in einem stark verringerten Aktin-Signal, was darauf schließen lässt, dass die Integrität der Humanzellen unter diesen Bedingungen bereits gestört war. Eine um 10-fach geringere Menge an Proteinase K ($0,5 \text{ ng/}\mu$) hatte dagegen so gut wie keinen Effekt auf den Abbau dieser Proteine (Abb. 6.2B). Für das folgende Adhäsionsexperiment mit rCPn0473 wurde daher eine ProteinaseK-Konzentration von 5 ng/ μ l und eine Inkubationszeit von 10 Min auf Eis verwendet. Die Auswertung des Adhäsionsexperiments mit rCPn0473 an den Proteinase Kbehandelten HEp-2 Zellen zeigte, dass die Bindung von rCPn0473 Humanprotein-abhängig ist (Abb. 6.2C). Die Adhäsion von rCPn0473 an unbehandelte HEp-2 Zellen stieg mit der Zeit an. Setzte man die Menge des gebundenen Proteins zum Ende des Experiments (60 Min) auf 100 % (\pm 10 %), so zeigte rCPn0473 nach 15 Min Inkubation bei 4 °C bereits 33 % \pm 0,7 %, nach 30 Min 65 % \pm 10 % Bindung. Im Vergleich dazu konnten lediglich 5 % \pm 0,3 % nach 15 Min, 10 % ± 3,8 % nach 30 Min bzw. 13 % ± 8 % rCPn0473 nach 60 Min adhäriert an Proteinase Kbehandelten HEp-2 Zellen detektiert werden (Abb. 6.2C). Damit war die Bindungskapazität sogar drastischer reduziert als bei der Bindung von Pmp21 an seinen Rezeptor EGFR (43 % ± 15 %, 60 Min).

Humane Zelloberflächenproteine sind demnach für die Bindung von CPn0473 an humane Zellen essentiell. Für die Bindung an diesen unbekannten Interaktionspartner ist die Bindedomäne (BD, AS307-356) bereits ausreichend. Der direkte proteinöse Interaktionspartner konnte in dieser Arbeit allerdings leider noch nicht identifiziert werden. Viele Zelloberflächenproteine präferieren eine bestimmte Zusammensetzung benachbarter Moleküle innerhalb der Membran und sind daher in distinkten Regionen innerhalb der Membran lokalisiert. Im Folgenden sollte daher die Präferenz von CPn0473 zu Regionen in der humanen Plasmamembran untersucht werden.

6.2.1 Die CPn0473 Bindung erfolgt in Cholesterin-reichen Domänen

Die zuvor erzielten Ergebnisse zeigten, dass der erste Kontakt von CPn0473 mit der humanen Zelle über ein Zelloberflächenprotein erfolgt. Im Folgenden sollte die CPn0473 Binderegion an der humanen Plasmamembran (PM) weiter charakterisiert werden. Hierzu wurde drei Komponenten in und an der PM untersucht. Neben den Proteinen und Phospholipiden stellt das Cholesterin einen wichtigen Bestandteil der humanen PM dar. Cholesterin reguliert durch dessen Anwesenheit bzw. Abwesenheit die Fluidität einer Membran (Cooper 2000). Außerdem spielt Cholesterin auch bei der Funktion von CPn0473 im Rahmen der chlamydialen Infektion eine essentielle Rolle (Fechtner, Galle et al. 2016). Auch das Zytoskelett, in Form von Aktin- und Mikrotubuli-Filamenten, lokalisiert auf der intrazellulären Seite der Membran, stabilisiert die die PM (Singer and Nicolson 1972). Aktin ist außerdem wichtig für die Aufrechterhaltung von Cholesterin-reichen Mikrodomänen in der PM (Goswami, Gowrishankar et al. 2008, Chichili and Rodgers 2009). Durch Markierung des Glycosphingolipids GM1, welches in Cholesterin-reichen Regionen in der humanen PM lokalisiert, mit FITC-markiertem Cholera-Toxin Untereinheit B (CTxB) konnte gezeigt werden, dass rekombinantes CPn0473 (rCPn0473) in Cholesterinreichen Regionen bindet (Fechtner, Galle et al. 2016). Zur Destabilisierung dieser Mikrodomänen wurde das humane Zytoskelett depolymerisiert und dessen Einfluss auf die Mikrodomänen-CPn0473 Lokalisierung in der humanen PM untersucht (Abb. 6.2D,E). In unbehandelten HEp-2 Zellen konnte das kortikale Aktin-Zytoskelett flächendeckend an der humanen PM detektiert werden. Deutlich zu erkennen war eine Akkumulierung der Aktin-Signale in distinkten Regionen gemeinsam mit den CTxB- und den rCPn0473-Signalen (Abb. **6.2**D, Pfeilspitzen). Die Destabilisierung des Aktin-Zytoskeletts durch Cytochalasin D führte zur Relokalisierung des Aktin-Signals. Es war nicht mehr uniform unterhalb der PM verteilt, sondern stark reduziert und nur noch in wenigen Bereichen akkumuliert (Abb. 6.2D, Pfeilspitzen). Interessanterweise waren sowohl die CTxB-Signale, als Marker für Cholesterinreiche Mikrodomänen, als auch die rCPn0473 Signale, stark reduziert. Einige Signale akkumulierten in den wenigen Aktin-positiven Bereichen (Abb. 6.2D, Pfeilspitzen).

Die zweite Klasse des Zytoskeletts, die Mikrotubuli, durchspannen die Zellen von einem Mikrotubuli-organisierendem Zentrum (MTOC) ausgehend. In unbehandelten Humanzellen konnten die Mikrotubuli-Filamente, ausgehend von einer Region nahe dem Zellkern hinein in das Zytosol gut detektiert werden (Abb. 6.2E). Nach der Behandlung der Humanzellen mit Nocodazol waren diese Filamente nicht mehr sichtbar. Die Destabilisierung des Mikrotubuli-Zytoskeletts, welches für die Aufrechterhaltung der Cholesterin-reichen Mikrodomänen in der PM keine Rolle spielt, hatte weder einen Einfluss auf die CTxB-Verteilung noch auf die Bindung des rCPn0473 Proteins an die Membran (Abb. 6.2E). Die Signale für CTxB und rCPn0473 korrelierten weiterhin an der gesamten PM, wobei sie in gewissen Bereichen stärker akkumulierten.

Diese Ergebnisse unterstreichen einmal mehr die Bedeutung der Cholesterin-reichen Mikrodomänen innerhalb der humanen PM und des F-Aktin-Zytoskelett für die Bindung des Proteins CPn0473 an die humanen Zellen. Es zeigt außerdem, dass die Adhäsion von CPn0473 von mehr als einem Faktor innerhalb der PM abhängig ist. Ein Einfluss der Phospholipide bei der Bindung von CPn0473 an die humanen Zellen blieb noch zu untersuchen.

6.3 LIPP bindet das negativ-geladene Phospholipid Phosphatidylserin

Neben der Adhäsion an humane Zellen zeigt rekombinantes CPn0473 (rCPn0473) bereits in Liposomen-Präzipitations-Experimenten eine Affinität zu Lipiden. Um diese Interaktion genauer studieren zu können, wurde in Kooperation mit Dr. Thorsten Eierhoff (HHU Düsseldorf) und Prof. Dr. Winfried Römer (ALU Freiburg) die Adhäsion von rCPn0473 an *Giant unilamellar vesicles* (GUVs) untersucht. Diese 5 µm bis 20 µm großen Liposomen erlauben die mikroskopische Analyse der Interaktion von Proteinen mit Membranen. Zur Bestimmung der von rCPn0473 bevorzugten Lipidspezies wurde GUVs mit verschiedenen Lipid-Kompositionen durch Elektroformation hergestellt und ihre Interaktion mit rCPn0473 untersucht (Abb. **6.3**A,B). Da in Interaktionsstudien mit Lipiden, immobilisiert auf einer Membran, rCPn0473 bereits eine Tendenz zur Bindung an negativ-geladenen Lipide gezeigt hatte (Fechtner 2013), wurde in einem ersten Ansatz die Interaktion von rCPn0473 an GUVs mit Phosphatidylcholin und 5 mol% Phosphatidylserin (PS), Phosphatidsäure (PA) oder Phosphatidylinositol-2phosphat (PIP2) untersucht. Als Kontrolle wurden Phosphatidylcholin (PC)-haltige GUVs ohne zusätzliche negativ-geladene Lipide getestet.



Abb. 6.3: Rekombinantes CPn0473 interagiert mit Phosphatidylserin in artifiziellen Membransystemen.

A, **B**: Bindung von rekombinantem CPn0473 (rCPn0473) an Giant unilamellar vesicles (GUVs) unterschiedlicher Lipid-Komposition. GUVs mit einer Lipid-Mischung aus DOPC und Texas-Red-markiertem DOPE, sowie eines zusätzlich hinzugefügten Lipids (5 mol%) wurden mit DyLight488-markiertem rCPn0473 bei RT inkubiert. Die Bindung des Proteins wurde mikroskopisch analysiert. DOPC: Phosphatidylcholin, DOPS: Phosphatidylserin, DOPA: Phosphatidsäure, PIP2: Phosphatidylinositol-Diphosphat, DOPE: Phosphatidylethalonamin. **A**: Die Bindungs-Effizienz von rCPn0473 an die unterschiedlichen GUVs mit und ohne Cholesterin wurden jeweils an mindestens 125 GUVs ausgewertet. Die statistische Signifikanz ist angegeben mit *** (p<0.01), ** (p<0.05) und n.s. nicht signifikant (n= 2). **B**: Repräsentative Bilder von GUVs aus DOPC, Cholesterin und dem angegebenen Lipid nach Inkubation mit DyLight488-markiertem rCPn0473. Größenstandard: 10 μm.

C: Bindung von rLactadherin (rLactC2) und einer Dreifach-Alanin-Mutante von rLactadherin (rLactC2AAA) an immobilisierte Lipide auf einer Membran (Echelon). 1 μg/ml rLactC2 (linke Seite), oder rLactC2AAA (rechte Seite) wurden mit den Lipid-Membranen für 1 Stunde bei RT inkubiert. Die Bindung wurde mit anti-GST-Antikörpern (1:1000) und AP-gekoppelten-anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern (1:7500) analysiert. 100 pmol der folgenden Lipide sind auf der Membran immobilisiert: Glyceryltripalmitat (GT), Diacylglycerin (DAG), Phosphatidsäure (PA), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylethalonamin (PE), Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylglycerin (PG), Cardiolipin (CL)Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylinositol-(4,5)-Diphosphat (PI(4,5)P2), Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Triphosphat (PI(3,4,5)P3), Cholesterin (Chol), Sphingomyelin (SM) und Sulfatid.

D: Bindung von rCPn0473 an GUVs unterschiedlicher PS Konzentration. GUVs aus Lipid-Mischungen mit DOPC und 5 mol% bzw. 20 mol% DOPS wurden mit 10 ng/ μ l DyLight488-markiertem rCPn0473 oder rLactC2 (nur 20 mol% PS) bei RT inkubiert. Die Bindung des Proteins wurde mikroskopisch analysiert. Die Bindungs-Effizienz der Proteine an die GUVs wurde jeweils an mindestens 75 GUVs ausgewertet. Die statistische Signifikanz ist angegeben mit *** (p<0.001), ** (p<0.01) * (p<0.05) und n.s. nicht signifikant (n= 2).

Während keine Bindung von rCpn0473 an PC-haltige GUVs detektiert werden konnte, war die Bindung von rCPn0473 an PS-haltige GUVs mit 42 % \pm 2,2 % rCPn0473-positiven GUVs am stärksten (Abb. 6.3A,B). Die Bindung von rCPn0473 an PA-haltige GUVs war dagegen mit 16 % \pm 5,6 % rCPn0473-positive GUVs deutlicher geringer als an die PS-haltigen GUVs. Eine Bindung von rCPn0473 an PIP2-haltige GUVs konnte jedoch nicht beobachtet werden (Abb. **6.3**A). Da für die Funktionalität von rCPn0473 bei der Adhäsion an humane Zellen, sowie bei dessen Rolle während der Internalisierung der chlamydialen EBs, bereits eine Abhängigkeit von Cholesterin nachgewiesen werden konnte, wurde in einem zweiten Ansatz die Adhäsion von rCPn0473 an GUVs mit oben genannten Lipid-Kompositionen zuzüglich 20 mol% Cholesterin untersucht. Tatsächlich steigerte sich die Adhäsion von rCPn0473 an PS-haltige GUVs in Anwesenheit von Cholesterin auf 50 % \pm 0,3 %. Im Gegensatz dazu konnte die Adhäsion von rCPn0473 an die PA-haltigen GUVs (17 % \pm 5,6 %) nicht signifikant verbessert werden. In Anwesenheit des Cholesterins konnte auch keine Bindung an die reinen PC-GUVs beobachtet werden. Interessanterweise zeigte rCPn0473 in Anwesenheit von Cholesterin eine schwache Bindung (11 % \pm 1,5 %) an PIP2-haltige GUVs.

Da das GUV Experiment auf PS als möglichen Lipid-Interaktionspartner von CPn0473 hinwies, wurde zu Vergleichszwecken für die folgenden Experimente die Lipid-Bindedomäne des Glykoproteins Lactadherin (LactC2, EGF-8-Protein, MFG-E8) als PS-Marker-Protein (siehe Kapitel 3.1.4, (Yeung, Gilbert et al. 2008)) rekombinant aufgereinigt und verwendet. Um die Spezifität dieses Marker-Proteins zu verifizieren, wurde das aufgereinigte Protein zunächst an immobilisierten Lipiden auf einer Membran getestet (Abb. 6.3C). rLactC2 zeigte eine sehr spezifische Bindung für das immobilisierte PS Lipid, nicht aber für andere negativ-geladene oder ungeladene Lipide. Eine Dreifach-Adenin-Mutante von rLactC2 (rLactC2AAA, W26A, W33A, F34A), welche nicht mehr in der Lage ist PS in humanen Zellen zu binden (Yeung, Gilbert et al. 2008), war, wie zu erwarten, auch nicht mehr in der Lage, die immobilisierten Lipide auf der Membran zu binden (Abb. 6.3C). Um die Dosis-Abhängigkeit der CPn0473 Bindung an die GUVs zu studieren, wurde die Menge an PS in der Lipid-Mischung für die Herstellung der GUVs von 5 mol% auf 20 mol% erhöht. Die Bindung von rCPn0473 an die 20 mol% igen GUVs war im Vergleich zu den 5 mol% igen PS-GUVs mit 84 % ± 6,5 % deutlich erhöht, und damit ähnlich stark wie die Bindung von rLactC2 (Abb. 6.3D). Im Vergleich hierzu waren 99 % ± 1,2 % aller PS-haltigen GUVs (20 mol%) rLactC2-positiv. Eine Bindung des Proteins an eine PC-haltige GUVs konnte nicht beobachtet werden (Abb. 6.3D).

Für die Bindung an humanen Zellen konnte bereits eine Bindedomäne (BD) im C-Terminus des Proteins (AS 307-356) identifiziert werden (Galle 2012, Fechtner, Galle et al. 2016). Um zu überprüfen, ob diese Domäne auch für die Bindung an PS essentiell ist, wurden verschiedene Konstrukte von rCPn0473 auf Bindung an PS-haltige GUVs getestet (Abb. 6.4).





A-C: Bindung von rekombinantem CPn0473 (rCPn0473) Varianten und rOmcB an PS-haltige GUVs. GUVs aus Lipid-Mischungen mit DOPC, Texas-Red-markiertem DOPE, Cholesterin und 20 mol% DOPS wurden mit DyLight488-markierten rProteinen bei RT inkubiert. Die Bindung der Proteine wurde mikroskopisch analysiert (BD=Bindedomäne, IED=Infektionserhöhende Domäne). **A:** Repräsentative Bilder von GUVs nach Inkubation mit den DyLight488-markierten rProteinen. Größenstandard 5 µm. **B:** Die Bindungs-Effizienz der Proteine an die GUVs wurde jeweils an mindestens 50 GUVs ausgewertet. Di Die statistische Signifikanz ist angegeben mit *** (p<0.01), ** (p<0.05) und n.s. nicht signifikant (n= 2). **C:** Schematische Darstellung der rCPn0473 Deletionsvarianten und rOmcB. Wichtige Aminosäurepositionen sind angegeben. (N=N-Terminus, C=C-Terminus).

die ohne Humanzell-Bindedomäne Interessanterweise zeigte Deletionsvariante (rCPn0473∆BD) mit 93 % ± 3,1 % rCPn0473-positiven GUVs ein Bindungsvermögen an PShaltige GUVs, das leicht aber signifikant affiner gegenüber PS war, als das des Volllängenproteins (rCPn0473 VL) (Abb. 6.4). Die zweite bereits identifizierte Domäne (Infektionserhöhende Domäne, IED) ist essentiell für die Induktion der chlamydialen Internalisierung durch rCPn0473 (Galle 2013, Fechtner, Galle et al. 2016). Eine Deletionsvariante ohne IED (rCPn0473∆IED) zeigte interessanterweise einen kompletten Verlust der Bindung an PS-haltige GUVs $(1\% \pm 1\% \text{ rCPn0473-positive GUVs})$. In einem Kontrollversuch wurde das Fusionsprotein aus der CPn0473-IED und der OmcB-BD (rCPn0473-IED OmcB-BD) auf Interaktion mit den PS-haltigen GUVs getestet. Rekombinantes OmcB, welches auf der humanen Zelloberfläche an Zucker bindet, konnte selbst nicht mit den GUVs interagieren (3 % ± 4,3 % positive GUVs). Im Gegensatz dazu war das Fusionsprotein in der Lage, an die GUVs zu binden (93 $\% \pm 1,1$ %) und zeigte dabei eine Affinität ähnlich hoch wie rCPn0473∆BD und damit etwas höher als das Volllängenprotein. (Abb. 6.4).

Die GUV Ergebnisse legen nahe, dass rCPn0473, neben der Wirtszell-bindenden Domäne im C-Terminus (BD, AS 307-356), zusätzlich eine PS-bindende Domäne im N-Terminus trägt (AS 1-170). Diese Domäne ist auch verantwortlich für die rCPn0473-abhängige Steigerung der chlamydialen Internalisierung (Galle 2013, Fechtner, Galle et al. 2016). Der Einfluss des Phospholipids PS auf die chlamydiale Infektion sollte daher im folgenden Kapitel untersucht werden.

6.4 Die chlamydiale Internalisierung ist PS abhängig

Bisher konnte gezeigt werden, dass CPn0473 sowohl an humane Wirtszellproteine bindet als auch mit dem Phospholipid Phosphatidylserine (PS) interagieren kann. Um die Rolle von PS für die chlamydiale Infektion zu bestimmen, wurden *Chinese Hamster ovary* Zelllinen (CHO) mit reduziertem PS-Level mit *C. pneumoniae* infiziert (Abb. 6.5). Die CHO PSA3 Zelllinie besitzt eine PS-Defizienz aufgrund einer Mutation im *pss1* Gens. Dieses Gen kodiert für die Phosphatidylserin Synthase 1, die für den Hauptteil der PS-Synthese in Säugetierzellen verantwortlich ist. Ein Ausfall dieses Proteins resultiert in einer Reduktion der Gesamt-PS- Menge von etwa 70 % (Kuge, Nishijima et al. 1986, Kuge, Nishijima et al. 1986, Nishijima, Kuge et al. 1986).



Abb. 6.5: Die chlamydiale Internalisierung ist abhängig von der Verfügbarkeit von PS in der Wirtszelle.

A: Infektion von PS-kompetenten und -defizienten CHO Zelllinien durch *C. pneumoniae*. Wildtypische CHOs (CHO-K1) und PSdefiziente CHOs (CHO-PSA3) wurden mit chlamydialen EBs (MOI=20). Die Infektion wurde 48 Stunden nach Infektionsbeginn (hpi) durch Auszählung aller Inklusionen in 10 Gesichtsfeldern (Triplikate) ausgewertet. Die Infektiösität von *C. pneumoniae* in CHO-K1 Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Die statistische Signifikanz ist angegeben mit *** (p<0.001), ** (p<0.01) * (p<0.05) und n.s. nicht signifikant (n=3).

B: Internalisierung von *C. pneumoniae* in einer PS-defizienten CHO Zelllinie. Die wildtypische (CHO-K1) und die PS-defiziente CHO Zelllinie (CHO-PSA 3) wurde mit 100 ng/μl rCPn0473 oder BSA für 1 h bei 37 °C inkubiert. In Anwesenheit der Proteine wurden die Zellen daraufhin zunächst für 1 h bei 4 °C mit chlamydialen EBs infiziert, gefolgt von weiteren 2 h bei 37 °C. Nach Trypsinisierung der Zellen wurde die Menge an humaner und chlamydialer DNA mit spezifischen Oligonukleotiden durch quantitative RT-PCR ermittelt (Triplikate). Die Internalisierung in den BSA-vorbehandelten und infizierten Zellen wurden jeweils auf 1 gesetzt. Die statistische Signifikanz ist angegeben mit *** (p<0.001), ** (p<0.01) * (p<0.05) und n.s. nicht signifikant (n=3). **C**: Bindung von rCPn0473 an eine PS-defiziente CHO Zelllinie. Eine wildtypische (CHO-K1) und eine PS-defiziente CHO Zelllinie (CHO-PSA3) wurde mit 100 ng/μl rCPn0473 bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit HBSS gewaschen und mit Phospholyse-Puffer lysiert. Die Adhäsion des Proteins wurde im Anschluss im Westernblot mit anti-Histidin-Antikörpern (1:2500) und AP-gekoppelten-anti-Maus-Sekundärantikörpern (1:7500)). Die Proteinbanden wurden mit ImageJ Software quantifiziert. Die Bindungseffizienz ist in Prozent unter dem Blot angegeben und wurde relativ zur Aktin-

Ladekontrolle und dem Einsatz berechnet. Die Menge an gebundenem Protein zum Zeitpunkt 60 Min in den wildtypischen Zellen wurde auf 100 % Bindung gesetzt. Proteinmarker: PageRuler ist in kDa angegeben (n=4).

Wildtypische und PS-defiziente CHO Zellen wurden mit C. pneumoniae infiziert und deren Infektiösität 48 Stunden nach Infektionsbeginn (hpi) bestimmt. Im Vergleich zur Infektion der wildtypischen CHO Zellen (100 % Infektiösität), war die Infektion in den PS-defizienten PSA-3 Zellen um 45 % ± 11 % reduziert (Abb. 6.5A). Die Größe der Inklusionen nach 48 Stunden unterschied sich hingegen nicht. Da bereits gezeigt wurde, dass rekombinantes CPn0473 (rCPn0473) die chlamydiale Infektion durch Stimulation der Internalisierung Dosis-abhängig steigert (Fechtner, Galle et al. 2016), sollte nun untersucht werden, ob die stimulierte Aufnahme durch die Wirtszelle in Abwesenheit von einem Großteil des Wirtszell-PS reduziert war. Hierzu wurden die PS-defiziente (PSA3) und die wildtypische CHO Zelllinie entweder mit rCPn0473 oder BSA vorinkubiert und anschließend infiziert. Nach Abschluss der Internalisierung, 3 hpi, wurde die Internalisierungsrate der chlamydialen EBs quantifiziert (Abb. 6.5B). Im Vergleich zu BSA vorbehandelten Zellen, zeigten die mit rCPn0473 vorbehandelten wildtypischen CHOs eine um das 27 (± 3) -fache erhöhte Internalisierungsrate. Dabei ist die Erhöhung der Internalisierungsrate ähnlich der, die in den humanen HEp-2 Zellen beobachtet werden konnte (Fechtner, Galle et al. 2016). Interessanterweise konnte rCPn0473 die chlamydiale Internalisierung in den PS-defizienten CHOs nicht steigern und die relative Internalisierung sank sogar auf 0,11 (± 3) im Vergleich zu BSA-behandelten Zellen (Abb. 6.5B). Diese Reduktion der Internalisierung war allerdings nicht signifikant. Um festzustellen, ob das Fehlen der Internalisierungssteigerung aus einer reduzierten rCPn0473 Bindung an die PSdefizienten Zellen resultierte, wurden Bindungs-Experimente mit löslichem Protein durchgeführt (Abb. 6.5C). Nach 60 Minuten Inkubation unterschied sich die Bindung von rCPn047 an die PS-defizienten CHOs (PSA3) mit 108 % (± 47 %) nicht signifikant von der des Proteins an die wildtypischen CHO K1 Zellen (100 % ± 27 %). Auch nach 15 Min, mit 67 % (± 23 %) Bindung an CHO-K1 bzw. 76 % (± 36 %) an PSA 3 Zellen und nach 30 Min., mit 79 % (± 33 %) respektive 86 % (± 43 %), war die Bindung des Proteins an die beiden Zelllinien nicht signifikant verschieden (Abb. 6.5C). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass das Fehlen der Internalisierungssteigung der chlamydialen EBs nach Zugabe von rCPn0473 in einer reduzierten Bindung des Proteins begründet liegt.

Die CHO Experimente konnten eindeutig zeigen, dass die chlamydiale Infektion von der Menge an verfügbaren PS in der Wirtszelle abhängig ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch der Mechanismus, mit dem rCPn0473 in die Internalisierung der Chlamydien eingreift, eine ausreichende Menge PS bedarf. Jedoch blieb die Frage, wie CPn0473 und PS miteinander interagieren können um die chlamydiale Internalisierung zu beeinflussen.

6.4.1 Chlamydia pneumoniae induziert die Externalisierung von PS an der Wirtszelle

In dieser Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass CPn0473 in der Lage ist, PS zu binden. Außerdem zeigte sich, dass das Eindringen chlamydialer EBs und die Stimulation dieses Prozesses durch CPn0473, PS-abhängig ist. In der Plasmamembran (PM) gesunder humaner Zellen ist Phosphatidylserine (PS) auf der Membraninnenseite lokalisiert (van Meer 2011). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Infektion durch Chlamydien die Externalisierung von PS an der Wirtszellmembran induzieren kann (Goth and Stephens 2001).

Zunächst wurde daher versucht, die beobachtete PS-Externalisierung im Rahmen einer frühen chlamydialen Infektion zu verifizieren. Außerdem sollte untersucht werden, ob es sich dabei um eine örtlich-beschränkte PS-Externalisierung in der Nähe des adhärierten Chlamydiums handelt, oder ob die Zelle PS als Antwort auf eine Infektion überall an der PM externalisiert. Hierzu wurden humane epitheliale HEp-2 Zellen mit infektiösen EBs infiziert (Abb. 6.6). Möglicherweise externalisiertes PS wurde durch das PS-bindende Protein Annexin-V-Fluos an lebenden Zellen markiert. Annexin ist Membran-impermeabel und kann daher ausschließlich externalisiertes PS binden. Bereits 5 Min nach Beginn der Infektion konnte eine schwaches Annexin-Signal unterhalb der adhärierten chlamydialen EBs an der Wirtszell-PM detektiert werden. Dieses Signal wurde mit Fortschreiten der Infektion deutlich stärker. So war es nach 30 bzw. 60 Min deutlich unter nahezu jedem adhärierten EB nachweisbar (Abb. 6.6A).





A, **B**: PS-Externalisierung während der frühen chlamydialen Infektion. Humane HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* oder *C. trachomatis* Serovar E oder LGV (MOI=10) infiziert. Externalisiertes PS an der humanen PM wurde mit FITC-markiertem Annexin-V (1:50) für 20 Min bei 4 °C vor der Fixierung mit PFA an lebenden Zellen markiert. **A**: Repräsentative Aufnahmen von einer *C. pneumoniae* Infektionen zu den angegebenen Zeitpunkten. Im Falle der Hitze-getöteten Bakterien wurden die Chlamydien vor Infektionsbeginn für 30 Min. bei 60 °C inkubiert. Der weiße Kasten markiert jeweils den Ausschnitt der vergrößerten Abbildungen in den Einzelkanal-Bildern. Größenstandard: 2,5 µm. **B**: Die Rate an externalisiertem PS bei einer chlamydialen Infektion 1 hpi wurde durch Auswerten von mindesten 30 adhärierten chlamydialen EBs ermittelt (Triplikate). Die statistische Signifikanz ist angegeben mit *** (p<0.001), ** (p<0.01) * (p<0.05) und n.s. nicht signifikant (n= 3). Repräsentative Aufnahmen einzelner EBs sind auf der rechten Seite dargestellt. Größenstandard: 1 µm.

Interessanterweise zeigten Hitze-inaktivierte chlamydiale EBs, dessen Oberflächenproteine durch die Hitze-Behandlung denaturiert und daher inaktiviert gemacht wurden, keine Annexin-Signale. Die PS-Externalisierung schien daher durch ein Oberflächenprotein induziert worden zu sein. Um die Spezies-Abhängigkeit dieser Externalisierung zu untersuchen, wurde eine Infektion mit den *C. trachomatis* Serovaren E und LGV sowie mit *C. pneumoniae* untersucht. Interessanterweise waren Annexin-Signale an 80 % (\pm 9 %) aller *C. pneumoniae* EBs, aber nur an 13 % (\pm 5 %) respektive 7 % (\pm 3 %) aller *C. trachomatis* Serovare E und LGV EBs nachweisbar (Abb. 6.6B). Die PS-Externalisierung ist daher ein *C. pneumoniae*-spezifisches Merkmal.

Annexin-V bindet PS sehr spezifisch, ist aber ausschließlich in Anwesenheit einer hohen Konzentration an Calciumionen aktiv (Raynal and Pollard 1994). Hohe Calciumkonzentrationen allerdings können die Verteilung von Phosphatidylserin durch Stimulation von Lipid-Translokatoren, wie Scramblasen und Flippasen, entscheidend beeinflussen (siehe Kapitel 3.1.1) (Bevers and Williamson 2010). Um den Einfluss von Calcium auf die beobachtetet chlamydiale PS-Externalisierung auszuschließen, wurde die Anwesenheit von PS auf der Zelloberfläche auch mit der PS-Bindedomäne des Marker-Proteins Lactadherin (LactC2) untersucht. Zunächst wurde die PS-Externalisierung in apoptotischen Zellen parallel mit Annexin-V-Fluos und mit der rekombinant hergestellten Bindedomäne von Lactadherin (rLactC2) untersucht (Abb. 6.7A). Lebende, nicht apoptotische Zellen zeigten keine Annexin-Bindung. An apoptotischen Zellen hingegen konnte Annexin in definierten Bereichen an der Zellmembran detektiert werden (Abb. 6.7A). Auch wenn lebende Zellen einige wenige Hintergrundsignale des Antikörpers, gerichtet gegen den GST-Tag von rLactC2 zeigten, war die Bindung des Proteins an apoptotischen Zellen doch sehr viel stärker sichtbar. Das Protein konnte punktiert, ähnlich wie Annexin zuvor, gebunden an die Membran der apoptotischen Zellen detektiert werden (Abb. 6.7A).



Abb. 6.7: Das PS-bindende Lactadherin bindet externalisiertes PS an der humanen Plasmamembran.

A: PS-Externalisierung an apoptotischen Humanzellen. Die PS-bindende Domäne von Lactadherin wurde, fusioniert mit einem GST-Tag, rekombinant in E. coli hergestellt (rLactC2). Repräsentative Aufnahmen lebender und apoptotischer Zellen nach Färbung mit FITC-markiertem Annexin-V (1:50) oder rLactC2 (2,5 μ g/ml). Humane HEp-2 Zellen wurden für 4 Stunden in Anwesenheit (apoptotische Zellen) oder in Abwesenheit (lebende Zellen) mit 2,5 μ M Staurosporin in DMEM Medium bei 37 °C inkubiert. Externalisiertes PS wurden mit FITC-markiertem Annexin-V (1:50) oder rLactC2 (2,5 μ g/ml) für 30 Min bei 4 °C vor Fixierung mit PFA an lebenden Zellen markiert. rLactC2 wurde nach der Fixierung mit anti-GST-Antikörpern (1:50) und Alexa488-gekoppelten-anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern (1:200) detektiert. Die DNA wurde mit DAPI (1:1000) gefärbt. Der weiße Kasten in den Bildern in der rechten Spalte markiert jeweils den gewählten Ausschnitt der vergrößerten Einzelkanal-Bilder (links). Größenstandard 10 μ m.

B: PS-Externalisierung in Cholesterin-reichen Mikrodomänen an der humanen Membran während einer *C. pneumoniae* Infektion. Humane HEp-2 Zellen wurden mit chlamydialen EBs (MOI=1) infiziert. 1 hpi wurden die Zellen mit rLactC2 (2,5 μg/ml) und der Cholera-Toxin B Untereinheit (CTxB, 10 μg/ml) für 30 Min bei 4 °C markiert. rLactC2 wurde mit Alexa594-markiertenanti-GST-Antikörpern (1:50) und anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern (1:200) gefärbt. Die DNA wurde mit DAPI (1:1000) gefärbt. Ein typisches Signal ist hier dargestellt. Der weiße Kasten im rechten Bild markiert den gewählten Ausschnitt der vergrößerten Einzelkanal-Bilder. Die Vergrößerungen sind unterteilt in XY-, YZ- und XZ-Ansichten. Größenstandard 1 μm.

Im nächsten Schritt wurde eine chlamydiale Infektion 60 Minuten nach Infektionsbeginn mit rLactC2 auf die Anwesenheit von PS auf der Außenseite der Wirtszellmembran hin untersucht. Zugleich wurde die Anwesenheit von Cholesterin-reichen Regionen in der Membran mit Hilfe des GM1-bindenden Cholera-Toxin B untersucht (Abb. 6.7B). Das rLactC2-Signal kolokalisierte mit den chlamydialen LPS Signalen an der humanen Zelle. Zusätzlich akkumulierte das CTxB Signal als Marker für Cholesterin-reiche Regionen um die adhärierten Chlamydien (Abb. 6.7B).

Die mikroskopischen Analysen der rLactC2 Bindung während der chlamydialen Infektion konnte die Anwesenheit von PS auf der extrazellulären Seite der Wirtszell PM unterhalb adhärierter chlamydialer EBs bestätigen. Mit dieser Experimentreihe konnte gezeigt werden, dass eine *C. pneumoniae* Infektion die Externalisierung von PS induziert. Eine *C. trachomatis* Infektion hingegen resultierte in einer deutlich geringeren PS-Externalisierung. Der Mechanismus hinter dieser Translokation sowie eine mögliche Beteiligung chlamydialer und humane Proteine war jedoch noch nicht bekannt.

6.5 CPn0473 induziert PS-Externalisierung

Das negativ geladene Phospholipid Phosphatidylserine (PS), in gesunden Humanzellen auf der inneren Plasmamembranseite (PM) lokalisiert, wird im Zuge einer chlamydialen Infektion externalisiert. CPn0473 ist in der Lage, mit PS in artifiziellen Membranen zu interagieren. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob auch rekombinantes CPn0473 (rCPn0473) eine Externalisierung des Lipids an der PM induzieren kann.

Hierzu wurden HEp-2 Zellen zunächst mit rCPn0473 inkubiert und anschließend die Anwesenheit von PS auf der extrazellulären PM Seite mittels Annexin-V Färbung untersucht (Abb. 6.8).





A-C: PS Externalisierung durch rekombinantes CPn0473 (rCPn0473) an humanen Zellen. Humane HEp-2 Zellen wurden mit rekombinantem rCPn0473 inkubiert. Externalisiertes PS an der humanen PM wurde an lebenden Zellen mit FITC-markiertem Annexin-V (1:50) für 20 Min bei 4 °C vor der Fixierung mit PFA an lebenden Zellen markiert. Gebundenes rCPn0473 wurde detektiert mit anti-CPn0473-Antikörpern (1:25) und Alexa594-markierten-anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern (1:200) und die DNA wurde markiert mit DAPI (1:1000). **A:** Repräsentative Aufnahmen unbehandelte HEp-2 Zellen (oberer Reihe) und Zellen nach Inkubation mit rCPn0473 (100 ng/µl) bei 37 °C zu angegebenen Zeitpunkten und. Größenstandard: 10 µm. **B:** Externalisiertes PS in (**A**) wurde mit ImageJ Software ausgewertet (mindestens 20 Zellen). Die statistische Signifikanz ist angegeben mit *** (p<0.001), ** (p<0.05) und n.s. nicht signifikant (n= 3). **C:** Externalisiertes PS an humanen Zellen nach Inkubation mit steigenden Konzentrationen von rCPn0473 wurde auf 100 % PS Externalisierung gesetzt. Die statistische Signifikanz ist angegeben mit *** (p<0.001), ** (p<0.001), ** (p<0.001), ** (p<0.05) und n.s. nicht signifikant (n= 3).

D: Die Adhäsion von Kontrollproteinen externalisiert kein PS. Humane HEp-2 Zellen wurden mit rekombinantem Protein (100 g/µl) bei 37 °C für 1 h inkubiert. Externalisiertes PS an der humanen PM wurde mit FITC-markiertem Annexin-V (1:50) wie in (A) beschrieben markiert. Die Adhäsion von rOmcB wurde mit anti-OmcB-Antikörpern (1:25), rPmp21 mit anti-Pmp21-Antikörpern (1:100), rGST mit anti-GST-Antikörpern (1:50) und Alexa594-markierten-anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern (1:200) detektiert. Die DNA wurde mit DAPI (1:1000) gefärbt. Größenstandard: 10 µm.

Wie zu erwarten, konnten an der humanen PM unbehandelter HEp-2 Zellen keine Annexin-V-Signale und demnach kein extrazelluläres PS detektiert werden. Wurden die Zellen jedoch mit rCPn0473 inkubiert, so konnten bereits nach 15 Minuten Annexin-V Signale an der humanen PM detektiert werden. Das an den Humanzellen gebundene rCPn0473 konnte mit spezifischen CPn0473-Antikörpern angefärbt werden. Die Annexin-Signale kolokalisierten perfekt mit den Signalen für rCPn0473 an der Membran (Abb. 6.8A). Dabei waren PM-Bereiche ohne rCPn0473 auch Annexin-negativ, während Bereiche mit starker rCPn0473 Bindung auch intensiver durch Annexin-V gebunden werden konnten. Die rCPn0473- wie auch die Annexin-Signale, wurden mit zunehmender Inkubationsdauer stärker (Abb. 6.8A,B). Die Signalstärke von Annexin, gleichbedeutend mit der Menge an externalisiertem PS an der humanen PM lag nach 15 Min bei 59 ± 22,4 und stieg nach 30 Min auf 253,7 ± 40,2 und nach 60 Min Inkubationszeit auf 383,5 ± 75,3 relativ zu den unbehandelten Zellen (Abb. 6.8B). Außerdem korrelierte die Menge an externalisiertem PS mit der Menge an eingesetztem rCPn0473 (Abb. 6.8C). Relativ zu unbehandelten Zellen (0 % externalisiertes PS) stieg die Menge an externalisiertem PS Dosisabhängig mit zunehmender rCPn0473 Konzentration an. Bei einem Einsatz von 12,5 ng/µl rCPn0473 war 31 % (± 20 %) PS externalisiert. Bei einem Einsatz von 25 ng/µl und 50 ng/µl stieg die PS Menge auf der extrazellulären PM Seite auf 44 % (± 18 %), respektive 59 % (± 12 %). Interessanterweise korrelierte sie stärke der PS-Signale und die Menge an gebundenem rCPn0473 zu allen vier Zeitpunkten im Durchschnitt mit 0,97. Damit steigt die Menge an PS auf der Membran-Außenseite proportional zur Konzentration an eingesetztem rCPn0473 (Abb. 6.8C). Im Gegensatz zu rCPn0473 zeigte keines der Kontrollproteine eine Induktion der PS-Externalisierung. Das nicht-adhäsive Protein rGST konnte wie zu erwarten nicht an den humanen Zellen detektiert werden, und die nachfolgende Annexin-V Färbung zeigte dementsprechend auch keine Signale. Die beiden chlamydialen Adhäsine rPmp21 und rOmcB waren zwar an den humanen Zellen detektierbar, doch konnte auch hier keine Annexin-Bindung gezeigt werden (Abb. 6.8D).

Ähnlich wie zuvor bei der PS-Externalisierung durch *C. pneumoniae* (siehe Kapitel 6.4.1), wurde auch hier zusätzlich mit dem PS-bindenden Marker-Protein Lactadherin (rLactC2) nach PS auf der extrazellulären Seite der PM von rCPn0473-behandelten Humanzellen gesucht (Abb. 6.9A).



Abb. 6.9: Die PS Externalisierung durch rCPn0473 wird durch dessen N-Terminus induziert und ist von der Apoptose entkoppelt.

A: PS Externalisierung durch Bindung von rekombinantem CPn0473 (rCPn0473) an humane Zellen. Repräsentative Aufnahmen von humanen HEp-2 Zellen nach Inkubation mit rCPn0473 (100 ng/μl) für die angegebenen Zeiten. Externalisiertes PS an der humanen PM wurde mit FITC-markiertem rLactC2 oder der Mutante rLactC2AAA, unfähig zur PS-Bindung, (2,5 µg/ml), für 30 Min bei 4 °C vor der Fixierung mit PFA an lebenden Zellen markiert. Gebundenes rCPn0473 wurde mit anti-CPn0473-Antikörpern (1:25) und Alexa594-markierten-anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern (1:200) detektiert. Die DNA wurde mit DAPI (1:1000) gefärbt. Größenstandard: 10 μm.

B: Westernblot Analyse von Apoptose-Marker-Proteinen in humanen Zellen. Humane Hep-2 Zellen wurden mit Staurosporin (Stspr, 2,5 μ M), rCPn0473 oder BSA (100 ng/ μ l) für 16 h (linker Blot), 15 Min. oder 30 Min. (mittlerer Blot) inkubiert oder mit *C. pneumoniae* (*C. pn.*, MOI=20, rechter Blot) für 2 h infiziert. Die humanen Zellen wurden mit Phospholyse-Puffer lysiert und im Anschluss im Westernblot analysiert. PARP1, Caspase 3 und Aktin wurden mit anti-PARP1-Antikörpern (1:1000), anti-Caspase 3-Antikörpern (1:1000), anti-Aktin-Antikörpern (1:2000) und AP-gekoppelten-anti-Kaninchen und AP-gekoppelten-anti-Maus-Sekundärantikörpern (1:200) detektiert. Proteinmarker: PageRuler ist in kDa angegeben (+ = Infektion mit C. pn., - = PBS

Inkubation, p113 = aktives PARP1 Volllängenprotein, p89=inaktives PARP1 Spaltprodukt, p36 = inaktives Caspase 3 Volllängenprotein). Proteinmarker: PageRuler ist in kDa angegeben.

C, **D**: PS Externalisierung durch Inkubation mit rCPn0473 (100 ng/μl) für 60 Min. Externalisiertes PS an der PM wurde mit FITCmarkiertem Annexin-V (1:50) für 20 Min bei 4 °C vor der Fixierung mit PFA markiert. Das rCPn0473 Volllängenprotein und die Deletionsvarianten wurde mit anti-CPn0473-Antikörpern (1:25) und Alexa594-markierten-anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern (1:200) detektiert. Die DNA wurde mit DAPI (1:1000) gefärbt. **C**: Repräsentative Aufnahmen von humanen HEp-2 Zellen nach Inkubation mit rCPn0473-Deletionsvarianten. Größenstandard: 10 μm. **D**: Repräsentative Aufnahmen von wildtypischen CHO K1 Zellen und PS-defizienten CHO PSA3 Zellen nach Inkubation mit rCPn0473 Volllängenprotein. Größenstandard: 10 μm.

Humane HEp-2 Zellen wurden zunächst mit rCPn0473 inkubiert, bevor extrazelluläres PS an der PM lebender Zellen mit rLactC2 markiert wurde. Im Gegensatz zu unbehandelten Humanzellen, an denen rLactC2 nicht detektierbar war, konnte rLactC2 sowohl nach 30-, als auch nach 60-minütiger Inkubation mit rCPn0473 an der PM der Humanzellen detektiert werden. Dabei kolokalisierten die Signale von rLactC2 vollständig mit denen des gebundenen rCPn0473 (Abb. 6.9A). Eine Dreifach-Alanin-Mutante von rLactC2 (rLactC2 AAA), welche nicht mehr in der Lage ist PS zu binden (siehe Kapitel 6.3), zeigte erwartungsgemäß keine Bindung (Abb. 6.9A). Die rCPn0473 Signale waren hingegen vergleichbar intensiv.

Rekombinantes CPn0473 ist in der Lage, nach Bindung an der PM humaner Zellen PS zu externalisieren. Die PS Translokation ist dabei Dosis-, wie auch Zeitabhängig. Da die PS-Externalisierung allerdings auch ein Schlüsselereignis apoptotischer Zellen ist, andererseits bereits gezeigt werden konnte, dass Chlamydien während der Infektion anti-apoptotische Signalwege stimulieren (Sarkar, Moller et al. 2015), sollte im Folgenden Kapitel eine mögliche Apoptose-induzierende Wirkung durch rCPn0473 untersucht werden.

6.5.1 Die rCPn0473-spezifische PS-Externalisierung ist kein Signal für Apoptose

Phosphatidylserin (PS) Externalisierung ist ein Kennzeichen für Apoptose in humanen Zellen. Diese wird initiiert durch Spaltung und Aktivierung von Cystein-Aspartat-spezifischen Proteasen (Caspasen). Konkret aktiviert die Caspase 3 durch Spaltung die Scramblase Xkrelated Protein 8 (Xkr 8), die für die Externalisierung des PS verantwortlich gemacht wird (Suzuki, Denning et al. 2013). Zusätzlich spaltet und deaktiviert unter anderem Caspase 3 die Poly(ADP-ribose) -Polymerase 1 (PARP 1), was eine Degradation der DNA zur Folge hat.

Um zu testen, ob die beobachtete PS-Externalisierung durch rekombinantes CPn0473 (rCPn0473) ein Zeichen einer aktivierten Apoptose in den humanen Zellen ist, wurden Westernblot Analysen von Apoptose-spezifischen Marker-Proteinen in rCPn0473-behandelten Zellen durchgeführt (Abb. 6.9B). In BSA-behandelten Kontroll-Zellen konnte das 36 kDa große Volllängenprotein Caspase 3 (p36) oberhalb der 35 kDa Markierung detektiert werden. Auch die aktive 113 kDa große Volllängenvariante von PARP-1 (p113) konnte auf der erwarteten Höhe bei etwa 120 kDa nachgewiesen werden. Als Positiv-Kontrolle einer Induktion der Apoptose wurden Humanzellen mit Staurosporin behandelt. Staurosporin, ein mit ATPkonkurrierender Kinase-Inhibitor, wird eingesetzt, um eine Caspase-3-abhängig Apoptose in Humanzellen zu induzieren (Andersson, Sjostrand et al. 2000, Chae, Kang et al. 2000). Die Inkubation der Humanzellen mit Staurosporin für 16 Stunden führte zum Verlust des Caspase 3 p36 Signals, was auf eine Spaltung und Aktivierung der Caspase 3 hindeutet. Zusätzlich konnte ein Signal für PARP 1 oberhalb der 100 kDa, aber unter der 120 kDa Markierung detektiert werden (Abb. 6.9B). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um eines der beiden durch Caspase 3 induzierten Spaltprodukte des inaktiven PARP 1 Proteins (p89). Interessanterweise waren sowohl Caspase 3 als auch PARP 1 nach einer Infektion mit *C. pneumoniae* als Volllängenproteine auf gleicher Höhe wie in den PBS-behandelten HEp-2-Proben detektierbar. Ebenso konnte keine Spaltung der beiden Apoptose-Marker-Proteine in rCPn0473- oder BSAbehandelten Humanzellen nach 15 Min oder 30 Min, aber auch nicht nach 16 Stunden, wie bei Staurosporin, beobachtet werden (Abb. 6.9B).

Die Westernblot Analysen zeigten, dass die rCPn0473 induzierte PS-Externalisierung Apoptoseentkoppelt ist und aus diesem Grund ein anderer Mechanismus zu Grunde liegen muss.

6.5.2 Die rCPn0473-induzierte PS-Externalisierung wird durch dessen N-Terminus

vermittelt

Rekombinantes CPn0473 (rCPn0473) induziert nach Bindung an die humane Plasmamembran (PM) eine Externalisierung von Phosphatidylserin (PS). Der Mechanismus hinter dieser Translokation ist von der Apoptose-induzierten PS-Externalisierung entkoppelt. Im Folgenden sollte untersucht werden, welcher Bereich im Protein die PS-Externalisierung vermittelt.

Zunächst wurde getestet, welche Region(en) des Proteins (Abb. 3.6) für die Externalisierung essentiell waren (Abb. 6.9C). Nach Inkubation der humanen Zellen mit rekombinantem CPn0473 ohne Bindedomäne (rCPn0473 Δ BD) konnte, wie bereits gezeigt, kein Proteinsignal

an der humanen Plasmamembran (PM) detektiert werden. Erwartungsgemäß konnte mit dem PS Marker-Protein Annexin-V auch keine PS-Externalisierung an der humanen PM nachgewiesen werden. Die Inkubation der Humanzellen mit einer rCPn0473 Variante mit verkürztem N-Terminus (Δ AS 1-171/ rCPn0473 Δ IED) zeigte zwar Bindung des Proteins an die Humanzelle, aber eine Markierung mit Annexin war nicht feststellbar, d.h. eine Translokation von PS fand nicht statt. Das Adhäsionsvermögen dieser Variante unterschied sich dabei nicht von der des Volllängenproteins (Fechtner, Galle et al. 2016). Demgegenüber war eine rCPn0473 Variante mit interner Deletion ($\Delta AS 150-255$), aber sowohl mit IED als auch mit BD, erwartungsgemäß in der Lage an die Humanzellen zu binden und auch PS an der humanen PM zu externalisieren (Abb. 6.9C). Ähnlich wie beim Volllängenprotein rCPn0473 kolokalisierten die Signale für Annexin, als Marker für externalisiertes PS, und rCPn0473 an der humanen PM perfekt. Regionen mit intensiven rCPn0473-Signalen waren hierbei auch wieder stark Annexinpositiv, während die rCPn0473-freien Regionen an der humanen PM ebenfalls Annexin-negativ blieben. Um die Wichtigkeit der CPn0473-IED genauer zu untersuchen, wurde die Domäne zum einen als Fusionsprotein mit der Bindedomäne des chlamydialen OmcB (rCPn0473-IED_OmcB), zum anderen fusioniert mit GST (rCPn0473-IED_GST) rekombinant hergestellt. Das Fusionsproteine rCPn0473-IED_GST war nicht in der Lage, an die humanen Zellen zu binden und konnte darüber hinaus auch keine PS-Externalisierung induzieren. Das Fusionsprotein rCPn0473-IED_OmcB hingegen konnte, gebunden an die humanen Zellen, detektiert werden und induzierte eine Externalisierung von PS an der humanen PM (Abb. 6.9C).

Um zu studieren, ob die Menge an externalisiertem PS durch rCPn0473 aufgrund der Reduktion des verfügbaren PS innerhalb der Wirtszelle beeinflusst werden kann, wurden CHO Zellen mit reduziertem PS-Reservoir (PSA3, 30 % wildtypisches PS) (Nishijima, Kuge et al. 1986), welche bereits in den Internalisierungsstudien mit Chlamydien zum Einsatz kamen (siehe Kapitel 6.4), mit rCPn0473 behandelt (Abb. 6.9D). Die bereits bekannten Adhäsionsexperimente mit löslichem Protein hatten gezeigt, dass sich die Bindung von rCPn0473 an wildtypische CHO K1 Zellen nicht wesentlich von der an die PSA3 Mutanten Zellen unterschied (siehe Kapitel 6.4). Allerdings waren die PS-Signale, markiert durch Annexin-V, auf der Membran-Außenseite der wildtypischen CHO K1 Zellen deutlich stärker sichtbar als dies für die PS-reduzierte PSA3 Zellline der Fall war. Erst nach 60 Min Inkubation mit rCPn0473 waren schwache Annexin-V-Signale an der PM der Mutanten-Zellen detektierbar. In CHO K1 Wildtyp-Zellen konnte PS bereits nach 30 Min intensiv und nach 60 Min deutlich stärker als bei der PSA3 Zelllinie detektiert werden (Abb. 6.9D).

Die internalisierungssteigernde Wirkung durch rCPn0473 kann durch Depletion von Cholesterin aus der Wirtszell-PM aufgehoben werden (Fechtner, Galle et al. 2016). Da nun die selbe Region (IED-Domäne, AS 1-150), die für die Internalisierung der Chlamydien essentiell ist, auch für die PS-Externalisierung eine Rolle spielt, sollte der Einfluss von Cholesterin auf die rCPn0473-induzierte PS-Externalisierung untersucht werden.



Abb. 6.10: Die rCPn0473-induzierte PS Externalisierung ist abhängig von der Integrität der Cholesterin-reichen Mikrodomänen.

A: Depletion von Cholesterin in der humanen Plasmamembran und Depolymerisierung des humanen Zytoskeletts. Humane HEp-2 Zellen wurden mit Methyl-᠒-cyclodextrin (M᠒CD, 5 mM), Cytochalasin D (Cyto D, 20 µM) oder Nocodazol (Noco, 10 µM) jeweils bei 37 °C für 60 Min inkubiert. Cholesterin-reiche Regionen in der PM wurden mit der FITC-markierten Cholera Toxin Untereinheit B (10 µg/ml), Aktin mit Rhodamin/Phalloidin (1:25), Mikrotubuli mit anti-Alpha-Tubulin-Antikörpern (1:100) und Alexa594-markierten-anti-Maus-Sekundärantikörpern (1:200) und die DNA mit DAPI (1:1000) markiert. Größenstandard: 10 µm. **B:** Bindung von rCPn0473 und PS Externalisierung an humanen Zellen mit depletiertem Cholesterin bzw. depolymerisiertem Zytoskelett. Humane HEp-2 Zellen wurden wie in (A) beschrieben behandelt. In Anwesenheit der jeweiligen Inhibitoren wurden die Zellen anschließend für 60 Min mit rCPn0473 (100 ng/团) bei 37 °C inkubiert. Externalisiertes PS an der humanen PM wurde mit FITC-markiertem Annexin-V (1:50) für 20 Min bei 4 °C vor der Fixierung mit PFA an lebenden Zellen markiert. Adhäriertes rCPn0473 wurde mit anti-CPn0473-Antikörpern (1:25) und Alexa594-sekundären-Kaninchen-Antikörpern (1:200). Die DNA wurde mit DAPI (1:1000) gefärbt. Pfeilspitzen markieren Akkumulationen von Annexin und rCPn0473 Signalen. Größenstandard: 10 μm.

Hierzu wurden humane HEp-2 Zellen vor und während der Inkubation mit rCPn0473 zur Depletion von Cholesterin mit Methyl-beta-cyclodextrin (M β CD) behandelt (Abb. 6.10). Die Anwesenheit von Cholesterin wurde wie zuvor (siehe Kapitel 6.2.1) durch Markierung des GM1 Glykolipids mit der FITC-markierter Cholera-Toxin Untereinheit B (CTxB) nachgewiesen. Während CTxB in unbehandelten Zellen die komplette humane Plasmamembran markierte, führte die Behandlung mit MβCD zu einer starken Reduktion bis hin zu dem kompletten Verlust der CtxB-Signale, was darauf hindeutet, dass die Cholesterin-Depletion durch MβCD erfolgreich war (Abb. 6.10A). Interessanterweise war nach Inkubation mit rCPn0473 und in Anwesenheit von MβCD, keine Bindung des PS Marker-Protein Annexin-V, also auch kein externalisiertes PS an der humanen PM nachweisbar (Abb. 6.10B). Im Vergleich hierzu hatte die Behandlung der HEp-2 Zellen mit DMSO, dem Lösungsmittel von MβCD, keinen Einfluss auf die Bindung und die PS-Externalisierung durch rCPn0473. Nachdem gezeigt werden konnte, dass für die Aufrechterhaltung von Cholesterin-reichen Regionen, als Binderegion für rCPn0473, humane Zytoskelett-Strukturen eine Rolle spielen (Kapitel 4.2.1), wurden sowohl das Aktin- als auch das Mikrotubuli-Zytoskelett in humanen HEp-2 Zellen depolymerisiert und daraufhin die PS-Externalisierung durch rCPn0473 untersucht. Die Depletion des Mikrotubuli-Zytoskeletts durch Nocodazol hatte keinen Einfluss auf die PS-Externalisierung (Abb. 6.10B). Rekombinantes CPn0473 und Annexin-V-positive Signale konnten an der humanen PM vollständig kolokalisierend detektiert werden. Eine Cytochalasin D-Behandlung zur Depolymerisierung des Aktin Zytoskelett hatte per se hingegen keinen Einfluss auf die PS-Externalisierung (Abb. **6.10**B). Jedoch waren die Signale des adhärierten rCPn0473 Proteins nicht mehr gleichmäßig über die humane PM verteilt, sondern häufig akkumuliert in distinkten Regionen an der PM zu finden, während die übrigen Regionen keine oder nur sehr schwache rCPn0473-Signale aufwiesen (Abb. 6.10B, Pfeile). Das veränderte Bindungsverhalten von rCPn0473 nach Cytochalasin D Behandlung konnte bereits zuvor beobachtet werden und folgt der Verteilung von Cholesterin-reichen Mikrodomänen in der humanen PM (siehe Kapitel 6.2.1). Interessanterweise assoziierten die Signale des externalisierten PS mit den Signalen für rCPn0473.

Diese rCPn0473-Daten konnten zeigen, dass für die PS-Externalisierung durch rCPn0473 die Bindung an die Humanzelle durch die BD sowie die ersten 150 AS des Proteins essentiell sind. Damit wird die PS-Externalisierung, wie auch die Stimulation der chlamydialen Internalisierung durch dieselbe Domäne induziert. Weiter zeigte sich, dass beide Prozesse die Aufrechterhaltung von Cholesterin-reichen Region in der humanen PM und das F-Aktin-Zytoskelett benötigen.

6.6 C. pneumoniae induziert PS-Externalisierung durch Oberflächenlokalisiertes

CPn0473

Nachdem gezeigt werden konnte, dass *C. pneumoniae* EBs und das chlamydiale Protein CPn0473 eine PS-Externalisierung an der humanen Plasmamembran (PM) induzieren können, sollte die Rolle des Proteins bei der chlamydialen PS-Externalisierung im Folgenden durch Manipulation der CPn0473-Proteinmenge auf der Oberfläche chlamydialen EBs untersucht werden. Da *C. pneumoniae* genetisch nicht manipulierbar ist, musste die Menge an CPn0473 auf den chlamydialen EBs auf andere Weise reguliert werden.

Um die CPn0473-Menge auf der Oberfläche von *C. pneumoniae* EBs zu reduzieren, wurde die EBs vor der Infektion der humanen HEp-2 Zellen mit anti-CPn0473 Antikörpern inkubiert. Die Antikörper sollten das Protein auf der EB-Oberfläche maskieren und somit dessen Funktion blockieren. Um die Menge an CPn0473 auf der chlamydialen Oberfläche hingegen zu erhöhen, wurden die EBs mit rekombinantem CPn0473 (rCPn0473) inkubiert. Die Menge an gebundenem Protein wurde mittels Westernblot-Analyse überprüft. In beiden Fällen wurde erneute Annexin als PS Marker-Protein verwendet (Abb. 6.11). Im Vergleich zu den unbehandelten Chlamydien (100 %) lag die Anzahl an PS-externalisierenden Chlamydien nach der Vorbehandlung mit anti-CPn0473 Antikörpern 60 Min. nach Infektionsbeginn nur noch bei $65 \% (\pm 28 \%)$ (Abb. 6.11A,B). Chlamydien, die vor der Infektion mit einem spezifischen Antikörper gegen das Oberflächenprotein Pmp21 behandelt wurden, induzierten die PS-Externalisierung an der Wirtszell-Membran nahezu unverändert (94 % \pm 16 %). Im Folgenden wurde die CPn0473 Menge auf der chlamydialen Oberfläche erhöht und diese dann zur Infektion eingesetzt. In drei unabhängigen Experimenten wurden rCPn0473-beschichtete Chlamydien auf ihre PS-Externalisierungskapazität getestet (Abb. **6.11**A,C).



Abb. 6.11: Die C. pneumoniae-induzierte PS Externalisierung ist CPn0473-abhängig.

A-C: PS Externalisierung durch *C. pneumoniae* mit variierenden CPn0473-Konzentrationen. Gradienten-gereinigte chlamydiale EBs (3x106 IFU) wurden mit anti-CPn0473-Antikörpern (1:25), anti-Pmp21-Antikörpern (1:100) oder rekombinantem CPn0473 (rCPn0473, 1 μM) für 2 h auf Eis inkubiert. Humane HEp-2 Zellen wurden mit den vorbehandelten Chlamydien für 1 Std. bei 37 °C stationär infiziert. Externalisiertes PS wurde markiert mit FITC-markiertem Annexin-V (1:50) für 20 Min. bei 4 °C. CPn0473 und Pmp21 wurden markiert mit anti-CPn0473-Antikörpern (1:25) oder anti-Pmp21-Antikörpern (1:100) und AP-gekoppelten-anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern (1:200) **A:** Repräsentative Aufnahmen humaner Zellen nach Infektion mit *C. pneumoniae*

EBs (MOI=4) nach Vorbehandlung mit anti-CPn0473-Antikörpern (α CPn0473) oder rCPn0473. Die DNA wurde mit DAPI (1:1000) gefärbt. Größenstandard: 2,5 µm. **B**: Die Anzahl an PS-externalisierenden Chlamydien, prä-inkubiert mit anti-Pmp21- oder anti-CPn0473-Antikörpern, wurde durch Auszählen von mindestens 70 *C. pneumoniae* EBs ausgewertet. Die statistische Signifikanz ist angegeben mit *** (p<0.001), ** (p<0.01), * (p<0.05) und n.s. nicht signifikant (n= 2). **C**: Die Menge an externalisiertem PS an der humanen PM wurde durch Auswertung von jeweils mindestens 25 *C. pneumoniae* EBs, prä-inkubiert mit rCPn0473, durch Nikon NIS Software ausgewertet und ist in Prozent angegeben. Die Menge an CPn0473 auf der Oberfläche der Chlamydien (1x106 IFU) wurde im Westernblot mittels ImageJ Software ausgewertet. Die statistische Signifikanz ist angegeben mit *** (p<0.001), ** (p<0.05) und n.s. nicht signifikant. Proteinmarker: PageRuler ist in kDa angegeben.

Die Westernblot-Analysen der rCPn0473-behandelten Chlamydien zeigten eine Erhöhung der Proteinkonzentration auf das 3.2-, 4.8-, respektive 3.8-fache im Vergleich zu den unbehandelten Chlamydien (Abb. 6.11C). Auch mikroskopisch waren die CPn0473-Signale der vorbehandelten Chlamydien deutlich intensiver sichtbar (Abb. 6.11A). Die Menge an detektierbarem Annexin-V-Signal der rCPn0473-vorbehandelten Chlamydien stieg auf 315 %, 435 % und 211 % und war damit signifikant höher, als bei den unbehandelten Chlamydien (Abb. 6.11C). Die Annexin-V-Signale der Mikroskopie und die CPn0473 Mengen ermittelt mittels Westernblot Analyse korrelierten dabei mit 0,98, 0,91 und 0,58 im Verhältnis PS zu CPn0473. Damit korreliert die Annexin-Signal-Intensität, als Marker für externalisiertes PS, in zwei der drei Experimenten nahezu perfekt mit der erhöhten CPn0473 Menge auf der Oberfläche der Chlamydien.

Mit Hilfe der modifizierten chlamydialen EBs konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass die Verfügbarkeit von CPn0473 auf der EB-Oberfläche mit der Stärke der PS-Externalisierung korreliert. Daher ist anzunehmen, dass die chlamydiale PS-Externalisierung durch CPn0473 realisiert wird. Der Mechanismus hinter dieser Membran-Modulation blieb jedoch noch ungeklärt.

6.7 CPn0473 interagiert mit der humanen Plasmamembran

6.7.1 CPn0473 und die humane Scramblasen

C. pneumoniae bindet auf der extrazellulären Seite an die Plasmamembran (PM) der Wirtszelle. Im Laufe des Adhäsions- und Internalisierungsprozesses induzieren die EBs eine Translokation des auf der zytoplasmatischen PM-Seite lokalisierten Phosphatidylserins (PS) durch das oberflächenlokalisierte CPn0473. Dies impliziert, dass die Chlamydien entweder mit einer auf der extrazellulären Membranseite zugänglichen Lipid-Translokase, wie einer Scramblase, Flippase, oder Floppase interagieren, oder die Wirtszell-Membran selbst penetrieren um anschließend PS selbst zu translozieren. Als potentieller Interaktionspartner von CPn0473 wurden die beiden Scramblasen Xkr8 (XK Related 8) und TMEM16F (Transmembranprotein 16F) untersucht, da beiden bereits eine Rolle während der PS-Externalisierung in apoptotischen Zellen bzw. aktivierten Blutzellen nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 3.1.3) (Suzuki, Umeda et al. 2010, Suzuki, Denning et al. 2013).

Zunächst wurde die Anwesenheit der beiden Proteine in den verwendeten humanen HEp-2 Zellen mittels Westernblot Analyse untersucht. Beide Proteine konnten in Proteinlysaten der Zellen auf Höhe ihres theoretischen Molekulargewichts detektiert werden (Abb. 6.12A): Die Xkr8 Bande lief bei 60 kDa und TMEM16F bei 95 kDa. Als nächstes wurde die subzelluläre Lokalisierung mikroskopisch analysiert (Abb. 6.12B). Beide Proteine fanden sich punktiert sowohl an der humanen PM als auch im Zytosol der Zellen wieder (Abb. 6.12B). Nun wurden die humanen HEp-2 Zellen mit rekombinantem CPn0473 (rCPn0473) inkubiert und die Lokalisierung der beiden Scramblasen erneut untersucht (Abb. 6.12C,D). TMEM16F war weiterhin ubiquitär in der humanen Zelle verteilt (Abb. 6.12D). Nach 15 Min Inkubation mit rCPn0473 waren auch die Xkr8-Signale noch punktiert und ubiquitär in den HEp-2 Zellen verteilt. (Abb. 6.12C, Pfeile). Einzelne Signale an der PM kolokalisierten mit den Signalen von adhäriertem rCPn0473. Nach 30 Min. Inkubation waren die Xkr8-Signale fast ausschließlich an der PM sichtbar. Dabei kolokalisierten die Signale zu 100 % mit den Signalen für rCPn0473 (Abb. 6.12C, Pfeile). Als Kontrolle wurden HEp-2 auch mit dem rekombinanten Protein OmcB (rOmcB) inkubiert. Allerdings konnte zu keinem Zeitpunkt eine Veränderung in der Verteilung von Xk8 aufgezeichnet werden. Ebenso wenig konnte eine Veränderung in der Verteilung der beiden Membranproteine EGFR (EGF Rezeptor) und TfR (Transferrin Rezeptor) nach Inkubation der Hep-2 Zellen mit rCPn0473 beobachtet werden (Anhang Abb. 8.1A). Die Relokalisierung der Scramblase XKr8 wurde demnach spezifisch ausgelöst durch rCPn0473.



Abb. 6.12: Relokalisierung der humane Scramblase Xkr8 nach PS Externalisierung durch rCPn0473.

A, B: Lokalisierung humaner Scramblasen. A: Westernblot Analyse humaner Scramblasen. Humane HEp-2 Zellen (1x106) wurden mit Phospholyse-Puffer lysiert und im Westernblot analysiert. Die humanen Scramblasen TMEM16F und Xkr8 wurden mit anti-Xkr8-Antikörpern (1:300) und anti-TMEM16F-Antikörpern (1:300) und AP-gekoppelten-anti-Ziege- und AP-gekoppelten anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern (1:7500) detektiert. Als Ladekontrolle wurde Aktin mit anti-Aktin-Antikörpern (1:2000) und AP-gekoppelten-anti-Maus-Sekundärantikörpern (1:7500) detektiert. Proteinmarker: PageRuler ist in kDa angegeben.
B: Repräsentative Aufnahmen zur Lokalisierung von Xkr8 und TMEM16F in humanen HEp-2 Zellen durch Markierung mit anti-Xkr8-Antikörpern (1:25) oder anti-TMEM16F-Antikörpern (1:25) und Alexa488-gekoppelten-anti-Ziege- oder Alexa488-gekoppelten-anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern (1:200). Die DNA wurde mit DAPI (1:1000) gefärbt. Größenstandard 10 μm.

C, **D**: Lokalisierung humaner Scramblasen nach Inkubation von HEp-2 Zellen mit rCPn0473. Repräsentative Aufnahmen von Xkr8 (**C**) oder TMEM16F (**D**) in humanen HEp-2 Zellen, nach Inkubation mit Alexa-594-markiertem rCPn0473 oder rOmcB (100 ng/μl) bei 37 °C für die angegebenen Zeiten. Die Antikörperfärbung erfolgte wie in (**B**). Der weiße Kasten in den Bildern in der rechten Spalte markiert jeweils den gewählten Ausschnitt der vergrößerten Einzelkanal-Bilder (links). Größenstandard 10 μm.

Um eine direkte Interaktion von CPn0473 und Xkr8 nachzuweisen, sollten die beiden Proteine mittels Co-Immunopräzipitation (co-IP) gemeinsam aus den Lysat rCPn0473-behandelter Zellen präzipitiert werden. Mittels co-IP können Protein-Protein-Interaktionen untersucht werden. Hierbei wird ein Protein mit Hilfe spezifischer Antikörper präzipitiert (*Bait*-Protein). Mögliche Interaktionspartner (*Prey*-Proteine) werden auf diese Weise ebenfalls präzipitiert und können mittels Westernblot Analysen identifiziert werden. Sowohl rCPn0473 als auch Xkr8 waren in den Lysat-Proben vor Beginn der Präzipitation detektierbar (Anhang Abb. 8.1B, Einsatz). Leider war es weder möglich Xkr8 als *Bait* (IP: α CPn0473) im Anschluss an die Präzipitation im Westernblot zu detektieren (Anhang Abb. 8.1B). CPn0473 konnte zumindest als *Bait*-Protein (IP: α CPn0473) im Westernblot detektiert werden (Anhang Abb. 8.1B). Dies könnte bedeuten, dass es keine Interaktion der beiden Proteine miteinander gab, oder dass die Konzentration des Xkr8 Proteins für eine erfolgreiche co-IP zu gering war

Ob es sich bei der Relokalisierung von Xkr8 um einen sekundären Effekt der PS-Externalisierung durch rCPn0473 handelt, oder ob die Relokalisierung essentiell für die PS Translokation ist, konnte bis zu diesem Zeitpunkt nicht aufgeklärt werden.

6.7.2 CPn0473 penetriert die humane Zellmembran

Im Folgenden sollte getestet werden, ob rekombinantes CPn0473 (rCPn0473) in die Plasmamembran (PM) der Wirtszelle eindringt oder nur von außen an diese bindet. Denn sollte CPn0473 eigenständig PS translozieren können, müsste das Protein in der Lage sein, die humane Plasmamembran (PM) zu durchspannen. Zur Beantwortung dieser Frage sollte zunächst untersucht werden, wie rCPn0473 nach Adhäsion an die humane PM auf/in dieser lokalisiert. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Herrn Heinz Ahlert zwei Einzelcystein Varianten von CPn0473 generiert, welche mit Hilfe des Cystein-spezifischen Markers, HDPD-Biotin, spezifisch markiert wurde. CPn0473 besitzt natürlicherweise keine Cysteine in seiner Aminosäuresequenz. Aus diesem Grund wurde ein Cystein am N-Terminus und in einer weiteren Variante ein Cystein am C-Terminus durch das entsprechende Cystein Basen-Triplet "TGT" in die *cpn0473*-Gensequenz eingeführt (Abb. 6.13A). Die aufgereinigten rekombinanten Proteinvarianten wurden dann mit humanen HEp-2 Zellen inkubiert. Durch anschließende de-Biotinylierung aller extrazellulär-zugänglichen Biotin-Reste durch β -Mercaptoethanol sollte die Zugänglichkeit des N- bzw. des C-Terminus bestimmt werden (Abb. 6.13B,C).





Abb. 6.13: Ausrichtung von rCPn0473 in der humanen Plasmamembran.

A: Schematische Darstellung der rCPn0473 Einzelcystein-Varianten. Die Aminosäure-Position der Humanzell-Bindedomäne (BD) ist eingetragen (N=N-Terminus, C=C-Terminus, Cys=Cystein).

B: Westernblot-Analyse der Biotinylierung von rCPn0473 Einzelcystein-Varianten mit Cystein-spezifischem Biotin. 500 ng der rCPn0473 Einzelcystein-Varianten und das wildtypische rCPn0473 wurden im Westernblot mit AP-gekoppeltem-Streptavidin (1:1000) und Anti-Histidin-Antikörpern (1:2500) und AP-gekoppelten-anti-Maus-Sekundärantikörpern (1:7500) analysiert. Proteinmarker: PageRuler ist in kDa angegeben.

C: Debiotinylierung der Einzelcystein-Varianten an humanen Zellen. Humane HEp-2 Zellen wurden mit den biotinylierten Einzelcystein-Varianten von rCPn0473 (100 ng/µl) für 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann mit PBS gewaschen und mit β -Mercaptoethanol (β Merc, 100 mM) für 10 Min inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und mit Phospholyse-Puffer lysiert. Die Biotinylierung der Proteine wurde im Westernblot mit AP-gekoppelten-Streptavidin (1:1000) überprüft. Die Proteine wurden zusätzlich mit anti-Histidin-Antikörpern (1:2500) und AP-gekoppelten-anti-Maus-Sekundärantikörpern (1:7500) markiert. Aktin dient als Ladekontrolle für die SDS PAGE und wurde mit anti-Aktin-Antikörpern (1:2000) und AP-gekoppelten-anti-Maus-Antikörpern (1:7500) gefärbt. Einsatz: Ladekontrolle der eingesetzten rProteine im Experiment. Die Menge an Biotin wurde mit ImageJ Software analysiert und in Relation zum Einsatz und den Proben ohne β Merc (-) ausgewertet. Die Zahlen sind in Prozent unter dem Blot angegeben. Proteinmarker: PageRuler ist in kDa angegeben.

Zunächst musste jedoch verifiziert werden, dass die Cysteine in beiden Varianten, nicht aber das wildtypische rCPn0473 Protein biotinylierbar waren. Sowohl die N-terminale als auch die C-terminale Cystein Variante konnten erfolgreich biotinyliert werden, wobei das Signal des Cterminalen Cysteins deutlich schwächer detektierbar war (Abb. 6.13B). Das wildtypische rCPn0473 hingegen zeigte keine Biotinylierung. Im nächsten Schritt wurden humane HEp-2 Zellen mit den beiden Cystein-Varianten inkubiert. Nachdem jegliches extrazelluläre Biotin mittels β -Mercaptoethanol-Behandlung entfernt worden war, wurde das verbliebene, und demnach intrazelluläre, Biotin mittels Westernblot Analyse detektiert (Abb. 6.13C). Beide Einzel-Cystein-CPn0473 Varianten konnten im Westernblot detektiert werden und waren damit in der Lage, an die HEp-2 Zellen zu binden (Abb. 6.13C, Einsatz). Die Behandlung mit β -Mercaptoethanol hatte keinen Einfluss auf die Adhäsion der CPn0473 Varianten. Somit war eine reduzierte Biotinylierung einzig auf eine unterschiedliche Zugänglichkeit der Biotin-Reste am N- bzw. C-Terminus von rCPn0473 zurückzuführen. Die β -Mercaptoethanol-Behandlung der HEp-2 Zellen, inkubiert mit N-terminal-markiertem CPn0473 (CysN), reduzierte die Biotinmenge auf 6 % ± 5 % im Vergleich zu PBS-behandelten HEp-2 Zellen. Im Gegensatz dazu verblieb 39 % ± 1 % des Biotin-Signals des C-terminal-markierten CPn0473 (CysC) nach β -Mercaptoethanol-Behandlung im Westernblot detektierbar (Abb. 6.13C).

Diese Biotinylierungs-Ergebnisse deuten auf eine Penetration der humanen PM durch den C-Terminus hin. Um eine mögliche Transmembran (TM)-Domäne zu identifizieren wurde zunächst der C-Terminus mit Hilfe des Bioinformatik-Programms PHOBIUS untersucht. Interessanterweise wurde eine Domäne mit erhöhter Hydrophobizität zwischen der Aminosäure (AS) 396 und der AS 426 identifiziert (Abb. 6.14A). Die Wahrscheinlichkeit einer möglichen TM in diesem Bereich wurde auf etwa 60 % determiniert. Die Angaben für Intra- und Extrazellulär wurden durch das Programm nur symbolisch eingetragen, und repräsentieren nicht eine tatsächliche Vorhersage der Lokalisierung der Bereiche N- und C-Terminal der hypothetischen TM. Um die Funktionalität der vorhergesagten TM Domäne zu analysieren, wurde eine Deletionsvariante von rCPn0473 mit einer Deletion der Domäne von AS 396 bis AS 426 (Δ TM) kloniert, rekombinant in *E. coli* hergestellt und aufgereinigt (Abb. 6.14B). Die Domäne liegt zentral in einem Bereich des Proteins, der in einer Masterarbeit mit Hilfe von sukzessiven Deletionsvarianten in Far Western Experimenten als essentiell für eine Selbstinteraktion von rCPn0473 charakterisiert wurde (Galle 2013).


Abb. 6.14: Eine rCPn0473 Variante ohne Transmembrandomäne interagiert nicht mehr mit sich selbst

A: Analyse der Hydrophobizität im C-Terminus von CPn0473 (AS 256-508) durch das Bioinformatik Programm PHOBIUS. Die Aminosäureposition der potentiellen Transmembrandomäne wurde eingetragen.

B: Schematische Darstellung von rCPn0473 und einer Deletionsvariante ohne Transmembrandomäne (ΔTM, AS 396 – AS 426). Die Aminosäure-Positionen der Humanzell-Bindedomäne (BD) und der potentiellen Transmembrandomäne (TM) sind eingetragen (N=N-Terminus, C=C-Terminus).

C: Analyse der Oligomerisierung von rCPn0473 im Nativen Blue Native Gel. Das rCPn0473 Volllängenprotein (VL) und die Variante mit deletierter Transmembrandomäne (Δ TM) wurden bei 40.000 G für 30 Min bei 4 °C zentrifugiert. 2 µg der Proteine wurden auf ein natives Blue Native Gel (3 % - 12 %, Life Technology) geladen. Elektrophorese-Konditionen: 60 Min. bei 150 V (12-16 mA) und für 90 Min bei 250 V (8-10 mA). Die Gele wurden im Anschluss auf eine PVDF-Membran geblottet und mit anti-Histidin-Antikörpern (1:1000) und AP-gekoppelten-anti-Kaninchen-Antikörpern (1:7500) analysiert. Zusätzlich wurden 2 µg der beiden Proteinvarianten auf ein SDS-Gel geladen und mittels Coomassie gefärbt. Proteinmarker: PageRuler ist in kDa angegeben.

D: Multi-angle-light-scattering (MALS) zur Größenbestimmung von rCPn0473. Das rCPn0473 Volllängenprotein (VL) und die Variante mit deletierter Transmembrandomäne (Δ TM) wurden bei 40.000 G für 30 Min bei 4 °C zentrifugiert. 3mg/ml der Proteine wurde im Anschluss mittels MALS analysiert. In den Chromatogrammen ist die Spannung und der differentielle Brechungsindex gegen die Zeit dargestellt. Oben: Chromatogramm von rCPn0473 VL, Unten: Chromatogramm von Δ TM; dRI: differentieller Brechungsindexdetektor (Blaue Linie, Proteinkonzentration), FM: Lichtstreuungsdetektor (Rote Linie, Proteinmasse), UV: Detektor für Ultraviolettes Licht (Grüne Linie, Proteinnachweis).

Um zu testen, ob das Protein durch die Deletion der AS 396 bis 426 die Fähigkeit der Selbstinteraktion verloren hat, wurde das Volllängenprotein (rCPn0473 VL) und die Deletionsvariante rCPn0473∆TM auf ein Natives Gel, einem *Blue-Native* Gel, geladen und anschließend geblottet (Abb. 6.14C). In einem SDS-Gel liefen beide Proteine denaturiert bei ihrer erwarteten Laufhöhe von etwa 70 kDa. Im Nativen Gel lief rCPn0473 VL hingegen deutlich

höher als die Δ TM-Varianten und konnte auf einer Laufhöhe zwischen 720 kDa und 1.048 kDa detektiert werden. Im Vergleich zum denaturierten monomeren Protein im SDS-Gel erschien das VL Proteins im nativen Gel 10 bis 15-fach größer. Das Hauptsignal der Δ TM-Variante hingegen lief auf einer Höhe zwischen 70 kDa und 100 kDa, also nahe am apparenten Molekulargewicht des monomeren Proteins im SDS-Gel (Abb. 6.14C). Ein geringer Anteil der Δ TM-Probe lief auf Höhe des VL-Proteins im nativen Gel, was entweder an präzipitierten Proteinaggregaten oder in einer verbliebenden Fähigkeit zur Selbstinteraktion begründet sein kann.

Zur weiteren Charakterisierung der Protein-Komplexe wurde das rCPn0473 VL-Protein und die ∆TM-Variante, im Rahmen einer Kooperation mit Olivia Spitz (AG Schmitt, HHU), mit einem Mehrwinkel-Lichtstreudetektor (Multi-angle-light scattering, MALS) analysiert (Abb. 6.14D). Bei der MALS-Methode werden Proteine oder Proteinkomplexe zunächst ihrem molekularen Gewicht (MW) entsprechend, abfallend aufgetrennt (Größenausschluss-Chromatographie, SEC). Daraufhin wird ihre absolute Masse, aufgrund der Fähigkeit Licht zu streuen, ermittelt. Je größer ein Protein(komplex) dabei ist, desto stärker wird das Licht gestreut. Drei Signale wurden in der Messung aufgezeichnet und in Chromatogrammen dargestellt (Abb. 6.14D): Das UV-Signal (grüne Linie) dient dem generellen Nachweis für die Anwesenheit des eingesetzten Proteins; Das Signal des differenziellen Brechungsindexdetektors (dRI, blaue Linie) dient der Bestimmung der Proteinkonzentration; Das Signal des Lichtstreuungsdetektors (FM, rote Linie) dient der Bestimmung der molekularen Masse der Proteinkomplexe (Abb. 6.14D). Nach 30 Minuten Messung sollten alle Proteine, unabhängig ihrer Masse das System vollständig durchlaufen haben. Die signifikanten Peaks der dRI Messung (blau) in den Chromatogrammen ab der 30. Min stellen die Salze der Pufferlösung dar. Der Bereich davor wurde für die Proteinmessung herangezogen. Zunächst wurde das Volllängenprotein (VL) getestet (Abb. 6.14D, oberes Chromatogramm). Das Chromatogramm zeigte Signale im UV (grün) ab Min 12 bis zum Ende der Messung. Die dRI-Messung (blau) zeigte drei Peaks bei Min 15, Min 19 und Min 24. Die FM-Messung (rot) zeigte allerdings ausschließlich einen signifikanten Peak zwischen der 12. Min und der 18. Min (Abb. 6.14D, oberes Chromatogramm). Damit korrelierte das FM-Signal zwar mit dem des ersten dRI-Peaks, jedoch verliefen beide Kurven antiparallel mit einem Maximum in der FM-Messung bei Min 13 und einem Maximum in der dRI-Messung bei Min 15 (Abb. 6.14D, oberes Chromatogramm). Beide Messungen werden für die Berechnung der absoluten Masse des Proteins benötigt. Eine Auswertung der Proteingröße war aufgrund dieses Kurvenverlaufs nicht möglich.

Die Messung von rCPn0473 Δ TM ergab UV-Signale (grün) im Bereich zwischen der 12. Min und der 24. Min (Abb. 6.14D, unteres Chromatogramm). In diesem Bereich wurden vier Peaks in der dRI-Messung (blau) bei Min 14, Min 17, Min 20 und Min 24 aufgezeichnet. Die FM-Messung (rot) ergab drei Peaks bei Min 10, Min 14 und Min 17 (Abb. 6.14D, unteres Chromatogramm). Der zweite und dritte FM-Peak korrelierte dabei mit dem ersten respektive dem zweiten dRI-Peak. Beide Peaks wurden daraufhin ausgewertet. Ein kleiner Anteil der Δ TM-Probe, gemessen bei Min 14 wurde auf ein molekulares Gewicht von 414,90 kDa bestimmt. Die dominierende Proteinvariante der Δ TM-Probe hingegen, sichtbar anhand des größten dRI-Signals (blau) bei Min 17 Min, wurde auf eine Größe von 84,65 kDa bestimmt. Damit glich die ermittelte Masse der rCPn0473 Δ TM Hauptvariante in der MALS Messung der beobachteten Größe des monomeren Proteins im SDS-Gel (Laufhöhe: etwa 70 kDa). Die rCPn0473 Δ TM-Variante schien somit die Fähigkeit verloren zu haben, Proteinkomplexe zu bilden.

Zur weiteren Charakterisierung der Funktionalität der TM wurden die Assoziation von rCPn0473 VL und CPn0473∆TM mit Membranen in Liposomen-Präzipitations-Experimenten getestet (Abb. 6.15A). Hierbei werden Liposomen, bestehend aus Phosphatidylcholin, mit dem Protein gemischt und anschließend per Zentrifugation präzipitiert. Die pelletierten Liposomen (P) und der Überstand (Ü) wurden im Anschluss im Westernblot auf die Anwesenheit des Proteins überprüft. Das lösliche rCPn0473 VL Protein konnte bereits nach 5 Min Inkubation gemeinsam mit den Liposomen präzipitiert werden. Ein weiterer Anstieg der Proteinkonzentration über die Zeit in der Pellet-Fraktion im Vergleich zur Überstand-Fraktion konnte nicht beobachtet werden, was auf eine Sättigung des Proteins in den Liposomen bereits nach 5 Min hindeutet (Abb. 6.15A, Blot links oben). Interessanterweise konnte das Protein durch Zugabe des Detergenz Triton X-100, welche Membranen solubilisiert, teilweise wieder in den Überstand zurückgeführt werden. Als Negativ-Kontrolle, wurde rGST mit den Liposomen inkubiert. Auch wenn einige sehr schwache Banden in der Pellet-Fraktion detektiert werden konnten, verblieb der größte Anteil an rGST im Überstand. Auch die rCPn0473∆TM Variante wurde mit den Liposomen inkubiert, konnte allerdings, ähnlich wie rGST, fast ausschließlich im Überstand detektiert und demnach nicht im Komplex mit den Liposomen präzipitiert werden (Abb. 6.15B, Blot unten links und rechts oben).



Abb. 6.15: rCPn0473 interagiert mit sich selbst und penetriert Membranen über seine Transmembrandomäne.

A: Liposomen-Pulldown-Experiment mit rekombinantem CPn0473 (rCPn0473) Volllänge (VL) und einer Variante ohne Transmembrandomäne (Δ TM). 50 µl Liposomen, mittels *"Freeze-Thaw-Sonification"*-Methode aus Phosphatidylcholin (PC) hergestellt, wurden mit 5 µg rProtein für die angegebenen Zeiten bei RT inkubiert. Zusätzlich wurde ein Ansatz nach Inkubation für 30 Min. mit 1 % Triton X100 gemischt. Nach Zentrifugation wurden die Pellets in 100 µl PBS resuspendiert und die Anwesenheit der Proteine im Pellet (P) und im Überstand (Ü) im Westernblot mit anti-Histidin-Antikörpern (1:2500) und AP-gekoppelten-anti-Maus-Sekundärantikörpern (1:7500) analysiert. Proteinmarker: PageRuler ist in kDa angegeben.

B, C: Penetration der Membran von GUVs durch rCPn0473. GUVs, mit einer Lipid-Mischung aus Phosphatidylcholin (DOPC, 55 mol%), Phosphatidylserin (DOPS, 20 mol%) und Cholesterin (25 mol%), wurden mittels Swelling Methode generiert und mit Carboxyfluorescein (CF) gefüllt. Die präparierten GUVs wurden mit 1 μg Alexa-594-markiertem rCPn0473 VL, rCPn0473ΔTM, oder ohne rProtein (Bleaching) inkubiert. B: Diagramme der Fluoreszenz Intensitäten im grünen (CF-Intensität, oberes Diagramm) und roten Kanal (Alexa-594-Intensitäten, unteres Diagramm) gegen die Zeit. Die Signal-Intensitäten von jeweils mindestens 15 GUVs wurden mittels NIS Software aufgezeichnet und in Relation zum Hintergrundsignal außerhalb der GUVs ausgewertet. 100 % Signalintensität ist definiert als die CF-Intensität innerhalb des GUV Lumens (oberes Diagramm) und der Alexa594-Intensität außerhalb der GUVs (unteres Diagramm) zu Beginn des Experiments. Die statistische Signifikanz von CPn0473 VL gegenüber CPn0473ΔTM und der Bleaching Kontrolle ist angegeben mit *** (p<0.001), ** (p<0.05) und

n.s. nicht signifikant (n=3). C: Repräsentative Aufnahmen der CF-gefüllten GUVs zu Beginn und am Ende der Inkubation mit Alexa-594-markiertem rCPn0473 oder rCPn0473^{DTM}. Größenstandard: 10 μm.

Zur Verifikation der bisherigen Ergebnisse wurde das rCPn0473 VL und CPn0473∆TM auf Interaktion mit PS-haltigen Giant unilamellar vesicles (GUVs) getestet (Abb. 6.15B,C). In Kooperation mit Dr. Thorsten Eierhoff (HHU Düsseldorf) wurden die GUVs mit Carboxyfluorescein (CF) gefüllt, um eine mögliche Penetration der Membran durch die Proteine über das Austreten des Farbstoffs mikroskopisch zu erfassen. CF konnte Konzentrationsabhängig im Lumen der GUVs mikroskopisch detektiert werden. Zusätzlich konnten die Alexa594-gefärbten Proteinvarianten zu Beginn des Experiments außerhalb der GUVs beobachtet werden (Abb. 6.15B,C). Zur Analyse wurden die Signale im grünen (CF) und im roten Kanal (Alexa594-markiertes Protein) mit Hilfe des Programms NIS Element aufgezeichnet und ausgewertet. Beide Proteinvarianten adhärierte binnen einer Minuten an die PS-haltigen GUVs, wobei die Bindung des VL Proteins über die Zeit etwas stärker zu sein schien, als bei der ΔTM-Variante (Abb. 6.15C). Interessanterweise konnte nach 3 Min Inkubation des VL Proteins mit den GUVs eine Reduktion des initialen CF-Signals im GUV Lumen auf 60 % aufgezeichnet werden. Über die Zeit verringerte sich das Signal weiter bis schlussendlich nach 20 Minuten nur noch 40 % des initialen CF-Signal detektierbar war (Abb. 6.15B). Im Vergleich hierzu blieb das CF-Signal in den rCPn0473∆TM-behandelten GUVs viel stabiler (Abb. 6.15C). Erst in den letzten Minuten sank das Signal parallel zu den unbehandelten GUVs (Bleaching-Kontrolle) um zirka 25 % ab. Dabei unterschied sich das Signal zu keiner Zeit signifikant von der Bleaching-Kontrolle. Interessanterweise konnte im Verlauf des Experiments mit rCPn0473 VL ein Anstieg des Signals im roten Kanal (Alexa594-markiertes Protein) im Lumen der GUVs beobachtet werden (Abb. 6.15B,C). Dem Verlust des CF-Signals im grünen Kanal folgend, stieg das rCPn0473 VL-Signal in den GUV Lumen nach 6 Min Inkubation signifikant an. Nach 19 Min Inkubation war das Protein-Signal im Lumen der GUVs, im Vergleich zum Signal außerhalb der GUVs, mit 95 % maximal angestiegen. Der Anstieg des Alexa594-Signals verlief dabei deutlich langsamer und etappenweise im Vergleich zum Abfall des CF-Signals. Im selben Zeitraum sank das Signal im roten Kanal für die rCPn0473∆TM-behandelten GUVs, wie auch das Signal im Lumen unbehandelter GUVs (Bleaching-Kontrolle) geringfügig ab (Abb. 6.15B,C).

Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass CPn0473 eine humane Plasmamembran mit Hilfe dessen C-Terminus penetrieren kann. Außerdem schien CPn0473 über die AS 396 bis AS 426 mit anderen CPn0473 Proteinen interagieren zu können. Diese Domäne scheint auch an der Interaktion des Proteins mit reinen Phospholipidmembranen, sowie deren Penetration beteiligt zu sein.

6.7.3 LIPP transloziert PS von der intra- auf die extrazelluläre Membranseite

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass CPn0473 in der Lage ist Membranen zu penetrieren und sich selbst in die Membran zu integrieren (siehe Kapitel 6.7.2), um dadurch möglicherweise Membranen zu destabilisieren. Es wäre daher theoretisch möglich, dass CPn0473 selbst als Lipid-Transporter agiert und Phosphatidylserin (PS) von der zytoplasmatischen Seite einer humanen PM auf die extrazelluläre Seite der Membran transportiert. Um zu überprüfen, ob rekombinantes CPn0473 (rCPn0473) in der Lage ist, PS von einer Seite einer Membran auf die andere zu transportieren, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Thorsten Eierhoff (HHU Düsseldorf) asymmetrische GUVs erzeugt (Abb. 6.16). Im Gegensatz zu den herkömmlichen GUVs, zeichnen sich asymmetrische GUVs durch die Beschränkung mindestens einer Lipid-Spezies auf nur einer Seite einer Doppelmembran aus.

Dr. Thorsten Eierhoff entwickelte ein Verfahren, abgewandelt von (Pautot, Frisken et al. 2003), um GUVs zu generieren, bei denen PS ausschließlich auf der inneren bzw. ausschließlich auf der äußeren Membranseite vorlag (siehe Kapitel 5.5.4). In diesem Verfahren werden zunächst beide Membranseiten separat präpariert. Die Lipidmischung der äußeren Membranseite wird auf eine Glukoselösung gegeben, sodass eine Lipideinzelschicht entsteht, wobei die polaren Lipidköpfe der Zuckerlösung zugewendet sind. Die Lipidmischung der inneren Membranseite wird währenddessen mit einer Saccharose-Lösung kräftig gemischt, woraufhin die Lipide Mizellen bilden, mit den Fettsäureresten nach außen gerichtet. Die Mizellen der späteren inneren Membranseite werden daraufhin auf die Lipideinzelschicht der äußeren Membran zentrifugiert wodurch sie durch diese eingeschlossen werden und als asymmetrische GUVs mit innerer und äußerer Membranseite zu Boden sinken. Da rCPn0473 an GUVs mit 20 mol% PS die stärkste Bindung gezeigt hatte (siehe Kapitel 6.3), wurde für die Herstellung asymmetrischer GUVs eine Lipid-Mischungen mit Phosphatidylcholin (DOPC, 55 mol%), Cholesterin (25 mol%) und Phosphatidylserin (DOPS, 20 mol%) für die eine Membranseite und eine Lipid-Mischungen mit Phosphatidylcholin (DOPC, 75 mol%), Cholesterin (25 mol%), aber ohne Phosphatidylserin für die zweite Membranseite verwendet. Vor Beginn der Experimentreihe wurde die korrekte Lokalisierung von PS in jeweiligen GUV-Membranseite zunächst mit der FITC-markierten, PSbindenden Domäne des Marker-Proteins Lactadherin (rLactC2) überprüft (Abb. 6.16A). Hierfür wurden die GUVs mit rLactC2 inkubiert oder bei deren Herstellung mit rLactC2 gefüllt. Nur wenn die präparierten GUVs die folgenden Bedingungen erfüllten wurden sie für die PS-Translokationsexperimente mit rCPn0473 verwendet (Anhang Abb. 8.2A): GUVs, welche PS auf der äußeren Membranseite integriert hatten, konnte durch rLactC2 Zugabe von außen gebunden und grün markiert werden (Abb. 6.16A). Im Gegensatz hierzu war rLactC2 nicht in der Lage von außen an GUVs zu binden, welche PS in der inneren Membranseite integriert hatten. Wenn rLactC2 hingegen bei der Generierung der asymmetrischen GUVs ins Lumen der GUVs verpackt wurde, war das Protein in der Lage an solche GUVs zu binden, die PS auf der inneren Membranseite integriert hatten (Abb. 6.16A). Dabei adhärierte rLactC2 binnen Sekunden an die GUVs und war damit ähnlich adhärent wie zuvor an den durch Elektroformation erzeugten symmetrischen GUVs mit PS in beiden Membranseiten (siehe Kapitel 6.3). GUVs ohne eindeutige Asymmetrie wurden hingegen nicht mit rCPn0473 getestet (Anhang Abb. 8.2B).



Abb. 6.16: In asymmetrischen GUVs transportiert rCPn0473 Phosphatidylserin von der inneren auf die äußere Membranseite. A, **B:** Bindung von rLactC2 an asymmetrische GUVs. Asymmetrische GUVs wurden mit einer Lipid-Mischung aus Phosphatidylcholin (DOPC, 55 mol%), Phosphatidylserin (DOPS, 20 mol%) und Cholesterin (25 mol%) auf der einen und mit Phosphatidylcholin (DOPC, 75 mol%) und Cholesterin (25 mol%) auf der anderen Membranseite hergestellt. Die präparierten GUVs wurden mit 1 µg FITC-markiertem rLactC2 oder mit 1 µg FITC-markiertem rLactC2 und 1 µg Alexa-594-markiertem rCPn0473 über die angegebenen Zeiten inkubiert. **A:** Repräsentative Aufnahmen von asymmetrischen GUVs nach 30 Minuten Inkubation mit rLactC2 oder rLactC2 und rCPn0473 nach 30 Minuten Inkubation. Die Lokalisierung von PS zu Beginn des Experiments ist auf der rechten Seite angegeben. Im Falle von "rLactC2 verpackt" (2. Reihe) wurde das Protein bei der

Herstellung der GUVs ins Lumen eingeschlossen. Größenstandard 10 μ m. **B**: Die rLactC2 Intensität an der GUV Membran von mindestens 15 GUVs wurde mit ImageJ Software quantifiziert. Die Intensität des Hintergrundsignals wurde auf 1 gesetzt. Die Lokalisierung von PS zu Beginn des Experiments ist unter dem Diagramm angegeben (+= Anwesenheit des Proteins, -= Abwesenheit des Proteins). Die statistische Signifikanz, gegenüber GUVs mit DOPS auf der inneren Membranseite und inkubiert mit rLact2 ohne rCPn0473, ist angegeben mit *** (p<0.001), ** (p<0.05) und n.s. nicht signifikant (n=3).

Nachdem die Asymmetrie der GUVs durch das Adhäsionsverhalten von rLactC2 sichergestellt werden konnte, wurde GUVs mit PS integriert in die innere Membranseite in drei unabhängigen Experimenten gleichzeitig mit FITC-markiertem rLactC2 und Alexa594-markiertem rCPn0473 inkubiert. Interessanterweise war rLactC2 in Anwesenheit von rCPn0473 in der Lage an die GUVs zu binden, obwohl PS initial auf der inneren Membranseite lokalisiert war (Abb. 6.16A). Durch Auswertung der Fluoreszenzsignale des FITC-markierten rLactC2 an den GUVs, in Relation zum Hintergrund-Signal (Median=1) außerhalb der GUVs konnte die Menge an PS in der GUV Membran Außenseite aufgezeichnet werden (Abb. 6.16B). Die rLactC2 Signal-Intensität an GUVs mit PS in der äußeren Membranseite (Median 5.4, Min. 1, Max. 10.1) zeigte bereits nach 1 Min Inkubation eine deutliche Bindung von rLactC2 und damit, wie zu erwarten, die Anwesenheit von PS in der äußeren Membranseite. Die Signalstärke vom gebundenen rLactC2 war nach 30 Min Inkubation allerdings nur noch halb so stark wie zu Beginn des Experiments (Median 2.4, Min. 1, Max. 5), was eventuell auf einen passiven Transport der Lipide auf die innere Membranseite oder aber ein Ausbleichen des FITC-Signals nach 30 Min hindeutete. Dem Gegenüber zeigten GUVs mit PS auf der inneren Membranseite, die mit rLactC2 in Abwesenheit von rCPn0473 inkubiert worden waren, zu Beginn des Experiments nur ein minimales Signal (Median 1, Minima 1, Maxima 3.7), welches sich nicht signifikant vom Hintergrund-Signal unterschied. Dieses stieg auch nach 30 Min Inkubation nicht signifikant an, was einen passiven Transport des Lipids zwischen den Membranseiten im untersuchten Zeitraum ausschloss (Median 1, Min. 1, Max. 1.6) (Abb. 6.16A,B). Interessanterweise war die Signal-Intensität von rLactC2 an GUVs mit PS in der inneren Membranseite in Anwesenheit von rCPn0473 (Median 2.6, Minima 1, Maxima 10.5) gleich zu Beginn des Experiments ähnlich hoch wie in GUVs mit PS in der äußeren Membranseite nach 30 Min. Die weitere Inkubation der GUVs für 30 Min. veränderte die Signalintensität des gebundenen rLactC2 nicht (Median 3.2, Minima 1, Maxima 8.4). Sie war allerdings weiterhin signifikant höher als an den GUVs mit PS in der inneren Membranseite und ausschließlich mit rLactC2 inkubiert (Abb. 6.16A,B).

Das Experiment mit den asymmetrischen GUVs zeigte, dass CPn0473 in der Lage ist Phosphatidylserin von der inneren Seite einer reinen Phospholipidmembran auf die äußere Seite zu translozieren. Weitere Proteine waren hierfür nicht erforderlich. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass infektiöse *C. pneumoniae* EBs, über das oberflächenlokalisierte Adhäsin CPn0473, das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) von der inneren Seite einer humanen Plasmamembran auf die extrazelluläre Seite translozieren können. Hierzu durchspannt das chlamydiale Protein, möglicherweise in einem CPn0473-Multiproteinkomplex, die humane Plasmamembran mit seinem C-Terminus und bindet PS über den N-Terminus. CPn0473 ist dabei autonom in der Lage PS zu translozieren, auch wenn an einer effiziente PS Externalisierung an der humanen Plasmamembran weitere humane oder chlamydiale Proteine beteiligt sein könnten.

7 Diskussion

Chlamydien und andere Pathogene adhärieren an ihrer Wirtszelle über eine Reihe von Proteinen, sogenannten Adhäsinen. Für C. pneumoniae wurden bisher die Proteine OmcB, die Familie der Pmps und das Protein CPn0473 als Adhäsine identifiziert. Ihr Zusammenspiel ermöglicht es dem Bakterium an die Plasmamembran (PM) der Wirtszelle zu binden. Dabei bindet das OmcB an Glykosaminglykane, Zuckerstrukturen in der humanen Wirtszellmembran (Moelleken and Hegemann 2008). Für Pmp21 konnte gezeigt werden, dass das Protein an den humanen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) bindet kann (Becker 2013, Molleken, Becker et al. 2013). Einige Adhäsine erfüllen, neben der Vermittlung der Adhäsion, auch noch eine weitere Rolle. So aktiviert die Bindung von Pmp21 an den humanen EGFR diesen Rezeptor und induziert eine intrazelluläre Signalkaskade, welche essentiell für das Eindringen des Bakteriums in die Wirtszelle und das intrazelluläre Überleben des Bakteriums in der Wirtszelle ist (Molleken, Becker et al. 2013, Molleken and Hegemann 2017). Auch das oberflächenlokalisierte CPn473 ist für die Aufnahme der Chlamydien durch die Wirtszelle essentiell (Fechtner, Galle et al. 2016). CPn0473 bindet über eine C-terminale Bindedomäne (BD, AS 307 - AS 356) über einen noch nicht identifizierten Interaktionspartner an die humanen Zellen. Dort gebunden ist das Protein an der chlamydialen Internalisierung beteiligt. Über einen unbekannten Mechanismus vermittelt durch eine N-terminale CPn0473-Domäne (Infektionserhöhende Domäne, IED, AS1-AS150) stimuliert rekombinantes Protein die Aufnahme der Bakterien. Diese Aufnahme, wie auch der Einfluss von CPn0473 auf diesen Prozess ist dabei von der Verfügbarkeit von Cholesterin in der humanen PM abhängig (Fechtner, Galle et al. 2016).

Das Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Funktion von CPn0473 im Infektionsgeschehen. Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse wird vorgeschlagen das Protein CPn0473 in LIPP, für Lipid-dependent Internalization **P**romoting **P**rotein umzubenennen.

7.1 Die Bindung des chlamydialen Adhäsins LIPP

7.1.1 LIPP bindet initial einen proteinösen humanen Interaktionspartner

Das chlamydiale Protein LIPP (Cpn0473) wird 48 Stunden nach Infektionsbeginn und damit kurz vor oder während der Redifferenzierung der chlamydialen Retikularkörperchen (RBs) in die Elementarkörperchen (EBs) gebildet. Die späte Synthese deutet auf eine Funktion entweder beim Austreten der chlamydialen EBs zum Ende des Infektionszyklus, oder aber während der Initiation des neuen Infektionszyklus und damit während der Adhäsion und der Internalisierung hin. Im Zeitraum zwischen der 48. Stunde und der 72. Stunde des chlamydialen Infektionszyklus wird das Protein auf die Oberfläche der infektiösen EBs transloziert. Dort ist das Protein sowohl durch Antikörper, als auch durch Biotinylierung zumindest teilweise markierbar (Abb. 6.1). Wie LIPP auf der chlamydialen Oberfläche verankert ist, konnte bisher nicht aufgelöst werden. Es ist nicht anzunehmen, dass LIPP auf der chlamydialen Oberfläche als Teil des stark-quervernetzten Außenmembrankomplexes (cOMC) verankert ist, da dem Protein zum einen die notwendigen Cysteine für die Bildung der Disulfidbrücken fehlen, zum anderen das Protein auch mit nicht-ionischen Detergenzien, wie Triton X100 oder auch NP40, von der chlamydialen Oberfläche entfernt werden konnte (Fechtner, Galle et al. 2016).

Rekombinantes LIPP (rLIPP) adhäriert an die humane Plasmamembran (PM) über eine Aminosäure-Region im C-Terminus. Bindestudien mit einer Reihe von LIPP-Deletionsvarianten legen nahe, dass die für die Bindung essentielle Region zwischen den Aminosäuren 307 und 356 liegen muss. Die Funktionalität dieser Domäne konnte mit Hilfe eines Fusionsproteins, bestehend aus der LIPP Bindedomäne (BD) und dem nicht-adhäsiven GST, in dieser Arbeit bestätigt werden (Abb. 6.2A). Mit Hilfe der BD adhäriert LIPP an eine proteinöse Komponente oder einer Struktur, welche mit Proteinen assoziiert ist, denn das Protein war nicht mehr in der Lage, an Proteinase K-behandelte Humanzellen zu binden (Abb. 6.2C). Zellen, die mit Proteinase K behandelt wurden, weisen keine extrazellulären Proteinbestandteile mehr auf. Dies impliziert allerdings auch Protein-assoziierte Zucker. Daher ist eine Interaktion von rLIPP mit Zuckerresten an glykosylierten Proteinen ebenso denkbar und bedarf weiterer Experimente. So wären Bindestudien mit LIPP an Zucker-defizienten Zellen, oder Amylasebehandelten Zellen sinnvoll. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit die Cholesterin-Abhängigkeit bei der Adhäsion von LIPP an die humane Plasmamembran verifiziert werden. Interessanterweise ist die Bindung von rLIPP nicht nur an Cholesterin-depletierten Zellen reduziert, sondern auch in Zellen, bei denen Aktin-Zytoskelett depolymerisiert wurde das Wirtszell-eigene (Abb. 6.2D). Die Depolymerisierung des Aktin-Zytoskeletts hat zur Folge, dass das Aktin in definierten Regionen unterhalb der Plasmamembran akkumuliert. Dem folgend lokalisiert das GM1-bindende Toxin CTxB, als Marker für Cholesterin-reiche Regionen, an diese Aktin-Flecken. Auch rLIPP wird akkumuliert an diesen Regionen detektiert, während das LIPP-Signal an der restlichen Plasmamembran reduziert ist. Cholesterin sitzt vermehrt in Membranregionen mit hoher Ordnung (lo-Phasen, auch bekannt unter dem Begriff Lipid Rafts). Die Aufrechterhaltung dieser Ordnung wird unter anderem auch durch die Interaktion mit dem kortikalen Aktin-Zytoskelett vermittelt. Dies könnte erklären, warum das Cholesterin in den Regionen des akkumulierten, depolymerisierten Aktins lokalisiert (Bodin, Soulet et al. 2005, Kok 2014). Das auch für die Funktion von LIPP während der Internalisierung der Chlamydien die Anwesenheit von Cholesterin in der humanen PM essentiell ist, erklärt eventuell die beobachtete Lokalisierung des Proteins in den Aktin- und Cholesterin-positiven Regionen der humanen PM.

7.1.2 LIPP bindet das Negativ-geladene Phospholipid Phosphatidylserin

Neben der Bindung an die humane Zelle, wahrscheinlich über Protein-Protein Interaktionen, zeigt LIPP ein weiteres sehr interessantes Bindungsverhalten. Das Protein ist in der Lage mit reinen Phospholipiden in Form von Liposomen zu interagieren. Interaktionsstudien mit verschiedenen immobilisierten Phospholipiden auf einer Membran, in vorangegangenen Studien, deuten auf eine Bindung an negativ-geladene Lipide hin (Fechtner 2013). In humanen Zellen gibt es drei Gruppen von negativ-geladenen Phospholipiden: Phosphatidsäure (PA) lokalisiert in beiden Membranschichten der Plasmamembran, während die Gruppen der Phosphatidylinositole (PIPs) und Phosphatidylserin (PS) jeweils nur in der inneren Membranseite von gesunden Zellen zu finden sind. In künstlich erzeugten Phospholipidmembranen, in Form von Giant unilamellar vesicles (GUVs), bindet rekombinantes LIPP (rLIPP) sowohl PA als auch PS, wobei die Bindung an PS eindeutig stärker war. Darüber hinaus war die Interaktion mit dem Phospholipid in Anwesenheit von Cholesterin noch einmal signifikant erhöht, was einmal mehr die Wichtigkeit von Cholesterin für das Protein aufzeigt. Es

15

ist durchaus anzunehmen, dass LIPP, während der Bindung an Membranen, zusätzlich mit Cholesterin interagiert, um eine stabile Adhäsion zu erzielen. Die Interaktion mit PS wird durch eine Domäne in den ersten 170 Aminosäuren (AS) von LIPP initiiert (Abb. 6.3). Diese Domäne wurde ursprünglich als Infektionserhöhende Domäne (IED) identifiziert, da sie die Stimulation der chlamydialen Internalisierung durch rLIPP vermittelt (Galle 2013, Fechtner, Galle et al. 2016). Interessanterweise ist die IED nicht nur essentiell, sondern bereits ausreichend um eine Bindung an PS-haltige GUVs zu ermöglichen. Die Bindedomäne (BD), verantwortlich für die Adhäsion an humane Zellen, zeigt hingegen keinerlei Adhäsionsvermögen an reine Phospholipid-Membranen. Dies impliziert, dass die Interaktion mit humanen Zellen durch zwei distinkte Domänen vermittelt wird. Zum einen adhäriert LIPP über die BD an die humane Plasmamembran, zum anderen interagiert das Protein über die IED mit der Humanzelle, wahrscheinlich mit PS.

Eine Interaktion von Proteinen mit Phospholipiden in Membranen kann auf unterschiedliche Weise ablaufen. In der Literatur sind bereits einige Lipid-bindende Domänen beschrieben, wobei die meisten Domänen für die Interaktion von Proteinen mit der Phospholipid-Gruppe der PIPs beschrieben werden. So binden die C1- und C2-Domänen zumeist PIPs, aber in seltenen Fällen, wie beispielsweise beim PS-Marker-Protein Annexin auch PS. Die Interaktion erfolgt über aromatische und hydrophobe Aminosäuren in den Domänen (Tait and Gibson 1992, Medkova and Cho 1999). Die diskoidale C2-ähnliche Domäne, unter anderem identifiziert beim PS-Marker-Protein Lactadherin, dient ebenfalls der Bindung an PS (Shi, Heegaard et al. 2004, Yeung, Gilbert et al. 2008). Die Pleckstrin Homologie (PH) Domäne schließlich vermittelt die Adhäsion an Vertreter der PIPs über das Motiv K-Xn-(K/R)-X-R], wobei K für Lysin und R für Arginin steht, welche beide eine essentielle Rolle bei der Interaktion mit dem Phospholipid spielen (Lemmon 2007, Manna, Albanese et al. 2007). Aufgrund von fünf potentiellen Wasserstoffbrücken-Bindungs-Donatoren hat Arginin die Fähigkeit sehr stabile Arginin-Phosphat-Cluster mit den Phospholipiden der Membran zu bilden (Li, Vorobyov et al. 2013). Auch LIPP besitzt eine Reihe von Argininen und Lysinen. So sind alleine in der für die Bindung an PS essentiellen IED bereits 25 der beiden positiv-geladene AS (16,7 % der AS-Sequenz) vertreten. Sie sind über die gesamte Sequenz verteilt, zeigen dabei allerdings kein spezifisches Muster.



Abb. 7.1: Bioinformatische Analyse des CPn0473 (LIPP) N-Terminus

A-D: Schematische Darstellung der Aminosäurekomposition des N-Terminus von CPn0473 (LIPP) (**A**, **C**). Abgebildet sind die Aminosäuresequenz im Einbuchstaben-Code, dessen postulierter Sekundärstruktur (SS) mit Vorhersage-Wahrscheinlichkeit (W.-keit) durch das bioinformatische Programm PHYRE 2. Die SS wird dabei unterteilt in Alpha Helices, Beta Strands oder Disordered und ist in Bezug auf die betrachtete Sequenz in Prozent angegeben. Die helikale Projektion der durch PHYRE 2 postulierten α -Helices (W.-keit > 9) durch das Programm Heli Quest ist in (**B**, **D**) dargestellt. Die Hydrophobizität (H), das hydrophobe Moment (μ H) und die Netto Ladung der postulierten Helices ist angegeben. Der Pfeil gibt die Richtung des hydrophoben Moments an, wobei die Länge des Pfeils mit dessen Stärke korreliert.

A und B: Analyse der IED (AS 1 - AS 150) von CPn0473 (LIPP)

C und D: Analyse der Aminosäuren 151 – 250 von CPn0473 (LIPP)

Simulationen mit diversen bioinformatischen Programmen sagen mehrere α -Helices innerhalb der Domäne vorher: AS 51 - AS 59, AS 68- AS 72, AS 84 - AS 96, AS 113 - AS 120 und AS 124 -AS 147. Drei dieser Helices (AS 51 – AS 59, AS 84 – AS 96 und AS 124 – AS 147) werden durch das Programm Phyre2 mit über 90 % Wahrscheinlichkeit angenommen (Abb. 7.1A). Alle drei Helices besitzen mindestens drei positiv-geladene AS (Arginin (R), Lysin (K)). Mit Hilfe einer helikalen Projektion können die Helices auf ihre physikalischen-chemischen Eigenschaften untersucht werden (Abb. 7.1B). Das Programm Heli Quest ordnet dabei jeweils immer 18 AS in einer Alpha-Helix so an, dass fünf helikale Windungen (3,6 AS pro Windung) abgebildet werden. Besitzen, auf diese Weise dargestellt, mindestens fünf der benachbarten AS hydrophobe Reste bilden sie eine hydrophobe Oberfläche. Die Anordnung zeigt, dass die positiv geladenen AS im Falle der ersten und dritten Helix rings um diese verteilt sind. In der zweiten Helix hingegen sind alle 4 Lysine und das eine Arginin auf einer Hälfte der Helix lokalisiert, z.T. sogar benachbart. Diesem Cluster gegenüber sind die hydrophobe AS Valin (V), Leucin (L), Isoleucin (I) und Tryptophan (W) lokalisiert und geben der Helix hier eine hydrophobe Oberfläche. Die zweite Helix, von AS 84-101, zeigt bei diesen Analysen sowohl die stärkste Nettoladung (+5), als auch das größte hydrophobe Moment (μ H=0.630), gerichtet auf den Bereich der hydrophoben AS. Insbesondere die zweite Helix zeigt somit alle Charakteristika einer sogenannten amphipathischen Helix (APH). APHs sind α -Helices, die sich durch eine hydrophobe Oberfläche auf der einen und einer Ansammlung von polaren Aminosäuren auf der gegenüberliegenden Helix-Seite mit einem starken hydrophoben Moment auszeichnen (Eisenberg, Weiss et al. 1982). APHs sind aufgrund dieser Eigenschaften in der Lage mit Phospholipiden zu interagieren. Es kann daher postuliert werden, dass die PS-bindenden Eigenschaften von LIPP durch eine oder mehrere amphipathische Helices, wie die von AS 84 bis AS 101, vermittelt wird. Auch wenn die IED von LIPP die Adhäsion an PS vermitteln konnte, wäre es dennoch möglich, dass weitere Regionen nahe der IED ebenfalls mit Lipiden interagieren könnte. Zwar verhinderte die Deletion der IED eine Interaktion von LIPP mit den PS-haltigen GUVs, aber möglicherweise hatte die Deletion dieses Proteinabschnitts einen negativen Einfluss auf die Funktionalität angrenzender AS-Regionen. Aus diesem Grund wurde die Suche nach amphipathischen Helices auf den gesamten N-Terminus bis hin zu AS 250 ausgeweitet (Abb. **7.1**C). In diesem Bereich konnten zwei weitere Helices mit über 90 Wahrscheinlichkeit vorausgesagt werden, wobei nur die Helix von AS 190-207 (Helix 4) einen amphipathischen Charakter mit einem hydrophoben Moment von μ H= 0.495 bei einer Netto Ladung von +3 aufweist. Dabei lokalisieren drei der vier positiv-geladenen AS in der polaren Region gegenüber der hydrophoben Helix Oberfläche (Abb. 7.1D).

Studien an über 23.000 Helices von mehr als 11.000 Proteinen, darunter 1.757 amphipathische Helices, haben ergeben, dass eine typische amphipathische Helix ein hydrophobes Moment von μ H > 0,5 und einer Nettoladung von +1 bis +3, in seltenen Fällen sogar > +4 aufweist. Darüber hinaus weisen diese Helices eine erhöhte Frequenz der polaren AS Arginin (R) und Lysin (K) und der hydrophoben AS Isoleucin (I) auf (Sharadadevi, Sivakamasundari et al. 2005). Dabei kann man unterschiedliche Klassen von amphipathischen Helices unterscheiden. So weisen Mitglieder der Klassen der Apolipoproteine, der Lytischen-Polypeptide und der Polypeptid-Hormone ein hydrophobes Moment von μ H > 0,3 und einer hohen Netto Ladung auf, unterscheiden sich aber in der Zusammensetzung der polaren AS. Apolipoproteine weisen negativ-geladene AS im Zentrum und positiv-geladen AS an den Rändern der polaren Helix-Seite auf. Die Polypeptide tragen hingegen fast ausschließlich positiv-geladene AS. Beide Polypeptid Klassen besitzen daher eine hohe Nettoladung. In wässriger Lösung besitzen die Polypeptide eine geordnete Struktur und verändern ihre Konformation zu einer amphipathischen Helix nach Kontakt zu einer lipidösen Oberfläche, wie sie auf einer Zelloberfläche anzutreffen ist. Die Interaktion geschieht über zwei funktionell verschiedene Domänen, wobei das aktive Zentrum im N-Terminus und eine die Bindung unterstützende Domäne im C-Terminus liegt. Im Gegensatz zu den zuvor genannten Klassen zeichnen sich die amphipathischen Helices von integralen Transmembranproteinen durch eine Häufung von polaren, aber ungeladenen AS auf der von der hydrophoben Seite abgewandten Helix Seite aus. (Segrest, De Loof et al. 1990). Es ist durchaus möglich, dass die Interaktion von LIPP mit dem Phospholipid PS über amphipathische Helices geschieht. Daher sollten in einem zukünftigen Projekt die hier identifizierten amphipathischen Helices in LIPP ausgeschaltet und die PS-Bindefähigkeit dieser Varianten untersucht werden. Durch die Anreicherung positiv-geladener AS im polaren Membranbereich und der hohen Netto Ladung der Helices in LIPP ähneln diese dem Aufbau der amphipathischen Helices von Polypeptiden, die bei Kontakt zur Zelle eine Konformationsänderung initiieren. Eine Strukturanalyse durch Kristallographie der bereits identifizierten Domänen in Anwesenheit und Abwesenheit von Lipiden sowie NMR Studien könnten einen tieferen Einblick in die Struktur des Proteins und dem Ablauf der PS-Interaktion geben.

7.2 Phosphatidylserin, ein Lipid essentiell in der chlamydialen Infektion

C. pneumoniae besitzt wie alle Gram-negativen Bakterien eine äußere und eine innere Membran. Das Lipidom der äußeren Membran besteht vorwiegend aus Lipopolysachariden, während sich die innere Membran aus Bakterien-typischen Lipide wie Phosphatidylethalonamin (PE), Phosphatidylglycerin (PG) und Phosphatidylserin (PS) und Eukaryoten-typischen Lipide, wie Phosphatidylcholin (PC) zusammensetzt (Hatch and McClarty 1998, Carabeo, Mead et al. 2003). Auch wenn durch die Bakterien selbst synthetisierbar, wird das Phospholipid PS zusätzlich aus der Wirtszelle rekrutiert und dient den Chlamydien als Substrat für die Synthese von PE (Wylie, Hatch et al. 1997). Der Einfluss von PS auf die Infektiösität von C. pneumoniae wurde bisher nicht intensiv studiert.

7.2.1 Die chlamydiale Infektion ist Phosphatidylserin-abhängig

Das chlamydiale Protein LIPP wird spät in der Infektion gebildet und dann auf die Oberfläche der Chlamydien transportiert. Eine Interaktion von LIPP und Phosphatidylserin (PS) ist daher entweder sehr spät im Infektionszyklus, beim Verlassen der Wirtszelle, oder aber sehr früh beim Eindringen in die Wirtszelle möglich. Um den Einfluss von Wirtszell-eigenem PS auf die chlamydiale Infektion zu untersuchen, wurde eine PS-defiziente CHO Zelllinie mit Chlamydien infiziert und 48 Stunden nach Infektionsbeginn, also vor der Translokation von LIPP auf die chlamydialen Oberfläche, durch Auszählen der Einschlüsse analysiert. Interessanterweise ist die Infektion in der PS-defizienten Zelllinie, welche immer noch 30 % des wildtypischen PS aufweist, um fast die Hälfte reduziert (Abb. 6.5). Die chlamydiale Infektion ist demnach auf die Anwesenheit des Wirtszell-eigenen PS angewiesen. Da der Infektionsdefekt bereits nach 48 Stunden nachweisbar war, ist davon auszugehen, dass die Reduktion des PS-Levels bereits frühe Prozesse im Infektionszyklus beeinflusst. Rekombinantes LIPP (rLIPP) ist in der Lage eine chlamydiale Infektion zu stimulieren (Fechtner, Galle et al. 2016). Dies geschieht, wie im Kapitel 7.1.2 bereits erläutert, durch die IED-Domäne, die auch die Interaktion von rLIPP mit PS-haltigen GUVs vermittelt. Des Weiteren bleibt festzuhalten, dass Hamsterzellen nicht der natürliche Wirt von C. pneumoniae sind. Ein Einfluss des Wirtswechsels auf die Infektion kann daher nicht ausgeschlossen werden. Aus diesen Gründen wurde im weiteren Verlauf die Internalisierung von C. pneumoniae und der Einfluss von rLIPP auf diesen Prozess in den PSdefizienten CHO Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass rLIPP zwar in der Lage ist die chlamydiale Infektion in wildtypischen Hamsterzellen zu stimulieren, nicht aber in der PSdefizienten Zelllinie (Abb. 6.5). Wichtig festzuhalten ist hier, dass die Bindung des Proteins an beide Zelllinien nahezu identisch ist. Das Ausbleiben der Stimulation durch rLIPP legt daher nahe, dass die rLIPP-PS-Interaktion während der Adhäsion- und Internalisierung-Prozesse zu Beginn einer chlamydialen Infektion erfolgen muss. Gleichzeitig zeigen die Ergebnisse einmal mehr, dass die initiale Bindung des Proteins an die Wirtszelle nicht über PS, sondern eine andere Komponente, wie beispielsweise einem Protein oder Protein-assoziierten Zucker, erfolgen muss.

7.2.2 Chlamydien externalisieren Phosphatidylserin in der Wirtszell-Membran früh in

der Infektion

Phosphatidylserin (PS) ist in gesunden Zellen auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran (PM) lokalisiert. Da es außerdem keine Evidenz gibt, dass LIPP während der Internalisierung der Chlamydien über die Wirtsmembran hinweg transportiert wird, muss das Lipid im Zuge der chlamydialen Adhäsion und Internalisierung auf die extrazelluläre Seite der PM transportiert werden um so durch LIPP gebunden werden zu können. Tatsächlich wurde die Externalisierung von PS während der ersten Stunden einer chlamydialen Infektion bereits beschrieben. PS konnte transient auf der Oberfläche der infizierten Wirtszellen durch Annexin angefärbt und mittels FACS gemessen werden (Goth and Stephens 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte nun mikroskopisch gezeigt werden, dass die beschriebene PS-Externalisierung in direkter räumlicher Nähe zum adhärierten chlamydialen EB an der Wirtszell-PM ausgelöst wird (Abb. 6.6). Dabei sind ersten Annexin-Signale, als Marker für externalisiertes PS, bereits 5 Min nach Infektionsbeginn detektierbar. Die PS Externalisierung wird dabei höchstwahrscheinlich durch ein C. pneumoniae-spezifisches Protein induziert, da in der verwandten chlamydialen Spezies C. trachomatis nur wenige PS-positive adhärente Chlamydien detektiert werden konnten. Die Adhäsion und Internalisierung der Chlamydien erfolgt in den Cholesterinangereicherten und geordneten Lo-Phasen der humanen Plasmamembran (Fechtner, Galle et al. 2016). Auch die PS-Externalisierung der adhärierten Chlamydien erfolgt in diesen Lo-Phasen und unterstreicht einmal mehr die Wichtigkeit dieser Regionen für die chlamydiale Infektion (Abb. 6.7B). Aufgrund der rapiden Externalisierung des Lipids, binnen weniger Minuten, und dem Ausbleiben der Caspase 3 Aktivierung, sowie anderen Apoptose-spezifischer Marker, muss der Chlamydien-induzierte Mechanismus entkoppelt des Apoptose-abhängigen PS-Externalisierungsmechanismus ablaufen (Abb. 6.9B). Darüber hinaus ist im Zuge einer Infektion mit C. pneumoniae beschrieben, dass durch eine Aktivierung des PI3-Kinase-Akt-Signalweges und des MAP-Kinase-Erk-Signalwegs und die Expression des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1 ein Aktivierung apoptotischer Prozesse in der Wirtszelle verhindert wird (Sarkar, Moller et al. 2015).

Die Externalisierung von PS ist keineswegs ein Chlamydien-spezifischer Mechanismus. So induziert die Adhäsion des Gram-negativen Bakteriums Helicobacter pylori die Externalisierung von PS an der Wirtszellmembran. Die Externalisierung erfolgt über einen bislang ungeklärten Mechanismus, welcher aber ebenfalls von dem der Apoptose abweicht. Es wird vermutet, dass die Externalisierung von PS dem Bakterium als Pforte zur Translokation eigener Proteine über das Typ-IV-Sekretionssystem (T4SS) auf die zytoplasmatische Seite der humanen Plasmamembran dient. So ist die Lipid-Translokation essentiell für den T4SS-Transport des bakteriellen Proteins CagA in die Wirtszelle und damit die Pathogenität des Bakteriums. Eine typische Lipid-Bindedomäne konnte im CagA Protein zwar nicht identifiziert werden, jedoch scheinen Arginine in einer zentralen Domäne des Proteins bei der Translokation des Proteins und der anschließenden Lokalisierung an die interzelluläre Membranseite eine Rolle zu spielen (Murata-Kamiya, Kikuchi et al. 2010). Auch die Infektion mit Listeria monocytogenes induziert die Externalisierung von PS in der humanen Plasmamembran. In diesem Fall ist die PS-Externalisierung verknüpft mit der Schädigung der Wirtsmembran durch das Bakterium während der Formierung einer Membrankrümmung beim Austritt aus der Zelle. Der Mechanismus hinter der PS Externalisierung oder ein beteiligtes bakterielles Protein ist hier auch nicht bekannt. Es wird angenommen, dass die Bakterien, umhüllt von der PS-positiven Wirtsmembran, durch PS-Rezeptoren auf den Immunzellen, den Makrophagen, gebunden und internalisiert werden und so weitere Zellen infizieren können (Czuczman, Fattouh et al. 2014).

Auch einige Viren induzieren die Externalisierung von PS an ihren Wirtszellen. So translozieren Humanzellen, nach einer Infektion mit Influenza Viren PS auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran. Hierbei dient die durch das Virus induzierte PS Externalisierung auf die extrazelluläre Seite allerdings als Marker für die Aufnahme der infizierten Zellen durch Makrophagen und dendritischen Zellen und damit der Bekämpfung des Virus (Shiratsuchi, Kaido et al. 2000). Diese PS-Externalisierung wird allerdings vermutlich durch die Wirtszelle initiiert und geht einher mit der Aktivierung einer Caspase-Kaskade und folgt damit dem Mechanismus der Apoptose-spezifischen PS-Externalisierung. Im Gegensatz zu der chlamydialen PS Externalisierung erfolgt diese Virus-induzierte Lipid Translokation erst einige Stunden nach Infektionsbeginn und dient damit wahrscheinlich der Virus-Bekämpfung durch den Wirt. Andere umhüllte Viren, wie das Vacciniavirus, zeigen nach Verlassen der Wirtszelle eine Anreicherung von PS in der sie umhüllenden, ehemals eukaryotischen Membran. Diese Anhäufung von PS erfolgt wahrscheinlich über passive transversale Diffusion der Lipide in der nun nicht mehr durch die Wirtszelle regulierten Membran erfolgt. Es wird vermutet, dass diese Membran-Reorganisation die Aufnahme der Viren in der nächsten Infektionsrunde durch Makropinozytose stimulieren soll (apoptotische Mimikry) (Mercer and Helenius 2008).

Einzig die beobachtete PS-Externalisierung durch *Helicobacter pylori* ähnelt zeitlich der Chlamydien-induzierten PS-Externalisierung, wobei es sich bei *H. pylori*, im Gegensatz zu *C. pneumoniae*, nicht um ein intrazelluläres Pathogen handelt. Auch wenn die anderen beschriebenen PS-Translokationen mechanistisch weit entfernt von dem hier bei *C. pneumoniae* Ablauf sind, unterstreichen diese Beobachtungen doch die Wichtigkeit von PS bei der Infektion von humanen Zellen durch diverse Pathogene. Mehr noch, in den meisten Fällen dient die Anreicherung von PS in der extrazellulären Membranseite der verbesserten Aufnahme des Pathogens durch die Wirtszelle oder der Erhöhung der Pathogenität. Interessanterweise ist bei keinem der PS-externalisierenden Pathogenen ein bakterielles, respektive virales Protein bekannt, welches die Translokation des Lipids direkt, oder indirekt induzieren kann.

7.3 Auf den Spuren des Mechanismus von LIPP

C. pneumoniae induziert die Externalisierung von Phosphatidylserin (PS). Dabei wird PS nur in direkter Nähe zum adhärierten chlamydialen Elementarkörperchen (EB) transloziert. Es ist daher naheliegend, dass ein oberflächenlokalisiertes, *C. pneumoniae*-spezifisches Protein, wie LIPP, die Externalisierung des Lipids in der Wirtszellmembran induziert.

7.3.1 LIPP induziert die Externalisierung von Phosphatidylserin

Um die Möglichkeit der Phosphatidylserin (PS)-Externalisierung durch LIPP zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit humane Zellen mit rekombinantem LIPP (rLIPP) inkubiert. Die Anwesenheit von PS in der äußeren Seite der humanen Plasmamembran (PM) wurde mit Hilfe der beiden Fluoreszenz-markierten PS-Marker-Proteine Annexin und der rekombinant hergestellten Bindedomäne von Lactadherin (rLactC2) untersucht. Annexin ist ein Calciumabhängiger PS-Marker, während rLactC2 als Calcium-unabhängiger Marker für PS fungiert. Beide sind Membran-impermeabel und können daher nur an PS in der extrazellulären Seite einer humanen PM binden.

PS, welches in gesunden humanen Zellen ausschließlich auf der inneren Membranseite lokalisiert ist, kann in unbehandelten Zellen auch in diesen Experimenten nicht auf der extrazellulären Membranseite detektiert werden. Jedoch bewirkt die Adhäsion von rLIPP bereits nach wenigen Minuten eine durch Annexin-Bindung nachweisbare Translokation des Lipids auf die extrazelluläre Seite. Diese steigert sich mit zunehmender Protein-Konzentration und Inkubationsdauer. Andere Adhäsine wie rOmcB oder rPmp21 zeigen dagegen keine Wirkung auf die Lipid-Asymmetrie (Abb. 6.8). Auch durch rLactC2 lässt sich das PS auf der extrazellulären PM-Seite von rLIPP-behandelten humanen Zellen detektieren. Für diese Lipid-Translokation ist eine Bindung von rLIPP an die humane Zelle zwingend notwendig, da eine rLIPP Deletionsvariante ohne Bindedomäne (BD) kein PS mehr externalisieren konnte. Auch die bereits zuvor angesprochene Infektionserhöhende Domäne (IED), welche sowohl für die Stimulation der chlamydialen Internalisierung als auch für die Bindung von rLIPP an PS in den GUVs verantwortlich ist, ist für die PS Externalisierung essentiell. Der Verlust der IED führt, im Gegensatz zu einer internen Deletion zwischen der IED und der BD, zu einem Aussetzen der PS-Externalisierung (Abb. 6.9). Eine weitere Gemeinsamkeit der stimulierenden Wirkung auf die chlamydiale Internalisierung und der PS Externalisierung durch rLIPP ist die Abhängigkeit von Cholesterin in der Wirtszellmembran. Die Eliminierung des Cholesterins verhindert die PS Externalisierung. Eine Depolymerisierung des Wirtszell-Mikrotubuli-Zytoskeletts hat keinen Einfluss auf die PS-Externalisierung, wobei die Depolymerisierung des Aktin-Zytoskelett zur Akkumulation von Aktin Flecken unterhalb der humanen Plasmamembran führt und die Bindung von LIPP und die PS-Externalisierung durch das Protein auf diese Stellen beschränkte. Das veränderte Bindungsverhalten von rLIPP konnte bereits zuvor in Bindestudien beobachtet werden (Abb. 6.2D). Die PS Externalisierung innerhalb dieser Aktin-positiven Regionen der PM ist ähnlich der, in unbehandelten Zellen (Abb. 6.10). Wie auch zuvor bei der PS Externalisierung durch adhärierte Chlamydien ist auch bei der Inkubation von rLIPP mit den humanen Zellen keine Aktivierung von apoptotischen Markern, wie der Caspase 3 zu beobachten. (Abb. 6.9B). Die rLIPP Behandlung induziert also keine Apoptose in den Humanzellen. Daher kann der apoptotische Mechanismus zur Externalisierung von PS im Falle der rLIPP- bzw. Chlamydieninduzierten Lipid-Translokation ausgeschlossen werden.

Um die Rolle von LIPP bei der Chlamydien-induzierten PS Externalisierung abschließend zu untersuchen, wurde die Wirkung unterschiedlicher LIPP Proteinmengen auf infektiösen EBs bezüglich der PS Externalisierung hin untersucht. Da C. pneumoniae nicht genetisch manipulierbar ist, wurde die Anzahl an LIPP Molekülen auf der chlamydialen Oberfläche anderweitig reguliert. Zu diesem Zweck wurden die Chlamydien entweder mit anti-LIPP-Antikörpern oder mit rLIPP inkubiert. Die Antikörper-Bindung sollte die Anzahl frei verfügbarer LIPP Moleküle senken, während Letzteres die Zahl der LIPP Moleküle erhöhen sollte. Und tatsächlich ist die PS Externalisierung an der humanen Plasmamembran durch anti-LIPP-Antikörper vorbehandelte Chlamydien reduziert, während die PS-Externalisierung durch rLIPP vorbehandelten Chlamydien verstärkt wird (Abb. 6.11). Diese Ergebnisse implizieren, dass die durch C. pneumoniae induzierte PS-Externalisierung über LIPP initiiert wird. Die Bindung von LIPP an die humane Zelloberfläche erfolgt dabei Lipid-unabhängig über die BD. Daran anschließend interagiert die IED, vielleicht über amphipathische Helices, mit der humanen Zelle und induziert die Externalisierung des Phospholipids PS. Dabei ist der Mechanismus der PS-Externalisierung durch die chlamydiale Infektion und durch rLIPP unabhängig von dem in apoptotischen Zellen.

Es stellt sich die Frage wie das Protein die Lipid Translokation initiieren kann und welche Rolle humane Komponenten dabei spielen. So sitzen in der PM humaner Zellen diverse Lipid Transporter, die entweder Lipide von der inneren Seite auf die äußere transportieren (Floppasen), von der äußeren auf die innere Membranseite (Flippasen) oder Lipide in beide Richtungen translozieren können (Scramblasen) (Bevers and Williamson 2010). LIPP könnte mit diesen interagieren um eine PS-Externalisierung zu induzieren. Dafür müsste das Protein entweder die Aktivität von Flippasen hemmen, oder die Floppasen und Scramblasen aktivieren. Die Scramblasen Xkr8 und TMEM16F sind die am besten charakterisierten PS-Scramblasen (Suzuki, Umeda et al. 2010, Suzuki, Denning et al. 2013), weswegen zunächst eine Interaktion von rLIPP mit diesen beiden Lipid-Transportern untersucht wurde. Beide werden beschrieben als integrale Proteine, lokalisiert in der PM humaner Zellen (Suzuki, Umeda et al. 2010, Suzuki, Denning et al. 2013). Die Mikroskopie unbehandelter humane HEp-2 Zellen bestätigt dies nur teilweise (Abb. 6.12B). Einige Signale sind durchaus an der PM zu finden, doch sind die meisten Signale intrazellulär lokalisiert. Dies mag darin begründet sein, dass in diesen Experimenten endogenes Xkr8 markiert wurde, während in der Literatur zumeist ektopische-exprimierte und GFP-markierte Proteine untersucht wurden. Im Falle von TMEM16F ändert sich an der Lokalisierung der Scramblase auch nach Behandlung der humanen Zellen mit rLIPP nichts. Dagegen lokalisieren signifikant mehr Xkr8-Signale in rLIPP-positiven Regionen an der humanen PM (Abb. 6.12). Ob die Relokalisierung der Scramblase eine Folge der PS-Externalisierung, oder die PS Externalisierung durch die Interaktion von rLIPP mit der Scramblase erfolgt, muss in zukünftigen Experimenten untersucht werden. Möglich wäre, dass die LIPP-Bindung an die humane Zelle Signalproteine unterhalb der humanen PM aktiviert, die eine Rekrutierung der Scramblase ermöglichen. LIPP könnte auch direkt an Xkr8 in der humanen PM binden, auch wenn eine Interaktion beider Proteine in Ko-Immunopräzipitations-Experimenten nicht gezeigt werden konnte (Anhang Abb. 8.1B). Dies muss aber eine generelle Interaktion beider Proteine nicht ausschließen. Da Xkr8 nämlich nicht über anti-Xkr8-Antikörper-gekoppelte Beads aus den Lysaten präzipitiert werden konnte, kann auch eine zu geringe Xkr8-Menge in den Zellen der Grund für den fehlenden Nachweis einer Interaktion gewesen sein.

So sollte GFP-markiertes Xkr8 ektopisch in humanen Zellen exprimiert werden, um die Proteinmenge in den Zellen zu erhöhen. In diesen Zellen sollten die Ko-Immunopräzipitations-Experimente wiederholt werden. Außerdem sollten Xkr8-Knockout- oder Knockdown-Zelllinien hergestellt und mit rLIPP behandelt werden, um eine mögliche Rolle der Scramblase bei der LIPP-induzierten PS Externalisierung aufzuzeigen. Zur Untersuchung der Wichtigkeit

1

humaner Flippasen sollten LIPP-behandelte Zellen auf die Anwesenheit von erhöhtem Calciumionen (Ca²⁺) im Zytosol untersucht werden. Erhöhte Calcium-Konzentration deuten auf eine Aktivierung Calcium-abhängiger Flippasen hin. Eine Behandlung mit Calcium-Chelatoren, wie EGTA, könnte im Gegenzug die Aktivierung dieser Flippasen inhibieren.

Die initiale Bindung von LIPP muss an einem Protein erfolgen, auch wenn dieser humane Interaktionspartner immer noch identifiziert werden muss. Als gesichert gilt allerdings, dass die LIPP-induzierte PS-Externalisierung einer komplexen Membranstruktur bedarf. Dies wird durch die Abhängigkeit von Cholesterin und das Akkumulieren von gebundenem rLIPP und externalisiertem PS in Lo-Phasen der Membran unterstrichen (Abb. 6.2 und Abb. 6.10). Auch die PS Externalisierung in apoptotischen Zellen erfolgt in distinkten Domänen an der Plasmamembran, die ebenfalls GM1-positiv und damit Cholesterin-reich sind (Ishii, Mori et al. 2005). Diese Phasen oder Domänen zeichnen sich auch durch die Ansammlung spezifischer Proteine und einer geordneten Struktur aus, was diversen Pathogenen als Internalisierungsportal in die Zelle dient (Hartlova, Cerveny et al. 2010). Die Externalisierung von PS in diesen Domänen mag, neben der möglichen Aktivierung der dort lokalisierten Signalmoleküle, als zusätzlicher Initiator für die Aufnahme von Pathogenen durch die Humanzelle dienen. Es ist anzunehmen, dass die Externalisierung des PS durch rLIPP die Internalisierung der Chlamydien beeinflussen kann, da beide Prozesse durch dieselbe Domäne im Protein induziert werden. Darüber hinaus regulieren die negativ-geladenen Lipide die Endozytose der Humanzelle auf unterschiedliche Weise. So konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der Lipid-Asymmetrie und des damit einhergehenden Transportes von PS auf die extrazelluläre Seite zu einem Anstieg an endozytotischen Ereignisse führt (Zha, Genest et al. 2001). In Hefen dient die Externalisierung von Lipiden ebenfalls der Initiation der Endozytose. So wird postuliert, dass der Krümmung der Plasmamembran für die Formierung endozytotischer Vesikel eine Veränderung der Lipidkomposition vorausgeht. Der Rücktransport der Lipide auf die intrazelluläre Membranseite durch die Flippasen dient der Hefe dann bei der Vesikelformierung (Farge, Ojcius et al. 1999, Pomorski, Lombardi et al. 2003). PS ist gemeinsam mit den Phosphatidylinositolen (PIPs) der Hauptladungsträger in der inneren peripher-assoziierte Membranseite. Viele Proteine binden über elektrostatische Wechselwirkung an die Membran. Manche dieser Proteine präferieren, abhängig von ihrer Netto-Ladung, dabei entweder die PM, oder Kompartimente des Endomembransystems. Ein Wegfall der Oberflächenladung an der dem Zytosol-zugewandten Membranseite, durch Externalisierung oder Modifizierung der Lipide, resultiert in einem Abdocken dieser Plasmamembran-lokalisierten Proteine und der Relokalisierung von Proteinen des Endomembransystems. Dies liegt daran, dass sich die Membranen aufgrund der Lipid-Translokation im Hinblick auf ihrer Oberflächenladung angeglichen haben. So zeigt das Protein Rac1 eine starke PM-Lokalisierung, während das etwas geringer geladene Rac2 eher das Endomembransystem präferiert (Yeung, Gilbert et al. 2008). Mitglieder der Rho GTPase Familie, zu denen auch die Rac-Proteine zählen, sind auch an der Remodulierung des Aktinzytoskeletts und an der Regulation diverser Kinasen, wie der PI3 Kinase und Kinasen des Erk-Signalwegs, beteiligt. Dabei nehmen sie direkten Einfluss auf die Clathrin-abhängige und unabhängige Endozytose der Wirtszelle (Qualmann and Mellor 2003, Xiang, Stack et al. 2016). Sowohl dem Protein Rac 1 als auch der PI3 Kinase konnten bereits eine Rolle bei der Infektion durch C. pneumoniae nachgewiesen werden. Dabei wird Rac1 früh in der Infektion aktiviert und unterstützt die Aufnahme der Chlamydien durch die Wirtszelle. Der Mechanismus hinter dieser Aktivierung ist allerdings noch nicht geklärt (Hybiske and Stephens 2007, Zhang, Wang et al. 2014). Die Veränderung des Ladungspotentials und die damit einhergehende Veränderung der Proteinlokalisierung konnte außerdem auch bei der Formierung von Phagosomen beobachtet werden. (Yeung, Terebiznik et al. 2006). Phagosomen sind Vesikel, welche bei der Aufnahme von kleinen Partikeln bis hin zur Größe einiger Bakterien wie Coxiella spp., Mycobacterium spp. oder auch Chlamydia spp. entstehen. Durch die Externalisierung des negativ-geladenen Lipids PS könnte LIPP die Lokalisierung und Funktion von humanen Proteinen, welche an der Endozytose der Wirtszelle involviert sind, regulieren und auf diese Weise zur Aufnahme der Chlamydien beitragen. Außerdem könnte die Veränderung der Lipidkomposition innerhalb der Membranseiten einen direkten Einfluss auf die Integrität und Flexibilität der Membran haben. Die physikalischen Eigenschaften einer Membran lassen sich durch die Integration eines Proteins manipulieren (siehe auch Kapitel 7.3.2).

7.3.2 LIPP penetriert die humane Plasmamembran um Phosphatidylserin zu externalisieren

Für die Integration von LIPP in die Plasmamembran der Wirtszelle ist eine Membrandurchspannende Domäne nötig. Um die Lokalisierung des Proteins an der humanen

Plasmamembran studieren zu können, wurden N- und C-terminale Einzel-Cystein-Varianten von LIPP mit Biotin markiert und an Humanzellen adhärieren gelassen. Durch nachfolgende de-Biotinylierung wurde sämtliche extrazellulär-zugängliche Biotin-Reste abgespalten und die Lokalisierung des Proteins an der Membran anhand des zurückgebliebenen Biotins bestimmt. Das Ergebnis zeigt, dass der C-Terminus des Proteins in der Plasmamembran sitzt oder diese sogar durchdringt, während der N-Terminus extrazellulär verbleibt (Abb. 6.13). Nachdem dies auf die Anwesenheit einer Transmembrandomäne (TM) im C-Terminus hinwies, wurde im LIPP-Abschnitt von AS 396 bis AS 426 eine potentielle TM mit Hilfe des bioinformatischen Programms PHOBIUS vorhergesagt. Interessanterweise lag die postulierte TM in einem Bereich des Proteins der in vorangegangenen Arbeiten bereits als Selbstinteraktionsdomäne (SID) von LIPP identifiziert wurde (Galle 2013). Und tatsächlich scheint die TM essentiell für die Interaktion des Proteins mit sich selbst zu sein. Die Auswertung des Laufverhalten von LIPP in Nativen-Proteinen suggeriert, dass das Volllängenprotein (VL-Protein) Komplexe aus 10 - 15 LIPP Einzelmolekülen bildet. Der Verlust der TM hingegen verhindert diese Komplexbildung (Abb. 6.14). Erste Daten der Δ TM-Variante in MALS Experimenten bestätigen diese Beobachtung. Eine Auswertung des VL-Proteins war aufgrund des Kurvenverlaufs im Chromatogramm leider nicht möglich (Abb. 6.14). Dies kann darin begründet gewesen sein, dass Degradationsprodukte von rCPn0473, inklusive Selbstinteraktionsdomäne, mit den Proteinkomplexen interagierten und dies die MALS-Messung behinderte. Eine Variante ohne TM zeigt darüber hinaus auch eine stark reduzierte Bindung an PC-haltige Liposomen (Abb. 15). Das VL-Protein lässt sich hingegen mit den Liposomen präzipitieren. Da in diesem Fall kein PS in den Liposomen integriert ist, kann eine stabile Interaktion des Proteins u.a. durch die Integration über eine TM-Domäne erklärt werden. Das diese wahrscheinlich auch Membran-durchspannend ist zeigen die Adhäsionsexperimente mit Carboxyfluorescein (CF)gefüllten GUVs. Während VL-Protein behandelte GUVs über die Zeit porös werden, sichtbar am schwindenden CF-Signal, bleiben ∆TM-behandelte GUVs impermeabel (Abb. 6.15). Beide Proteine sind in der Lage an die PS-haltigen GUVS über die N-terminale IED Domäne zu binden. Allerdings scheint die Bindung von ∆TM ein wenig schwächer zu sein, als die des VL-Proteins. Neben dem schwindenden CF-Signal in den VL-Protein-behandelten GUVs kann mit kurzer Verzögerung ein Eintritt des Alexa594-Farbstoffes beobachtet werden. Dieser Farbstoff ist an das rLIPP gekoppelt, was vermuten lässt, dass das VL-Proteine oder Proteinfragmente über die Zeit in das GUV Lumen gelangen können. Das dies erst nach dem Verschwinden des CF-Signals erfolgt, deutet darauf hin, dass LIPP durch Inkorporation über die TM zunächst kleine Poren in den GUVs bildet durch die das CF austreten kann. Über die Zeit bildet LIPP einen größeren Proteinkomplex und eine größere Pore in der Membran, durch die Alexa-594-markierte Einzelproteine oder Proteinfragmenten den Eintritt ins GUV Lumen ermöglicht werden. Die GUV Membran bleibt dabei über den gesamten Zeitraum erhalten und zerbricht nicht.

Die detaillierte Analyse der Region um die TM (AS 371 - AS 480) mit dem Programm PHYRE ergab, dass die als TM identifizierte Region eine lange α -Helix zu bilden scheint, die von AS 392 bis AS 437 reicht (Abb. 7.2A). Die Helix lässt sich mit Hilfe einer Helix-Rad Projektion durch das Programm Heli Quest in zwei aufeinander folgenden Helices (Helix 1: AS 392 - AS 409 und Helix 2: AS 410 – AS 428) anordnen. Man erkennt deutlich einen hydrophoben Bereich in den Helices mit den Aminosäuren Alanin (A), Phenylalanin (F) Isoleucin (I), Valin (V) und Tryptophan (W). Diese bilden eine hydrophobe Oberfläche mit dem AS-Motiv A-A-F-A-I-L-A-V-W-F (Helix 1) respektive F-A-I-V-L-F (Helix 2). Demgegenüber befinden sich in beiden Helices Regionen aus polaren Aminosäuren (Abb. 7.2B). Diese Anordnung aus hydrophoben Bereichen und gegenüberliegenden polaren Bereichen einer α -Helix, ist, wie bereits zuvor in den PSbindenden Bereichen des LIPP N-Terminus besprochen (siehe Kapitel 7.1.2), ein Charakteristikum von amphipathischen Helices. Im Gegensatz zu den zuvor identifizierten amphipathischen Helices überwiegen in diesem Falle allerdings ungeladene polare Aminosäuren in der polaren Region der Helices. Vier der sieben (Helix 1) bzw. fünf der sieben (Helix 2) polaren Aminosäuren, Serin (S) und Glutamin (Q) und Glycerin (G), welches in Nachbarschaft zu polaren AS durch das Programm ebenfalls als polare AS eingestuft wird, sind ungeladen. Sie bilden eine polare Oberfläche mit dem Motiv R-Q-V-K-S-D-G-S (Helix 1) respektive S-R-Q-S-S-S (Helix 2) (K=Lysin, D=Asparaginsäure, V=Valin). Die Hydrophobizität der Aminosäuren, sowie das hydrophobe Moment liegen über die gesamte Länge der Sequenz konstant bei etwa 0.5 und damit relativ hoch.



Abb. 7.2: Bioinformatische Analyse der Transmembran Domäne (TM)

A und **B**: Schematische Darstellung der Aminosäurekomposition der Aminosäuren (AS) 361 – AS 480 im C-Terminus von CPn0473 (LIPP). Abgebildet sind die Aminosäuresequenz im Einbuchstaben-Code, dessen Sekundärstruktur (SS) mit Vorhersage-Wahrscheinlichkeit (W.-keit) durch das bioinformatische Programm PHYRE 2 (A). Die SS wird dabei unterteilt in Alpha Helices, Beta Strands oder Disordered und ist in Bezug auf die betrachtete Sequenz in Prozent angegeben. Die helikale Projektion der durch PHYRE 2 postulierten zwei α -Helices durch das Programm Heli Quest ist in(B) dargestellt. Die Hydrophobizität (H), das hydrophobe Moment (μ H) und die Netto Ladung der postulierten Helices ist angegeben. Der Pfeil gibt die Richtung des hydrophoben Moments an, wobei die Länge des Pfeils mit dessen Stärke korreliert.

C: Darstellung der Hydrophobizität und des hydrophoben Moments über die gesamte TM (AS 396 - AS 426) durch das bioinformatische Programm Heli Quest.

Wie bereits in Kapitel 7.1.2 dargelegt, unterscheiden sich die physikalischen Parameter und die Komposition der Aminosäuren in den Helix-Regionen je nach Proteinklasse. Ein Merkmal von amphipathischen Helices in integralen Membranproteinen ist die Häufung ungeladener Aminosäuren in der polaren Helix-Region. Es wird angenommen, dass sich integrale Membranproteine in biologischen Membranen in Proteinkomplexen so anordnen, dass sie mit der hydrophoben Oberfläche der amphipathischen Helices den hydrophoben Bereichen der Membran, zugewandt sind. Die polare Seite liegt damit auf der Membran-abgewandten und anderen Membranproteinen-zugewandten Seite (Segrest, De Loof et al. 1990). Bei einer möglichen Komplexbildung des Proteins in der Membran, wie beispielsweise einer Pore, ist eine Komposition aus ungeladenen AS statt der Anhäufung geladener, sich abstoßender AS bevorzugt. Dies trifft auch für die TM von LIPP zu. Die bioinformatischen Analysen in Kombination mit den experimentellen Daten legen nahe, dass LIPP in der Lage ist in die humane Plasmamembran zu inserieren. Die Insertion eines Peptids, oder eines Proteins in eine Phospholipid-Membran kann dabei zu einer Translokation von Lipiden führen. So wurde beim Adenylatcyclase-Toxin von Bordetella pertussis beobachtet, dass sich das Toxin in reine Phospholipid-Membranen von Liposomen inserieren kann. Der darauffolgende Zusammenbruch der Permeabilitätsbarriere, welche mit einem Austritt von wässriger Lösung aus dem Liposomen-Lumen einhergeht, führt zu einer Translokation von Lipiden in der Membran (Martin, Requero et al. 2004). Auch das Toxin Melittin von Apis mellifera inseriert in synthetische Membranen und induziert hierbei einen ungerichteten Transport von Lipiden auf die extrazelluläre Seite (Smith, Separovic et al. 1994, Yang, Harroun et al. 2001, Anglin, Brown et al. 2009). Ebenso verhält es sich bei synthetischen Peptiden, die in der Lage sind Membranen zu penetrieren (Boon and Smith 2001, Boon and Smith 2002). Jedoch konnte keinem dieser Toxine bzw. Peptide eine spezifische und direkte Lipid-Interaktion nachgewiesen werden. Auch ist nicht geklärt, ob die Proteine eine Translokation ausschließlich an reine, synthetische Membranen oder aber auch an einer biologischen Membran induzieren können. LIPP ist damit das bisher einzige Protein, welches spezifisch mit einem Phospholipid interagiert und dieses an humanen Zellen externalisiert. Offen bleibt allerdings die Frage, ob im Rahmen der Externalisierung von PS an humanen Zellen auch weitere Lipide transloziert werden. Dies bedarf weiterer, zukünftiger Experimente.

Es ist anzunehmen, dass die Integration von LIPP in die Membran nicht nur bei der Externalisierung von PS essentiell ist, sondern darüber hinaus auch noch einen Einfluss auf die Flexibilität und Krümmung der Wirtszellmembran hat. Denn sowohl integrale Membranproteine, als auch Phospholipide können die Krümmung einer Membran entscheidend beeinflussen. Relevant hierfür ist das Profil der Proteine bzw. der Lipide. Im Falle der Lipide betrachtet man das Verhältnis der Lipidkopfgruppe zu den Ausmaßen der Fettsäuren. Sind beide Molekülteile vergleichbar groß spricht man von Typ 0 oder zylindrischen Lipiden. Ist die Kopfgruppe kleiner als die Fettsäure nennt man die Lipide Typ I oder kegelförmige Lipide. Die Gruppe der Typ II Lipide, auch verkehrt-kegelförmige Lipide genannt, besitzen große Kopfgruppen im Vergleich zu ihren Fettsäuren. Die Lipide selbst besitzen weder eine positive noch eine negative Krümmung (McMahon and Boucrot 2015).



negative Membran-Krümmung

positive Membran-Krümmung

Abb. 7.3: Die Lipid-und Protein-Geometrie bestimmt die Krümmung einer Membran

Schematische Darstellung der Form diverser Lipide (A) und Proteine (B) aufgrund ihrer physiochemischen Eigenschaften und ihr Einfluss auf die Krümmung einer Membran (McMahon and Boucrot 2015). In Blau dargestellt ist die polare Kopfgruppe. PE: Phosphatidylethalonamin, PA: Phosphatidsäure, LPC: Lysophosphatidylcholin, PIP: Phosphatidylinositol, PC: Phosphatidylcholin, PS: Phosphatidylserin.

Die Ansammlung der Lipid-Typen I und II können innerhalb einer Membran eine räumliche Spannung auslösen, die durch Krümmung der Membran selbst wieder gelöst werden kann. Dabei induzieren Typ I Lipide eine Spannung in der Membran, die durch eine sogenannte negative Krümmung, also ein Zusammenführen der Lipidkopfgruppen, der Membran aufgelöst wird. Eine Akkumulation von Typ II Lipiden bewirkt hingegen eine Spannung, die durch eine positive Krümmung in der Membran, d.h. das Zusammenführen der Lipidschwänze bei gleichzeitiger Abstoßung der Lipidkopfgruppen, wieder gelöst wird. Zylindrische Lipide, wie die Phospholipide PC und PS, induzieren hingegen keine direkte Krümmung (Abb. 7.3A). Allerdings wurde beschrieben, dass PS unter bestimmten äußeren Bedingungen die Krümmung der Membran in negativer Orientierung fördern kann. Dies ist vermutlich mit einer Neutralisierung der negativen Ladung des Lipids verknüpft (Fuller, Benatti et al. 2003). Peripher-adhärierte Proteine, oder Proteine, welche nur eine Seite einer Lipiddoppelschicht durchdringen, induzieren über amphipathische Helices eine positive Krümmung. Integrale Proteine hingegen induzieren eine Krümmung abhängig von der Form des inserierten Proteinabschnitts (Drin and Antonny 2010, McMahon and Boucrot 2015). Der Effekt ist umso stärker, je mehr Proteine einer Art lokal, beispielsweise durch Selbstinteraktion, akkumulieren (Abb. 7.3B). Zum Zeitpunkt dieser Arbeit konnten noch keine Daten zur Struktur von LIPP gewonnen werden, weswegen man nur vermuten kann, dass die Integration des Proteins über die TM und die mögliche Komplexbildung mehrerer LIPP Moleküle eine Krümmung in der Membran auslösen können. Dieser Eingriff in die Membranstruktur könnte, neben der PS-Externalisierung, zur Aufnahme der Chlamydien in die Wirtszelle und zur Stimulation der chlamydialen Internalisierung durch rLIPP beitragen.

7.3.3 LIPP externalisiert Phosphatidylserin

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass das chlamydiale Protein LIPP das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) binden kann und die Externalisierung dieses Lipids in biologischen Membranen induziert. Zugleich ist das Protein in der Lage, Phospholipid-Membranen zu penetrieren. Wie bereits zuvor erwähnt ist die Translokation von Lipiden nach Penetration der Membran bereits bei anderen Proteinen beobachtet worden. Aus diesem Grund wurde die Möglichkeit einer direkten PS-Translokation durch rekombinantes LIPP (rLIPP) mit Hilfe von asymmetrischen GUVs mikroskopisch getestet. Asymmetrische GUVs zeichnen sich durch die Anwesenheit einer definierten Lipidspezies auf nur einer Seite der Phospholipid-Membran aus und imitieren damit die Asymmetrie einer humanen Plasmamembran ohne Proteine. Die Anwesenheit von PS in der äußeren Membranseite kann durch das Marker-Protein Lactadherin (rLactC2) aufgezeichnet werden. Da der Eintritt von markierten Proteinen in das Lumen von symmetrischen GUVs bereits in vorangegangen Experimenten im Rahmen der Interaktion von rLIPP mit der GUV Membran über die Zeit beobachtet werden konnte (Abb. 6.15), wurde in diesen Experimenten insbesondere darauf geachtet, dass keinerlei Anreicherung von fluoreszierenden Proteinen im Lumen der GUVs erfolgt. Eine Membranfärbung ohne die Anreicherung des Marker-Proteins im Lumen sollte daher nur durch Bindung von Lipiden auf der Membran-Außenseite möglich sein. Tatsächlich zeigt die Inkubation der asymmetrischen GUVs mit rLIPP bereits nach wenigen Minuten eine deutliche Translokation des Lipids (Abb. **6.16**). Da keine Proteinsignale im Lumen der GUVs detektierbar sind, kann davon ausgegangen werden, dass die Integrität der GUVs im gewählten Zeitraum nicht beeinträchtigt ist und rLIPP die Translokation des Lipids auf die äußere Seite der Membran ausgelöst hat. Damit ist rLIPP in der Lage PS, ohne die Unterstützung humaner Proteine, von der Lumenseite auf die äußere Seite der Membran zu bewegen. Die erste Bindung von LIPP an die GUVs erfolgt entweder über die Interaktion mit einzelnen PS Lipiden, die bereits passiv in die äußere Membranseite transportiert wurden, oder aber durch die elektrostatische Interaktion mit der Membran selbst. Denkbar ist, dass LIPP in der Lage ist schwach an Membranen jeglicher Komposition zu binden. Daraufhin integriert das Protein, entweder als Oligomer in die GUV-Membran, oder oligomerisiert im Anschluss an die Integration in die Membran. Die Bindung wird allerdings erst dann stabil, wenn LIPP spezifisch mit PS interagiert. Der darauffolgende Export von PS in die äußere Membranseite erlaubt es dann weiteren LIPP Molekülen an die Membran zu binden. Dies könnte auch erklären, warum LIPP in Bindestudien an humanen Zellen über die Zeit immer stärker bindet. Je mehr PS externalisiert wird, desto mehr LIPP Moleküle sind in der Lage zu binden. Aufgrund der hohen Geschwindigkeit der PS Translokation kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Externalisierung von PS durch rLIPP nicht einfach um einen passiven transversalen Transport des Lipids handelt. Die Kinetik des Lipidtransports über eine Membran hinweg wird in der Regel mit Hilfe von Floreszenz-markierten Lipiden, den NBD-Lipiden (7-nitrobenz.2.oxa.1,3-diazol-4-yl) ermittelt. Die modifizierten Lipide werden in die Membran integriert und über die Zeit von der äußeren, auf die innere Membranseite transportiert. Dort sind sie geschützt vor einer erneuten Extraktion aus der Membran oder dem Ausbleichen (Quenchen) der modifizierten Kopfgruppe. Innerhalb von 30 Minuten werden in Liposomen Experimenten weniger als 1 % PC oder PE und etwa 2 % PS oder PA passiv transloziert. Die Inkorporation eines Lipid-Transporters steigert die Translokation auf das 3fache für PC, 4fache für PE, 6fache für PS und sogar auf das 10fache für PA. Auch innerhalb einer Klasse von Lipiden gibt es signifikante Unterschiede bei der Translokation. So verlangsamt sich der Transport, je länger die Fettsäureschwänze eines Lipids sind. Die Aktivierungsenergie zur Translokation beträgt zwischen 15 und 50 Kcal/mol (Geldwerth, de Kermel et al. 1991).



Abb. 7.4: Zwei Modelle zur Proteinintegration in eine Membran

Schematische Darstellung der Integration von Membran-durchspannenden Proteinen nach dem Fass-Modell (links) und dem Ringporen-Modell (rechts) ((Yang, Harroun et al. 2001)). Lipide auf der inneren Membranseite sind grün dargestellt, Lipide auf der äußeren Membranseite weiß. Ein möglicher Austausch von Lipiden der beiden Lipidseiten ist dargestellt.

Wie genau LIPP in der Membran verankert ist, bleibt allerdings noch zu beweisen. In der Natur gibt es unter den Zellmembran-penetrierende Proteine zwei unterschiedliche Modelle (Yang, Harroun et al. 2001). Zum einen können Proteine, wie das Peptidantibiotikum Alamethicin, senkrecht in eine Membran integrieren ohne diese direkt zu stören, was als Fass-Modell bekannt ist (Qian, Wang et al. 2008). Zum anderen können die Proteine bei der Penetration eine Biegung der Membran induzieren, was zur Folge hat, dass sich die Phospholipid-Kopfgruppen der äußeren Membran entlang des inserierten Proteins anlagern und die innere und äußere Membranschicht Kontakt aufnehmen (Ringporen-Modell). Während ein Austausch von Lipiden zwischen den beiden Membranseiten im Falle des Fass-Modells energetische deutlich anspruchsvoller wäre, ist im Falle des Ringporen-Modells ein Austausch der Lipide zwischen den beiden Membranseiten einfach möglich (Abb. 7.4). Im Falle des bereits zuvor angesprochenen Toxins Melittin wird davon ausgegangen, dass das Protein nach dem Ringporen-Modell in die Membran integriert und so die komplette Doppellipidschicht durchspannt (Allende, Simon et al. 2005, Sengupta, Leontiadou et al. 2008). Auch der humane Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF2) integriert, vermutlich über das Ringporen-Modell, in die humane Membran. In diesem Fall geschieht die Integration allerdings von der

1

zytoplasmatischen Seite als Teil eines unkonventionellen Sekretionsmechanismus. Nach der Bindung an die PM über Phosphatidylinositole, erfolgt eine Oligomerisierung des Proteins, was zur Bildung einer Pore in der Membran führt. Nach der Translokation des Proteins bindet FGF2 an Heparansulfate auf der Zelloberfläche (Steringer, Muller et al. 2015). Sollte LIPP, ähnlich des Melittins und des FGF2, die Membran mittels des Ringporen-Modells durchspannen wäre es auf diese Weise auch möglich mit Lipiden, wie PS, oder Proteinen, involviert in Endozytose-Prozessen, auf der intrazellulären Seite der humanen Plasmamembran zu interagieren. Weiterhin muss bedacht werden, dass die Integration von Proteinen zumindest kurzfristig das Risiko einer Verletzung der Plasmamembran mit sich bringt. In eukaryotischen Zellen ist eine solche Verletzung der Membran von einer vorübergehenden Externalisierung von PS begleitet. Experimente konnten zeigen, dass diese PS-positiven Domänen auf der Zelloberfläche durch endozytotische Prozesse über die Zeit von der Zelle wieder aufgenommen werden. Der genaue Ablauf dieser Membran-Reparatur ist allerdings noch nicht verstanden (Draeger, Monastyrskaya et al. 2011). Auch Chlamydien könnten sich diesen Mechanismus zu Nutze machen und durch die Integration von LIPP und die drauffolgende Translokation des Proteins auf die zytosolische Membranseite der humanen Zelle eine PS Externalisierung induzieren. Im Zuge der Reparatur des betroffenen, PS-positiven Bereichs der Membran durch Endozytose würde das Chlamydium daraufhin von der Wirtszelle aufgenommen.

7.4 LIPP, die chlamydiale Phosphatidylserin-Translokase

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das chlamydiale Protein CPn0473 (LIPP) spät in der Infektion auf die Oberfläche der infektiösen, chlamydialen Elementarkörperchen (EBs) geladen wird. Dort lokalisiert das Protein mit anderen Adhäsinen, wie dem OmcB und den Pmp Proteinen. Nach der initialen und reversiblen Adhäsion von OmcB an Heparansulfat-ähnlichen Glykosaminglykanen erfolgt die stabile Adhäsion über die Pmp-Proteine und LIPP (Moelleken and Hegemann 2008, Fechtner, Stallmann et al. 2013). Dabei interagieren beide Proteine zunächst mit humanen proteinösen Interaktionspartnern. Pmp21 interagiert mit dem humanen EGF-Rezeptor, während LIPP an ein noch nicht bekanntes humanes Protein bindet (Abb. 7.5B,C) (Moelleken, Schmidt et al. 2010, Molleken, Becker et al. 2013).



Abb. 7.5: Die funktionelle Rolle von LIPP in der chlamydialen Infektion

A: Schematische Darstellung des CPn0473 (LIPP) Moleküls. Die drei funktionell relevanten Domänen und deren Funktion sind angegeben. Die durch bioinformatische Programme identifizierten amphipathischen Helices sind in grün markiert. IED: infektionserhöhende Domäne, BD: Bindedomäne, SID: Selbstinteraktionsdomäne. Aminosäurepositionen sind markiert. B: Schematische Darstellung eines möglichen Mechanismus der CPn0473 (LIPP)-induzierten PS Externalisierung. Der N- und C-Terminus des Proteins sind eingezeichnet. In grün ist Phosphatidylserin, in grau Cholesterin und in weiß sind die übrigen Lipide markiert. Im Protein sichtbar sind die drei Domänen aus (A). **C:** Modell der Adhäsion und Internalisierung durch Chlamydia pneumoniae. OmcB: Außenmembrankomplex Protein B, T-III-SS: Typ-3-Sekretionssystem, Pmp21: Polymorphes Membranprotein 21, EGFR: Wachstumsfaktor-Rezeptor, GAG:

Glykosaminoglykan. Als roter Pfeil ist der Eintritt des Chlamydiums per Endozytose eingezeichnet.

Die Adhäsion der Proteine erfolgt in Cholesterin-reichen geordneten lo-Phasen der humanen Plasmamembran (PM). Diese sind, aufgrund der spezifischen Lokalisierung von Rezeptoren und intrazellulären Adapterproteinen, auch für die nachfolgende Internalisierung des Bakteriums essentiell (Korhonen, Puolakkainen et al. 2012). Als Folge des stabilen Kontakts des Chlamydiums mit der Wirtszelle werden Typ-III-Sekretionsnadeln auf der chlamydialen Oberfläche aktiviert und Effektorproteine sekretiert (Clifton, Fields et al. 2004, Betts-Hampikian and Fields 2011). Die Interaktion von Typ-III-sekretierte Proteinen, wie CPn0678, welches das humane Nexin SNX9 rekrutiert und mit diesem interagiert, sowie die Interaktion von CPn0572 (TARP Homolog) mit dem humanen Aktin-Zytoskelett vermittelt daraufhin die Internalisierung des Chlamydiums durch die Wirtszelle (Clifton, Dooley et al. 2005, Murra 2009, Hänsch 2016). Auch LIPP ist an der Internalisierung des Chlamydiums direkt beteiligt. Nach der initialen Adhäsion von LIPP an die Wirtszelle, über eine Bindedomäne (BD) im C-Terminus, befindet sich das Protein in räumlicher Nähe zu den Phospholipiden der humanen Membran (Abb. 7.5B,C). Die Interaktion mit der lipidösen Oberfläche der Humanzelle induziert zunächst die Ausbildung amphipathischer Helices in einem hydrohoben Bereich, C-terminal der BD (Abb. 7.5A,B). Dies führt zur Integration des C-Terminus in die humane PM. Ob dieser Interaktion mit einer Übertragung des Proteins von der chlamydialen Oberfläche einhergeht ist aufgrund des komplexen, nun folgenden Mechanismus anzunehmen, aber noch nicht bewiesen. Die Abspaltung könnte durch Auflockerung des chlamydialen Außenmembrankomplexes mit Hilfe der humane Disulfid-Isomerase PDI erfolgen, deren enzymatische Aktivität für den Eintritt von C. trachomatis in die Wirtszelle bereits beobachtet werden konnte (Abromaitis and Stephens 2009). Ob die nun folgende Externalisierung des PS von humanen Lipid-Transportern, wie Xkr8 unterstützt wird ist noch nicht geklärt. Integriert in die Membran über den C-Terminus, bilden 10-15 LIPP Moleküle einen großen Ringporenkomplex, welcher es dem Protein ermöglicht die humane PM zu durchspannen und das auf der Membran-Innenseite lokalisierte Phospholipid Phosphatidylserin (PS) zu externalisieren (Abb. 7.5B,C). Die enge Interaktion von LIPP mit den humanen Phospholipiden induziert die Bildung amphipathischer Helices im N-Terminus und die Bindung des externalisierten PS durch diese. Die Insertion von LIPP in die humane PM und die darauffolgende Externalisierung von PS induzieren eine Krümmung der Membran um das Chlamydium. Die Translokation von PS auf die äußere Membranseite führt außerdem zur
Relokalisierung von Membran-assoziierten humanen Proteinen, wie den Rac-Proteinen, im Endomembransystem (Abb. 7.5C). Dies, wie auch die Aktivierung von SNX9 durch CPn0678 rekrutiert die Kinasen PI3K und PI5K (Hänsch 2016). Die Synthese von PI(4,5)P₂ respektive PI(3,4,5)P₃ durch die beiden Kinasen ist Teil der humanen Endozytose Maschinerie und wird auch im Zuge einer Infektion durch Chlamydien ausgenutzt (Molleken and Hegemann 2017). Des Weiteren stimulieren sowohl SNX9 als auch die Rac Proteine über Adapterproteine die Polymerisierung des Aktinzytoskeletts unterhalb der Plasmamembran was zur Aufnahme des Chlamydiums und Stabilisierung der frühen Inklusion beitragen kann. Somit stimulieren die beiden chlamydialen Proteine LIPP auf der äußeren und CPn0678 an der inneren Membranseite gemeinsam die Endozytose des adhärierten Chlamydiums durch die Wirtszelle.

Damit übernimmt LIPP sowohl bei der Adhäsion als auch bei der Internalisierung der Chlamydien eine wichtige Rolle. LIPP ist das erste bakterielle Protein, welches von der extrazellulären Seite einer humanen Plasmamembran ein Phospholipid externalisiert, um die Internalisierung eines Pathogens zu ermöglichen.

LITERATURVERZEICHNIS

Abromaitis, S. and R. S. Stephens (2009). "Attachment and entry of Chlamydia have distinct requirements for host protein disulfide isomerase." <u>PLoS Pathog</u> **5**(4): e1000357.

Ajonuma, L. C., K. L. Fok, L. S. Ho, P. K. Chan, P. H. Chow, L. L. Tsang, C. H. Wong, J. Chen, S. Li, D. K. Rowlands, Y. W. Chung and H. C. Chan (2010). "CFTR is required for cellular entry and internalization of Chlamydia trachomatis." <u>Cell Biol Int</u> **34**(6): 593-600.

Alder-Baerens, N., Q. Lisman, L. Luong, T. Pomorski and J. C. Holthuis (2006). "Loss of P4 ATPases Drs2p and Dnf3p disrupts aminophospholipid transport and asymmetry in yeast post-Golgi secretory vesicles." <u>Mol Biol Cell</u> **17**(4): 1632-1642.

Allende, D., S. A. Simon and T. J. McIntosh (2005). "Melittin-induced bilayer leakage depends on lipid material properties: evidence for toroidal pores." <u>Biophys J</u> 88(3): 1828-1837.

Andersson, M., J. Sjostrand, A. Petersen, A. K. Honarvar and J. O. Karlsson (2000). "Caspase and proteasome activity during staurosporin-induced apoptosis in lens epithelial cells." <u>Invest</u> <u>Ophthalmol Vis Sci</u> **41**(9): 2623-2632.

Anglin, T. C., K. L. Brown and J. C. Conboy (2009). "Phospholipid flip-flop modulated by transmembrane peptides WALP and melittin." <u>J Struct Biol</u> **168**(1): 37-52.

Arkhipov, A., Y. Yin and K. Schulten (2008). "Four-scale description of membrane sculpting by BAR domains." <u>Biophys J</u> **95**(6): 2806-2821.

Avinoam, O., M. Schorb, C. J. Beese, J. A. Briggs and M. Kaksonen (2015). "ENDOCYTOSIS. Endocytic sites mature by continuous bending and remodeling of the clathrin coat." <u>Science</u> **348**(6241): 1369-1372.

Badour, K., M. K. McGavin, J. Zhang, S. Freeman, C. Vieira, D. Filipp, M. Julius, G. B. Mills and K. A. Siminovitch (2007). "Interaction of the Wiskott-Aldrich syndrome protein with sorting nexin 9 is required for CD28 endocytosis and cosignaling in T cells." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **104**(5): 1593-1598.

Barbour, A. G., K. Amano, T. Hackstadt, L. Perry and H. D. Caldwell (1982). "Chlamydia trachomatis has penicillin-binding proteins but not detectable muramic acid." <u>J Bacteriol</u> **151**(1): 420-428.

Basse, F., J. G. Stout, P. J. Sims and T. Wiedmer (1996). "Isolation of an erythrocyte membrane protein that mediates Ca2+-dependent transbilayer movement of phospholipid." <u>J Biol Chem</u> **271**(29): 17205-17210.

Beatty, W. L., G. I. Byrne and R. P. Morrison (1993). "Morphologic and antigenic characterization of interferon gamma-mediated persistent Chlamydia trachomatis infection in vitro." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **90**(9): 3998-4002.

Bebear, C. and B. de Barbeyrac (2009). "Genital Chlamydia trachomatis infections." <u>Clin Microbiol</u> <u>Infect</u> **15**(1): 4-10.

Becker, E. (2013). <u>Characterization of the chlamydial Pmp adhesin family</u>. PhD PhD, Heinrich-Heine-Universität.

Beeckman, D. S. and D. C. Vanrompay (2009). "Zoonotic Chlamydophila psittaci infections from a clinical perspective." <u>Clin Microbiol Infect</u> **15**(1): 11-17.

Bernfield, M., M. Gotte, P. W. Park, O. Reizes, M. L. Fitzgerald, J. Lincecum and M. Zako (1999). "Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans." <u>Annu Rev Biochem</u> **68**: 729-777.

Beswick, E. J., A. Travelstead and M. D. Cooper (2003). "Comparative studies of glycosaminoglycan involvement in Chlamydia pneumoniae and C. trachomatis invasion of host cells." <u>J Infect Dis</u> **187**(8): 1291-1300.

Betts-Hampikian, H. J. and K. A. Fields (2011). "Disulfide bonding within components of the Chlamydia type III secretion apparatus correlates with development." <u>J Bacteriol</u> **193**(24): 6950-6959.

Bevers, E. M., P. Comfurius and R. F. Zwaal (1983). "Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation." <u>Biochim Biophys Acta</u> **736**(1): 57-66.

Bevers, E. M. and P. L. Williamson (2010). "Phospholipid scramblase: an update." <u>FEBS Lett</u> **584**(13): 2724-2730.

Birkelund, S., M. Morgan-Fisher, E. Timmerman, K. Gevaert, A. C. Shaw and G. Christiansen (2009). "Analysis of proteins in Chlamydia trachomatis L2 outer membrane complex, COMC." <u>FEMS</u> <u>Immunol Med Microbiol</u> **55**(2): 187-195.

Blasi, F., P. Tarsia and S. Aliberti (2009). "Chlamydophila pneumoniae." <u>Clin Microbiol Infect</u> **15**(1): 29-35.

Blumberg, P. M., N. Kedei, N. E. Lewin, D. Yang, G. Czifra, Y. Pu, M. L. Peach and V. E. Marquez (2008). "Wealth of opportunity - the C1 domain as a target for drug development." <u>Curr Drug Targets</u> **9**(8): 641-652.

Bodin, S., C. Soulet, H. Tronchere, P. Sie, C. Gachet, M. Plantavid and B. Payrastre (2005). "Integrindependent interaction of lipid rafts with the actin cytoskeleton in activated human platelets." <u>J Cell</u> <u>Sci</u> **118**(Pt 4): 759-769.

Boon, J. M. and B. D. Smith (2001). "Facilitated phosphatidylcholine flip-flop across erythrocyte membranes using low molecular weight synthetic translocases." <u>J Am Chem Soc</u> **123**(26): 6221-6226.

Boon, J. M. and B. D. Smith (2002). "Synthetic membrane transporters." <u>Curr Opin Chem Biol</u> **6**(6): 749-756.

Bose, J., A. D. Gruber, L. Helming, S. Schiebe, I. Wegener, M. Hafner, M. Beales, F. Kontgen and A. Lengeling (2004). "The phosphatidylserine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal." <u>J Biol</u> **3**(4): 15.

Brugger, B., B. Glass, P. Haberkant, I. Leibrecht, F. T. Wieland and H. G. Krausslich (2006). "The HIV lipidome: a raft with an unusual composition." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **103**(8): 2641-2646.

Burd, C. G. and S. D. Emr (1998). "Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains." <u>Mol Cell</u> **2**(1): 157-162.

Carabeo, R. A. and T. Hackstadt (2001). "Isolation and characterization of a mutant Chinese hamster ovary cell line that is resistant to Chlamydia trachomatis infection at a novel step in the attachment process." <u>Infect Immun</u> **69**(9): 5899-5904.

Carabeo, R. A., D. J. Mead and T. Hackstadt (2003). "Golgi-dependent transport of cholesterol to the Chlamydia trachomatis inclusion." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **100**(11): 6771-6776.

Chae, H. J., J. S. Kang, J. O. Byun, K. S. Han, D. U. Kim, S. M. Oh, H. M. Kim, S. W. Chae and H. R. Kim (2000). "Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts." <u>Pharmacol Res</u> **42**(4): 373-381.

Chi, E. Y., C. C. Kuo and J. T. Grayston (1987). "Unique ultrastructure in the elementary body of Chlamydia sp. strain TWAR." <u>I Bacteriol</u> **169**(8): 3757-3763.

Chichili, G. R. and W. Rodgers (2009). "Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure." <u>Cell Mol Life Sci</u> **66**(14): 2319-2328.

Cho, W. and R. V. Stahelin (2006). "Membrane binding and subcellular targeting of C2 domains." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1761**(8): 838-849.

Clifton, D. R., C. A. Dooley, S. S. Grieshaber, R. A. Carabeo, K. A. Fields and T. Hackstadt (2005). "Tyrosine phosphorylation of the chlamydial effector protein Tarp is species specific and not required for recruitment of actin." <u>Infect Immun</u> **73**(7): 3860-3868.

Clifton, D. R., K. A. Fields, S. S. Grieshaber, C. A. Dooley, E. R. Fischer, D. J. Mead, R. A. Carabeo and T. Hackstadt (2004). "A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **101**(27): 10166-10171.

Confer, A. W. and S. Ayalew (2013). "The OmpA family of proteins: roles in bacterial pathogenesis and immunity." <u>Vet Microbiol</u> **163**(3-4): 207-222.

Cooper, G. M. (2000). "The Cell, 2nd edition - A molecular approach." <u>Sunderland (MA): Sinauer</u> <u>Associates</u> **Available from:** <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9839</u>.

Corbalan-Garcia, S., J. Garcia-Garcia, J. A. Rodriguez-Alfaro and J. C. Gomez-Fernandez (2003). "A new phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-binding site located in the C2 domain of protein kinase Calpha." <u>J Biol Chem</u> **278**(7): 4972-4980.

Cossart, P. and P. J. Sansonetti (2004). "Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens." <u>Science</u> **304**(5668): 242-248.

Cureton, D. K., R. H. Massol, S. P. Whelan and T. Kirchhausen (2010). "The length of vesicular stomatitis virus particles dictates a need for actin assembly during clathrin-dependent endocytosis." <u>PLoS Pathog</u> **6**(9): e1001127.

Czuczman, M. A., R. Fattouh, J. M. van Rijn, V. Canadien, S. Osborne, A. M. Muise, V. K. Kuchroo, D. E. Higgins and J. H. Brumell (2014). "Listeria monocytogenes exploits efferocytosis to promote cell-to-cell spread." <u>Nature</u> **509**(7499): 230-234.

Davidson, A. L. and J. Chen (2004). "ATP-binding cassette transporters in bacteria." <u>Annu Rev</u> <u>Biochem</u> **73**: 241-268.

Davis, D. B., K. R. Doherty, A. J. Delmonte and E. M. McNally (2002). "Calcium-sensitive phospholipid binding properties of normal and mutant ferlin C2 domains." <u>J Biol Chem</u> **277**(25): 22883-22888.

Dekkers, D. W., P. Comfurius, A. J. Schroit, E. M. Bevers and R. F. Zwaal (1998). "Transbilayer movement of NBD-labeled phospholipids in red blood cell membranes: outward-directed transport by the multidrug resistance protein 1 (MRP1)." <u>Biochemistry</u> **37**(42): 14833-14837.

Dekkers, D. W., P. Comfurius, R. G. van Gool, E. M. Bevers and R. F. Zwaal (2000). "Multidrug resistance protein 1 regulates lipid asymmetry in erythrocyte membranes." <u>Biochem J</u> **350 Pt 2**: 531-535.

Diraviyam, K., R. V. Stahelin, W. Cho and D. Murray (2003). "Computer modeling of the membrane interaction of FYVE domains." <u>J Mol Biol</u> **328**(3): 721-736.

Doherty, G. J. and H. T. McMahon (2009). "Mechanisms of endocytosis." <u>Annu Rev Biochem</u> **78**: 857-902.

Draeger, A., K. Monastyrskaya and E. B. Babiychuk (2011). "Plasma membrane repair and cellular damage control: the annexin survival kit." <u>Biochem Pharmacol</u> **81**(6): 703-712.

Drin, G. and B. Antonny (2010). "Amphipathic helices and membrane curvature." <u>FEBS Lett</u> **584**(9): 1840-1847.

Eisenberg, D., R. M. Weiss and T. C. Terwilliger (1982). "The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix." <u>Nature</u> **299**(5881): 371-374.

Everett, K. D., R. M. Bush and A. A. Andersen (1999). "Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms." Int J Syst Bacteriol **49 Pt 2**: 415-440.

Fadel, S. and A. Eley (2008). "Is lipopolysaccharide a factor in infectivity of Chlamydia trachomatis?" <u>J Med Microbiol</u> **57**(Pt 3): 261-266.

Fadok, V. A., D. L. Bratton, D. M. Rose, A. Pearson, R. A. Ezekewitz and P. M. Henson (2000). "A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells." <u>Nature</u> **405**(6782): 85-90.

Farge, E., D. M. Ojcius, A. Subtil and A. Dautry-Varsat (1999). "Enhancement of endocytosis due to aminophospholipid transport across the plasma membrane of living cells." <u>Am J Physiol</u> **276**(3 Pt 1): C725-733.

Fechtner, T. (2013). <u>Characterization of the new, potentieal adhesins Yaa1, Yaa2 und Yaa3 from</u> <u>Chlamydia pneumoniae</u>, Heinrich-Heine-University.

Fechtner, T., J. N. Galle and J. H. Hegemann (2016). "The novel chlamydial adhesin CPn0473 mediates the lipid raft-dependent uptake of Chlamydia pneumoniae." <u>Cell Microbiol</u> **18**(8): 1094-1105.

Fechtner, T., S. Stallmann, K. Moelleken, K. L. Meyer and J. H. Hegemann (2013). "Characterization of the interaction between the chlamydial adhesin OmcB and the human host cell." <u>J Bacteriol</u> **195**(23): 5323-5333.

Feher, V. A., A. Randall, P. Baldi, R. M. Bush, L. M. de la Maza and R. E. Amaro (2013). "A 3dimensional trimeric beta-barrel model for Chlamydia MOMP contains conserved and novel elements of Gram-negative bacterial porins." <u>PLoS One</u> **8**(7): e68934.

Ferguson, K. M., M. A. Lemmon, J. Schlessinger and P. B. Sigler (1995). "Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain." <u>Cell</u> **83**(6): 1037-1046.

Finco, O., A. Bonci, M. Agnusdei, M. Scarselli, R. Petracca, N. Norais, G. Ferrari, I. Garaguso, M. Donati, V. Sambri, R. Cevenini, G. Ratti and G. Grandi (2005). "Identification of new potential vaccine candidates against Chlamydia pneumoniae by multiple screenings." <u>Vaccine</u> **23**(9): 1178-1188.

Fudyk, T., L. Olinger and R. S. Stephens (2002). "Selection of mutant cell lines resistant to infection by Chlamydia trachomatis and Chlamydia pneumoniae." <u>Infect Immun</u> **70**(11): 6444-6447.

Fujita, A., J. Cheng, K. Tauchi-Sato, T. Takenawa and T. Fujimoto (2009). "A distinct pool of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolae revealed by a nanoscale labeling technique." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **106**(23): 9256-9261.

Fuller, N., C. R. Benatti and R. P. Rand (2003). "Curvature and bending constants for phosphatidylserine-containing membranes." <u>Biophys J</u> **85**(3): 1667-1674.

Galietta, L. J. (2009). "The TMEM16 protein family: a new class of chloride channels?" <u>Biophys J</u> **97**(12): 3047-3053.

Galle, J. (2012). <u>Funktionsanalyse des Chlamydia pneumoniae Adhäsionsprotein Yaa1</u>. Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität.

Galle, J. (2013). <u>Funktion des Chlamydia pneumoniae Adhäsins Yaa1 bei der Internalisierung von Humanzellen</u>, Heinrich Heine Universität.

Gaullier, J. M., A. Simonsen, A. D'Arrigo, B. Bremnes, H. Stenmark and R. Aasland (1998). "FYVE fingers bind PtdIns(3)P." <u>Nature</u> **394**(6692): 432-433.

Geldwerth, D., A. de Kermel, A. Zachowski, F. Guerbette, J. C. Kader, J. P. Henry and P. F. Devaux (1991). "Use of spin-labeled and fluorescent lipids to study the activity of the phospholipid transfer protein from maize seedlings." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1082**(3): 255-264.

Gerlach, R. G. and M. Hensel (2007). "Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens." Int J Med Microbiol **297**(6): 401-415.

Gietz, R. D., R. H. Schiestl, A. R. Willems and R. A. Woods (1995). "Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure." <u>Yeast</u> **11**(4): 355-360.

Goswami, D., K. Gowrishankar, S. Bilgrami, S. Ghosh, R. Raghupathy, R. Chadda, R. Vishwakarma, M. Rao and S. Mayor (2008). "Nanoclusters of GPI-anchored proteins are formed by cortical actindriven activity." <u>Cell</u> **135**(6): 1085-1097.

Goth, S. R. and R. S. Stephens (2001). "Rapid, transient phosphatidylserine externalization induced in host cells by infection with Chlamydia spp." <u>Infect Immun</u> **69**(2): 1109-1119.

Grieshaber, S. S., N. A. Grieshaber and T. Hackstadt (2003). "Chlamydia trachomatis uses host cell dynein to traffic to the microtubule-organizing center in a p50 dynamitin-independent process." J <u>Cell Sci</u> **116**(Pt 18): 3793-3802.

Grieshaber, S. S., N. A. Grieshaber, N. Miller and T. Hackstadt (2006). "Chlamydia trachomatis causes centrosomal defects resulting in chromosomal segregation abnormalities." <u>Traffic</u> **7**(8): 940-949.

Grimwood, J., L. Olinger and R. S. Stephens (2001). "Expression of Chlamydia pneumoniae polymorphic membrane protein family genes." Infect Immun **69**(4): 2383-2389.

Grimwood, J. and R. S. Stephens (1999). "Computational analysis of the polymorphic membrane protein superfamily of Chlamydia trachomatis and Chlamydia pneumoniae." <u>Microb Comp Genomics</u> **4**(3): 187-201.

Groen, A., M. R. Romero, C. Kunne, S. J. Hoosdally, P. H. Dixon, C. Wooding, C. Williamson, J. Seppen, K. Van den Oever, K. S. Mok, C. C. Paulusma, K. J. Linton and R. P. Oude Elferink (2011). "Complementary functions of the flippase ATP8B1 and the floppase ABCB4 in maintaining canalicular membrane integrity." <u>Gastroenterology</u> **141**(5): 1927-1937 e1921-1924.

Halleck, M. S., J. J. Lawler, S. Blackshaw, L. Gao, P. Nagarajan, C. Hacker, S. Pyle, J. T. Newman, Y. Nakanishi, H. Ando, D. Weinstock, P. Williamson and R. A. Schlegel (1999). "Differential expression of putative transbilayer amphipath transporters." <u>Physiol Genomics</u> **1**(3): 139-150.

Hamon, Y., C. Broccardo, O. Chambenoit, M. F. Luciani, F. Toti, S. Chaslin, J. M. Freyssinet, P. F. Devaux, J. McNeish, D. Marguet and G. Chimini (2000). "ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine." <u>Nat Cell Biol</u> **2**(7): 399-406.

Hanayama, R., M. Tanaka, K. Miwa, A. Shinohara, A. Iwamatsu and S. Nagata (2002). "Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes." <u>Nature</u> **417**(6885): 182-187.

Hänsch, S. (2016). <u>Analysis of the new potential effector proteins CPn0712, CPn0677 and CPn0678</u> <u>from Chlamydia pneumoniae</u>. PhD, Heinrich-Heine-University.

Harris, S. R., I. N. Clarke, H. M. Seth-Smith, A. W. Solomon, L. T. Cutcliffe, P. Marsh, R. J. Skilton, M. J. Holland, D. Mabey, R. W. Peeling, D. A. Lewis, B. G. Spratt, M. Unemo, K. Persson, C. Bjartling, R. Brunham, H. J. de Vries, S. A. Morre, A. Speksnijder, C. M. Bebear, M. Clerc, B. de Barbeyrac, J. Parkhill and N. R. Thomson (2012). "Whole-genome analysis of diverse Chlamydia trachomatis strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing." <u>Nat Genet</u> **44**(4): 413-419, S411.

Hartlova, A., L. Cerveny, M. Hubalek, Z. Krocova and J. Stulik (2010). "Membrane rafts: a potential gateway for bacterial entry into host cells." <u>Microbiol Immunol</u> **54**(4): 237-245.

Hatch, G. M. and G. McClarty (1998). "Phospholipid composition of purified Chlamydia trachomatis mimics that of the eucaryotic host cell." <u>Infect Immun</u> **66**(8): 3727-3735.

Hatch, T. P. (1996). "Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in chlamydiae?" <u>J Bacteriol</u> **178**(1): 1-5.

Haucke, V. (2005). "Phosphoinositide regulation of clathrin-mediated endocytosis." <u>Biochem Soc</u> <u>Trans</u> **33**(Pt 6): 1285-1289.

Hegemann, J. H. and K. Moelleken (2012). Chlamydial adhesion and adhesins. <u>Intracellular</u> <u>Pathogens I: Chlamydiales M. Tan, Bavoil, P. Washington, DC, ASM Press.</u>

Horn, M. (2008). "Chlamydiae as symbionts in eukaryotes." <u>Annu Rev Microbiol</u> 62: 113-131.

Huang, Z., X. Chang, J. R. Riordan and Y. Huang (2004). "Fluorescent modified phosphatidylcholine floppase activity of reconstituted multidrug resistance-associated protein MRP1." <u>Biochim Biophys</u> <u>Acta</u> **1660**(1-2): 155-163.

Hybiske, K. and R. S. Stephens (2007). "Mechanisms of Chlamydia trachomatis Entry into Nonphagocytic Cells." Infect Immun **75**(8): 3925-3934.

Hybiske, K. and R. S. Stephens (2007). "Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium Chlamydia." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **104**(27): 11430-11435.

Ishii, H., T. Mori, A. Shiratsuchi, Y. Nakai, Y. Shimada, Y. Ohno-Iwashita and Y. Nakanishi (2005). "Distinct localization of lipid rafts and externalized phosphatidylserine at the surface of apoptotic cells." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **327**(1): 94-99.

Itoh, T. and P. De Camilli (2006). "BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1761**(8): 897-912.

Jean, S. and A. A. Kiger (2012). "Coordination between RAB GTPase and phosphoinositide regulation and functions." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **13**(7): 463-470.

Kamp, D. and C. W. Haest (1998). "Evidence for a role of the multidrug resistance protein (MRP) in the outward translocation of NBD-phospholipids in the erythrocyte membrane." <u>Biochim Biophys</u> <u>Acta</u> **1372**(1): 91-101.

Kay, J. G. and S. Grinstein (2013). "Phosphatidylserine-mediated cellular signaling." <u>Adv Exp Med</u> <u>Biol</u> **991**: 177-193.

Klockner, A., C. Otten, A. Derouaux, W. Vollmer, H. Buhl, S. De Benedetti, D. Munch, M. Josten, K. Molleken, H. G. Sahl and B. Henrichfreise (2014). "AmiA is a penicillin target enzyme with dual activity in the intracellular pathogen Chlamydia pneumoniae." <u>Nat Commun</u> **5**: 4201.

Kodigepalli, K. M., K. Bowers, A. Sharp and M. Nanjundan (2015). "Roles and regulation of phospholipid scramblases." <u>FEBS Lett</u> **589**(1): 3-14.

Kok, J. W., Klappe, K., Hummel, I. (2014). "The Role of the Actin Cytoskeleton and Lipid Rafts in the Localization and Function of the ABCC1 Transporter." <u>Advances in Biology</u> **2014**(Article ID 105898): 11.

Korhonen, J. T., M. Puolakkainen, A. Haveri, A. Tammiruusu, M. Sarvas and R. Lahesmaa (2012). "Chlamydia pneumoniae entry into epithelial cells by clathrin-independent endocytosis." <u>Microb</u> <u>Pathog</u> **52**(3): 157-164.

Krachler, A. M., H. Ham and K. Orth (2011). "Outer membrane adhesion factor multivalent adhesion molecule 7 initiates host cell binding during infection by gram-negative pathogens." <u>Proc Natl Acad</u> <u>Sci U S A</u> **108**(28): 11614-11619.

Krachler, A. M. and K. Orth (2011). "Functional characterization of the interaction between bacterial adhesin multivalent adhesion molecule 7 (MAM7) protein and its host cell ligands." <u>J Biol Chem</u> **286**(45): 38939-38947.

Kuge, O., M. Nishijima and Y. Akamatsu (1986). "Phosphatidylserine biosynthesis in cultured Chinese hamster ovary cells. II. Isolation and characterization of phosphatidylserine auxotrophs." J <u>Biol Chem</u> **261**(13): 5790-5794.

Kuge, O., M. Nishijima and Y. Akamatsu (1986). "Phosphatidylserine biosynthesis in cultured Chinese hamster ovary cells. III. Genetic evidence for utilization of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine as precursors." <u>J Biol Chem</u> **261**(13): 5795-5798.

Kutateladze, T. G. (2007). "Mechanistic similarities in docking of the FYVE and PX domains to phosphatidylinositol 3-phosphate containing membranes." <u>Prog Lipid Res</u> **46**(6): 315-327.

Lee, S. A., R. Eyeson, M. L. Cheever, J. Geng, V. V. Verkhusha, C. Burd, M. Overduin and T. G. Kutateladze (2005). "Targeting of the FYVE domain to endosomal membranes is regulated by a histidine switch." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **102**(37): 13052-13057.

Lemmon, M. A. (2007). "Pleckstrin homology (PH) domains and phosphoinositides." <u>Biochem Soc</u> <u>Symp(74)</u>: 81-93.

Lenoir, G., P. Williamson, C. F. Puts and J. C. Holthuis (2009). "Cdc50p plays a vital role in the ATPase reaction cycle of the putative aminophospholipid transporter Drs2p." <u>J Biol Chem</u> **284**(27): 17956-17967.

Leventis, P. A. and S. Grinstein (2010). "The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes." <u>Annu Rev Biophys</u> **39**: 407-427.

Li, L., I. Vorobyov and T. W. Allen (2013). "The different interactions of lysine and arginine side chains with lipid membranes." J Phys Chem B **117**(40): 11906-11920.

Liechti, G. W., E. Kuru, E. Hall, A. Kalinda, Y. V. Brun, M. VanNieuwenhze and A. T. Maurelli (2014). "A new metabolic cell-wall labelling method reveals peptidoglycan in Chlamydia trachomatis." <u>Nature</u> **506**(7489): 507-510.

Linhardt, R. J. and T. Toida (2004). "Role of glycosaminoglycans in cellular communication." <u>Acc</u> <u>Chem Res</u> **37**(7): 431-438.

Liu, X., M. Afrane, D. E. Clemmer, G. Zhong and D. E. Nelson (2010). "Identification of Chlamydia trachomatis outer membrane complex proteins by differential proteomics." <u>J Bacteriol</u> **192**(11): 2852-2860.

Luczak, S. (2016). <u>Biochemical and Biophysical Characterization of the Adhesin and Invasin Pmp21</u> <u>from Chlamydia pneumoniae</u> PhD, Heinrich-Heine-University.

Malkova, S., R. V. Stahelin, S. V. Pingali, W. Cho and M. L. Schlossman (2006). "Orientation and penetration depth of monolayer-bound p40phox-PX." <u>Biochemistry</u> **45**(45): 13566-13575.

Manna, D., A. Albanese, W. S. Park and W. Cho (2007). "Mechanistic basis of differential cellular responses of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate- and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-binding pleckstrin homology domains." <u>J Biol Chem</u> **282**(44): 32093-32105.

Martin, C., M. A. Requero, J. Masin, I. Konopasek, F. M. Goni, P. Sebo and H. Ostolaza (2004). "Membrane restructuring by Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin, a member of the RTX toxin family." <u>J Bacteriol</u> **186**(12): 3760-3765.

McClure, E. E., A. S. O. Chavez, D. K. Shaw, J. A. Carlyon, R. R. Ganta, S. M. Noh, D. O. Wood, P. M. Bavoil, K. A. Brayton, J. J. Martinez, J. W. McBride, R. H. Valdivia, U. G. Munderloh and J. H. F. Pedra (2017). "Engineering of obligate intracellular bacteria: progress, challenges and paradigms." <u>Nat Rev</u> <u>Microbiol</u> **15**(9): 544-558.

McCoy, A. J. and A. T. Maurelli (2006). "Building the invisible wall: updating the chlamydial peptidoglycan anomaly." <u>Trends Microbiol</u> **14**(2): 70-77.

McMahon, H. T. and E. Boucrot (2011). "Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **12**(8): 517-533.

McMahon, H. T. and E. Boucrot (2015). "Membrane curvature at a glance." <u>J Cell Sci</u> **128**(6): 1065-1070.

Medkova, M. and W. Cho (1999). "Interplay of C1 and C2 domains of protein kinase C-alpha in its membrane binding and activation." <u>I Biol Chem</u> **274**(28): 19852-19861.

Meleard, P., L. A. Bagatolli and T. Pott (2009). "Giant unilamellar vesicle electroformation from lipid mixtures to native membranes under physiological conditions." <u>Methods Enzymol</u> **465**: 161-176.

Mercer, J. and A. Helenius (2008). "Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells." <u>Science</u> **320**(5875): 531-535.

Miyanishi, M., K. Tada, M. Koike, Y. Uchiyama, T. Kitamura and S. Nagata (2007). "Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor." <u>Nature</u> **450**(7168): 435-439.

Moelleken, K. and J. H. Hegemann (2008). "The Chlamydia outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding." <u>Mol Microbiol</u> **67**(2): 403-419.

Moelleken, K., E. Schmidt and J. H. Hegemann (2010). "Members of the Pmp protein family of Chlamydia pneumoniae mediate adhesion to human cells via short repetitive peptide motifs." <u>Mol Microbiol</u> **78**(4): 1004-1017.

Molleken, K., E. Becker and J. H. Hegemann (2013). "The Chlamydia pneumoniae invasin protein Pmp21 recruits the EGF receptor for host cell entry." <u>PLoS Pathog</u> **9**(4): e1003325.

Molleken, K. and J. H. Hegemann (2017). "Acquisition of Rab11 and Rab11-Fip2-A novel strategy for Chlamydia pneumoniae early survival." <u>PLoS Pathog</u> **13**(8): e1006556.

Montigiani, S., F. Falugi, M. Scarselli, O. Finco, R. Petracca, G. Galli, M. Mariani, R. Manetti, M. Agnusdei, R. Cevenini, M. Donati, R. Nogarotto, N. Norais, I. Garaguso, S. Nuti, G. Saletti, D. Rosa, G. Ratti and G. Grandi (2002). "Genomic approach for analysis of surface proteins in Chlamydia pneumoniae." <u>Infect Immun</u> **70**(1): 368-379.

Morein, S., A. Andersson, L. Rilfors and G. Lindblom (1996). "Wild-type Escherichia coli cells regulate the membrane lipid composition in a "window" between gel and non-lamellar structures." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> **271**(12): 6801-6809.

Murata-Kamiya, N., K. Kikuchi, T. Hayashi, H. Higashi and M. Hatakeyama (2010). "Helicobacter pylori exploits host membrane phosphatidylserine for delivery, localization, and pathophysiological action of the CagA oncoprotein." <u>Cell Host Microbe</u> **7**(5): 399-411.

Murra, G. (2009). <u>Identification and characterization of adhesion proteins from the human pathogen</u> <u>Chlamydia pneumoniae</u>. PhD, Heinrich-Heine-University.

Nakano, K., T. Yamamoto, T. Kishimoto, T. Noji and K. Tanaka (2008). "Protein kinases Fpk1p and Fpk2p are novel regulators of phospholipid asymmetry." <u>Mol Biol Cell</u> **19**(4): 1783-1797.

NCBI "National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US),."<u>National Center for Biotechnology Information; [1988]</u> [cited 2017 Nov 23].(Available from: <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</u>).

Niehus, E., E. Cheng and M. Tan (2008). "DNA supercoiling-dependent gene regulation in Chlamydia." <u>J Bacteriol</u> **190**(19): 6419-6427.

Nishijima, M., O. Kuge and Y. Akamatsu (1986). "Phosphatidylserine biosynthesis in cultured Chinese hamster ovary cells. I. Inhibition of de novo phosphatidylserine biosynthesis by exogenous phosphatidylserine and its efficient incorporation." <u>J Biol Chem</u> **261**(13): 5784-5789.

Nunes, A. and J. P. Gomes (2014). "Evolution, phylogeny, and molecular epidemiology of Chlamydia." Infect Genet Evol **23**: 49-64.

Owen, D. M., A. Magenau, D. Williamson and K. Gaus (2012). "The lipid raft hypothesis revisited-new insights on raft composition and function from super-resolution fluorescence microscopy." <u>Bioessays</u> **34**(9): 739-747.

Pankov, R., T. Markovska, P. Antonov, L. Ivanova and A. Momchilova (2006). "The plasma membrane lipid composition affects fusion between cells and model membranes." <u>Chem Biol Interact</u> **164**(3): 167-173.

Paterson, J. K., K. Renkema, L. Burden, M. S. Halleck, R. A. Schlegel, P. Williamson and D. L. Daleke (2006). "Lipid specific activation of the murine P4-ATPase Atp8a1 (ATPase II)." <u>Biochemistry</u> **45**(16): 5367-5376.

Patki, V., D. C. Lawe, S. Corvera, J. V. Virbasius and A. Chawla (1998). "A functional PtdIns(3)Pbinding motif." <u>Nature</u> **394**(6692): 433-434.

Pautot, S., B. J. Frisken and D. A. Weitz (2003). "Engineering asymmetric vesicles." <u>Proc Natl Acad Sci</u> <u>U S A</u> **100**(19): 10718-10721.

Peeling, R. W. and R. C. Brunham (1996). "Chlamydiae as pathogens: new species and new issues." <u>Emerg Infect Dis</u> **2**(4): 307-319.

Peters, J., D. P. Wilson, G. Myers, P. Timms and P. M. Bavoil (2007). "Type III secretion a la Chlamydia." <u>Trends Microbiol</u> **15**(6): 241-251.

Peterson, E. M., L. M. de la Maza, L. Brade and H. Brade (1998). "Characterization of a neutralizing monoclonal antibody directed at the lipopolysaccharide of Chlamydia pneumoniae." <u>Infect Immun</u> **66**(8): 3848-3855.

Pizarro-Cerda, J. and P. Cossart (2006). "Bacterial adhesion and entry into host cells." <u>Cell</u> **124**(4): 715-727.

Pomorski, T., R. Lombardi, H. Riezman, P. F. Devaux, G. van Meer and J. C. Holthuis (2003). "Drs2p-related P-type ATPases Dnf1p and Dnf2p are required for phospholipid translocation across the yeast plasma membrane and serve a role in endocytosis." <u>Mol Biol Cell</u> **14**(3): 1240-1254.

Popov, V. L., A. A. Shatkin, V. N. Pankratova, N. S. Smirnova, C. H. von Bonsdorff, M. R. Ekman, A. Morttinen and P. Saikku (1991). "Ultrastructure of Chlamydia pneumoniae in cell culture." <u>FEMS</u> <u>Microbiol Lett</u> **68**(2): 129-134.

Pospischil, A., R. Thoma, M. Hilbe, P. Grest and J. O. Gebbers (2002). "Abortion in woman caused by caprine Chlamydophila abortus (Chlamydia psittaci serovar 1)." <u>Swiss Med Wkly</u> **132**(5-6): 64-66.

Qian, S., W. Wang, L. Yang and H. W. Huang (2008). "Structure of the alamethicin pore reconstructed by x-ray diffraction analysis." <u>Biophys J</u> **94**(9): 3512-3522.

Qualmann, B. and H. Mellor (2003). "Regulation of endocytic traffic by Rho GTPases." <u>Biochem J</u> **371**(Pt 2): 233-241.

Raggers, R. J., A. van Helvoort, R. Evers and G. van Meer (1999). "The human multidrug resistance protein MRP1 translocates sphingolipid analogs across the plasma membrane." <u>J Cell Sci</u> **112 (Pt 3)**: 415-422.

Raynal, P. and H. B. Pollard (1994). "Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1197**(1): 63-93.

Reyes, C. L. and G. Chang (2005). "Structure of the ABC transporter MsbA in complex with ADP.vanadate and lipopolysaccharide." <u>Science</u> **308**(5724): 1028-1031.

Rockey, D. D., J. Lenart and R. S. Stephens (2000). "Genome sequencing and our understanding of chlamydiae." Infect Immun **68**(10): 5473-5479.

Roelants, F. M., A. G. Baltz, A. E. Trott, S. Fereres and J. Thorner (2010). "A protein kinase network regulates the function of aminophospholipid flippases." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **107**(1): 34-39.

Rurangirwa, F. R., P. M. Dilbeck, T. B. Crawford, T. C. McGuire and T. F. McElwain (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 Pt 2**: 577-581.

Saito, K., K. Fujimura-Kamada, N. Furuta, U. Kato, M. Umeda and K. Tanaka (2004). "Cdc50p, a protein required for polarized growth, associates with the Drs2p P-type ATPase implicated in phospholipid translocation in Saccharomyces cerevisiae." <u>Mol Biol Cell</u> **15**(7): 3418-3432.

Sambrook, J., T. Maniatis and E. Fritsch (1989). <u>Molecular cloning: A laboratory manual</u>. Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor laboratory.

Sandvig, K., S. Pust, T. Skotland and B. van Deurs (2011). "Clathrin-independent endocytosis: mechanisms and function." <u>Curr Opin Cell Biol</u> **23**(4): 413-420.

Sarkar, A., S. Moller, A. Bhattacharyya, M. Behnen, J. Rupp, G. van Zandbergen, W. Solbach and T. Laskay (2015). "Mechanisms of apoptosis inhibition in Chlamydia pneumoniae-infected neutrophils." <u>Int J Med Microbiol</u> **305**(6): 493-500.

Schlegel, R. A. and P. Williamson (2001). "Phosphatidylserine, a death knell." <u>Cell Death Differ</u> **8**(6): 551-563.

Sebastian, T. T., R. D. Baldridge, P. Xu and T. R. Graham (2012). "Phospholipid flippases: building asymmetric membranes and transport vesicles." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1821**(8): 1068-1077.

Segawa, K., S. Kurata, Y. Yanagihashi, T. R. Brummelkamp, F. Matsuda and S. Nagata (2014). "Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure." <u>Science</u> **344**(6188): 1164-1168.

Segrest, J. P., H. De Loof, J. G. Dohlman, C. G. Brouillette and G. M. Anantharamaiah (1990). "Amphipathic helix motif: classes and properties." <u>Proteins</u> **8**(2): 103-117.

Sengupta, D., H. Leontiadou, A. E. Mark and S. J. Marrink (2008). "Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1778**(10): 2308-2317.

Sharadadevi, A., C. Sivakamasundari and R. Nagaraj (2005). "Amphipathic alpha-helices in proteins: results from analysis of protein structures." <u>Proteins</u> **59**(4): 791-801.

Shen, Y., M. Naujokas, M. Park and K. Ireton (2000). "InIB-dependent internalization of Listeria is mediated by the Met receptor tyrosine kinase." <u>Cell</u> **103**(3): 501-510.

Shi, J., C. W. Heegaard, J. T. Rasmussen and G. E. Gilbert (2004). "Lactadherin binds selectively to membranes containing phosphatidyl-L-serine and increased curvature." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1667**(1): 82-90.

Shiratsuchi, A., M. Kaido, T. Takizawa and Y. Nakanishi (2000). "Phosphatidylserine-mediated phagocytosis of influenza A virus-infected cells by mouse peritoneal macrophages." <u>J Virol</u> **74**(19): 9240-9244.

Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." Nature 387(6633): 569-572.

Simons, K. and D. Toomre (2000). "Lipid rafts and signal transduction." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **1**(1): 31-39.

Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972). "The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes." <u>Science</u> **175**: 720-731.

Smith, J. D., C. Waelde, A. Horwitz and P. Zheng (2002). "Evaluation of the role of phosphatidylserine translocase activity in ABCA1-mediated lipid efflux." <u>J Biol Chem</u> **277**(20): 17797-17803.

Smith, R., F. Separovic, T. J. Milne, A. Whittaker, F. M. Bennett, B. A. Cornell and A. Makriyannis (1994). "Structure and orientation of the pore-forming peptide, melittin, in lipid bilayers." <u>J Mol Biol</u> **241**(3): 456-466.

Soriani, M., P. Petit, R. Grifantini, R. Petracca, G. Gancitano, E. Frigimelica, F. Nardelli, C. Garcia, S. Spinelli, G. Scarabelli, S. Fiorucci, R. Affentranger, M. Ferrer-Navarro, M. Zacharias, G. Colombo, L. Vuillard, X. Daura and G. Grandi (2010). "Exploiting antigenic diversity for vaccine design: the chlamydia ArtJ paradigm." <u>J Biol Chem</u> **285**(39): 30126-30138.

Stahelin, R. V. (2009). "Lipid binding domains: more than simple lipid effectors." <u>J Lipid Res</u> **50 Suppl**: S299-304.

Stahelin, R. V., P. Subramanian, M. Vora, W. Cho and C. E. Chalfant (2007). "Ceramide-1-phosphate binds group IVA cytosolic phospholipase a2 via a novel site in the C2 domain." <u>J Biol Chem</u> **282**(28): 20467-20474.

Stephens, R. S., G. Myers, M. Eppinger and P. M. Bavoil (2009). "Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of Chlamydia resolved." <u>FEMS Immunol Med Microbiol</u> **55**(2): 115-119.

Steringer, J. P., H. M. Muller and W. Nickel (2015). "Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2--a novel type of protein translocation across membranes?" <u>J Mol Biol</u> **427**(6 Pt A): 1202-1210.

Stevens, H. C., L. Malone and J. W. Nichols (2008). "The putative aminophospholipid translocases, DNF1 and DNF2, are not required for 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-phosphatidylserine flip across the plasma membrane of Saccharomyces cerevisiae." <u>J Biol Chem</u> **283**(50): 35060-35069.

Su, H., L. Raymond, D. D. Rockey, E. Fischer, T. Hackstadt and H. D. Caldwell (1996). "A recombinant Chlamydia trachomatis major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **93**(20): 11143-11148.

Suzuki, J., D. P. Denning, E. Imanishi, H. R. Horvitz and S. Nagata (2013). "Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells." <u>Science</u> **341**(6144): 403-406.

Suzuki, J., T. Fujii, T. Imao, K. Ishihara, H. Kuba and S. Nagata (2013). "Calcium-dependent phospholipid scramblase activity of TMEM16 protein family members." <u>J Biol Chem</u> **288**(19): 13305-13316.

Suzuki, J., E. Imanishi and S. Nagata (2014). "Exposure of phosphatidylserine by Xk-related protein family members during apoptosis." <u>J Biol Chem</u> **289**(44): 30257-30267.

Suzuki, J., M. Umeda, P. J. Sims and S. Nagata (2010). "Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F." <u>Nature</u> **468**(7325): 834-838.

Tait, J. F. and D. Gibson (1992). "Phospholipid binding of annexin V: effects of calcium and membrane phosphatidylserine content." <u>Arch Biochem Biophys</u> **298**(1): 187-191.

Takai, Y., A. Kishimoto, Y. Iwasa, Y. Kawahara, T. Mori and Y. Nishizuka (1979). "Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids." <u>J Biol Chem</u> **254**(10): 3692-3695.

Tang, X., M. S. Halleck, R. A. Schlegel and P. Williamson (1996). "A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity." <u>Science</u> **272**(5267): 1495-1497.

Tilney, L. G. and D. A. Portnoy (1989). "Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, Listeria monocytogenes." <u>J Cell Biol</u> **109**(4 Pt 1): 1597-1608.

Valdivia, R. H. (2008). "Chlamydia effector proteins and new insights into chlamydial cellular microbiology." <u>Curr Opin Microbiol</u> **11**(1): 53-59.

van Helvoort, A., A. J. Smith, H. Sprong, I. Fritzsche, A. H. Schinkel, P. Borst and G. van Meer (1996). "MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine." <u>Cell</u> **87**(3): 507-517.

van Meer, G. (2011). "Dynamic transbilayer lipid asymmetry." <u>Cold Spring Harb Perspect Biol</u> 3(5).

Van Ooij, C., E. Homola, E. Kincaid and J. Engel (1998). "Fusion of Chlamydia trachomatis-containing inclusions is inhibited at low temperatures and requires bacterial protein synthesis." <u>Infect Immun</u> **66**(11): 5364-5371.

Vance, J. E. (2008). "Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids." <u>I Lipid Res</u> **49**(7): 1377-1387.

Vila-Corcoles, A., O. Ochoa-Gondar, T. Rodriguez-Blanco, X. Raga-Luria, F. Gomez-Bertomeu and E. S. Group (2009). "Epidemiology of community-acquired pneumonia in older adults: a population-based study." <u>Respir Med</u> **103**(2): 309-316.

Wang, Y., S. Kahane, L. T. Cutcliffe, R. J. Skilton, P. R. Lambden and I. N. Clarke (2011). "Development of a transformation system for Chlamydia trachomatis: restoration of glycogen biosynthesis by acquisition of a plasmid shuttle vector." <u>PLoS Pathog</u> **7**(9): e1002258.

Weinberger, A., F. C. Tsai, G. H. Koenderink, T. F. Schmidt, R. Itri, W. Meier, T. Schmatko, A. Schroder and C. Marques (2013). "Gel-assisted formation of giant unilamellar vesicles." <u>Biophys J</u> **105**(1): 154-164.

Wheelhouse, N. M., M. Sait, K. Aitchison, M. Livingstone, F. Wright, K. McLean, N. F. Inglis, D. G. Smith and D. Longbottom (2012). "Processing of Chlamydia abortus Polymorphic Membrane Protein 18D during the Chlamydial Developmental Cycle." <u>PLoS One</u> **7**(11): e49190.

White, J. A. (2009). "Manifestations and management of lymphogranuloma venereum." <u>Curr Opin</u> <u>Infect Dis</u> **22**(1): 57-66.

Woehlecke, H., A. Pohl, N. Alder-Baerens, H. Lage and A. Herrmann (2003). "Enhanced exposure of phosphatidylserine in human gastric carcinoma cells overexpressing the half-size ABC transporter BCRP (ABCG2)." <u>Biochem J</u> **376**(Pt 2): 489-495.

Wolf, K., E. Fischer and T. Hackstadt (2000). "Ultrastructural analysis of developmental events in Chlamydia pneumoniae-infected cells." Infect Immun **68**(4): 2379-2385.

Wuppermann, F. N., J. H. Hegemann and C. A. Jantos (2001). "Heparan Sulfate-like Glycosaminoglycan Is a Cellular Receptor for Chlamydia pneumoniae." <u>I Infect Dis</u> **184**(2): 181-187.

Wuppermann, F. N., K. Molleken, M. Julien, C. A. Jantos and J. H. Hegemann (2008). "Chlamydia pneumoniae GroEL1 protein is cell surface associated and required for infection of HEp-2 cells." J <u>Bacteriol</u> **190**(10): 3757-3767.

Wylie, J. L., G. M. Hatch and G. McClarty (1997). "Host cell phospholipids are trafficked to and then modified by Chlamydia trachomatis." <u>J Bacteriol</u> **179**(23): 7233-7242.

Xiang, R. F., D. Stack, S. M. Huston, S. S. Li, H. Ogbomo, S. K. Kyei and C. H. Mody (2016). "Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate (Rac) and Src Family Kinases (SFK) Are Proximal and Essential for Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Activation in Natural Killer (NK) Cell-mediated Direct Cytotoxicity against Cryptococcus neoformans." J Biol Chem **291**(13): 6912-6922.

Yabas, M., C. E. Teh, S. Frankenreiter, D. Lal, C. M. Roots, B. Whittle, D. T. Andrews, Y. Zhang, N. C. Teoh, J. Sprent, L. E. Tze, E. M. Kucharska, J. Kofler, G. C. Farell, S. Broer, C. C. Goodnow and A. Enders (2011). "ATP11C is critical for the internalization of phosphatidylserine and differentiation of B lymphocytes." <u>Nat Immunol</u> **12**(5): 441-449.

Yang, L., T. A. Harroun, T. M. Weiss, L. Ding and H. W. Huang (2001). "Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores." <u>Biophys J</u> **81**(3): 1475-1485.

Yarar, D., M. C. Surka, M. C. Leonard and S. L. Schmid (2008). "SNX9 activities are regulated by multiple phosphoinositides through both PX and BAR domains." <u>Traffic</u> **9**(1): 133-146.

Yeagle, P. L. (1993). "The membranes of cells (2nd Edition)." <u>Trends Cell Biol</u> **4**(9): 349.

Yeung, T., G. E. Gilbert, J. Shi, J. Silvius, A. Kapus and S. Grinstein (2008). "Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization." <u>Science</u> **319**(5860): 210-213.

Yeung, T., M. Terebiznik, L. Yu, J. Silvius, W. M. Abidi, M. Philips, T. Levine, A. Kapus and S. Grinstein (2006). "Receptor activation alters inner surface potential during phagocytosis." <u>Science</u> **313**(5785): 347-351.

Zha, X., J. Genest, Jr. and R. McPherson (2001). "Endocytosis is enhanced in Tangier fibroblasts: possible role of ATP-binding cassette protein A1 in endosomal vesicular transport." <u>J Biol Chem</u> **276**(42): 39476-39483.

Zhang, J., H. Wang, L. Zhang, T. Zhang, B. Wang, X. Li, J. Wei and L. Zhang (2014). "Chlamydia pneumoniae infection induces vascular smooth muscle cell migration via Rac1 activation." <u>J Med Microbiol</u> **63**(Pt 2): 155-161.

Zhou, Q., J. Zhao, J. G. Stout, R. A. Luhm, T. Wiedmer and P. J. Sims (1997). "Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids." <u>J Biol Chem</u> **272**(29): 18240-18244.

Zinser, E., C. D. Sperka-Gottlieb, E. V. Fasch, S. D. Kohlwein, F. Paltauf and G. Daum (1991). "Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote Saccharomyces cerevisiae." <u>J Bacteriol</u> **173**(6): 2026-2034.

Anhang

8 Anhang

Zusätzliche Abbildungen

Α



В



A: Lokalisierung von membranständigen humanen Rezeptoren nach Inkubation mit rCPn0473. Repräsentative Aufnahmen vom Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) und dem Transferrin Rezeptor (TfR) nach Inkubation von humanen HEp-2 Zellen mit Alexa-594-markiertem rCPn0473 (100 ng/µl) bei 37 °C für 60 Minuten. Die humanen Rezeptoren EGFR und TfR wurden markiert anti-EGFR-Antikörpern (1:50) oder anti-Tfr-Antikörpern (1:100) und Alexa488-gekoppelten-anti-Maus-Sekundärantikörpern (1:200). Die DNA wurde mit DAPI (1:100) gefärbt. Der weiße Kasten in den Bildern in der rechten Spalte markiert jeweils den gewählten Ausschnitt der vergrößerten Einzelkanal-Bilder (links). Größenstandard 10 µm. (+= Inkubation mit rCPn0473, -= Inkubation mit PBS).

B: Co-Immunopräzipitation des humanen Proteins Xkr8 und der rekombinanten Proteinen rCPn0473 oder rOmcB. Humane Zellen wurden mit rProtein (100 ng/µl) für eine Stunde bei 37 C inkubiert, anschließend mit DTSSP Crosslinker behandelt und Iysiert. Die Lysate wurde anschließend mit mMacs Beads (Miltenyi), gekoppelt mit Antikörpern gerichtet gegen hXkr8 (α Xkr8) oder gegen CPn0473 (α CPn0473), ü/N bei 4 °C inkubiert. Die Elution der an den Beads gebundenen Proteine erfolgte, nach mehrmaligen waschen mit HBSS, mit vorgeheiztem Proteinpuffer. 20 µl der eingesetzten Lysate (Einsatz) und 25 µl der eluierten Proben wurden anschließend im Westernblot überprüft. rCPn0473 und rOmcB wurden mit anti-Histidin-Antikörpern (1:2500) und AP-gekoppelten-anti-Maus-Antikörpern (1:7500), Xkr8 mit anti-Xkr8-Antikörpern (1:300) und AP-gekoppelten-anti-Ziege-Sekundärantikörpern (1:7500) detektiert. Der Stern markiert jeweils die erwartete Laufhöhe der Proteine.



Abb. 8.2: Nachweis der Lipid-Asymmetrie in GUVs durch rLactC2 Bindung.

A,B: Asymmetrische GUVs wurden mit einer Lipid-Mischung aus Phosphatidylcholin (DOPC, 55 mol%), Phosphatidylserin (DOPS, 20 mol%) und Cholesterin (25 mol%) auf der einen und mit Phosphatidylcholin (DOPC, 75 mol%) und Cholesterin (25 mol%) auf der anderen Membranseite hergestellt. Die präparierten GUVs wurden mit 1 μg FITC-markiertem rLactC2 auf ihre Asymmetrie getestet. GUV-Präparationen mit korrekter Asymmetrie (**A**) konnten danach für weitere Studien verwendet werden, während GUV-Präparationen mit unzureichender Asymmetrie (**B**) verworfen wurden. Die Lokalisierung von PS zu Beginn des Experiments ist auf der rechten Seite angegeben. Im Falle von "rLactC2 verpackt" wurde das Protein bei der Herstellung der GUVs ins Lumen eingeschlossen. Größenstandard 10 μm.

Manuskripte:

Das folgende Manuskript wurde am 21. Februar 2016 im Journal Cellular Microbiology publiziert:

The novel chlamydial adhesin CPn0473 mediates the lipid raft-dependent uptake of *Chlamydia pneumoniae*. (Cellular Microbiology (2016) 18(8), 1094–1105)

Autoren: Tim Fechtner, Jan N. Galle und Johannes H. Hegemann

Nachfolgend aufgelistet sind die Abbildungen aus dem Manuskript, die abgewandelt auch als Abbildung in dieser Dissertation verwendet wurden (mit entsprechender Abbildungsnummer) und deren Experimente ich selbst durchgeführt habe:

- Figur 2B und C (differenzielle Permeabilisierung einer chlamydialen Infektion und anschließende Mikroskopie): in der Dissertation in Abb. 1A.
- Figur 3B (Mikroskopie einer chlamydialen Infektion): in der Dissertation in Abb. 1B.
- Fig 3D (Biotinylierung oberflächenlokalisierter chlamydialer Proteine und anschließender Westernblot Analyse) in der Dissertation in Abb. 1C

 \triangleright

Darüber hinaus habe ich auch noch die Experimente zu folgenden Abbildungen aus dem Manuskript durchgeführt

- Figur 4D (nur die Infektion und Quantitative-Real-Time-PCR der Deletionsvarianten CPn0473-ΔBD, -Δ1-171 und -Δ151-255)
- Figur 5A und B (nur die Quantifizierung der mikroskopischen Aufnahmen, das Experiment selber wurde von Tim Fechtner durchgeführt)
- Fig S1: Bindeassays an humanen HEp-2 Zellen mit löslichem rekombinantem Protein (rProtein) oder an Latexkügelchen gekoppelt
- Figur S3: mikroskopische Auswertung einer chlamydiale Infektion nach Vorbehandlung der chlamydialen EBs mit rProteinen
- Fig S4A mikroskopische Auswertung einer chlamydiale Infektion in rProteinborbehandelten humanen Hep2-Zellen

Über die experimentelle Durchführung hinaus habe ich mit beiden Autoren am Manuskript geschrieben und die Abbildung angefertigt.

Ich bestätige hiermit die Richtigkeit dieser Angaben.

28.11.2017, Remscheid

The novel chlamydial adhesin CPn0473 mediates the lipid raft-dependent uptake of *Chlamydia pneumoniae*

Tim Fechtner, Jan N. Galle and Johannes H. Hegemann*

Lehrstuhl für Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitätsstraße 1, 40225 Düsseldorf, Germany.

Summary

Chlamydiae are Gram-negative, obligate intracellular pathogens that pose a serious threat to public health worldwide. Chlamydial surface molecules are essential for host cell invasion. The first interaction with the host cell is thereby accomplished by the Outer membrane complex protein B (OmcB) binding to heparan sulfate moieties on the host cell surface, followed by the interaction of the chlamydial polymorphic membrane proteins (Pmps) with host cell receptors. Specifically, the interaction of the Pmp21 adhesin and invasin with its human interaction partner, the epidermal growth factor receptor, results in receptor activation, down-stream signalling and finally internalization of the bacteria. Blocking both, the OmcB and Pmp21 adhesion pathways, did not completely abolish infection, suggesting the presence of additional factors relevant for host cell invasion. Here, we show that the novel surface protein CPn0473 of Chlamydia pneumoniae contributes to the binding and invasion of infectious chlamydial particles. CPn0473 is expressed late in the infection cycle and located on the infectious chlamydial cell surface. Soluble recombinant CPn0473 as well as rCPn0473-coupled fluorescent latex beads adhere to human epithelial HEp-2 cells. Interestingly, in classical infection blocking experiments pretreatment of HEp-2 cells with rCPn0473 does not attenuate adhesion but promotes dosedependently internalization by C. pneumoniae suggesting an unusual mode of action for this adhesin. This CPn0473-dependent promotion of infection by C. pneumoniae depends on two

Received 4 September, 2015; revised 21 December, 2015; accepted 4 January, 2016. *For correspondence. E-mail johannes.hegemann@hhu. de; phone: +49 211 81-13733; fax: +49 211 81-10637. different domains within the protein and requires intact lipid rafts. Thus, inhibition of the interaction of CPn0473 with the host cell could provide a way to reduce the virulence of *C. pneumoniae*.

Introduction

Chlamvdia pneumoniae and C. trachomatis are Gramnegative, obligate intracellular human pathogens. C. pneumoniae infects the respiratory tract, and virtually everybody is infected at least once during a lifetime (Gravston et al., 1990). C. trachomatis causes ocular (serovars A-C) and urogenital-tract infections (serovars D-K and LGV) and is the most common cause of preventable blindness and a leading cause of sexually transmitted diseases worldwide (Bebear and de Barbeyrac, 2009; Hu et al., 2010). The chlamydial life cycle is unique, involving alternation between two developmental forms. The infectious but metabolically inert elementary body (EB) adheres to and invades host cells, and differentiates into the metabolically active reticulate body (RB) in a membrane-bounded vacuole or inclusion. The RB then replicates several times before differentiating into the infectious form and exiting the host cell [reviewed in Abdelrahman and Belland (2005).

EB adhesion is essential for invasion and infection of host cells, but little is known about the proteins involved on either side. Attachment of C. pneumoniae is mediated by binding of the conserved adhesin OmcB to heparan sulfatelike proteoglycans (GAG) on human cells (Stephens et al., 2001; Fadel and Eley, 2007; Moelleken and Hegemann, 2008). Interestingly, the GAG specificity of C. trachomatis OmcB reflects biovar-specific differences, which might in part account for tissue tropism and the spread of the pathogen (Moelleken and Hegemann, 2008; Fechtner et al., 2013). However, blockade of the OmcB-GAG interaction by various means inhibits infection only moderately, implying that additional adhesin-receptor interactions occur (Wuppermann et al., 2001; Moelleken and Hegemann, 2008; Fechtner et al., 2013). Indeed, members of the C. pneumoniae polymorphic membrane protein (Pmp) family have subsequently been identified as adhesins that recognize receptors on human HEp-2 cells (Moelleken et al., 2010; Hegemann and Moelleken, 2012), and it has been demonstrated that Pmp21 also promotes

© 2016 The Authors Cellular Microbiology Publised by John Wiley & Sons Ltd

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made. internalization by interacting with and activating the epidermal growth factor receptor (EGFR) (Molleken et al., 2013). Blocking experiments with a recombinant Pmp protein in combination with OmcB showed additive effects reducing infection by approximately 70%, indicative of separate adhesion pathways and suggesting that attachment is a multistep process involving at least two distinct pathways (Becker and Hegemann, 2014). Thus, the involvement of other chlamydial and host cell factors in the adhesion of C. pneumoniae has been suggested [summarized in Hegemann and Moelleken (2012)]. Adhesion is followed by internalization of the chlamydial EBs, and this is dependent on cholesterol- and sphingolipid-rich lipid-raft domains, as disruption of lipid rafts by depletion of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin (M $\beta CD)$ or the sequestering agents nystatin and filipin strongly inhibit internalization and infection (Stuart et al., 2003; Korhonen et al., 2012)

Because adhesion and internalization are essential for infection by obligate intracellular pathogens, we suspected that C. pneumoniae uptake requires a variety of chlamydial protein-host molecule interactions. Here, we show that the EB surface protein CPn0473 adheres to human epithelial cells and is essential for very early steps

CPn0473 promotes Chlamydia pneumoniae entry 1095

in infection. Moreover, CPn0473 promotes EB uptake dose-dependently in a lipid raft-dependent manner. Thus, we have identified a surface localized protein for the promotion of target-cell invasion by the chlamydial pathogen.

Results

CPn0473 binds to human epithelial cells

In a screen for new chlamydial proteins involved in adhesion/internalization, we employed the yeast display system successfully used previously to identify and characterize the chlamydial adhesins OmcB and Pmp21 (Moelleken and Hegemann, 2008; Moelleken et al., 2010). Among several preselected chlamvdial proteins tested, we found that yeast cells presenting the predicted chlamydial protein CPn0473 adhered to HEp-2 cells almost as well as a strain bearing invasin, a known adhesin from Yersinia pseudotuberculosis (Fig. 1A). To confirm this, we performed diverse adhesion assays with the purified Histagged recombinant full length protein, rCPn0473 (508 aa). Fluorescently labelled latex beads coated with rCPn0473 (100 µg ml⁻¹), unlike beads coated with either BSA or GST, adhered as strongly to HEp-2 cells (151±34.4%)



Fig. 1. CPn0473 binds to human epithelial cells

A. Adhesion of chlamydial protein-presenting yeast cells to human cells. HEp-2 cells were incubated with a two-fold excess of yeast cells displaying Aga2, Aga2-Inv or Aga2-CPn0473, and adhesion was quantified by counting the numbers of human cells and attached yeast cells. Binding of Aga2-Inv was set to 100% (n=3). B. Adhesion of protein-coated, fluorescent latex beads to HEp-2 cells. HEp-2 cells were incubated with a tenfold excess of beads coated with

100 μ g ml⁻¹ BSA, rGST, rlnv, rOmcB-BD or rCPn0473. Adhesion was quantified by flow cytometric measurement of the overall fluorescence of HEp-2 cells bearing attached beads (triplicates). The level of binding seen with beads coated with rlnv was set to 100% (*n*=3).

C. Adhesion of His-tagged soluble recombinant proteins to HEp-2 cells. HEp-2 cells were incubated with the specified soluble recombinant protein for the indicated times. Unbound protein was washed off and adherent protein quantified on Western blots with a monoclonal anti-His antibody. Positions of MW markers are marked. Shown is a typical experimental result. Statistical significance of differences is denoted by *** (p < 0.001), ** (p < 0.01) and * (p < 0.05). n.s., not significant.

1096 T. Fechtner, J. N. Galle and J. H. Hegemann

asbeads bearing invasin or the binding domain of the chlamydial adhesin OmcB (Fig. 1B). Interestingly, however, no evidence for the uptake of the rCPn0473-coated beads into the human cells was obtained (data not shown). We also tested the soluble His-tagged recombinant CPn0473 itself and found that while binding of invasin was first detectable after 15 min of incubation, attachment of rCPn0473 occurred within 1 min, and amounts of bound rCPn0473 increased with time (Fig. 1C). To further characterize the adhesion properties of CPn0473 we created successive deletion variants and tested their adhesion to human cells when coupled to fluorescently labelled beads and as soluble proteins (Fig. S1A). These experiments determined a 50 amino acid region (aa 307-356) as being essential for CPn0473 adhesion to the host cell. To confirm the impact of these amino acids on binding, we tested a rCPn0473 deletion variant lacking only the amino acids 307-356. This mutant version (rCPn0473∆BD) showed a complete loss of binding (Fig. S1B), indicating that this domain is essential for CPn0473-mediated adhesion to human cells.

CPn0473 is expressed late in the infection cycle and localizes on the surface of EBs

In order to determine the expression profile of CPn0473 during a C. pneumoniae infection we raised a polyclonal antibody against the full-length rCPn0473 (Fig. S2A, B) and performed western blots over the infection cycle. The CPn0473 protein could first be detected at 48 h post infection (hpi) and the signal stayed until 96 hpi confirming that CPn0473 is a late expressed protein (Fig. 2A). To study the subcellular localization of CPn0473, infected HEp-2 cells were fixed either with methanol to stain all chlamydial proteins or with paraformaldehyde (PFA) followed by differential permeabilization to prevent staining of intrachlamydial proteins (Moelleken and Hegemann, 2008; Wuppermann et al., 2008; Moelleken et al., 2010). As in the western blot analysis, we were able to first detect CPn0473 at 48 hpi inside the chlamvdial particles (Fig. 2B). From 72 hpi on CPn0473 was detectable on the surface of the newly synthesized infectious EBs (Fig. 2C). The staining pattern of the intrachlamydial DnaK confirmed the integrity of the bacteria after differential permeabilization. Within cells fixed with PFA and permeabilized with 2% saponin, which disrupts the integrity of the bacteria. DnaK could still be recognized by the antibody, proving the latter's functionality in PFA-fixed cells (Fig. S2C).

For CPn0473 we observed ring-like signals surrounding the EBs, mimicking the pattern observed for the major outer membrane protein MOMP and chlamydial LPS (shown here) and the Pmp21 adhesin described previously (Moelleken *et al.*, 2010) (Fig. 3A, arrowheads; Fig. 3B). Moreover, the CPn0473 signal was also detectable early during the next round of infection, as it could be visualized on the surface of adherent EBs at 15 min pi (Fig. 3C).

To confirm the surface localization of CPn0473, intact infectious EBs were biotinylated. After lysis, biotinylated proteins were affinity-enriched and analysed via immunoblotting using specific antibodies. While intrachlamydial proteins like EFTu or DnaK could not be detected, surfacelocalized proteins like Pmp21 and also CPn0473 could be purified after lysis (Fig. 3D). In contrast, neither intrachlamydial nor extra-chlamydial proteins could be detected in whole protein extracts from unbiotinylated chlamydial EBs (Fig. 3D).

To characterize the mode of localization of CPn0473, EBs were treated with ionic and non-ionic detergents. In agreement with previous reports (Wuppermann et al., 2008). PBS does not extract the intracellular proteins S1 and EF-Tu (although it does leach out GroEL1) nor did it remove MOMP or CPn0473 from the EB surface (Fig. 3E). However, most of the CPn0473 (and significant amounts of GroEL1), but no MOMP, S1 or EF-Tu, were found in the supernatant fraction after exposing EBs to 1% Triton X-100. Interestingly, while the portion of CPn0473 remaining in the pellet was intact, almost the entire fraction extracted by Triton X-100 consisted of protein fragments (Fig. 3E, asterisks). Treatment with 2% Sarkosyl extracted almost all the full-length CPn0473 (as well as some S1 and EF-Tu), while MOMP, as a member of the Sarkosyl-insoluble chlamydial outer membrane complex (cOMC) (Caldwell et al., 1981), was retained in the pellet. Thus, these results indicate that CPn0473 is accessible on the EB surface, but is not part of the cOMC

To explore the possible role of CPn0473 in infection, we performed antibody neutralization experiments. Treatment of EBs with antiserum against EF-Tu had no effect on infection, but preincubation with anti-CPn0473 reduced *C. pneumoniae* infection by about 30% (relative to exposure to the pre-immune serum), an effect comparable to that of anti-OmcB (Fig. 3F). Hence, CPn0473 possesses the characteristics of an adhesin and is important for infection.

rCPn0473 boosts C. pneumoniae infection by enhancing internalization of EBs

To further assess the impact of CPn0473 on infection, we preincubated HEp-2 cells with rCPn0473 prior to infection. Pretreatment of EBs with heparin to block OmcB-mediated adhesion (Moelleken and Hegemann, 2008) reduced infectivity by tenfold, to 9±1.3% of values for PBS and BSA controls (Fig. 4A). In contrast, preincubation with rCPn0473 for 2h prior to exposure to *C. pneumoniae* EBs *enhanced* infection in a dose-dependent manner, and by nearly threefold (283±21.6%) at an input concentration of 200 μ g ml⁻¹ (Fig. 4A). Indeed, when added together with the EBs, the boosting effect was equal to that seen after a 2h preincubation (Fig. 4B), while addition at 2 or 6 hpi, i.e. after internalization is complete, did not enhance infectivity any



Fig. 2. CPn0473 is expressed late in the infection cycle and located on the surface of infectious EBs A. Detection of CPn0473 during the course of infection via Western blots (representative blot). HEp-2 cells infected with C. pneumoniae (MOI = 10)

A: Detection of of nor 2 during the constant of the characteristic strength and the strength and the characteristic strength and the strength and the strength and the characteristic strength and the st intra-chlamydial proteins (B) or paraformaldehyde (PFA), followed by differential permeabilization using 0.05% saponin to stain surface localized chlamydial proteins only (C). Anti-DnaK antibodies were used to stain intra-chlamydial proteins. CPn0473 was stained using anti-CPn0473 antibodies. DAPI was used to stain DNA and is only shown in the merge picture. The arrowheads mark the *C. pneumoniae* inclusion. Scale bar: 10 µm.

more (Fig. 4B). Unlike rOmcB and rPmp21, which mask their interaction partner on the host cell, thus making them inaccessible to the endogenous protein on the EB surface (Moelleken and Hegemann, 2008; Moelleken et al., 2010), these results indicate that rCPn0473 stimulates adhesion and/or internalization of EBs. In order to dissect protein function in more detail, we tested the adhesion-mediating C-terminus of rCPn0473 (aa 256-508) for its ability to boost



1098 T. Fechtner, J. N. Galle and J. H. Hegemann

Fig. 3. CPn0473 is expressed on the chlamydial cell surface and contributes to infection by C. pneumoniae

A and B. Detection of CPn0473 on the surface of infectious EBs. HEp-2 cells infected with *C. pneumoniae* (MOI = 1) were fixed with PFA at 72 hpi (A) or 96 hpi (B) and permeabilized with 0.1% Triton allowing staining of extrachlamydial proteins only (representative picture). DNA was stained with DAPI, chlamydial MOMP, LPS and CPn0473 with specific polyclonal antibodies. (A) The arrowheads point to EBs in which colocalization of CPn0473 and MOMP can clearly be seen. Scale bar: 2 µm. (B) The image shows an individual EB released from an inclusion. Scale bar: 1 µm C. Localization of CPn0473 on infectious EB by confocal microscopy at 15 min pi shown in all three projections (labelled xy, xz, yz). DNA was stained with DAPI (blue) and CPn0473 with specific polyclonal antibodies (green) (representative picture). N = nucleus. Scale bar: 2 μm. D. Biotinylation of surface localized CPn0473 on infectious EBs. About 5 × 10⁷ purified EBs were or were not incubated with 5 mM Biotin. After lysis and centrifugation biotinylated as well as non-biotinylated protein solutions were enriched using Streptavidin-Agarose and analysed on Western blots using polyclonal anti-EF-Tu, anti-DnaK, anti-Pmp21 or anti-CPn0473 antibodies. As an input control 1 x 10⁷ purified EBs were loaded

(representative blot) (n=3). E. Intact CPn0473 can be extracted from EBs with 2% Sarkosyl. Purified EBs were treated with PBS, 1% Triton X-100 or 2% Sarkosyl and pelleted.

The pellet (P) and supernatant (S) fractions were analysed on Western blok using monoclonal anti-S, and polyclonal anti-GroEL1, anti-EF-Tu, anti-MOMP or anti-CPn0473 antibodies (representative blot). Asterisk indicates CPn0473 fragments. F. Effects on infectivity upon pretreatment of *C. pneumoniae* EBs with various polyclonal antibodies. EBs were treated with pre-immune serum or antiserum at the indicated didutions prior to incubation with HEp-2 cells (MOI = 20). Infectivity was quantified 50 hpi by counting the numbers of inclusions in ten microscopic fields (duplicates). Infectivity of EBs pretreated with the pre-immune serum at each dilution was set to 100% (n = 3).

the infection. Even though the protein variant was able to bind human cells, it did not boost the infection. The N-terminus (aa 1-255) on the other hand was neither able to bind to human cells nor to boost the infection (Fig. S3C). This implies that the N-terminus of CPn0473 (aa 1-255) is required for the boost. Using additional smaller N-terminal deletion variants we could show that the first 150 aa of CPn0473 is essential to boost the infection, as a deletion variant lacking aa 151-255 still boosted infection, while a deletion variant lacking the first 171 amino acids did not show this phenotype anymore (Fig. S3). However, both protein variants were able to bind to HEp-2 cells to the same extent (41% respectively 42% of full-length CPn0473) (Fig. S1C). Thus, the capacities for adhesion and boost formation are located in different regions of CPn0473.

Next we tested whether pretreatment with rCPn0473 stimulated EB adhesion to host cells. In adhesion assays with fluorescence-labelled carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) EBs, binding to HEp-2 cells was unaffected by pretreatment with rCPn0473 (100 µg ml⁻¹), regardless of the number of inclusion-forming units (IFUs) employed

(Fig. 4C). Indeed, at high molecules of infection (MOI), adhesion of CFSE-labelled EBs was slightly but significantly reduced upon rCPn0473 pretreatment (85±5%), while the control - pretreatment with heparin, which is known to block adhesion - reduced EB binding to HEp-2 cells to $8.3\pm1\%$ (Fig. 4C) (Moelleken and Hegemann, 2008; Molleken et al., 2010). Adhesion was linearly dependent on IFU concentration, indicating that the target-cell surface was not saturated with EBs. Thus, we addressed the role of rCPn0473 in EB internalization using real-time PCR. Pretreatment of EBs with heparin abrogated OmcB-mediated adhesion, reducing relative internalization to 0.58 ± 0.22% in comparison to PBS and BSA controls (1.90 ± 0.56% and 1.16 ± 0.42% respectively) (Fig. 4D). In contrast, pretreatment of HEp-2 cells with rCPn0473 (100 µg ml⁻¹) markedly increased relative internalization to 14.26±2.67% (Fig. 4D). Again, we tested different deletion variants to analyse the effects of CPn0473 on the chlamydial internalization in more detail. Neither the binding-deficient variant CPn0473∆BD nor the deletion variant lacking the first 170 aa (CPn0473∆1-170)



CPn0473 promotes Chlamydia pneumoniae entry 1099

Fig. 4. Recombinant CPn0473 specifically boosts internalization of C. pneumoniae EBs

A. Impact of soluble CPn0473 on the efficiency of infection by C. pneumoniae. HEp-2 cells were pretreated with PBS, BSA (200 μ g ml⁻¹) or rCPn0473 (at the indicated concentrations) for 2 h prior to infection with *C. pneumoniae* (MOI = 20). As a control, EBs were also pretreated with heparin (500 μ g ml⁻¹) (*n* = 3). Infectivity was quantified as in Fig. 2E (duplicates). Infectivity of PBS-treated cells was set to 100%. Statistical significance of differences is denoted as in Fig. 1.

B. Influence of the time of addition of rCPn0473 on infectivity. PBS or rCPn0473 (100 μ g ml⁻¹) was added to HEp-2 cells at the indicated time points prior to (–), together with (0 h), after (+), or 1 h before and again 2 h after (–1/+2) infection with *C. pneumoniae* (MOI = 20). At 2 hpi the medium was replaced by chlamydial arowth medium either with (in case of –1/+2 +6) or without rCPn0473 (n = 3). Statistical significance of differences is denoted as in Fig. 1.

growth medium either with (in case of -1/+2, +2, +6) or without rCPn0473 (n=3). Statistical significance of differences is denoted as in Fig. 1. C. Impact of soluble rCPn0473 on adhesion of fluorescence-labelled *C. pneumoniae* BEs to HEp-2 cells. HEp-2 cells were pretreated with PBS or rCPn0473 ($100 \mu g m^{-1}$) for 2 h prior to exposure to the indicated numbers (IFUs) of CFSE-labelled EBs to HEp-2 cells. HEp-2 cells were pretreated with PBS or rCPn0473 (n=3). Statistical significance of differences is denoted as in Fig. 1. ($100 \mu g m^{-1}$) for 2 h prior to exposure to the indicated numbers (IFUs) of CFSE-labelled EBs for 1 h at 4°C to allow adhesion but not intermalization. Adhesion was quantified by flow cytometric measurement of the overall fluorescence of HEp-2 cells bearing attached CFSE-labelled EBs (triplicates). The fluorescence level associated with binding of 2 × 10⁷ IFUs of CFSE-labelled EBs to cells pretreated with PBS was set to 100% adhesion (n=3). As a control, 2 × 10⁷ IFUs of CFSE-labelled EBs were also pretreated with heparin (500 $\mu g m^{-1}$) and tested for adhesion. Statistical significance of differences is denoted as in Fig. 1. D. Effect of soluble full-length rCPn0473 (FL) and rCPn0473 deletion variants on internalization of *C. pneumoniae* EBs. HEp-2 cells were pretreated with PBS, BSA or rCPn0473 variants (100 $\mu g m^{-1}$) for 1 h prior to infection with *C. pneumoniae*. As a control, EBs were also pretreated with heparin as in A. At 2 hpi non-intermalized EBs were removed by treatment with trypsin. Internalization was then quantified by determining the ratio of chlamydial to human DNA in the cells by real-time PCR using 16S rINA and GAPDH primers (triplicates) (n=3). Statistical significance of differences is denoted as in Fig. 1.

Intermalized EBs were removed by treatment with trypsin. Intermalization was then quantified by determining the ratio of chlamydial to human DNA in the cells by real-time PCR using 16S rRNA and GAPDH primers (triplicates) (*n* = 3). Statistical significance of differences is denoted as in Fig. 1. E. Impact of chemical inhibitors of endocytosis on the infectivity of *C. pneumoniae* and its enhancement by rCPn0473. HEp-2 cells were treated with dynasore (0.1 mM, 30 min), MjCD (5 mM, 60 min), nystatin (30 µg ml⁻⁷, 30 min), cytochalasin D (CytoD) (20 µM, 60 min) or the corresponding solvent (DMSO). The medium was then replaced by medium containing the specific inhibitor or the corresponding solvent, rCPn0473 (100 µg ml⁻¹) or PBS and EBs (MOI = 20). At 2 hpi the medium was replaced by chlamydial growth medium. Infection was quantified as in Fig. 3E (duplicates). The infectivity of solvent and PBS-treated cells was set to 100%. The rCPn0473-induced boosting factor is given above each experiment (*n* = 3). Statistical significance of differences is denoted as in Fig. 1.

1100 T. Fechtner, J. N. Galle and J. H. Hegemann

boosted internalization. Interestingly, CPn0473∆151-255 was still able to enhance the relative internalization rate of *C. pneumoniae*, albeit to a lesser extent than the full-length rCPn0473 (Fig. 4D).

Next we wanted to test whether pre-loading of rCPn0473 onto infectious EBs would modulate their infectivity in a subsequent infection. Chlamydiae were pretreated with rCPn0473, PBS, BSA or rPmp21 prior to infection of HEp-2 cells. The infectivity of rCpn0473coated EBs was significantly increased (177±37%), compared with BSA-pretreated EBs (104 ± 14%). Interestingly, infectivity of Pmp21-coated EBs was also slightly increased (125±46 %) (Fig. S4A). These data indicate that while EB attachment is unaffected, prior exposure to rCPn0473 specifically increases the efficiency of uptake of EBs into host cells. Interestingly, we found that rCPn0473 also promoted infection by C. trachomatis E (to 174 ± 8.3% in comparison to controls), while the infectivity of serovar L2 was not significantly affected (Fig. S4C). Moreover, rCPn0473 had no effect on the adhesion and invasion properties of beads coated with rPmp21, the only known chlamydial adhesin and invasin (Molleken et al., 2013), suggesting that rCPn0473 does not act as a general booster of internalization (data not shown).

rCPn0473-dependent promotion of infection by C. pneumoniae requires intact lipid rafts

Because internalization of C. pneumoniae EBs is dependent on cholesterol- and sphingolipid-rich lipid-raft domains we asked whether such domains are required for promotion of C. pneumoniae infection by rCPn0473 (Stuart et al., 2003; Korhonen et al., 2012). Indeed, disruption of lipid rafts with 5 mM M_βCD resulted in a strong decrease in adhesion $(59 \pm 13\%)$ and in infectivity $(4 \pm 0.8\%)$ (Fig. S4B and 4E). Under these conditions, addition of rCPn0473 did not enhance the infection any more ($5 \pm 0.8\%$; $1.25 \times fold$ increase) (Fig. 4E). To confirm this result, we pretreated HEp-2 cells with the cholesterol-sequestering agent nystatin, which decreased infection to 68±4.4% of control values. Again, the addition of rCPn0473 enhanced infection of nystatin-treated cells by C. pneumoniae (Fig. 4E) by only 1.24-fold, identical to the boost observed in MßCD-treated cells. Thus, while the promotion of an infection by rCPn0473 is largely dependent on intact lipid rafts, a lipid-raft-independent role of CPn0473 cannot be completely excluded.

The establishment and maintenance of lipid raft microdomains in the human membrane is dependent on the cortical actin cytoskeleton (Goswami *et al.*, 2008), [reviewed in (Chichili and Rodgers (2009)]. Therefore, we pretreated HEp-2 cells with the actin-destabilizing agent cytochalasin D, which results in a drop of the infectivity of *C. pneumoniae* (66±3,4%), as well as the CPn0473-dependent boost of infection (78±10%; 1.18×fold increase) (Fig. 4E). To probe whether rCPn0473 acts during formation of the endocytic vesicle or after the pinching-off of the vesicle, we inhibited dynamin, a key player in many endocytotic pathways. Inhibition of dynamin with dynasore reduced the level of infection by *C. pneumoniae* to $14\pm5.5\%$ of control values (Fig. 4E). Interestingly, addition of rCPn0473 to such cells markedly increased infectivity to $46\pm16.2\%$ (3.39×fold increase) (Fig. 4E), strongly suggesting that the boosting effect of rCPn0473 is mediated at a level prior to the dynamin-mediated step.

C. pneumoniae enters host cells via lipid-raft marker-positive domains

Having demonstrated that the boosting effect is dependent on cholesterol we also asked if invasion by *C. pneumoniae* EBs might occur via the cholesterol-rich membrane domains known as lipid rafts. To study this issue, infected HEp-2 cells were fixed with PFA at 15 min pi and stained with fluorescence-labelled cholera toxin B-subunit (CTxB), which recognizes the ganglioside GM1 specific for lipid rafts. 97 ± 2% of the invading EBs were indeed found to be associated with CTxB-positive domains (Fig. 5A, top row) at this early time point. By 60 min pi the entire inclusion membrane surrounding each internalized EB was highly enriched for the lipid-raft marker (98±0.04%) (Fig. 5A, middle and lower rows).

It has been demonstrated recently that the EGFR, to which the C. pneumoniae invasin Pmp21 binds, also accumulates in the plasma membrane of the human cell immediately subjacent to invading bacteria and in the early inclusion membrane (Molleken et al., 2013). When cells were doublestained for lipid rafts (with FITC-labelled CTxB) and for EGFR with a monoclonal antibody early in the infection phase (60 min pi), 82 ± 10% of the EGFR signals were found to colocalize with CTxB-positive microdomains and the associated bacteria (Fig. 5B, upper row). In contrast, the distribution of human transferrin receptor, which is not involved in the uptake of chlamydial EBs and does not localize to lipid-raft domains, was not correlated with that of the invading bacteria (5±1% colocalization) (Fig. 5B, lower row). These data demonstrate that C. pneumoniae entry sites coincide with lipid rafts, and EGFR accumulates at these sites, and this may play a positive role in EB uptake.

rCPn0473 binds to lipid raft domains

Interestingly, when analyzing the binding of rCPn0473 to HEp-2 cells microscopically, bound rCPn0473 was distributed in a discontinuous pattern of dots. Thus, we asked if these coincided with lipid rafts by incubating HEp-2 cells with rCPn0473 and CTxB for 15 min at 4°C. We observed similar staining patterns for rCPn0473 and CTxB, with rCPn0473 often accumulating in regions of the PM that were strongly labelled by the lipid-raft indicator (Fig. 5C, upper row). This pattern was more obvious in a rare subpopulation of cells that showed a distinct separation between CTxB-positive



CPn0473 promotes Chlamydia pneumoniae entry 1101

Fig. 5. *C: pneumoniae* induces accumulation of lipid-raft domains Representative confocal microscopy pictures of early events in infection by *C. pneumoniae* shown in all three projections (labelled xy, xz, yz) (MOI = 20). **C:** Localization of CPn0473 on infectious EB by confocal microscopy at 15 min pi A. Cells were fixed with PFA at indicated time points and permeabilized with 2% saponin. DNA was stained with DAPI, lipid rafts with FITC- labelled CTxB. Scale bar: 2 µm. The frequency of colocalization of adhered EBs (at least 120) and CTxB is given in percent (*n*=3). B. Cells were fixed with PFA and DNA and lipid rafts were stained as in A. The epidermal growth factor receptor (EGFR) and human transferrin receptor (hTfR) were labelled with specific monoclonal antibodies. Scale bar: 2 µm. The frequency of colocalization of adhered EBs(at least 75), CTxB and the burnare GERPATE

CTxB and the human EGR/hTfR is given in percent (n=2). C. Recombinant CPn0473 adheres to CTxB-positive domains. HEp-2 cells were incubated for 15 min at 4°C with rCPn0473 (20 µg ml⁻¹) and FITC-labelled cholera toxin B-subunit (CTxB, 10 µg ml⁻¹) to stain lipid rafts. Cells were then fixed using PFA, permeabilized with 2% saponin and rCPn0473 was detected with a monoclonal anti-His antibody. The boxed area in the lower row is shown at higher magnification on the right (enlarged). Scale bar: 5 µm.

1102 T. Fechtner, J. N. Galle and J. H. Hegemann

and CTxB-negative areas (Fig. 5C, lower row), most likely induced by CTxB as we also observed this in cells treated with CTxB and BSA (data not shown). Analysis of other adhesion-competent CPn0473 variants revealed that they, like the full-length protein, strictly followed the CTxB staining pattern (data not shown), suggesting that the CPn0473 binding domain is the main determinant of binding to CTxB-positive PM microdomains.

As described before, the establishment and maintenance of lipid raft microdomains in the human membrane is dependent on the cortical actin cytoskeleton (Goswami et al., 2008), [reviewed in Chichili and Rodgers (2009)]. To investigate the role of the actin and microtubule cytoskeleton on the lipid rafts/CPn0473-distribution at the host membrane, cells were treated with cytoskeleton destabilizing drugs prior to adhesion of CPn0473. In untreated cells actin filaments at the host plasma membrane accumulated underneath the distinct CTxB-positive domains, colocalizing with bound rCPn0473 (Fig. S5A, upper row). The inhibition of actin polymerization in the host cell by cytochalasin D led to a decrease in CTxB staining as well as to a reduction in the distinct staining pattern towards a more uniform CTxB distribution (Fig. S5A, lower row). Interestingly, the rCPn0473 adhesion pattern very closely followed the CTxB signal pattern. In contrast disruption of the host microtubule cytoskeleton by nocodazole did not significantly influence the distribution of CTxB or rCPn0473 (Fig. S5B). This finding again clearly indicates that CPn0473 preferentially associates with lipid raft microdomains.

Discussion

We have characterized CPn0473 as a novel EB surface protein that binds to cholesterol-rich regions in the bilayer of the host cell PM and contributes to internalization of C. pneumoniae via lipid rafts. CPn0473 is a C. pneumoniae specific protein with no homologues in other organisms that is expressed late during the infection cycle. The protein can first be detected within chlamydial particles at 48 hpi, when chlamydial RB to EB re-differentiation has started, and is located on the surface of infectious EBs at 72 hpi when C. pneumoniae EBs start to leave their host cells for new infections (Fig. 2). Antibodies raised against rCPn0473 reduce infection comparable to antibodies directed against the OmcB adhesin. However, CPn0473 it is not part of the cOMC as it appeared to be Sarkosyl soluble and does not contain any cysteine residues (Fig. 3). Interestingly, C-terminal fragments of CPn0473 can be extracted from EBs with 1% Triton, but not with PBS. Thus, CPn0473 may be processed and released from the EB during infection, perhaps after the highly cross-linked surface has been disrupted by disulfide reduction. Host protein disulfide isomerase (PDI) activity is necessary for internalization of C. trachomatis L2, and disulfide reduction of outer

membrane proteins is necessary for surface display of chlamydial Hsp70 (Raulston *et al.*, 2002; Abromaitis and Stephens, 2009). Thus, human PDI may make CPn0473 accessible for cleavage by a chlamydial or a host cell protease upon attachment of the EB.

Surprisingly, recombinant CPn0473 dose-dependently enhances the internalization of C. pneumoniae EBs resulting in an increased infectivity. To our knowledge this is the first example of a pathogen-derived protein which is able to promote the uptake process when added to the infection. Typically, blocking experiments with a soluble recombinant adhesin attenuate the host cell entry process because the specific receptor is blocked by the protein. Thus, the CPn0473-induced boosting phenotype suggests an unusual mode of action for this adhesin. The molecular basis for this phenomenon is currently not understood but is the subject of a subsequent study. Interestingly, increasing the amount of chlamydial adhesins on the EB surface, by incubating the EBs with recombinant Pmp21 and CPn0473 prior to an infection, enhances subsequent infection significantly. Presumably. the more adhesion molecules available on the EB surface, the more interaction partners can be recruited to the EB binding site on the host cell membrane, which then might allow the bacteria to infect its host more efficiently.

The CPn0473 domain analysis revealed the existence of at least two functionally distinct domains within the protein. The adhesion to human cells requires a 50 amino acids long stretch in the C-terminus (aa 307 to aa 356) (Fig. S1). The internalization enhancing effect is depending on the adhesion of CPn0473 to the human cell, but in addition requires the N-terminal 150 amino acids (Figs 3 and S3). Thus, most likely, CPn0473 action can be divided in two steps. First CPn0473 may bind via the C-terminal binding domain to the human host cell, followed by the action of the N-terminal part that supports the uptake process. The identity of the human interaction partner/s to whom CPn0473 is binding to remains to be identified. In agreement with others, we found that uptake of C. pneumoniae EBs is dependent on lipid rafts and requires the cortical actin cytoskeleton (Clifton et al. 2005) (Stuart et al., 2003; Korhonen et al., 2012). However, we show for the first time that lipid-raft domains are enriched at C. pneumoniae entry points as well as in the early inclusion membrane (Fig. 5). Moreover, the CPn0473-induced boost on EB internalization is directly dependent on the integrity of lipid rafts (Fig. 4). Finally, recombinant CPn0473 preferentially associates with CTxB-positive domains of HEp-2 cells, suggesting that CPn0473 has a higher affinity for lipid rafts than for other domains of the PM. Both CTxB and rCPn0473 signal intensities are decreased in the absence of cortical actin (Fig. S5). Inhibition of dynamin reduces susceptibility to infection, and rCPn0473 also boosted residual infectivity following inhibition of dynamin, indicating that it acts

upstream of the pinching-off of the endocytotic vesicle. Depletion of dynamin-II by siRNA also reduces uptake of *C. trachomatis* L2, while a dominant-negative K44A mutant of dynamin I had no effect (Boleti *et al.*, 1999; Hybiske and Stephens, 2007). Thus, dynamin-II may be a key player in chlamydial endocytosis generally.

In light of these findings, we propose that the initial contact with the target cell is mediated by OmcB. followed by specific adhesion of Pmp21 and possibly other Pmps to the EGFR associated with lipid rafts (Molleken et al., 2013). CPn0473, either located on the EB surface or released from it. may interact with its yet unknown interaction partner associated with the cholesterol-rich lipid-raft domains, which then serve as sites of entry for C. pneumoniae. Indeed, we found that EGFR accumulates in the early inclusion membrane and this coincides with the lipid rafts. Interestingly, in the presence of high concentrations of ligand, EGFR has been reported to be endocytosed in a lipid raft-dependent manner (Sigismund et al., 2005). The LOX-1 receptor previously reported to be essential for infection by C. pneumoniae (Campbell et al., 2012) also localizes to, and requires lipid rafts for its activity (Matarazzo et al., 2012). Furthermore, the fact that the C. pneumoniae-specific CPn0473 boosts infection by C. trachomatis E - but not L2 (Fig. S2) - implies that the two biovars use different mechanisms to invade host cells. Indeed, infection by serovar E is dependent on lipid rafts, while L2 shows no such dependency (Stuart et al., 2003).

Lipid rafts are targeted by several invasive pathogens, which often recruit them to the point of entry, so as to build up a large signalling platform that promotes invasion of the host cell [reviewed in (Vieira *et al.*, 2010)]. Here we have characterized a novel chlamydial protein that is involved in the lipid raft-dependent uptake of the EB and may participate in the accumulation of lipid rafts at the entry site of *C. pneumoniae*. The identification of the human interaction partner of CPn0473 will be the aim of future studies, as well as analyzing the precise role of CPn0473 during chlamydial infection. Furthermore, targeting the ability of CPn0473 to bind to the host cell and to enhance the chlamydial infection may offer a useful novel strategy to diminish the virulence of *C. pneumoniae*.

Experimental procedures

Chemicals and antibodies

For sources of all chemicals and antibodies used in this study refer to Supplement Experimental Procedures section in the Supporting Information.

DNA manipulations and protein expression

Escherichia coli XL₁ blue (Stratagene) was used for plasmid amplification and the Origami strain (Novagen) for protein expression. Plasmids were constructed by *in vivo* homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae* strain

CPn0473 promotes Chlamydia pneumoniae entry 1103

YKM2, a GFP-expressing version of EBY100 (Invitrogen) as described previously (Moelleken and Hegemann, 2008). *Yersinia pseudotuberculosis* invasin was expressed as the C-terminally His-tagged Inv₄₇₉ variant (aa 490–969) for purification of recombinant protein or as the Inv₁₉₇ variant (aa 772–969) for the yeast adhesion assay as described earlier (Moelleken and Hegemann, 2008; Moelleken *et al.*, 2010). The binding domain of OmcB (aa 40–100) from *C. pneumoniae* was expressed with a C-terminal His-tag and fused N-terminally His-tagged proteins. GST- and His-tagged proteins were purified with the protocols supplied by Sigma Aldrich and Qiagen respectively, and analysed on Western blots.

Immunofluorescence microscopy

Microscopy was performed with a Zeiss Cell Observer® SD confocal spinning- disc microscope or Nikon Eclipse Ti-E C2 confocal microscope. Confocal images were assembled using ZEN2011 (Zeiss) or NIS Element (Nikon) software. All other images were assembled using Image Pro Plus software. For further details refer to Supplement Experimental Procedures section in the Supporting Information.

Propagation of chlamydial strains

The HEp-2 cell line (epithelial larynx carcinoma, ATCC No.: CCL-23) was used for propagation of chlamydial strains and for adhesion and infection experiments. The cells were cultured in DMEM GlutaMax supplemented with FCS, vitamins, non-essential amino acids, amphotericin B ($2.5 \,\mu g \,ml^{-1}$) and gentamicin ($50 \,\mu g \,ml^{-1}$) (Invitrogen). *C. pneumoniae* GiD and the *C. trachomatis* serovars L2 (L2/434/Bu) and E (DK-20) were propagated in HEp-2 cells in the presence of 1.2 $\mu g \,ml^{-1}$ cycloheximide, and EBs were purified using 30% gastrografin (Schering).

Adhesion and infection assays

Unless otherwise stated, all adhesion assays were carried out with fully confluent layers of 10^6 HEp-2 cells grown on glass coverslips at 37°C in an atmosphere containing 6% CO₂.

CPn0473 was identified by an artificial adhesion assay performed using a yeast display system as previously described (Moelleken and Hegemann, 2008; Moelleken *et al.*, 2010).

The mode of surface localization of CPn0473 was assessed by differential detergent extraction of EBs. For further details refer to Supplement Experimental Procedures section in the Supporting Information.

Adhesion of soluble recombinant proteins as well as of protein-coated beads was assessed by overlaying HEp-2 cells with culture medium containing the protein of interest $(100 \,\mu g m l^{-1})$, and bound protein was quantified by immunoblotting. For further details refer to Supplement Experi-

1104 T. Fechtner, J. N. Galle and J. H. Hegemann

mental Procedures section in the Supporting Information. The effect of prior exposure to rCPn0473 on EB adhesion was measured by flow cytometric analysis of purified chlamydial EBs labelled with CFSE (Schnitger *et al.*, 2007).

To assess the effects of selected recombinant proteins on infectivity, HEp-2 cells were overlaid with culture medium containing the relevant protein prior to infection. Conversely, in another set of experiments, infectious EBs were pre-coated with selected recombinant proteins prior to infection. Infectivity was then quantified 50 hpi by the standard microscopy assay. The impact of selected antibodies on infectivity was measured in a similar way, after infection with EBs (MOI=20) that had been preincubated in preimmune serum or antiserum.

To quantify effects of recombinant proteins on EB internalization, cells were overlaid with cell culture media containing recombinant protein and infected with purified EBs (MOI = 20). Internalization was quantified by qPCR using a previously described protocol (Kim *et al.*, 2011). For further details refer to Supplement Experimental Procedures section in the Supporting Information.

Surface biotinylation of C. pneumoniae EBs

The $1*10^7$ purified infectious *C. pneumoniae* EBs were biotinylated with 5 mM Sulfo-NHS-Biotin for 2 hours on ice. EBs were lysed and incubated with Streptavidin-Agarose at 4°C overnight. The agarose was washed 5 times with PBS to remove unbiotinylated proteins, then resuspended in 150 µl PBS and analysed for bound (biotinylated) proteins by immunoblotting using anti-CPn0473, anti-Pmp21, anti-EF-Tu and anti-DnaK antibodies. As total protein lysate of 5*10⁵ untreated EBs was used as an input control.

Disruption of endocytotic processes with chemical inhibitors

HEp-2 cells were incubated with different inhibitors prior to infection with purified EBs (MOI=20), or exposure to recombinant protein (100 $\mu g \, m l^{-1}$) and the same inhibitor. Infectivity was quantified 50 hpi as described in the preceding texts. For further details refer to Supplement Experimental Procedures section in the Supporting Information.

Acknowledgements

We are grateful to Klaus L. Meyer (University of Düsseldorf) for the help with FACS. We thank S. Birkelund (Aarhus University) and G. Zhong (University of Texas Health Science Center at San Antonio) for antibodies. TF was a scholarship holder of the Graduate School ' Molecules of Infection (MOI)' funded by the Jürgen Manchot Foundation. JNG is a scholarship holder funded by the Jürgen Manchot Foundation. This work was supported in part by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, CRC 1208, project A05 to JHH.

Author's contribution

JHH conceived the study; TF and JNG performed, analysed, and interpreted the experiments. TF, JNG and JHH discussed the experiments and wrote the manuscript. The authors declare no competing financial interests.

References

- Abdelrahman, Y.M., and Belland, R.J. (2005) The chlamydial developmental cycle. FEMS Microbiol Rev 29(5): 949–959.
- Abromaitis, S., and Stephens, R.S. (2009) Attachment and entry of Chlamydia have distinct requirements for host protein disulfide isomerase. *PLoS Pathog* 5(4e1000357).
- Bebear, C., and de Barbeyrac, B. (2009) Genital Chlamydia trachomatis infections. *Clin Microbiol Infect* **15**(1): 4–10.
- 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 (4): 544–556.
- Boleti, H., Benmerah, A., Ojcius, D.M., Cerf-Bensussan, N., and Dautry-Varsat, A. (1999) Chlamydia infection of epithelial cells expressing dynamin and Eps15 mutants: clathrin-independent entry into cells and dynamin-dependent productive growth. J Cell Sci 112(Pt 10): 1487–1496.
- Caldwell, H.D., Kromhout, J., and Schachter, J. (1981) Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis. *Infect Immun* 31(3): 1161–1176.
- Campbell, L.A., Puolakkainen, M., Lee, A., Rosenfeld, M.E., Garrigues, H.J., and Kou, C.C. (2012) *Chlamydia pneumoniae* binds to the lectin-like oxidized LDL receptor for infection of endothelial cells. *Microbes Infect* 14(1): 43–49.
- Chichili, G.R., and Rodgers, W. (2009) Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure. *Cell Mol Life Sci* 66(14): 2319–2328.
- Clifton, D.R., Fields, K.A., Grieshaber, S.S., Dooley, C.A., Fischer, E.R. *et al* (2004) A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin. *Proc Natl Acad Sci U* S A 101(27): 10166–10171.
- Fadel, S., and Eley, A. (2007) Chlamydia trachomatis OmcB protein is a surface-exposed glycosaminoglycandependent adhesin. *J Med Microbiol* **56**(Pt 1): 15–22.
- Fechtner, T., Stallmann, S., Moelleken, K., Meyer, K.L., and Hegemann, J.H. (2013) Characterization of the interaction between the chlamydial adhesin OmcB and the human host cell. J Bacteriol 195(23): 5323–5333.
- Goswami, D., Gowrishankar, K., Bilgrami, S., Ghosh, S., Raghupathy, R., Chadda, R., *et al.* (2008) Nanoclusters of GPI-anchored proteins are formed by cortical actin-driven activity. *Cell* **135**(6): 1085–1097.
- 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(4): 618–625.
- Hegemann, J. H., and Moelleken, K. (2012) Chlamydial adhesion and adhesins. In *Intracellular Pathogens I: Chlamydiales*. Tan, M., Bavoil, P., (eds). Washington DC: ASM Press.
- Hu, V.H., Harding-Esch, E.M., Burton, M.J., Bailey, R.L., Kadimpeul, J., and Mabey, D.C. (2010) Epidemiology and

CPn0473 promotes Chlamydia pneumoniae entry 1105

control of trachoma: systematic review. *Trop Med Int Health* **15**(6): 673–691.

- Hybiske, K., and Stephens, R.S. (2007) Mechanisms of Chlamydia trachomatis Entry into Nonphagocytic Cells. *Infect Immun* **75**(8): 3925–3934.
- Kim, J.H., Jiang, S., Elwell, C.A., and Engel, J.N. (2011) Chlamydia trachomatis Co-opts the FGF2 signaling pathway to enhance infection. *PLoS Pathog* 7(10e1002285).
- Korhonen, J.T., Puolakkainen, M., Haveri, A., Tammiruusu, A., Sarvas, M., and Lahesmaa, R. (2012) *Chlamydia pneumoniae* entry into epithelial cells by clathrinindependent endocytosis. *Microb Pathog* 52(3): 157-164.
- Matarazzo, S., Quitadamo, M.C., Mango, R., Ciccone, S., Novelli, G., and Biocca, S. (2012) Cholesterol-lowering drugs inhibit lectin-like oxidized low-density lipoprotein-1 receptor function by membrane raft disruption. *Mol Pharmacol* 82(2): 246–254.
- Moelleken, K., and Hegemann, J.H. (2008) The Chlamydia outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminogly-can binding. *Mol Microbiol* **67**(2): 403–419.
- Moelleken, K., Schmidt, E., and Hegemann, J.H. (2010) Members of the Pmp protein family of Chlamydia pneumoniae mediate adhesion to human cells via short repetitive peptide motifs. *Mol Microbiol* **78**(4): 1004–1017.
- 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. *Mol Microbiol* 78(4): 1004–1017.
- Molleken, K., Becker, E., and Hegemann, J.H. (2013) The Chlamydia pneumoniae invasin protein Pmp21 recruits the EGF receptor for host cell entry. *PLoS Pathog* 9(4e1003325).
- Raulston, J.E., Davis, C.H., Paul, T.R., Hobbs, J.D., and Wyrick, P.B. (2002) Surface accessibility of the 70kilodalton Chlamydia trachomatis heat shock protein following reduction of outer membrane protein disulfide bonds. *Infect Immun* **70**(2): 535–543.
- Schnitger, K., Njau, F., Wittkop, U., Liese, A., Kuipers, J.G., Thiel, A., et al. (2007) Staining of Chlamydia trachomatis elementary bodies: a suitable method for identifying infected human monocytes by flow cytometry. J Microbiol Methods 69(1): 116–121.

- Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., *et al.* (2005) Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** (8): 2760–2765.
- Stephens, R.S., Koshiyama, K., Lewis, E., and Kubo, A. (2001) Heparin-binding outer membrane protein of chlamydiae. *Mol Microbiol* **40**(3): 691–699.
- Stuart, E.S., Webley, W.C., and Norkin, L.C. (2003) Lipid rafts, caveolae, caveolin-1, and entry by Chlamydiae into host cells. *Exp Cell Res* 287(1): 67–78.
- Vieira, F.S., Correa, G., Einicker-Lamas, M., and Coutinho-Silva, R. (2010) Host-cell lipid rafts: a safe door for microorganisms? *Biol Cell* **102**(7): 391–407.
- Wuppermann, F.N., Hegemann, J.H., and Jantos, C.A. (2001) Heparan sulfate-like glycosaminoglycan is a cellular receptor for *Chlamydia pneumoniae*. J Infect Dis 184(2): 181–187.
- Wuppermann, F.N., Molleken, 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. *J Bacteriol* **190**(10): 3757–3767.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Fig. S1. CPn0473 binds to human cells via a 50 aa region in its C-terminus.

Fig. S2. Detection of CPn0473 with the polyclonal anti-CPn0473 antibody.

Fig. S3. The rCPn0473- dependent boost of infection is mediated by its first 150 amino acids.

Fig. S4. Binding of *C. pneumoniae* is affected by cholesterol sequestering agents and recombinant CPn0473 boosts the infection by *C. pneumoniae* and *C. trachomatis* serovar E but not serovar L2.

Fig. S5. CTxB-positive domains are actin-dependent and targeted by rCPn0473.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1: Aufbau einer Phospholipidmembran	.16
Abb. 3.2: PS Externalisierung in apoptotischen Zellen und differenzierten Blutzellen	.23
Abb. 3.3: Taxonomie des Phylum Chlamydia	.31
Abb. 3.4: Der chlamydiale Infektionszyklus	. 35
Abb. 3.5: Adhäsion und Internalisierung von C. pneumoniae	. 38
Abb. 3.6: Das C. pneumoniae Protein CPn0473.	.40
Abb. 6.1: CPn0473 sitzt auf der Oberfläche infektiöser chlamydialer EBs	109
Abb. 6.2: Rekombinantes CPn0473 bindet an einen humanen proteinösen Interaktionspartner	113
Abb. 6.3: Rekombinantes CPn0473 interagiert mit Phosphatidylserin in artifiziel	llen
Membransystemen	117
Abb. 6.4: Die Interaktion mit PS erfolgt durch eine Domäne im N-Terminus von rCPn0473	119
Abb. 6.5: Die chlamydiale Internalisierung ist abhängig von der Verfügbarkeit von PS in	der
Wirtszelle	121
Abb. 6.6: Die Infektion mit C. pneumoniae induziert eine PS Externalisierung an der human	nen
Plasmamembran	124
Abb. 6.7: Das PS-bindende Lactadherin bindet externalisiertes PS an der humanen Plasmamembr	ran.
1	126
Abb. 6.8: Rekombinantes CPn0473 induziert die Externalisierung von PS an der humanen Membr	ran.
	128
Abb. 6.9: Die PS Externalisierung durch rCPn0473 wird durch dessen N-Terminus induziert und	l ist
von der Apoptose entkoppelt	130
Abb. 6.10: Die rCPn0473-induzierte PS Externalisierung ist abhängig von der Integrität	der
Cholesterin-reichen Mikrodomänen	134
Abb. 6.11: Die C. pneumoniae-induzierte PS Externalisierung ist CPn0473-abhängig	137
Abb. 6.12: Relokalisierung der humane Scramblase Xkr8 nach PS Externalisierung durch rCPn04	73.
	140
Abb. 6.13: Ausrichtung von rCPn0473 in der humanen Plasmamembran	142
Abb. 6.14: Eine rCPn0473 Variante ohne Transmembrandomäne interagiert nicht mehr mit s	sich
selbst	144

Abb. 6.15: rCPn0473 interagiert mit sich selbst und penetriert Membranen	über	seine
Transmembrandomäne		147
Abb. 6.16: In asymmetrischen GUVs transportiert rCPn0473 Phosphatidylserin von de	r innere	n auf
die äußere Membranseite		150
Abb. 7.1: Bioinformatische Analyse des CPn0473 (LIPP) N-Terminus		158
Abb. 7.2: Bioinformatische Analyse der Transmembran Domäne (TM)		171
Abb. 7.3: Die Lipid-und Protein-Geometrie bestimmt die Krümmung einer Membran		173
Abb. 7.4: Zwei Modelle zur Proteinintegration in eine Membran		176
Abb. 7.5: Die funktionelle Rolle von LIPP in der chlamydialen Infektion		178
Abb. 8.1: Weiterführende Experimente zur Relokalisierung von humanen Membr	anprote	einen
durch rCPn0473		196
Abb. 8.2: Nachweis der Lipid-Asymmetrie in GUVs durch rLactC2 Bindung.		197

Danksagung

Zunächst möchte ich mich an dieser Stelle bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Johannes Hegemann bedanken. Nachdem er mich bereit bei meiner Bachelor- und Master-Arbeit betreut hatte, gab er mir die Möglichkeit meine Arbeit an diesem spannenden Thema weiter zu führen. Er unterstützte mich dabei meinen ersten eigenen erfolgreichen Forschungsantrag zu schreiben und stand mir jederzeit für konstruktive Gespräche zur Verfügung. Gemeinsam konnten wir zwei Manuskripte erfolgreich publizieren und ein drittes hoffentlich bald einreichen.

Ich möchte mich auch herzlich bei Herrn Prof. Dr. Lutz Schmitt für die Übernahme des Zweitgutachter und für die vielen guten experimentellen Vorschläge während unserer Treffen bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt natürlich meinen Eltern und meinen beiden Schwestern für ihre liebevolle Unterstützung während meiner Studienzeit und auch darüber hinaus. Selbstverständlich gilt mein ganz besonderer Dank meiner Freundin, Stefanie Kobus, für die schöne Zeit und die großartige Unterstützung die ich erfahren durfte. Auch meinen Freunden möchte ich an dieser Stelle danken, die nach einem anstrengenden Arbeitstag oder einer anstrengenden Woche bei einem Bier wieder aufgebaut haben. Insbesondere Chris, Daniel, Marcel, Max und Thomas waren dabei immer eine große Hilfe.

Außerdem möchte ich mich bei allen ehemaligen (Alison, Astrid, Boris, Eli, Rafat, Sandra, Sebastian, Sonja, Sören und Tim), den gegenwärtigen (Corinna, Daisy, Dominik, Gaby, Irina, Katja, Klaus, Phillip, Sebastian und Susi) Mitarbeitern der AG Hegemann, den Mitarbeitern der AG Fleig (Anand, Caro, Eva, Marina, Natascha, Visnja und Ursula) und allen Bachelor- und Masterstudenten der beiden Arbeitsgruppen für die wundervolle Zeit im Labor bedanken. Dabei möchte ich einem ehemaligen Mitglied besonders danken: Dr. Tim Fechtner. Tim war ein großartiger Lehrer und Mentor während meiner Bachelor- und Masterarbeit. Aber auch außerhalb des Labors war er mir bei unzähligen Gelegenheiten ein großer Freund. Auch bei Katja Mölleken möchte ich mich ausdrücklich für ihre Hilfe und Unterstützung in den letzten Jahren bedanken. Bei Sebastian Hänsch, mittlerweile am CAi (HHU, Düsseldorf) tätig, bedanke ich mich für das ImageJ Skript zur Analyse der asymmetrischen GUVs, welches mir bei der Auswertung eine große Hilfe war.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Thomas Manchot und seiner Manchot-Stiftung für die Bewilligung meines Forschungsantrags und der dreijährigen Finanzierung meiner Arbeit über ein Stipendium. Der Graduierten Schule MOI II danke ich für die interessante Zeit während der Vorlesungen und den Symposien. Insbesondere der MOI II Koordinatorin Frau Dr. Inge Krümpelbeck gilt dabei mein Dank für ihre großartige Hilfe.

Ein großer Dank geht natürlich auch an meine Kooperationspartner. Zuerst an Dr. Thorsten Eierhoff für seine großartigste Unterstützung bei den GUV Experimenten, sowie der Etablierung des GUV Systeme an der HHU. Die gemeinsame Zeit, sowohl in Freiburg als auch in Düsseldorf werde ich nie vergessen. In diesem Zusammenhang geht mein Dank natürlich auch an Prof. Dr. Winfried Römer, in dessen Institut in Freiburg wir vor über vier Jahren die ersten Experimente mit artifiziellen Membransystemen machen durften und der uns bis heute großartig unterstützt. Bei Olivia Spitz aus der AG Schmitt möchte ich mich für die Hilfe mit den MALS Experimenten bedanken, die wir hoffentlich bald fortsetzen können. Ebenso danke ich Frau Dr. Astrid Höppner aus der Crystal und X-Ray Facility für die Möglichkeit erste Experimente bezüglich der Studie der CPn0473 Proteinstruktur machen zu dürfen. Auch hier bin ich gespannt, wie diese Experimente weiterlaufen.

Mein letzter Dank gilt natürlich den Korrektoren dieser Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst verfasst wurde und dass ich keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die aus anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn entsprechend übernommen wurden, habe ich mit Quellenangaben kenntlich gemacht.

Jan Niklas Galle

(Düsseldorf, November 2017)