

Die Funktion des *Chlamydia pneumoniae* Adhäsins LIPP und seines humanen Interaktionspartners 14-3-3ζ in der Infektion

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Philipp Timo Hanisch aus Viersen

Düsseldorf, November 2019

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: 19. Dezember 2019

Inhaltsverzeichnis

AE	BKÜF	RZUNGSVERZEICHNIS	
1	ZU	ISAMMENFASSUNG	
2	SU	JMMARY	
3	FI	NI FITUNG	
Ū			
3.1	I	Die humane Plasmamembran	9
(3.1.1	Phospholipide als Bausteine biologischer Membranen	. 11
(3.1.2	Besonderheiten der humanen Plasmamembran	. 11
(3.1.3	Lipid-Transporter der humanen Plasmamembran	. 12
3.2		Die Plasmamembran als Angriffsziel von Pathogenen	14
(3.2.1	Die Rolle amphipathischer Helices in der Pathogen-Infektion	. 14
;	3.2.2	Der Zipper- und Trigger-Mechanismus	. 16
3.3	(Chlamydien	18
(3.3.1	Die Gattung Chlamydia	. 18
(3.3.2	Der chlamydiale Entwicklungszyklus	. 20
(3.3.3	Chlamydia pneumoniae	. 22
(3.3.4	Cpn Adhäsion und Internalisierung	. 23
3.4	. 1	LIPP (CPn0473)	25
3.5		Die 14-3-3 Proteinfamilie: Historie, Struktur und Ligandenbindung	. 27
3.6		Funktionelle Eigenschaften von 14-3-3 Proteinen	. 31
3.7		14-3-3ζ	. 33
4	ZIE	ELSETZUNG	
5	ТЕ	IL I: MANUSKRIPT I	
5.1	7	Zusammenfassung	37
6	TE	IL II: MANUSKRIPT II	
			05
b .1	4	zusammeniassung	. 65
7	TE	IL III: WEITERE ERGEBNISSE	

7.1	Einleitung und Zusammenfassung bisheriger Daten	91		
7.2	Zielsetzung	92		
7.3	Naterial			
7.3.1	Gebrauchsmaterialien	93		
7.3.2	Geräte und Maschinen	94		
7.3.3	Chemikalien	96		
7.3.4	Lösungen und Puffer	98		
7.3.5	Agarosen	100		
7.3.6	Antikörper	100		
7.3.7	Färbemittel	101		
7.3.8	Kits	101		
7.3.9	Größenstandards	101		
7.3.1	0 Plasmide	101		
7.3.1	1 Zellen und Zelllinien	102		
7.3.1	Eukaryotische Zelllinien	102		
7.3.2	Medien:	104		
7.4	Methoden	105		
7.4.1	Molekularbiologische Methoden	105		
7.4.2	Biochemische Methoden	111		
7.4.3	Zellbiologische Methoden	119		
7.4.4	Mikroskopie	121		
7.5	Ergebnisse und Diskussion	123		
7.5.1	rLIPP formt oligomere Strukturen	123		
7.5.2	rLIPP induziert Membrankrümmung an synthetischen Membranen	127		
7.5.3	Die LIPP-Bindedomäne blockiert Adhäsin-typisch die chlamydiale Infektion	128		
7.5.4	Die rLIPP-Bindung ist abhängig von Heparansulfat-ähnlichen Glykosaminoglykanen	129		
7.5.5	LIPP, ein Adhäsin mit außergewöhnlichen Fähigkeiten	135		
LITER	ATURVERZEICHNIS	9		
ABBILDUNGSVERZEICHNIS164				
DANK	SAGUNG	5		

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG...... 167

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikromolar
AG	Arbeitsgruppe
Amp	Ampicillin
APH	amphipathische Helix
AS	Aminosäure
BD	Bindedomäne
Вр	Basenpaar
BSA	Kälberserum Albumin
cm ²	Quadratzentimeter
Ctr	Chlamydia trachomatis
Cpn	Chlamydia pneumoniae
cOMC	chlamydialer Außenmembrankomplex (chlamydia outer membrane complex)
dd	deionisiert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPA	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3- Phosphatidsäure (Phosphatidsäure)
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-Phosphocholin (Phosphatidylcholin)
DOPE	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-Phosphoethanolamin (Phosphatidylethanolamin)
DOPS	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoserin (Phosphatidylserin)
EB	Elementarkörperchen (elementary body)
E. coli	Escherichia coli
et al.	und andere
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	Infektions-erhöhende Domäne
IFU	Einschluss-bildende Einheit (inclusion forming unit)
IPTG	IsopropyI-β-D-Thiogalactopyranosid

Kan	Kanamycin
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
I	Liter
Lo	Membranphase hoher Ordnung (Lipid Raft)
Ld	Membranphase niedriger Ordnung
LGV	Lymphogranuloma venereum
LPS	Lipopolysaccharid
М	molar
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mМ	millimolar
MOI	Multiplizität der Infektion (multiplicity of infetion)
ng	Nanogramm
N-WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
OD	Optische Dichte
OmcB	Außenmembran Komplex Protein B
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PA	Phosphatidsäure
PBS	Physiologischer Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phosphatidylethalonamin
PFA	Para-Formaldehyd
PIP	Phosphatidylinositol
Pmp	Polymorphes Membran Protein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
r	rekombinant
RB	Retikularkörperchen (reticulate body)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SID	Selbstinteraktionsdomäne
SM	Sphingomyelin
SNX9	sortin nexin 9
sek	Sekunde
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem

Tarp	translocated actin recruiting protein
TEMED	Tetramethylethylendiamin
ТМ	Transmembrandomäne
U	Einheiten (Units)
ü/N	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
g	x-fache Erdbeschleunigung

1 Zusammenfassung

Das obligat intrazelluläre humanpathogene Bakterium Chlamydia pneumoniae (Cpn) nutzt verschiedene Adhäsine, um an die Wirtszelle zu binden. Neben dem Outer membrane complex B Protein (OmcB), welches Bindung über Heparansulfat-ähnliche Glykosaminoglykane (HS-ähnliche GAGs) vermittelt, und dem Polymorphen Membranprotein 21 (Pmp21), das mit dem humanen epidermal growth factor receptor (EGFR) interagiert, konnte CPn0473 als weiteres Cpn spezifisches Adhäsin beschrieben werden. Nach Bindung an einen unbekannten, humanen Interaktionspartner interagiert das Adhäsin mit negativ geladenen Phospholipiden und externalisiert selbstständig Phosphatidylserin (PS) von der inneren auf die äußere Lipidschicht der humanen Plasmamembran. Eine Vorinkubation von humanen Zellen mit rekombinantem CPn0473 (rCPn0473) führt zu einem Infektions-erhöhenden Effekt bei einer nachfolgenden Infektion. Über die potenzielle C-terminale Transmembrandomäne (TM) ist das Protein in der Lage Membranen zu penetrieren. Der genaue Mechanismus der PS Bindung und PS Externalisierung sowie der Membranpenetration ist bis jetzt ungeklärt. Aufgrund seiner einzigartigen Fähigkeiten wurde CPn0473 in Lipid Internalization Promoting Protein, kurz LIPP, umbenannt. In dieser Arbeit sollte ein möglicher humaner Interaktionspartner von LIPP identifiziert und die Interaktion von LIPP mit der Plasmamembran näher charakterisiert werden, um dessen Funktion innerhalb der frühen, chlamydialen Infektion weiter aufzuklären. Bindestudien an GAG-defizienten Zelllinien zeigten, dass LIPP, ähnlich wie OmcB, über HS-ähnliche GAGs an die humane Zelle bindet. Eine Vorinkubation von rLIPP mit Heparin hob die Bindung sowie den Infektions-erhöhenden Effekt auf. Über einen Hefe-Zwei-Hybrid-Screen konnte das humane, zytosolische Adapterprotein 14-3-3ζ als Interaktionspartner identifiziert werden. In vitro Pulldown-Experimente zeigten, dass rLIPP und r14-3-3ζ biochemisch miteinander interagieren. In Transfektionsexperimenten und Experimenten an Cpn infizierten Humanzellen wurde die in vivo Interaktion gezeigt. Adhäsionsexperimente an humanen Zellen und Versuche mit r14-3-3ζ gefüllten giant unilamellar vesicles (GUVs) demonstrierten, dass rLIPP in der Lage ist 14-3-3ζ selbständig vom Zytosol zur humanen Plasmamembran zu rekrutieren. Eine erhöhte, zytosolische 14-3-32 Verfügbarkeit bedingt eine erhöhte Aufnahme der elementary bodies (EBs) während der frühen Cpn Infektion und führt zu einer Vermehrung chlamydialer Einschlüsse 48 h nach der Infektion. Um mit 14-3-3ζ zu interagieren muss LIPP die humane Plasmamembran durchdringen. Mittels bioinformatischer Analyse konnten drei amphipathische Helices (APHs) innerhalb des LIPP N-Terminus identifiziert werden. Bindestudien an GUVs und Humanzellen zeigten, dass die ersten beiden APHs essenziell für die PS Bindung und PS Externalisierung sind, während die dritte APH einen regulativen Effekt vermittelt und die Membranpenetration fördert. Eine Deletion der ersten APH führte zudem zum Verlust des Infektions-erhöhenden Effekts und der 14-3-3ζ-Interaktion, womit sie unerlässlich für die erhöhte Aufnahme der Cpn EBs ist. Dies ist das erste Beispiel eines bakteriellen Adhäsins, welches mittels dreier APHs und einer TM eine Membran penetriert, um PS zu externalisieren und mit einem zytosolischen Adapterprotein zu interagieren.

2 Summary

The obligate intracellular human pathogenic bacterium *Chlamydia pneumoniae* (*Cpn*) uses various adhesins to bind to the host cell. In addition to the outer membrane complex B protein (OmcB), which mediates binding via heparan sulfate-like glycosaminoglycans (HS-like GAGs) and the polymorphic membrane protein 21 (Pmp21), which interacts with the human epidermal growth factor receptor, CPn0473 has been described as an additional *Cpn* specific adhesin. After binding to an unknown human interaction partner, the adhesin interacts with negatively charged phospholipids and externalizes phosphatidylserine (PS) from the inner to the outer leaflet of the human plasma membrane. A preincubation of human cells with recombinant CPn0473 (rCPn0473) leads to an infection-enhancing effect during a subsequent *Cpn* infection. Via a predicted C-terminal transmembrane domain (TM), the protein can penetrate membranes. The exact mechanisms of PS binding and PS externalization as well as membrane penetration remains unknown. Due to its unique properties, CPn0473 was renamed Lipid Internalization **P**romoting **P**rotein (LIPP). The aim of this work was to identify a human interaction partner of LIPP and furthermore characterize the interaction of LIPP with the human plasma membrane to elucidate its function within the early chlamydial infection.

Binding studies on GAG-deficient cells showed that LIPP, like OmcB, binds to human cells via HS-like GAGs. Preincubation of rLIPP with heparin inhibited LIPP binding and the infection increasing effect. Using a yeast two-hybrid screen, the cytosolic human adapter protein 14-3-3 ζ was identified as an interaction partner. *In vitro* pull-down experiments showed that rLIPP and 14-3-3 ζ interact biochemically. Transfection experiments and experiments with *Cpn* infected cells demonstrated the *in vivo* interaction. Adhesion experiments on human cells and experiments on giant unilamellar vesicles (GUVs) with luminal r14-3-3 ζ demonstrated that rLIPP on its own recruits 14-3-3 ζ to the inner leaflet of the membrane. An enhanced cytosolic 14-3-3 ζ availability leads to an increased uptake of elementary bodies (EBs) during early *Cpn* infection and to more chlamydial inclusions 48 h post infection.

To interact with 14-3-3 ζ , LIPP must penetrate the human plasma membrane. Using bioinformatic analysis, three amphipathic helices (APHs) were identified within the LIPP N-terminus. Binding studies on GUVs and human cells showed that the first two APHs are essential for PS binding and PS externalization, while the third APH mediates a regulatory effect and increases the LIPP mediated membrane penetration. Deletion of the first APH additionally leads to the loss of the infection enhancing effect and the interaction with14-3-3 ζ , making it essential for the *Cpn* EB uptake. This is the first example of a bacterial adhesin that uses three APHs and a TM to penetrate a membrane, externalize PS and interact with a cytosolic adapter protein.

3 Einleitung

3.1 Die humane Plasmamembran

Für alle Organismen von Archaeen bis zu den höheren Eukaryonten bieten Biomembranen die Fähigkeit zur Abgrenzung zu anderen Zellen und zur Kompartimentierung innerhalb der eukaryotischen Zellen. Die Plasmamembran (PM) gewährleistet dabei einen direkten Schutz des zytosolischen Zellinneren durch Abgrenzung zum extrazellulären Raum. Bezogen auf eukaryotische und besonders humane Zellen stellt die PM auch die erste Barriere für extra- und intrazelluläre Pathogene dar.





(A) Aufbau eines Phospholipids. Die Fettsäureschwänze haben Einfluss auf die Krümmung der Biomembran. Bei Eingliederung in eine planare Membran kann positive und negative Krümmung induziert werden. Zylinderförmig: keine Krümmung (PS = Phosphatidylserin, PC = Phosphatidylcholin), zylinderförmig: durch kleinere Kopfgruppe negative Krümmung (PE = Phosphatidylethanolamin, PA = Phosphatidylsäure, CL= Cardiolipin), kegelförmig: negative Krümmung (Detergenzien, LPL = Lysophospholipide), invers kegelförmig: positive Krümmung (LPC = Lysophosphatidylcholin, PIPs = Phosphatidylinositole).
Phospholipid-Schema verändert nach (Rice University, 2019), Form der Lipide aus (Li et al., 2015; McMahon und Boucrot, 2015).
(B) Spontane Assemblierung von Phospholipiden in aquatischer Lösung. Neben Micellen und Liposomen unterschiedlicher Größe kann auch eine planare Doppellipidschicht entstehen. Verändert nach (Mariana Ruiz Villareal, 2007).

(C) Schema der humanen Plasmamembran mit assoziierten Proteinen und Glykolipiden. Die Zuckerketten der Glykolipide/-proteine sind als grüne/blaue Kugeln dargestellt. Das Cholesterol der Plasmamembran ist in Gelb dargestellt. PC = Phosphatidylcholin, SM = Sphingomyelin, PA = Phosphatidylsäure, PS = Phosphatidylserin, PE = Phosphatidylethanolamin, PI3P = Phosphatidylinositol-3-phosphat, PI(4,5)P₂ = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Verändert nach (Rice University, 2019), Phospholipidkonzentrationen der PM aus (Pankov et al., 2006).

(D) Schematische Darstellung der in die PM integrierten Lipid-Transporter. Die Transportrichtung der Lipide ist durch Pfeile markiert.

3.1.1 Phospholipide als Bausteine biologischer Membranen

Die humane PM besteht etwa zu aus gleichen Teilen aus Lipiden und Proteinen (Abbildung 1). Phospholipide sind zumeist aus zwei, in Länge variierenden, hydrophoben Fettsäureschwänzen und einer hydrophilen Kopfgruppe aufgebaut (Abbildung 1A). Durch den amphipathischen Charakter der Phospholipide sind Biomembranen zur spontanen Assemblierung in wässriger Umgebung fähig. Hierbei werden die hydrophoben Fettsäureschwänze zueinander ausgerichtet, wobei die hydrophilen Kopfgruppen nach außen, hin zur aquatischen Umgebung gewendet werden. Durch die chemischen Eigenschaften der verschiedenen Phospholipide entstehen so verschiedene Membran-Konformationen. Während die zylinderförmigen Phospholipide Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylserin (PS) eine planare Membranschicht bilden, induzieren andere Phospholipide positive oder negative Krümmung. Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylsäure (PA) und Cardiolipin (CL) sind zwar nahezu zylinderförmig, induzieren aber aufgrund ihrer kleineren Kopfgruppe eine negative Krümmung in dicht gepackten Membranen. Lysophospholipide (LPL) sowie Detergenzien induzieren hingegen eine stärkere, negative Krümmung. Werden vermehrt die invers kegelförmigen Phosphatidylinositole (PIPs) oder Lysophosphatidylcholin (LPC) eingebaut, führt dies zu positiver Krümmung der Membran (Li et al., 2015; McMahon und Boucrot, 2015) (Abbildung 1A). Neben runden, einlagigen Mizellen (wenige Nanometer im Durchmesser, kein eingeschlossenes Volumen) und doppellagigen Liposomen/Vesikeln (im Bereich einiger Nanometer (Liposomen) bis mehrere 100 Mikrometer (giant unilamellar vesicle (GUVs)), schließen Volumen ein) können die Lipide auch planar in einer Doppelschicht angeordnet werden, wodurch es zur Formung der PM kommt (Abbildung 1B+C). Die entstandene Lipid-Doppelschicht dient über ihren Kohlenwasserstoffkern als Barriere für die meisten hydrophilen Moleküle, wobei sehr kleine - und lipophile Moleküle weiterhin in der Lage sind, die PM zu durchdringen (Pautot, Frisken und Weitz, 2003; van den Brink, E., van der Laan, E., Killian, J.A., de Kruijff, 2004; Weinberger et al., 2013).

3.1.2 Besonderheiten der humanen Plasmamembran

Da die humane PM nicht nur als Barriere, sondern auch als Kommunikationsplattform dient, muss ein Transport von wichtigen Signalstoffen und komplexeren Molekülen gewährleistet werden. Dazu durchdringen zum einen integrale Membranproteine die PM, zum anderem lagern sich periphere Membranproteine an diese an und vermitteln neben dem Proteintransport über die Membran weitere enzymatische Prozesse, Signalweiterleitungen und den Zell-Zell-Kontakt. Sie dienen zudem der Verankerung des kortikalen Aktin-Zytoskelettes sowie dem Aufbau des Glykokalyx (Saarikangas, Zhao und Lappalainen, 2010; Grecco, Schmick und Bastiaens, 2011; Uchimido, Schmidt und Shapiro, 2019).

Weitere Besonderheiten der PM neben der Komplexität sind ihr asymmetrischer Aufbau sowie ihre Fluidität. Bestimmte Phospholipide sind exklusiv auf der Innen- oder Außenseite der Membran lokalisiert. Dies ist von hoher Bedeutung für die Rekrutierung peripherer Membranproteine und dem endosomalen Transport. Cholinhaltige Lipide wie Phosphatidylcholin (PC) oder Sphingomyelin (SM) bilden gemeinsam mit Phosphatidylsäure (PA) die äußere Lipidschicht der PM. Die Aminophospholipide Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) sind in gesunden Zellen auf der Innenseite der PM lokalisiert. Gemeinsam mit den Phosphatidylinositole (PIPs) Phosphatidylinositol-3-phosphat (PI3P) und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat PI(4,5)P2 bilden sie die innere der PM-Lipiddoppelschicht. Die restlichen Mitglieder der PIP-Familie lokalisieren in den Membranen des endosomalen Netzwerks. Dort sind sie für den Vesikel-Transport innerhalb der Zelle relevant (van Meer, Voelker und Feigenson, 2008; Jean und Kiger, 2012). Neben den reinen Phospholipiden und assoziierten/integralen Membranproteinen besteht die PM auch aus Glykolipiden (mit Zuckern modifiziert) und Cholesterol. Als Sterol (polyzyklischer Alkohol) besitzt es statt der Fettsäureschwänze ein Grundgerüst aus hydrophobem Sterin und ist auf beiden Seiten der PM lokalisiert. Bezogen auf die reinen Lipide (inklusive Cholesterol) ist die humanen Plasmamembran zu 43,2 % aus PC, 12,2 % SM, 1,5 % PA, 16,1 % PE, 7,6 % PIPs, 6,4 % PS und 13 % Cholesterol aufgebaut (Pankov et al., 2006) (Abbildung 1C).

Innerhalb der PM sind Proteine und Lipide in einem fluiden Mosaik-Modell organisiert. Dies bedeutet, sie sind nicht starr verankert, sondern lateral frei beweglich (Singer und Nicolson, 1972). Stabilität wird über die Glykokalyx und das eng assoziierte Aktin-Zytoskelett vermittelt. Neben der globalen Stabilität vermittelt Cholesterol lokal Membranversteifungen. Durch den rigiden Carbonring des Sterols kann es mit den angrenzenden Phospholipiden interagieren. Antagonistisch dazu vermitteln Lipide mit kurzkettigen Fettsäureschwänzen eine erhöhte Fluidität (Cooper, 2000). Die PM kann so in zwei distinkten Hauptphasen unterteilt werden. Innerhalb der geordneten Phasen (Lo-Phasen/Lipid Rafts) ist eine Akkumulation von Cholesterol und Sphingolipiden zu finden. Zudem sind diese Phasen durch eine Vielzahl von Glycosylphosphatidylinositol-verankerten Proteinen (GPI-Proteinen) und Proteinen zur Signaltransduktion definiert. Lo-Phasen können so als Interaktionsplattform dienen. In ungeordneten Phasen (Ld-Phasen) sind die Phospholipide hingegen deutlich weniger dicht organisiert. Diese Phasen sind somit fluider als die Lo-Phasen (Simons und Ikonen, 1997; Simons und Toomre, 2000; Owen *et al.*, 2012).

3.1.3 Lipid-Transporter der humanen Plasmamembran

Um zusätzlich zur Beweglichkeit der Lipide, die Asymmetrie der PM zu gewährleisten, sind drei unterschiedliche Klassen von Lipid-Transportern in die Membran eingebaut: Flippasen, Floppasen und Scramblasen (Abbildung 1D). Flippasen transportieren Lipide ausschließlich von der äußeren auf die zytoplasmatische Seite der Membran. In humanen Zellen sind dies Proteine der Gruppe Typ4-ATPasen. Sie sind Teil der membranständigen P-Typ ATPasen, welche auch in anderen eukaryotischen Zellen,

Bakterien und Archaeen vertreten sind. Um ihre Lipidtranslokase-Aktivität ausüben zu können, benötigen sie neben ATP auch Kalzium. Die korrekte Lokalisation und Funktion wird zudem über die Interaktion mit CDC50 Proteinen und einem Netzwerk verschiedener Kinasen gewährleistet. In der humanen PM transloziert ATP11C, ein Mitglied der Typ4-ATPasen fusioniert mit CDC50A PS entgegen des Konzentrationsgefälles auf die zytosolische Seite der Membran (Tang *et al.*, 1996; Saito *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2008; Lenoir *et al.*, 2009; Roelants *et al.*, 2010; Yabas *et al.*, 2011; Owen *et al.*, 2012; Sebastian *et al.*, 2012; Segawa, Kurata und Nagata, 2018).

Floppasen wirken den Flippasen genau gegensätzlich, sind aber weit weniger genau studiert worden. Sie transportieren Lipide von der zytosolischen, auf die extrazelluläre Seite der Membran. Studien an Mäusen konnten zeigen, dass mehrere Mitglieder der *multi-drug resistance* Protein Familie (MDR) Lipide über die PM hinweg transportieren können. So transloziert MDR4 PC, das *multi-drug resistance related* Protein 1 (MRP1) PC und PS von der inneren auf die äußere Membranseite. Die Aktivität von MDR4 scheint dabei die Aktivität von ATP8B1 direkt zu beeinflussen. Ein Knockout von MRP1 in Mäusen führt zum Verlust beider Lipid-Translokation. Diese Prozesse sind ebenso als ATP-abhängig beschrieben (van Helvoort *et al.*, 1996; Bevers *et al.*, 1999; Groen *et al.*, 2011).

Bezogen auf die humane PM zeigen zudem ATP-abhängige ABC Transporter häufig eine Translokase-Aktivität. Interessanterweise können sie neben Flippase- und Floppaseaktivität auch als bidirektionale Transporter wirken. Bisher konnte für 20 der 48 identifizierten, humanen ABC Transportern eine oder mehrere dieser Translokase-Identitäten gezeigt werden. Sie sind in der Lage, Lipide oder lipidartige Moleküle, wie Steroide, Glykolipide, Toxine oder andere Metabolite über eine Membran zu transportieren (Molday, Zhong und Quazi, 2009; Tarling, Vallim und Edwards, 2013). Bezogen auf die PM transportieren die sieben ABC Transporter ABCA1, -A3, -A4, -A7, -B1, -B4 und -C1 Phospholipide auf die extrazelluläre Seite der Membran. Die Floppasen ABCA1 und -B1 beispielsweise transportieren vornehmlich Steroide, wie Cholesterol, während ABCA3 Cholin-Phospholipide aus Lungenzellen transloziert (Wang *et al.*, 2006; Matsumura *et al.*, 2007; Clay, Lu und Sharom, 2015; Neumann, Rose-Sperling und Hellmich, 2017). In der humanen Retina transportiert die Flippase ABCA4 PE hingegen auf die zytoplasmatische Seite der PM (Quazi, Lenevich und Molday, 2012). Für weitere Mitglieder der ABCA Familie konnte zudem PS-Translokase-Aktivität gezeigt werden, zusätzlich sind Mitglieder der ABCB Familie häufig PC spezifisch, wohingegen Mitglieder der ABCC Familie neben PC auch Sphingolipide translozieren (van Helvoort *et al.*, 1996; Kamp und Haest, 1998; Raggers *et al.*, 1999; Hamon *et al.*, 2000).

Neben dem energieabhängigen, bidirektionalen Transport von Lipiden durch ABC-Transporter kann durch Scramblasen auch eine energieunabhängige, bidirektionale Translokation über die Membran ablaufen. Bezogen auf die PM konnten innerhalb der letzten Jahre zwei Scramblasen beschrieben werden. TMEM16F und Xkr8 sind beide in der Lage, PS über die humane PM zu transportieren und in gesunden Zellen inaktiv. Während der Blutgerinnung induziert aktiviertes TMEM16F die PS Externalisierung innerhalb differenzierender Blutzellen, während aktiviertes Xkr8 die PS Externalisierung in apoptotischen Zellen induziert. Die Funktionsfähigkeit beider Scramblasen ist dabei Kalzium-abhängig. TMEM16F transportiert

zudem neben PS auch PC und PE über die PM (Suzuki *et al.*, 2010; Suzuki, Imanishi und Nagata, 2014, 2016; Galle, 2018).

3.2 Die Plasmamembran als Angriffsziel von Pathogenen

Für jedes Pathogen bildet die PM der Wirtzelle oder mit der PM assoziierte Proteine/Komplexe den ersten Kontaktpunkt. Extrazelluläre Pathogene binden dabei über wirtszelleigene Zuckerstrukturen, Lipide oder Proteine and die Zelle und induzieren die Translokation von Effektorproteinen. Intrazelluläre Pathogene, wie Viren oder Chlamydien überwinden die PM gar in Gänze. Um an die humane Zelle zu binden und diese zu überwinden sind evolutiv verschiedene Mechanismen entstanden.

3.2.1 Die Rolle amphipathischer Helices in der Pathogen-Infektion

Staphylococcus aureus beispielsweise nutzt das Glykoprotein Fibrinogen über die Fibronektin Bindeproteine A und B und das Kollagen Adhäsin Cna, um an die extrazelluläre Matrix der Wirtszelle zu binden. Auch Streptococcus sp. und Yersinia spp. binden über die Adhäsine Sfb1 und YadA an Fibronektin und Kollagen. E. coli und Salmonella sp. nutzen den jeweiligen Typ-I-Pilus zur Bindung an Mannose-haltige Glykoproteine. Neben der weit verbreiteten Adhäsionsstrategie von Pathogenen durch Bindung über PMassoziierte Zuckerstrukturen und Proteine, sind einige wenige Pathogene auch in der Lage, direkt mit der PM des Wirtes zu interagieren. Sie binden so stabil an die Zelle und sind sogar in der Lage, Poren zu bilden. Die Bindung an Phospholipide oder Phospholipid-ähnliche Strukturen wird neben Salmonella sp. auch von Vibrio parabaemolyticus genutzt. Salmonella sp. interagiert über FliC mit Cholesterol in der Wirtszell-PM während der Biofilmformation, Vibrio parabaemolyticus nutzt neben Fibronektin auch PA zur Interaktion mit der PM über das Protein MAM7 (Heise und Dersch, 2006; Hase et al., 2009; Crawford, Reeve und Gunn, 2010; Krachler, Ham und Orth, 2011; Dreux et al., 2013; Foster et al., 2014; Lillington, Geibel und Waksman, 2015; Stones und Krachler, 2015). Auch Helicobacter pylori zeigt eine, allerdings wenig charakterisierte, Interaktion mit Phospholipiden der Wirtszellmembran. Das Protein CagA interagieren hierbei mit PS. Das Motiv K-Xn-R-X-R (K= Lysin, R= Arginin, X=beliebige Aminosäure (AS)) ist für diese Interaktion höchstwahrscheinlich relevant. Der erfolgreiche Transport ins Zytosol der Wirtszelle sowie die CagA-Funktion muss die Induktion einer PS Externalisierung durch das Pathogen vorangehen (Murata-Kamiya et al., 2010). Auch die obligat intrazellulären Chlamydien interagieren mit der humanen PM und induzieren dabei eine PS Externalisierung. Mechanistisch sind die Lipidtranslokation, sowie der induzierte Einfluss auf die Infektion der Chlamydien im Kapitel: 3.3.4 "Cpn Adhäsion und Internalisierung" näher erläutert.

Bei Kontakt mit der PM kommt es bei Membran-durchspannenden Proteinen zu zwei möglichen Konformationen. Das Protein kann die Pore entweder über die Formation einer β -Fassstruktur innerhalb der PM des Wirtes bilden, beispielsweise Cholesterin-abhängig durch das α -Toxin von *Staphylococcus aureus*, oder α -helikale Strukturen zu Durchspannung der Membran nutzen (Heuck, Tweten und Johnson,

2001; Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2004). Die α -helikalen Strukturen können hier in Form von amphipathischen Helices (APHs) vorliegen (Abbildung 2).



Abbildung 2: Schematische Darstellung der Formation einer amphipathischen Helix bei Membrankontakt. Eine in wässriger Lösung ungeordnete Struktur bildet bei Kontakt mit der Membran eine amphipathische Helix aus. Dazu werden die hydrophoben AS zur Membranseite, die basischen und polaren AS zur wässrigen Lösung orientiert. Die amphipathische Helix kann so in die Lipiddoppelschicht integriert werden und im weiteren Verlauf neben Membranverformung auch eine Porenbildung induzieren. Plasmamembran Darstellung verändert nach (Mariana Ruiz Villareal, 2007).

Amphipathische Helices (APHs) besitzen in wässriger Lösung oft eine ungeordnete Struktur, unter anderem auf Grund der Abwesenheit von Glyzin, was zu fest definierten Strukturen beiträgt. Diese Konformation wird nach Kontakt zu einer lipidösen Oberfläche, wie der PM, in eine α-helikale Struktur umgewandelt. Die polaren AS sind dabei auf der Membran-zugewandten Seite, die hydrophilen AS auf der Seite der wässrigen Lösung zu finden. Je nach Gesamtlänge der APH, der Anzahl der hydrophoben AS, der Ladung und der Position der polaren AS innerhalb der APH können sie mit spezifischen Lipiden interagieren, die Membran verformen oder gar durchspannen (Abbildung 2) (Giménez-Andrés, Čopič und Antonny, 2018). Eine klassische amphipathische Helix besitzt ein hydrophobes Moment von μH >0,5 und eine Nettoladung von +1 bis +3, in seltenen Fällen sogar >+4. Innerhalb der Helix sind zudem in hohem Maße die polaren AS Lysin und (K) Arginin (R) sowie die hydrophobe AS Isoleucin (I) zu finden. Mitglieder der Lytischen-Polypeptide, der Apolipoproteine und der Polypeptid-Hormone weisen ein hydrophobes Moment von μ H > 0,3 und eine hohe Netto-Ladung auf, unterscheiden sich aber untereinander in der Organisation der polaren AS. Während Apoproteine negativ-geladene AS im Zentrum und positiv-geladene AS an den Rändern der polaren Helix-Seite aufweisen, tragen Polypeptide nahezu ausschließlich positiv-geladene AS. Polypeptide besitzen in aquatischer Umgebung bereits eine geordnete Struktur, durchlaufen aber eine Konformationsänderung zur APH bei Kontakt mit einer passenden Membran. APHs von integralen Transmembranproteinen zeichnen sich hingegen durch eine Häufung von polaren, ungeladenen AS aus. Diese sind auf der Helixseite lokalisiert, welche von der hydrophoben Seite abgewandt ist (Segrest *et al.*, 1990; Sharadadevi, Sivakamasundari und Nagaraj, 2005; Galle, 2018).

Poren-bildende/Membran-durchspannende Protein-Lipid-Interaktionen aus dem extrazellulären Bereich durch die PM sind hauptsächlich für Pathogene, Toxine und Peptide beschrieben. Das lytische Protein Equinatoxin II (EqtII) der Seeanemone Actinia equina ist gar in der Lage, nur durch Interaktion mit der PM eine etwa 2 nm große Pore zu bilden. Vor Kontakt mit der PM der Wirtszelle liegt das SM bindende Protein in einer löslichen Konformation vor. Dabei liegen die Regionen, welche später die PM durchspannen, durch Faltung verborgen im Inneren des Proteins (Rojko et al., 2013). Das 20kDa große Egtll nutzt nach Bindung an das Phospholipid SM eine amphipathische α-Helix für die Insertion in die PM. Zur Bildung der Pore durchläuft EqtII mehrere Konformationszustände. Das lösliche Protein bindet über ein aromatisches Cluster und eine C-terminale Phosphorylcholin-Bindestelle an die PM. Die stabile Bindung führt zu einer Konformationsänderung der hochflexiblen, N-terminalen AS 1-28 vom Kern des Proteins zur Schnittstelle zwischen Membran und aquatischer Lösung. Durch Ausbildung der APH wird das Protein in die PM inseriert. Es kommt nun zur Oligomerisierung dreier oder vierer Monomere, wodurch die Pore manifestiert wird (Anderluh et al., 1999; Hong et al., 2002; Malovrh et al., 2003; Mancheño et al., 2003; Gutierrez-Aguirre et al., 2004; Kristan et al., 2007; Castrillo et al., 2010a; Rojko et al., 2013). Die Oligomerisierung nach erfolgreicher Insertion in die Lipiddoppelschicht der PM ist ungewöhnlich. Normalerweise wird nach erfolgter Oligomerisierung der Poren-formenden Proteine zu einer Ring-artigen Struktur, der prä-Pore, die Adhäsion an und Internalisierung in die Membran vollzogen (Cosentino, Ros und García-Sáez, 2016). Nach erfolgreicher Adhäsion kann das Pathogen dann in die Wirtszelle aufgenommen werden.

3.2.2 Der Zipper- und Trigger-Mechanismus

Allgemein lassen sich die Internalisierungsstrategien von Pathogenen in zwei Mechanismen, den Zipperund den Trigger-Mechanismus unterteilen.



Abbildung 3: Pathogen Adhäsion/Internalisierung durch Zipper- und Trigger-Mechanismus.

Einleitung

Schematische Darstellung des Adhäsin-vermittelten Zipper-Mechanismus am Beispiel von Listeria monocytogenes und des Typ-III-System vermittelten Trigger-Mechanismus am Beispiel von Salomonella typhimurium. Bei beiden Invasionsmechanismen wird eine Polymerisation von Aktin unter dem Pathogen induziert.

Beim Zipper-Mechanismus, auch Rezeptor-vermittelte Internalisierung genannt, wird über die Bindung pathogener Adhäsine oder Pili an einen humanen PM-Rezeptor, normalerweise Integrine oder Cadherine, eine Signalweiterleitung ausgelöst. Diese vermittelt eine Neuorganisation des Aktin-Zytoskeletts, was zur Polymerisation des Aktins unterhalb des Pathogens führt. Die so entstandenen Membranverformungen schließen das Pathogen in Gänze ein, was dann zur Internalisierung des Pathogens führt (Abbildung 3) (Pizarro-Cerdá und Cossart, 2006; Cossart und Roy, 2010; Ribet und Cossart, 2015). Diesen Mechanismus nutzt beispielsweise das Gram-positive Bakterium Listeria monocytogenes. Dazu binden die Pathogeneigenen Proteine InIA und InIB an die PM-Proteine E-Cadherin und den Hepatozyt-Wachstumsfaktor Met. Dies führt unter anderem zur Akkumulation von α- und β-Catenin, Myosin VIIa, und Vezatin, der Aktivierung der PI3-Kinase und Aktin-Remodellierung unterhalb des Bakteriums. Über die Aktivierung von Wirtseigenen Septinen und Clathrin wird so die Internalisierung des Bakteriums abgeschlossen (Mengaud et al., 1996; Shen et al., 2000; Veiga und Cossart, 2005; Mostowy, Danckaert, et al., 2009; Mostowy, Nam Tham, et al., 2009; Pizarro-Cerdá und Cossart, 2009; Bonazzi und Cossart, 2011; Bonazzi et al., 2011; Pizarro-Cerda, Kuhbacher und Cossart, 2012; Cossart und Helenius, 2014; Ribet und Cossart, 2015). Weitere Pathogene, die den Zipper-Mechanismus nutzen, sind Yersinia spp., vermittelt über Invasin sowie EHEC und EPEC, vermittelt über Intimin. Invasin bindet an das humane Glykoprotein Integrin-β1 und vermittelt so die Aufnahme des Bakteriums. Das strukturell ähnliche Intimin interagiert mit dem bakteriellen, Typ-IIIsekretierten translozierten Intimin Rezeptor (Tir). Dieser wird nach Injektion in die PM der Wirtszelle integriert, wo er nach Bindung durch Intimin die Aktin-Polymerisation und folgend die Bildung eines F-Aktin Sockels unterhalb des adhärenten Bakteriums mediiert. Die Position der extrazellulären Pathogen EPEC und EHEC auf der humanen PM wird dadurch stabilisiert (Brett et al., 1993; Pizarro-Cerdá und Cossart, 2006; Vlisidou et al., 2006; Gerlach und Hensel, 2007).

Der Trigger-Mechanismus hingegen wird vornehmlich durch Typ-III-sekretierte Proteine eingeleitet. Die Proteine binden meist direkt an das Aktin Zytoskelett und mediieren die Aktin-Polymerisierung. Im Falle von *Salmonella typhimurium* binden die injizierten Effektoren unter anderem an die Wirtszell- RhoGTPasen Cdc42 und Rac, welche dann eine Aktin Remodellierung und Polymerisierung induzieren, das sogenannte Membran-Ruffling. Die gebildeten Strukturen umschließen das Bakterium über die Zeit vollständig. Dies führt schlussendlich zur Aufnahme des Pathogens durch die Wirtszelle (Abbildung 3) (Schlumberger und Hardt, 2006).

3.3 Chlamydien

Chlamydien gehören zu den obligat intrazellulären, Gram-negativen Bakterien und besitzen ein außergewöhnlich großes Wirtszellspektrum. Aufgrund ihrer Einzigartigkeit unter den Gram-negativen Bakterien wurden Chlamydien in ein eigenes Phylum, die *Chlamydiae*, eingeordnet. Untergeordnet existiert lediglich eine Ordnung, die *Chlamydiales*, welche vier Familien umfasst. Neben der Familie *Chlamydiaceae*, welche die Gattung *Chlamydia* beherbergt, beinhaltet sie drei Chlamydien-verwandte Familien (*Simkaniacea, Parachlamydiaceae, Waddliaceae*). Diese wurden nachträglich aufgrund ihrer bis zu 99 %-igen 16S rRNA Identität und des gemeinsamen Lebenszyklus der Ordnung *Chlamydiales* hinzugefügt (Abbildung 4) (Everett, Bush und Andersen, 1999; Rurangirwa *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2000; Corsaro, Valassina und Venditti, 2003).





Taxonomische Anordnung aller Mitglieder des Phylum Chlamdiae mit Schwerpunkt auf die Gattung Chlamydia (nach Horn, 2008). 16S Identitäten sind in Prozent angegeben (nach Everett, Bush 1999). Die humanpathogenen Spezies sind durch (+) gekennzeichnet. Die Länge der Linien entspricht nicht dem phylogenetischen Abstand der unterschiedlichen Spezies.

3.3.1 Die Gattung Chlamydia

Innerhalb der Gattung *Chlamydia* sind neun chlamydiale Spezies organisiert. Obwohl die neun Spezies eine etwa 95 % genomische Ähnlichkeit aufweisen, bedient jede Spezies eine bestimmte Nische und ist sehr

Einleitung

Wirts-spezifisch. Innerhalb der chlamydialen Entwicklungsgeschichte kam es zu einer massiven Reduktion der Genomgröße durch diverse Rekombinationsereignisse bei denen Genabschnitte deletiert oder dupliziert wurden. Durch den daraus resultierenden, evolutiven Prozess kam es zu der Entstehung neuer Spezies und Infektiosität großer Gewebe- und Wirtsspektren sowie Nischenbildung innerhalb der Gattung (Everett, Bush und Andersen, 1999; Horn, 2008; Borges *et al.*, 2012; Harris *et al.*, 2012; Nunes und Gomes, 2014; Domman und Horn, 2015).

Chlamydia trachomatis (Ctr) und Chlamydia pneumoniae (Cpn) bilden die beiden Spezies der direkten Humanpathogene innerhalb der Gattung. Mit etwa 600 Millionen infizierten Personen weltweit gehören sie zu den weit verbreitetsten humanpathogenen Erregern. Die Infektion ist Gewebe-spezifisch und kann dabei vor allem bei Ctr asymptomatisch ablaufen, was im weiteren Verlauf mit drastischen Folgen einhergehen kann. (Ojcius, Darville und Bavoil, 2005). Insgesamt umfasst die Spezies Ctr 19 Serovare, welche ganz unterschiedliche Krankheitsbilder, über verschiedene Verbreitungswege, verantworten (Schachter, 1999). Die Serovare A-C wurden als Hauptverursacher von okularen Trachomen identifiziert, welche in Endverlauf zu Erblindung führen. Sie werden vornehmlich über verunreinigtes Wasser und Schmierinfektionen übertragen. Okulare Trachome und Konjunktivitis sind vor allem in tropischen Entwicklungsländern mit nicht ausreichender Hygiene- und Gesundheitsvorsorge präsent, da es durch mangelnde Behandlung mit Antibiotika zu immer wiederkehrenden Reinfektionen kommt. In Industrieländern ist die Infektion mit Serovar A-C nur sehr selten anzutreffen (Sachsenweger, 2003; Bébéar und de Barbeyrac, 2009). Mit weltweit 106 Millionen Neuinfektionen pro Jahr (Stand 2011) bilden die sexuell übertragbaren Serovare D-K die größte Bedrohung in den Industrieländern ab. Die zu 70 % asymptomatisch verlaufende Infektion betrifft die lokalen Gewebe des Urogenitaltraktes was zu Cervicitis, Endometritis, Salpingitis und Urethritis führen kann (Detels et al., 2011). Hohe Reinfektionsraten und daraus resultierende Vernarbung der Eileiter sind für etwa zwei Drittel der tubulären Sterilitäten verantwortlich (Bébéar und de Barbeyrac, 2009). Neben den lokalen Infektionen durch die Serovare D-K kann es auch zu einer systemischen Infektion kommen. Die Ctr Serovare L1-L3 (LGV) nutzen das epithale Gewebe des Urogenitaltrakts lediglich als Eintrittsort. Sie führen zu einer systemischen Infektion mit anschließender Erkrankung des lymphatischen Systems (Lymphadenopathie). In Industrieländern ist die Infektionsgefahr jedoch gering. Die größte Prävalenz haben hierzulande die Serovare E und F (Morré et al., 2000; Ojicius, D. M., Darville, T., Bavoil, 2006; Bébéar und de Barbeyrac, 2009). Der zweite humanpathogene Erreger Cpn infiziert die oberen Atemwege sowie die Lunge. Er wird mit einer Reihe von respiratorischen und chronischen Erkrankungen assoziiert. Die Biologie wird im Kapitel: 3.3.3 "Chlamydia pneumoniae" im Detail erläutert.

Neben dem Menschen infiziert das Phylum *Chlamydiae* weltweit auch andere Säugetiere, Amphibien, Reptilien, Fische, Insekten, Krustentiere und Amöben. Trotz der hohen Wirtspezifizität bergen einige chlamydiale Spezies zoonotisches Potenzial, bei dem die Erreger vom Tier auf den Menschen übergreifen können. Eine zoonotische Übertragung von *C. abortus* auf den Menschen kann, wie bei Nutztieren beobachtet, zum Schwangerschaftsabbruch oder Todgeburten führen (Longbottom und Coulter, 2003). Eine Infektion mit *C. psittaci* führt, meist über das Einatmen kontaminierter Aerosole aus getrocknetem Kot, zu Psittakose. Die Krankheit zeichnet sich durch grippeähnliche Symptome aus, kann unbehandelt zum Tod führen und kommt deutlich häufiger vor als die Infektion mit *C. abortus* (Beeckman und Vanrompay, 2009a; Stewardson und Grayson, 2010). Vor allem in dichtbevölkerten Regionen der Erde mit niedrigem Hygienestandard führt dies zu massiven Problemen (Pospischil *et al.*, 2002; Horn, 2008; Beeckman und Vanrompay, 2009b; Rohde *et al.*, 2010).

3.3.2 Der chlamydiale Entwicklungszyklus

Alle chlamydialen Spezies eint der, unter Gram-negativen Bakterien einzigartige, biphasische Lebenszyklus. Als obligat intrazellulärer Mikroorganismus findet die Replikation innerhalb der Wirtszelle statt. Um den Wirt effizient zu infizieren, besitzen Spezies der Gattung Chlamydia zwei distinkte Formen, die infektiösen, aber metabolisch inaktiven Elementarkörperchen (EBs) (etwa 0,3 µm im Durchmesser) und die metabolisch aktiven, nicht infektiösen Retikularkörperchen (RBs) (etwa 1 µm im Durchmesser) (Chi, Kuo und Grayston, 1987; Popov et al., 1991; Wolf, Fischer und Hackstadt, 2000). Als Gram-negative Bakterien besitzen sie zwei Membranen, jedoch war lange strittig ob eine Peptidoglykanschicht existiert. Erst kürzlich konnte, nach über 50 Jahren der Debatte, gezeigt werden, dass Chlamydien tatsächlich während der Replikation Peptidoglykan produzieren (Barbour et al., 1982; McCoy und Maurelli, 2006; Klöckner et al., 2014; Liechti et al., 2014). Um die Stabilität des EBs zu gewährleisten, nutzen Chlamydien hauptsächlich den Außenmembrankomplex (cOMC). Dieser besteht aus den Cystein-reichen, Proteinen quervernetzten major outer membrane protein (MOMP) und den Außenmembrankomplexproteinen A und B (OmcA, OmcB). MOMP wurde zunächst als Porin mit adhäsiven Eigenschaften identifiziert, das Lipoprotein OmcA ragt von der Außenmembran ins chlamydiale Periplasma, wobei OmcB Heparansulfat-ähnliche Glykosaminoglykane (GAGs) über den N-Terminus auf der Plasmamembran der Wirtszelle bindet (Hatch, 1996; Moelleken und Hegemann, 2008; Confer und Ayalew, 2013; Fechtner et al., 2013). Es wird zudem vermutet, dass viele weitere Proteine, wie das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) oder die polymorphen Membranproteine (Pmps), direkt mit dem cOMC über Cysteine assoziiert sind (Birkelund et al., 2009; Betts-Hampikian und Fields, 2010; Liu et al., 2010; Mölleken, Schmidt und Hegemann, 2010; Mölleken, Becker und Hegemann, 2013). Obwohl die unterschiedlichen Spezies ganz unterschiedliche Gewebe infizieren, läuft der Infektionszyklus, wenn auch zeitlich leicht variabel, bei allen Spezies identisch ab. Die im Folgenden dargestellten Zeiten repräsentieren den Entwicklungs-/Infektionszyklus von Cpn (Wolf, Fischer und Hackstadt, 2000).



Abbildung 5: Der chlamydiale Infektions-/Entwicklungszyklus.

Schematische Darstellung des chlamydialen, biphasischen Lebenszyklus. Exemplarisch sind die Zeitangaben einer *Cpn* Infektion in Stunden (h) angegeben (Wolf, Fischer und Hackstadt, 2000). N = Nukleus, EB: infektiöse Elementarkörperchen, RB: metabolisch aktive Retikularkörperchen.

Beginnend mit der Adhäsion der 0,3 µm großen EBs an die Zellen des Zielgewebes folgt nach 0 - 2 h die Aufnahme in die Wirtszelle (Abbildung 5). Die beteiligten Proteine werden im Kapitel: 3.3.4 "*Cpn* Adhäsion und Internalisierung" detailliert erläutert. Bevor die Aufnahme des EBs in die Wirtszelle stattfindet, werden Effektorproteine über das T3SS ins Zytosol der Wirtszelle sekretiert. Im Zusammenspiel mit den chlamydialen Adhäsinen wird so die Aufnahme des Bakteriums durch die Wirtszelle eingeleitet. Während der Internalisierung wird das EB von einem Teil der wirtseigenen Doppellipidschicht umschlossen und diese wird fortan als Inklusion bezeichnet. Die chlamydialen Zellen verbleiben nun bis zur Beendigung des Infektionszyklus innerhalb der Inklusion, in der sie über Mikrotubuli innerhalb der Wirtszelle in die Nähe des Zellkerns transportiert werden (Grieshaber, Grieshaber und Hackstadt, 2003). Um der Immunantwort der Zellen und somit Fusion mit dem Wirtszell-Lysosom zu entgehen, interagiert das EB über Inklusionsmembran-ständige und sekretierte Effektorproteine mit der Wirtszelle. Zudem werden über diesen Weg Nährstoffe, die zur Replikation notwendig sind, akquiriert (Fields und Hackstadt, 2002; Valdivia, 2008). Bis zu 12 h nach der initialen Infektion (hpi) differenzieren sich die infektiösen EBs zu den metabolisch-

aktiven, größeren RBs. Das chlamydiale Chromosom dekondensiert, die Expression früher Proteine beginnt und die fertigen RBs replizieren sich in den folgenden 36 h bis zu 10-mal (Van Ooij *et al.*, 1998; Belland *et al.*, 2003; Peters *et al.*, 2007). Zu diesem Zeitpunkt können die chlamydialen Partikel bei Nährstoffmangel, einer zu starken Immunantwort der Zelle oder externem Antibiotikaeinsatz in eine Persistenz übergehen. In diesem Zustand findet die Replikation des Genoms weiterhin statt, die Teilung pausiert hingegen. Bei einer Verbesserung der äußeren Umstände findet dann die Redifferenzierung zu RBs statt (Campbell und Rosenfeld, 2014; Lewis *et al.*, 2014). Findet keine Störung der Replikation durch externe Umstände statt, redifferenzieren sich die RBs nach etwa 48 hpi asynchron zurück in die infektiösen EBs (Wolf, Fischer und Hackstadt, 2000). Dazu werden späte Gene exprimiert, die unter anderem für DNA kondensierende, bakteriellen Histone und Komponenten des cOMC kodieren, wodurch das Genom wieder kondensiert wird (Belland *et al.*, 2003).

Nach 72-96 hpi erfolgt dann die Freisetzung der EBs entweder durch Extrusion oder Lyse der Wirtszelle. Bei der Extrusion werden EBs in Vesikeln aus der Zelle geschleust, wobei die Wirtszelle intakt bleibt. Bei der Lyse hingegen stirbt die Wirtszelle. Die freigesetzten, chlamydialen EBs sind im Folgenden in der Lage, neue Wirtszellen zu infizieren womit der Zyklus von vorne beginnt (Hybiske und Stephens, 2007). Trotz intensiver Forschung und Charakterisierung, vor allem der humanpathogenen Spezies, existiert bis dato kein Impfstoff gegen eine chlamydiale Infektion.

3.3.3 Chlamydia pneumoniae

Die humanpathogene Spezies Cpn ist für akute sowie chronische Infektionen des humanen Respirationstrakts, wie Pharyngitis, Tracheitis, Sinusitis, Bronchitis oder Pneumonien weltweit verantwortlich. Ähnlich wie bei Ctr verlaufen die Infektionen zu 70 % asymptomatisch oder mit geringer Symptomatik ab. Durch diesen Umstand nimmt ein Großteil der infizierten Individuen keine medizinische Hilfe in Anspruch (Grayston et al., 1989; Hahn, Azenabor, Beatty, & Byrne, 2002; Hammerschlag, 1999). Etwa je 20 % der symptomatischen Infektionen beschränken sich auf den unteren bzw. oberen respiratorischen Trakt, 10 % sind Pneumonien. Aufgrund des sehr häufig asymptomatischen Krankheitsverlaufs und der Übertragung der Infektion via Aerosole ist die Durchseuchung innerhalb der Weltbevölkerung enorm. Etwa 80 % der erwachsenen Menschen tragen spezifische Antikörper, wobei mehrfach Infektionen über die Lebensdauer des Individuums die Regel darstellen. Die Daten zeigen, dass über die Lebensdauer fast jeder Mensch mindestens einmal mit Cpn infiziert wird (Kuo, C.C, Jackson, L.A, Campbell, L.A, Grayston, 1995; Choroszy-Król et al., 2014). Cpn wurde zudem immer wieder mit Alzheimer, Arteriosklerose, Multipler Sklerose, Asthma und Lungenkrebs in Verbindung gebracht. Es bleibt allerdings zu erwähnen, dass der Einfluss einer Cpn Infektion auf den Ausbruch der Krankheiten nie zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte. Es kann sich demnach also auch als eine Sekundärinfektion bei den bereits immunsuppressiven Patienten darstellen (Belland et al., 2004; Gérard et al., 2006; Grayston et al., 1993). Obwohl Ctr seit 2013 genetisch manipulierbar ist, konnte im letzten Jahr erstmals auch Cpn modifiziert werden. Bisher ist dies die einzige publizierte Arbeit dazu (Wang et al., 2011, 2013; Shima et al., 2018). Zu

Analysezwecken chlamydialer Proteine wird daher auf alternative Methoden, wie die Verwendung rekombinant hergestellten Proteinvarianten (*E. coli*) zurückgegriffen. Auch die Transfektion chlamydialer Gene im humanen Zellkultursystem ist eine weit verbreitete Methode, um Phänotypen chlamydialer Effektoren zu charakterisieren. Auf Grund dieser Hindernisse ist der Adhäsions- und Internalisierungsprozess trotz langjähriger Studien noch immer größtenteils ungeklärt. Im Folgenden ist eine Prozessübersicht *Cpn* Adhäsion und Internalisierung beschrieben.

3.3.4 Cpn Adhäsion und Internalisierung

Die Adhäsion und Internalisierung der Cpn EBs wird als mehrstufiger Prozess beschrieben.



Abbildung 6: Adhäsion und Internalisierung des Cpn EBs.

Schematische Darstellung der mehrstufigen Adhäsion und Internalisierung des chlamydialen EBs. Rot umrandet sind Proteine, die während des jeweiligen Stadiums relevant sind. Proteine, deren Interaktionspartner noch nicht aufgeklärt werden konnten, sind mit einem Fragezeichen markiert. MOMP = major outer membrane protein, OmcB = Außenmembrankomplexprotein B, T3SS= Typ-III-

Sekretionssystem, Pmp21 = polymorphes Membranprotein 21, GAG= Glykosaminoglykan, EGFR= epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor, SNX9= sortin nexin 9, N-WASP= Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein

Der initiale Kontakt zur Wirtszelle wird über chlamydiales OmcB hergestellt. Dazu werden Heparansulfatähnliche GAGs über den N-Terminus des Proteins an zwei spezifischen Heparansulfat-Bindemotiven auf der Plasmamembran der Wirtszelle gebunden (Abbildung 6). GAGs sind auf allen eukaryotischen Zellmembranen zu finden und sind als Teil der Glykokalyx zumeist an ein Kernprotein gebunden. Sie fungieren somit als Brückenelement zwischen den chlamydialen und eukaryotischen Oberflächenstrukturen, sodass die Entfernung der GAGs von der Oberfläche der Humanzelle bei Cpn zu einer signifikanten Reduktion der Infektiosität führt (Bernfield et al., 1999; Stephens et al., 2000; Carabeo und Hackstadt, 2001; Linhardt und Toida, 2004; Moelleken und Hegemann, 2008; Fechtner et al., 2013). Es wird vermutet, dass dieser initiale, reversible Kontakt den Weg für eine stabile Adhäsion des EBs über spezifische Adhäsine bereitet. In der Vergangenheit konnten bereits neben OmcB verschiedene Proteine des Außenmembrankomplexes sowie oberflächenpräsentierte Proteine als Adhäsionsfaktoren identifiziert werden, wobei die genaue Verantwortlichkeit innerhalb des Adhäsionsprozesses zumeist noch nicht voll aufgeklärt werden konnte. Rekombinant in E. coli hergestelltes, chlamydiales GroEL1 (rGroeEL1) bindet an humane Zellen und reduziert eine nachfolgende Infektion mit Cpn. Natives GroEL1 ist zudem auf Oberfläche der Chlamydien detektierbar, womit es einige Charakteristika chlamydialer Adhäsine beschreibt (Wuppermann et al., 2008). Ebenso ist Cpn0482 (ArtJ) auf der chlamydialen Oberfläche zu finden. Adhäsions- und Infektionsexperimente konnten auch hier zeigen, dass es an humane Zellen bindet und dass die Infektion negativ reguliert wird, wenn EBs mit CPn0482-spezifische Antikörper vorbehandelt werden (Montigiani et al., 2002). Mit 21 Proteinen, von denen 16 exprimiert werden, stellt die Familie der polymorphen Membranproteine (Pmps) in Cpn die größte Gruppe der Adhäsine dar. Eine Oberflächenexponation konnte für 6 der 16 exprimierten Pmps auf Cpn EBs nachgewiesen werden (Henderson & Lam, 2001). Die Pmps gehören zur Familie der Typ-V-Autotransporter. Über ihre N-terminale Sec-Signalsequenz wird das ungefaltete Protein ins chlamydiale Periplasma transportiert. Dort bildet der C-Terminus eine β-Fasstonnenstruktur aus, über die eine hydrophile Pore in der äußeren, chlamydialen Membran gebildet wird. Die funktionelle Passagierdomäne wird daraufhin an der Außenseite des EBs präsentiert und verankert. An der Oberfläche präsentiert, bilden die Pmps dann homo- und heteromere Strukturen aus und adhärieren über die zwei distinkten Motive (GGA (I, L, V) oder FxxN) an die humanen Zellen (Grimwood, Olinger und Stephens, 2001; Mölleken, Schmidt und Hegemann, 2010; Becker und Hegemann, 2014; Luczak et al., 2016). Bisher konnte der humane Interaktionspartner lediglich für Pmp21 ermittelt werden. Pmp21 bindet an den humanen, epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR). Dies führt zu Dimerisierung und Aktivierung des Rezeptors, woraufhin es zur Induktion intrazellulärer Signalkaskaden kommt (Mölleken, Becker und Hegemann, 2013; Mölleken und Hegemann, 2017). Auch das Protein CPn0473 (LIPP), welches im Rahmen dieser Arbeit detaillierter charakterisiert wurde, ist am Adhäsion- und Internalisierungsprozess von Cpn EBs beteiligt (Abbildung 6). Eine Beschreibung der bisherigen Erkenntnisse ist dem folgenden Kapitel zu entnehmen. Neben den beschriebenen Proteinen konnte auch eine Beteiligung von Lipid-Rafts bei der Adhäsion gezeigt werden. Aus der Bündelung der, in den Mikrodomänen enthaltenen, Rezeptormolekülen und der dadurch erhöhten Adhäsionswahrscheinlichkeit chlamydialer EBs wird eine Begünstigung der Internalisierung postuliert (Jutras, Abrami und Dautry-Varsat, 2003; Dautry-Varsat, Balañá und Wyplosz, 2004; Subtil *et al.*, 2004).

Die stabile Verbindung über chlamydiale Adhäsine vermittelt wahrscheinlich im Folgenden eine Interaktion des chlamydialen T3SS mit der humanen Plasmamembran (PM), wodurch eine Injektion von Effektorproteinen in die Wirtszelle ermöglicht wird. Diese Effektorproteine sind ebenso essenziell für eine erfolgreiche Infektion. Es konnte gezeigt werden, dass das Cpn TarP-Homolog CPn0572 mit Wirtszell-Aktin interagiert und maßgeblich an der Aktin-Modulation durch chlamydiale EBs beteiligt ist (Zrieg, Braun und Hegemann, 2017; Braun et al., 2019). Die chlamydialen Proteine CPn0677 und CPn0678 induzieren vermutlich Membranverkrümmungen auf der Innenseite der humanen Plasmamembran. Dazu nutzen sie amphipathische Helices. Durch Rekrutierung von humanem sorting nexin 9 (SNX9) induzieren sie entweder die Invagination der humanen Plasmamembran oder sind an der Dynein-abhängige Abschnürung der Inklusion innerhalb des endozytotischen Prozesses beteiligt. Dieser wird durch die Interaktion mit den Phosphoinositid-3-Kinasen PI3K + PI5K, dem N-WASP und dem Arp2/3 Komplex realisiert (Badour et al., 2007; Yarar et al., 2008; Murra, 2010; Hänsch, 2016). Neben den sekretierten Effektorproteinen können auch Adhäsine wie das Pmp21 humane Signalkaskaden über ihre Interaktionspartner induzieren. Die Pmp21-bedingte Aktivierung des EGFR induziert den Akt- sowie den ERK-Signalweg. Auch hier wird die PI3K aktiviert, welches wiederum das Phosphatidylinositol PI(4,5)P2 zu PI(3,4,5)P3 phosphoryliert. In Verbindung mit kortikal polymerisierten Aktin wird so ebenfalls der endozytotische Prozess zur Aufnahme des EBs induziert. Die Aktivierung des Akt-Signalweges führt dann zur Aufnahme der Inklusion in den perinuklearen Raum. Dort durchläuft die Inklusion zuerst die frühen Stadien des Endosoms, gefolgt vom Stadium des "Recycling Endosoms". Direkt nach Eintritt in die Wirtszelle werden Rab-GTPasen des frühen endosomalen Stadiums, darunter Rab4, Rab5 und Rab7 sowie die zwei "Recycling Endosoms" Marker Rab11 und Rab14 rekrutiert. Durch die spätere Entfernung von Rab4 und Rab7 von der Inklusion entgeht das EB dem lysosomalen Abbau. In der Nähe des Zellkerns angekommen, verbleibt die Inklusion nun bis zur Beendigung des Infektionszyklus im Stadium des "Recycling Endosoms" (Mölleken, Becker und Hegemann, 2013; Mölleken und Hegemann, 2017). Neben der stabilen Bindung an die Wirtszelle und der Sekretion von Effektorproteinen ins Zytoplasma der Wirtszelle externalisieren Chlamydien das Phospholipid PS über einen unbekannten Mechanismus. In Cpn wird die Externalisierung via CPn0473 (LIPP) vermittelt. Wie genau die Externalisierung vorteilhaft für die Internalisierung des EBs ist, konnte bisher nicht beschrieben werden.

3.4 LIPP (CPn0473)

Das 508 Aminosäuren (AS) große Protein CPn0473 wurde über ein Hefe-Oberflächenpräsentationssystem, welches bereits OmcB und Pmp21 identifizierte, als ein neues, chlamydiales Adhäsin beschrieben. Das

Protein weist keine Homologien innerhalb der Gattung *Chlamydia* auf und ist somit ein weiteres Beispiel der Diversität innerhalb der evolutionären Entwicklung der Chlamydien. 48 h nach Beginn einer *Cpn* Infektion, kurz vor der Redifferenzierung der RBs zu EBs ist das Protein erstmalig nachweisbar. 72 hpi kann es auf der Oberfläche neu synthetisierter EBs mittels Antikörper in einer ringförmigen Lokalisation detektiert werden. Das Protein ist demnach wahrscheinlich in den frühen Stadien der *Cpn* Infektion relevant. Wie das Protein auf die chlamydiale Oberfläche transportiert und dort verankert wird, konnte bisher nicht aufgeklärt werden (Fechtner, Galle und Hegemann, 2016). Solubilisierungsversuche zeigten, dass CPn0473 Sarkosyllöslich und somit anders als MOMP oder OmcB kein Bestandteil des cOMC ist.



Dargestellt sind alle bisher identifizierten Domänen inklusive Aminosäurepositionen. IED: Infektions-erhöhende Domäne (grün), BD: Bindedomäne (blau), SID: Selbstinteraktionsdomäne (schwarz), TM: potenzielle Transmembrandomäne (orange) (nach (Fechtner, Galle and Hegemann, 2016; Galle, 2018; Galle *et al.*, 2019)).

Adhäsionsexperimente mit rProtein, löslich und an Latexkügelchen gebunden, demonstrieren die schnelle, über die Zeit zunehmende Bindung an humane Zellen (1 Minute). Experimente mit sukzessiven Deletionsvarianten des C-terminalen Bereiches identifizierten eine Domäne, welche essenziell für diese Bindung an die Wirtszelle ist (Bindedomäne, BD, AS 307-356 (Abbildung 7). Neben der Bindung an Zellen konnte auch die Adhäsion an und die Interaktion mit negativ geladenen Phospholipiden, vor allem PS und PS-haltigen *giant unilamellar vesicles* (GUVs) attestiert werden. Versuche an asymmetrischen GUVs zeigen sogar, dass das rProtein selbstständig die GUV-Membran penetrieren und das innenliegende PS externalisieren kann. Das rProtein ist bei Bindung an die humane Wirtszelle also in der Lage, die Plasmamembran zu penetrieren und wirtseigenes PS selbstständig von der Innenseite der Plasmamembran zu externalisieren. Die durch rCPn0473 gesteuerte Externalisierung wirkt hingegen unüblicherweise nicht apoptotisch. Dies macht CPn0473 zur ersten, chlamydialen PS-Translokase und verantwortlich für die *Cpn* induzierte PS Externalisierung (Abbildung 6) (Fechtner, Galle und Hegemann, 2016; Galle, 2018). Wie die Bindung und Externalisierung sowie die Penetration systematisch ablaufen, sollte im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden.

Nebst der Bindung an Humanzellen und Interaktion mit negativ geladenen Phospholipiden ist CPn0473 auch in der Lage zu oligomerisieren. Die Selbstinteraktion erfolgt ebenfalls über eine Domäne im C-Terminus (Selbstinteraktionsdomäne, SID, AS 357-456) (Abbildung 7). Eine biologische Funktion hinter dieser Interaktion ist bisher nicht beschrieben. Innerhalb der SID ist zudem eine potenzielle Transmembrandomäne mit zwei vorhergesagten amphipathischen Helices lokalisiert (TM, AS 391-424). Die

TM ist maßgeblich an der Penetration der humanen Plasmamembran beteiligt. (Fechtner, 2013; Galle, 2018).

Anders als klassische Adhäsine wird eine chlamydiale Infektion in Blockierungsexperimenten, bei denen Zellen mit rProtein vorinkubiert werden, um die Infektion zu inhibieren, nicht blockiert, sondern gesteigert. Eine Vorbehandlung von Humanzellen mit rCPn0473 und nachfolgender Stimulation durch chlamydiale EBs steigerte die Infektion Dosis-abhängig. Dabei beruht die Steigerung nicht auf verbesserter Adhäsion der EBs an die Wirtszelle, sondern der Internalisierung der EBs in die Wirtszelle. Der Boost der Internalisierung wird durch eine 150 AS große Domäne im N-Terminus (Infektions-erhöhende Domäne, IED, AS 1-150) (Abbildung 7) induziert (Fechtner, Galle und Hegemann, 2016). Der Boost ist ebenfalls abhängig von der Verfügbarkeit humanem Cholesterin in der PM und der Polymerisation von Aktin in Zytoplasma der Wirtszelle, unterhalb der Membran (Abbildung 6). Dies korreliert mit den Beobachtungen, dass CPn0473 sowie chlamydiale EBs an Cholesterin-reiche Mikrodomänen innerhalb der Wirts-Plasmamembran (Lipid Rafts) binden (Fechtner, Galle und Hegemann, 2016). Aufgrund seiner spezifischen Eigenschaften innerhalb der Adhäsions- und Internalisierungsprozesses wird das Protein CPn0473 im Folgenden als *Lipid-dependent Internalization Promoting Protein*, kurz **LIPP**, bezeichnet (Galle, 2018; Galle *et al.*, 2019).

Trotz zahlreicher Ansätze, einen humanen Interaktionspartner für LIPP zu identifizieren, konnten bisher keine distinkten Proteine beschrieben werden. Experimente, bei denen humane Zellen mit Proteinase K vorbehandelt wurden, weisen zumindest darauf hin, dass es sich um einen proteinösen Interaktionspartner handeln könnte. Das Ziel dieser Arbeit ist neben der weiteren Charakterisierung von LIPP auch die Identifikation und Beschreibung des humanen Interaktionspartners.

3.5 Die 14-3-3 Proteinfamilie: Historie, Struktur und Ligandenbindung

Die 1967 identifizierte 14-3-3 Proteinfamilie ist eine Gruppe hochkonservierter, 30 kDa großer, multifunktioneller Proteine. Zuerst in Gehirngewebe identifiziert, finden sich Vertreter der stark exprimierten Proteinfamilie in nahezu allen Gewebeschichten (Celis *et al.*, 1990; Takahashi, 2003; Aitken, 2006). Zu den 14-3-3 Proteinen gehören die sieben Isoformen β , Υ , ϵ , η , σ , τ und ζ , wobei α und δ den, an Aminosäureposition 58 (S58) phosphorylierten Formen von β und ζ entsprechen (Aitken *et al.*, 1995) (Abbildung 8).



Abbildung 8 Gegenüberstellung der humanen 14-3-3 Isoformen.

(A) Phylogenetischer Stammbaum der sieben humanen 14-3-3 Isoformen. Die Sequenzen der sieben Isoformen wurden via ClustalOmega (Maximum-likelihood-Plot, 1000 Wiederholungen (bootstrap-replicates)) und IQ Tree zueinander ausgerichtet. Der

phylogenetische Baum wurde mit FigTree V.1.4.4 erstellt. Die Identifikationsnummern der jeweiligen Isoformen sind angegeben (UniprotKB Datenbank). Der schwarze Kreis markiert den unbekannten, gemeinsamem Vorfahren. Die angegebenen Abstände repräsentieren Nukleotidveränderungen pro Aminosäure (AS). Um die Veränderungen unter den Isoformen zu errechnen, müssen die Abstände aller Verzweigungen addiert werden.

(B) Vergleich der humanen 14-3-3 Isoformen über MultAlin V.5.4.1. Hohe Konsensus-Sequenzen sind in rot markiert. Zur strukturellen Orientierung sind die neun α -Helices von 14-3-3 ζ angegeben. V markiert hochvariable Regionen. V1= AS 1-9, V2= 26-37, V3= 71-85. V4= 97-118, V5= 140-153, V6= 238-258. Schematische Helixdarstellung von: (Dcrjsr, 2011)

(C) Strukturelle Darstellung der variablen 14-3-3 Regionen anhand der 14-3-3ζ Isoform (PDB ID: 5D2D). Variable Regionen sind in Dunkelblau dargestellt, N-terminales Methionin in türkis. Aus (McGowan et al., 2017).

(D) Übersicht der Position aller neun α-Helices in den sieben 14-3-3 Isoformen. Die Positionsdaten wurden der UniprotKB Datenbank entnommen.

(E) Identitätsanalyse aller humanen 14-3-3 Isoformen. Angegeben sind die Sequenzabdeckung (schwarz) sowie die AS-Identität in Prozent (rot). Die Analyse wurde mit den Datensätzen aus UniprotKB über NCBI Protein Blast durchgeführt.

In eukaryotischen Zellen lokalisieren 14-3-3 Proteine hauptsächlich im Zytoplasma. Vertreter der Proteinfamilie konnten allerdings auch im Nukleus, dem Golgi-Apparat und an der Plasmamembran gefunden werden (Celis *et al.*, 1990; Leffers *et al.*, 1993; Freed, McCormick und Ruggieri, 1994; Fanger *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 1998; Garcia-Guzman *et al.*, 1999). 14-3-3 Proteine sind in eine Vielzahl zellulärer Prozesse involviert. Sie interagieren unter anderem mit Kinasen, Phosphatasen und Transkriptionsfaktoren sowie Signalproteinen, die direkt in die Regulation der Dynamik des Zytoskeletts, zellulärer Regulation und Apoptose involviert sind. Aufgrund des breiten Spektrums an Interaktionspartnern wird für 14-3-3 Proteine eine Rolle als biochemische Regulatoren vermutet. Deswegen werden sie auch als Adapterproteine bezeichnet (Hanahan und Weinberg, 2000; Jin *et al.*, 2004; Meek, Lane und Piwnica-Worms, 2004; Pozuelo Rubio *et al.*, 2004; Benzinger *et al.*, 2005; Aitken, 2006; Tzivion *et al.*, 2006; Cornell und Toyo-oka, 2017). Ähnlich wie auch für *Cpn* konnte gezeigt werden, dass die 14-3-3 Isoformen ζ und ϵ mit einem breiten Spektrum neurodegenerativer Erkrankungen, wie Schizophrenie, Alzheimer oder Parkinson sowie der kortikalen Entwicklung in Verbindung stehen (Layfield *et al.*, 1996; Ostrerova *et al.*, 1999; Berg, Holzmann und Riess, 2003; Ikeda *et al.*, 2008; Cheah *et al.*, 2012; Toyo-oka *et al.*, 2014; Ashraf *et al.*, 2019).



Abbildung 9: 14-3-3ζ Monomer und Homodimer.

Darstellung der 14-3-3 Dimer am Beispiel der ζ Isoform, verändert nach (Sluchanko und Gusev, 2012). Unten ist zur besseren Übersichtlichkeit eine schematische Darstellung gezeigt. Die α -Helix α 1 (AS 3-15, schwarzer Kreis) eines Monomers bindet zur Dimerisierung an die α -Helix α 3 (AS 39-67, grauer Kreis) und α 4 (AS 75-107, graues Oval) des anderen Monomers. Die typischen Ligandenbindestellen sind rot markiert.

14-3-3 Proteine treten innerhalb der Zelle als monomere und dimere Form auf. Jedes Monomer ist aus neun α -Helices, welche bündelartig und antiparallel zueinander angeordnet sind, aufgebaut (Abbildung 8 + Abbildung 9). Untereinander verglichen, zeigen die sieben Isoformen sechs hochvariable Regionen, die sowohl innerhalb der charakteristischen α -Helices, oder in ungeordneten Bereichen der Proteine lokalisiert sind (Abbildung 8B). Trotz der variablen Regionen zeigen die Isoformen untereinander eine hohe Sequenzidentität von mindestens 60 %. Die Isoformen ζ , α und τ sind phylogenetisch eng miteinander verbunden (81,1-87,6 % AS Identität). Die Isoformen ϵ und σ sind phylogenetisch am weitetesten voneinander entfernt (Abbildung 8A, E). Innerhalb aller Isoformen ist die innere, konkave Oberfläche jedoch hoch konserviert. Sie beschreibt eine amphipathische Furche von etwa 35 x 16 Angström, in der Phosphoserin-/Phosphothreoninbindemotive lokalisiert sind. Die phylogenetischen Unterschiede sind demnach auf die veränderte, äußere Oberfläche der verschiedenen Isoformen zurückzuführen. Diese trägt entscheidend zur Bindespezifität der spezifischen Liganden bei (Benzinger *et al.*, 2005; Gardino, Smerdon und Yaffe, 2006; Yang *et al.*, 2006; Aitken, 2011). Erste Charakterisierungsexperimente wiesen zunächst darauf hin, dass die Bindung von 14-3-3 Proteinen an ihre Interaktionspartner exklusiv über eine Serin- oder Threonin-Phosphorylierung der Zielproteine und damit einhergehende Bindung über die amphipathische

Furche mediiert wird (Abbildung 9). Dazu werden die spezifische Bindungsstellen RSXpSXP (Modus I) und RXY/FXpSXP (Modus II) oder das Carboxy-terminale Motiv -pS/pTX1-2-CO2H (Modus III, X cannot be a Prolin) genutzt (R= Arginin, S= Serin, pS= phosphoryliertes Serin, P= Prolin, X= beliebige AS, Y= Tyrosin, F= Phenylalanin) (Furukawa et al., 1993; Michaud et al., 1995; Muslin et al., 1996; Yaffe et al., 1997; Aitken, 2011). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass 14-3-3 Proteine nicht-phosphorylierte Interaktionspartner über die amphipathische Furche mit einer gleich hohen Affinität binden (Fu, Coburn und Collier, 1993; Alam et al., 1994; Du, Fox und Pei, 1996; Clark et al., 1997; Masters et al., 1999; Aitken, 2011). So wird beispielsweise das humane Protein Bax, ein Kernelement in der Apoptose, in nicht phosphorylierter Konformation gebunden (Nomura et al., 2015). Weitere Beispiele nicht phosphorylierter Bindungspartner zeigen wenig bis keine Übereinstimmung mit den bekannten Bindemotiven, haben aber als strukturelle Merkmale amphipathische Helices gemeinsam (Aitken, 2011). Dies lässt vermuten, dass die 14-3-3 Bindung über verschiedene Wege, unabhängig von der Phosphorylierung des Zielproteins und die amphipathische Furche realisiert werden kann (Masters, S.C. et al., 1999). Zur Dimerisierung bindet die α-Helix a1 (AS 3-15) eines Monomers an die a-Helix a3 (AS 39-67) und a4 (AS 75-107) des zweiten Monomers, wodurch der N-terminale Teil essenziell für die Dimerisierung von 14-3-3 ist. 14-3-3 Proteine sind neben der Bildung von Homodimeren auch in der Lage heteromer zu Dimerisieren (Abbildung 9). Da der N-terminus innerhalb der verschieden Isoformen hochvariabel ist, limitiert dies aber bestimmte Dimer-Formationen (Abbildung 8) (Chaudhri, Scarabel und Aitken, 2003; Liang et al., 2008; Fischer et al., 2009; Kligys et al., 2009; Aitken, 2011). Insgesamt kann aber dennoch eine große Anzahl an verschieden Interaktionspartner gebunden werden. Zum einen sind 14-3-3 Proteine vor allem als Dimere aktiv, wobei jedes Monomer einen separaten Interaktionspartner binden kann, zum anderen können die 14-3-3 Isoformen posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Acetylierung unterlaufen. Durch die Kombination von Hetero-Dimerisierung und posttranslationaler Modifikation kann so eine riesige Anzahl an Interaktionspartnern erreicht werden (Liu et al., 1995; Xiao et al., 1995; Pawson und Scott, 1997; Fu, Subramanian und Masters, 2000; Darling, Yingling und Wynshaw-Boris, 2005; Aitken, 2006; Pennington et al., 2018).

3.6 Funktionelle Eigenschaften von 14-3-3 Proteinen

Neben Bindung zahlreicher Liganden, sind 14-3-3 Proteine in der Lage verschiedene Funktionen auszuüben, sobald sie an ihr/e Zielprotein/E gebunden haben (Abbildung 10).



Abbildung 10: Schematische Übersicht bekannter 14-3-3 Funktionen.

(A) Durch Bindung des rigiden 14-3-3 ans Zielprotein kann es zu Konformationsänderungen kommen.

(B) Die Bindung an einen phosphorylierten Liganden kann die Phosphorylierungsstelle maskieren und so eine Protein-Protein-Interaktion mit weiteren Proteinen inhibieren.

(C) Durch Bindung an zwei bereits interagierende Zielproteine kann die Protein-Protein-Interaktion stabilisiert werden (Scaffolding-Funktion).

(D) Die Interaktion zwischen 14-3-3 und dem Liganden kann die Dephosphorylierung des Liganden verhindern.

(E) Änderung der zellulären Lokalisation des Liganden durch Maskierung beispielsweise der nuklearen Lokalisationssequenz (NLS). Verändert nach (Cornell und Toyo-oka, 2017).

14-3-3 Proteine besitzen eine α-Helix-reiche, rigide Struktur. Diese hat einen stabilisierenden Effekt auf den Bindungspartner und induziert eine Konformationsänderung, was wiederrum die Aktivität des Bindungspartners beeinflusst (Abbildung 10A) (Yaffe, 2002). Die Aktivität kann dabei sowohl erhöht als auch erniedrigt werden. Im Fall der phosphorylierten Serotonin-N-Acetyltransferase wird die katalytisch aktive Form erst erreicht, wenn eine, durch 14-3-3 Bindung induzierte Konformationsänderung vollzogen ist. Die katalytisch aktive Form wird dabei zusätzlich durch das 14-3-3 Dimer stabilisiert (Obsil *et al.*, 2001). Die pflanzliche Adenosin-5-triphosphatase aus Chloroplasten wird hingegen durch die Interaktion mit 14-3-3 negativ reguliert (Bunney, van Walraven und de Boer, 2001).

Neben der globalen Konformationsänderung kann bei Interaktion mit 14-3-3 auch die Phosphorylierungsstelle maskiert werden (Abbildung 10B). Dies kann neben der Blockierung von Protein-Protein Interaktionen auch zur Blockierung von Protein-DNA-Interaktionen führen (Obsil und Obsilova, 2011; Cornell und Toyo-oka, 2017). Dafür wird Lokal in der Nähe der Phosphorylierung eine Konformationsänderung via 14-3-3 induziert. Dies ist zum Beispiel bei der Regulation von humanem BAD der Fall. Die Bindung von Bcl2 an phosphoryliertes BAD ist Teil der humanen Apoptose. Wird nun durch die Bindung von 14-3-3 an BAD die Interaktion mit Bcl2 blockiert, bricht der apoptotische Weg an dieser Stelle ab (Zha *et al.*, 1996).

Als Scaffolding-Protein ist 14-3-3 zudem in der Lage, Protein-Protein-Interaktionen zu stabilisieren. Da sowohl bei Homo- als auch bei Heterodimeren zwei verschiedene Liganden pro Monomer gebunden werden können, besteht die Möglichkeit einer Stabilisierung des Proteinpaars (Abbildung 10C). Dies ist beispielsweise bei der Interaktion von Raf und Bcr der Fall (Braselmann und McCormick, 1995).

Neben der Maskierung kann auch eine Protektion der Phosphorylierung vermittelt werden (Abbildung 10D). Zuletzt sind 14-3-3 Proteine sogar in der Lage, die subzelluläre Lokalisation des gebundenen Liganden zu manipulieren (Abbildung 10E). Dazu kann sowohl die Exportrate aus dem Zellkern verringert oder erhöht werden. Beispiele dazu sind cdc25C, die humane Telomerase und die Histon-Deacetylase 4 und 5. Im Fall von cdc25C wird der Transport über die Kernmembran durch die Bindung an 14-3-3 verhindert. Es kann so Einfluss auf die Zellzyklus-Progression nehmen (Dalal *et al.*, 1999; Lopez-Girona *et al.*, 1999; Grozinger und Schreiber, 2000; Muslin und Xing, 2000; Seimiya *et al.*, 2000; Telles *et al.*, 2009).

Da gezeigt werden konnte, dass 14-3-3 Interaktionspartner nicht Serin- oder Threonin-phosphoryliert sein müssen, um gebunden zu werden, treffen die meisten der beschriebenen Funktionen auch auf nicht phosphorylierte Interaktionspartner zu (Aitken, 2011).

3.7 14-3-3ζ

Auch wenn die verschiedenen Isoformen der 14-3-3 Proteinfamilie untereinander hohe Homologien, vor allem innerhalb der amphipathischen Furche, aufweisen, konnte einige, 14-3-3ζ exklusive Funktionen beschrieben werden.

14-3-3ζ ist auf der chromosomalen Region 8q22.3 lokalisiert. Diese ist in Krebszellen häufig dupliziert, wodurch 14-3-3ζ in Krebszellen hochreguliert wird. Es vermittelt eine anti-apoptotische Wirkung, welche bei Hochregulation der Expression verstärkt wird und ist somit ein optimales Ziel der Krebstherapie. Diese antiapoptotische Wirkung ist hauptsächlich für die ζ Isoform beschrieben. 14-3-3ζ agiert daher als zentrale Figur chemoresistenten Signalwegen ERK/MAP-Kinaseweg an onkogenen und wie dem (Zellproliferation/Apoptose), dem PI3K/Akt-Signalweg (Zellzyklusregulation), dem Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-1-Rezeptor (IGF-IR)-Signalweg (Zellproliferation) oder dem TGF-β-Signalweg (Zelladhäsion) (Xing et al., 2000; Chung et al., 2009; Neal und Yu, 2010; Xu et al., 2015). Transgen überexprimiert führt es beispielsweise in Mäusen zur Tumorgenese (Rehman et al., 2014). So konnten hohe 14-3-3ζ Level in diversen Krebsarten mit einer erhöhten Patientensterberate assoziiert werden, was wahrscheinlich auf die starke, 14-3-3 (vermittelte, anti-apoptotische Wirkung zurückzuführen ist (Fan et al., 2007; Neal et al., 2012; Lin et al., 2009, 2009; Lu et al., 2009, 2009; Neal et al., 2009, 2012; Bergamaschi, Christensen und Katzenellenbogen, 2011, 2011; Yang et al., 2011, 2011; Xu et al., 2015; Gu et al., 2018). 14-3-3ζ Überexpression reduziert den Effekt von 9NC6 (Capthotecin-Derivat/Krebstherapeutika) in Prostatakrebsgewebe. Die Herunterregulation von 14-3-3ζ in Lungenkrebsgewebe führt im Gegensatz zu einem verstärkten Effekt bei Verabreichung von Cisplatin (Zytostatikum zur Hemmung des Zellwachstums bzw. der Zellteilung). Diese und weitere Studien zeigen, dass 14-3-3ζ mit vielen Pro-Überlebensfaktoren interagiert und somit gerade in der Krebsforschung ein vielversprechender Kandidat für die Therapie darstellen könnte (Chatterjee et al., 2004; Fan et al., 2007).

4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, das Adhäsin LIPP näher zu charakterisieren, um seine Wirkungsweise innerhalb der frühen, chlamydialen Infektion weiter aufzuklären. Trotz intensiver Versuche ist der humane Interaktionspartner von LIPP bisher nicht identifiziert worden. Eines der primären Ziele dieser Arbeit bestand demnach darin, den humanen Interaktionspartner zu identifizieren und die Interaktion näher zu beschreiben. LIPP ist über die Bindung an und Externalisierung von zytoplasmatischem Phosphatidylserin auf die Außenseite der Plasmamembran an der chlamydialen Internalisierung beteiligt. Der Mechanismus der Phosphatidylserin-Bindung und Externalisierung ist bisher hingegen ungeklärt. Auch der Infektionserhöhende Effekt bei Vorinkubation von Humanzellen mit rekombinantem LIPP ist bisher systematisch nur wenig untersucht. Im Zuge dieser Arbeit sollte auf diese charakteristischen Eigenschaften von LIPP näher eingegangen und mögliche, wirkungsvermittelnde Areale des Proteins bestimmt oder näher eingegrenzt werden.
5 Teil I: Manuskript I

Chlamydia pneumoniae adhesin LIPP recruits and interacts with host cell 14-3-3 ζ in early infection

Philipp T. Hanisch, Lea M. Esser, Dominik K. Spona and Johannes H. Hegemann

Erstautor

Beteiligungen:

Philipp T. Hanisch: 70 %, Lea M. Esser: 15 %, Dominik K. Spona: 10 %, Prof. Dr. Johannes H.

Hegemann: 5 %

Philipp T. Hanisch (PTH) plante alle Experimente, die in diesem Manuskript dargestellt sind. PTH schrieb das gesamte Manuskript, wertete die Daten aus und stellte alle Figuren und Figurlegenden zusammen. PTH erbrachte die Daten zu folgenden Figuren: Fig. 2 B; Fig. 3 A, B, C; Fig 4.; Supl. Fig. 1. und erstelle das Modell Fig. 5

Im Rahmen der Masterarbeiten von Dominik K. Spona (DKS) wurde der Hefe-Zwei-Hybrid Screen durchgeführt und 14-3-3ζ identifiziert. DKS klonierte die 14-3-3ζ exprimierenden Plasmide, die in Fig. 1B + C, 3 A, C und D genutzt wurden.

Die Daten der folgenden Figuren wurden im Rahmen der Masterarbeit von Lea M. Esser und unter der Betreuung und engen Beaufsichtigung von PTH erbracht: Fig. 1; Fig 2 A, C; Fig 3 D, E, F. Prof. Johannes H. Hegemann übernahm als korrespondierender Autor Korrekturarbeiten am Manuskript und den Figuren. Er nahm während der Entstehungsphase dieses Manuskripts als Betreuer der Doktorarbeit Einfluss auf die Experimentwahl. Alle Koautoren waren in die Diskussion der Daten involviert.

Hiermit bestätige ich, dass diese Angaben korrekt sind. Düsseldorf, den 15.11.2019

Philipp T. Hanisch

5.1 Zusammenfassung

Für das obligat intrazelluläre Humanpathogen *Cpn* ist die Adhäsion an, gefolgt von der Internalisierung in die Wirtszelle von essenzieller Bedeutung für eine erfolgreiche Infektion und Vermehrung. Zur stabilen Adhäsion an die Wirtszelle nutzt das Bakterium verschiedene Adhäsine. In vorherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass das *Cpn* Adhäsin LIPP für die chlamydiale Infektion eine zentrale Rolle spielt. Es bindet an die Wirtszelle; transloziert selbstständig Phosphatidylserin (PS) von der inneren auf die äußere Seite der humanen Plasmamembran und vermittelt einen Infektions-erhöhenden Effekt. Ein humaner Interaktionspartner wurde hingegen bisher nicht identifiziert.

In diesem Manuskript konnte das humane, zytosolische Adapterprotein 14-3-3ζ über einen Hefe-Zwei-Hybrid-Screen als humaner Interaktionspartner identifiziert werden.

In vitro Pulldown-Experimente zeigten, dass rLIPP und r14-3-3ζ biochemisch miteinander interagieren. In Transfektionsexperimenten und Experimenten an *Cpn* infizierten Humanzellen wurde die *in vivo* Interaktion gezeigt. Adhäsionsexperimente an humanen Zellen und Versuche mit r14-3-3ζ gefüllten giant unilamellar vesicles (GUVs) demonstrierten, dass rLIPP in der Lage ist 14-3-3ζ selbständig vom Zytosol zur humanen Plasmamembran zu rekrutieren. Eine erhöhte, zytosolische 14-3-3ζ Verfügbarkeit bedingt eine erhöhte Aufnahme der elementary bodies (EBs) während der frühen *Cpn* Infektion und führt zu einer Vermehrung chlamydialer Einschlüsse 48 h nach der Infektion.

Die Daten lassen die Wichtigkeit dieser Interaktion in der frühen chlamydialen Infektion deutlich werden. Dies ist das erste Mal, dass gezeigt werden konnte wie ein bakterielles Adhäsin über die humane Plasmamembran mit einem Protein der 14-3-3 Familie interagiert.

Chlamydia pneumoniae adhesin LIPP recruits and interacts with host cell 14-3-3ζ in early infection

Philipp T. Hanisch, Lea M. Esser, Dominik K. Spona and Johannes H. Hegemann

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

Abstract

Chlamydia pneumoniae (*Cpn*) are Gram-negative, obligate intracellular bacteria which cause acute and chronic diseases of the upper and lower respiratory tract. Additionally, *Cpn* infections are linked to a wide range of neurodegenerative diseases including Alzheimer and Parkinson representing a serious threat to public health worldwide. As an obligate intracellular bacterium, *Cpn* adhesion and internalization are essential for the infection cycle. Here we report that the recently described LIPP, a *Cpn* adhesin with phospholipid translocation capacity, forms a stable interaction with the human cytosolic adapter protein 14-3-3 ζ at the plasma membrane the of mammalian host cells. We show that LIPP recruited to the host plasma membrane redirects 14-3-3 ζ to the plasma membrane. During the first minutes of a *Cpn* infection increasing amounts of 14-3-3 ζ can be found at the bacterial adhesion site. Increased 14-3-3 ζ concentration leads to an enhanced EB internalization and *Cpn* infection. Treatment of giant unilamellar vesicles (GUVs) with luminal 14-3-3 ζ with rLIPP induces 14-3-3 ζ redistribution to the inner membrane leaflet. Those finding mark the importance of the interaction between LIPP and 14-3-3 ζ in the early infection process. This is the first example of a bacterial adhesin interacting with cytosolic 14-3-3 ζ . However, the unique role of the interaction in *Cpn* pathogenesis remains to be determined.

Introduction

Chlamydia pneumoniae (Cpn) is one of the most prevalent human pathogens within the Gram-negative *Chlamydiae*, that infect a variety of organisms and tissues (Stephens, 1999). At adult age 70- 80 % of the human population are antibody-positive to *Cpn* which infects the respiratory tract and is associated with chronic diseases such as atherosclerosis, Alzheimer, and diseases of the central nervous system (Dahlén *et al.*, 1995; Blasi, 1996; Sriram *et al.*, 1999; Belland *et al.*, 2004; Blasi, Tarsia and Aliberti, 2009). All *Chlamydiae* share a unique, biphasic life cycle in which they alternate between two distinct developmental forms. As obligate intracellular bacteria the initial contact to the host cell is mediated by the elementary body (EB). After internalization the EB is packaged in a membrane-bound compartment termed inclusion where it differentiates to the reticulate body (RB). (Schramm, Bagnell and Wyrick, 1996; Belland, Ojcius and Byrne, 2004; AbdelRahman and Belland, 2005).

Initial binding of the *Cpn* EB occurs via chlamydial OmcB interacting with human heparan sulfate-like proteoglycans (GAGs) (Stephens *et al.*, 2001; Fadel and Eley, 2007; Moelleken and Hegemann, 2008). Attached to the host cell, members of the polymorphic membrane protein (Pmp) adhesin family, as shown

for Pmp21, interacts with and activates the human epidermal growth factor receptor (EGFR) (Mölleken, Schmidt and Hegemann, 2010; Mölleken, Becker and Hegemann, 2013; Becker and Hegemann, 2014). Recently we described the *Cpn*-specific adhesin Cpn0473 (LIPP) (Fechtner, Galle and Hegemann, 2016; Galle *et al.*, 2019). Interestingly in infection blocking experiments recombinant LIPP (rLIPP) does not constrict EB adhesion but promotes dose-dependently internalization by *Cpn* suggesting an unusual mode of action (Fechtner, Galle and Hegemann, 2016). Moreover, LIPP adhesion to human cells leads to phosphatidylserine (PS) externalization from the inner to the outer leaflet of the PM without inducing apoptosis. rLIPP also binds asymmetric giant unilamellar vesicles (GUVS) and induces PS externalization. This is associated with rLIPP-induced pore formation. Thus, LIPP is a bacterial PS translocase. This reveals a novel mechanism by which intracellular pathogens enter host cells (Galle *et al.*, 2019). So far, no proteinaceous interaction partner for LIPP has been characterized.

The 14-3-3 protein family is a group of highly conserved 30 kDa acidic, multifunctional proteins, firstly discovered in brain tissue and expressed in a wide range of organisms in nearly all tissues (Celis et al., 1990; Takahashi, 2003; Aitken, 2006). The human 14-3-3 family counts seven isoforms, β, Υ, ε, η, σ, τ and ζ , with α and δ representing the phosphoforms (Serine at position 158) of β and ζ (Aitken *et al.*, 1995). In eukaryotic cells, 14-3-3 mainly localizes in the cytoplasm, but isoforms have also been found in the nucleus, at the Golgi apparatus and the plasma membrane (PM) (Celis et al., 1990; Leffers et al., 1993; Freed, McCormick and Ruggieri, 1994; Fanger et al., 1998; Tang et al., 1998; Garcia-Guzman et al., 1999). Due to their broad range of interactions with several hundred proteins they are classified as "adapter proteins" (Hanahan and Weinberg, 2000; Jin et al., 2004; Meek, Lane and Piwnica-Worms, 2004; Pozuelo Rubio et al., 2004; Benzinger et al., 2005; Aitken, 2006; Tzivion et al., 2006). 14-3-3 isoforms are involved in a wide range of neurodegenerative diseases like Alzheimer and Parkinson (Layfield et al., 1996; Ostrerova et al., 1999; Ashraf et al., 2019). 14-3-3 proteins are highly helical in structure and usually form homo- or heterodimeric proteins. Crystallography of 14-3-3ζ showed that each monomer consists of nine antiparallel α-helices creating a large negatively charged channel in dimer conformation. Each monomer contains an inner, concave shaped region, the amphipathic groove, by which the binding to the interaction partner is usually mediated (Pawson and Scott, 1997; Darling, Yingling and Wynshaw-Boris, 2005; Aitken, 2006). In dimer conformation each monomer is capable of binding a different target protein, leading to significant implications in the regulation of cellular processes (Woodcock et al., 2003). 14-3-3 proteins interact with target proteins by binding to phosphoserine- (pS)/ phosphotreonine (pT) residues via the two binding sites RSXpSXP (mode I) or RXY/FXpSXP (mode II), or by the carboxy terminal -pS/pT X1-2-CO2 H motif (where X is not proline) (mode III) (Yaffe et al., 1997; Ganguly et al., 2005). However 14-3-3ζ also binds to nonphosphorylated interaction partners with the same stability via the amphipathic groove (Masters, S.C. et al., 1999).

In this study we show that the EB surface protein LIPP interacts with the human, cytosolic 14-3-3 ζ protein through the PM at the early steps of infection. Via GUV and pulldown experiments we demonstrate that LIPP can redirect the adaptor protein to the PM independent of other proteins forming a stable interaction.

Infection experiments show the relevance of the interaction in the first 30 min of a *Cpn* infection. Furthermore, transfection experiments reveal that an enrichment in 14-3-3 ζ availability promotes the chlamydial infection significantly. This is the first time an interaction between a chlamydial adhesin and a 14-3-3 protein is described.

Results

LIPP and 14-3-3ζ interact in vitro and in vivo

The chlamydial adhesin LIPP bind human epithelial cells (Fechtner, Galle and Hegemann, 2016). In order to identify interacting proteins, we performed an extensive yeast-two-hybrid (Y2H) screen using a human testis cDNA bank. Surprisingly, the screen revealed the host cytoplasmic 14-3-35 protein as a potential interaction partner. In vitro pulldown assays with recombinant His-tagged LIPP-HIS (rLIPP-HIS) and GSTtagged 14-3-3ζ (rGST-14-3-3ζ), performed with either Ni-NTA or glutathione-coated agarose beads confirmed the interaction between LIPP and 14-3-3ζ. The chlamydial adhesin rPmp21-HIS did not show any *in vitro* interaction (Fig. 1B). Since 14-3-3ζ is a cytoplasmatic protein, the interaction between LIPP and 14-3-3C most probably occurs within the host cell cytoplasm. We therefore made use of a GFP-LIPP and a 14-3-3ζ-mCherry transfection construct to monitor the localization of the fusion proteins in HEp-2 cells (Fig. 1C). Using CD-58-mCherry as a PM marker we found that transfected GFP-LIPP localized to the PM and to membranous structures likely mediated through the binding to phosphatidylserine-containing membrane (Fig. 1C+E) (Galle et al., 2019). 14-3-3ζ-mCherry shows a uniform cytoplasmic localization comparable to mCherry alone (Fig. 1B). Interestingly, the localization of 14-3-3ζ-mCherry changed upon co-transfection with GFP-LIPP. 14-3-3ζ-mCherry was redistributed to the host PM colocalizing with the LIPP-GFP signals, indicating a recruitment of 14-3-3 (by LIPP to the PM (Fig. 1C). Pulldown experiments of transfected GFP-LIPP using GFP-beads confirmed the interaction of GFP-LIPP with endogenous 14-3-3ζ (Fig. 1D) out of whole cell lysates. Interestingly the interaction with 14-3-3ζ is mediated by the LIPP N-Terminus (aa 1-204) and by its C-Terminus (aa 205-508), while neither GFP-EGFR nor GFP alone were able to pull endogenous 14-3-3ζ out of the cell lysate (Fig. 1A,D) supporting the specificity of the 14-3-3ζ -LIPP interaction.





Figure 1: LIPP and 14-3-3ζ interact in vitro and in vivo

(A) Scheme of used LIPP fragments. BD= binding domain, TM= transmembrane domain, LIPP= full length LIPP, LIPP_N= N-terminal LIPP, LIPP_C= C-terminal LIPP, LIPP_BD= previously defined BD \pm 40 amino acids (aa) flank, LIPP_ Δ TM= LIPP without previously defined TM domain (Fechtner, Galle and Hegemann, 2016; Galle *et al.*, 2019).

(B) Pulldown assay of purified rLIPP and purified r14-3-3 ζ . rLIPP-HIS, rGST-14-3-3 ζ and rPmp21-HIS were expressed in *E. coli* BL21 and purified out of cell lysate. Interaction of the purified proteins was analyzed on a Western blot using anti-HIS (α -HIS) and anti-GST (α -GST) specific antibodies. Estimated running height of elution is marked by asterisk (*). HIS-PD= pulldown via Ni-NTA agarose beads, GST-PD= pulldown via glutathione-agarose beads, FT= flow through, W= wash, E= elution.

(C) Co-expression of LIPP and 14-3-3ζ in human HEp-2 cells. GFP, GFP-LIPP, mcherry and 14-3-3ζ-mcherry were transfected either solo or in combination into human HEp-2 cells for 16 hours. Localization of the proteins was analyzed by confocal microscopy. DNA was stained with DAPI. Scale bar: 10µm.

(D) Co-purification of LIPP-GFP and endogenous host 14-3-3 ζ from HEp-2 cells. After transfection of GFP, GFP-LIPP (FL/N/C) or GFP-EGFR into HEp-2 cells for 16 h, cells were lysed with phospholysis-buffer. The cell lysate was incubated with GFP-beads. After collection of the flow through (FT), the beads were washed six times (W), bound protein was eluted (E) and analyzed by Western-Blots. Endogenous 14-3-3 ζ was detected via specific antibody. Estimated running height of elution is marked by asterisk (*). FT= flow through, W= wash, E= elution.

(E) Co-localization of LIPP and the host PM. GFP-LIPP and CD58-mCherry were co-transfected in human HEp-2 cells for 16 hours. Localization of the proteins was analyzed by confocal microscopy. DNA was stained with DAPI. Scale bar: 10µm.

LIPP and 14-3-3ζ interact through the barrier of the plasma membrane

Since the LIPP adhesin is located on the surface of Cpn EBs (Fechtner, Galle and Hegemann, 2016) it interacts with the outer leaflet of the PM of the human cell. To allow interaction between LIPP and the cytoplasmic 14-3-3ζ, the barrier of the PM must be overcome. Indeed there was evidence that the LIPP Cterminus is inserted in the host cell PM (Galle et al., 2019). To test if LIPP can conduct the redistribution of endogenous 14-3-3ζ when adhering to the PM, FITC labeled, recombinant variants of LIPP (rLIPP) and Pmp21 (rPmp21) were added to human HEp-2 cells for 60 min (Fig. 1A + 2A). At 37 °C rLIPP bound to the cell and induced a massive redistribution of endogenous 14-3-3ζ to the PM at the rLIPP adhesion sites. Distinct areas with a stronger rLIPP binding were also enriched with endogenous 14-3-3ζ (see zoom in Fig. 2A). In contrast incubation of cells with the control protein rPmp21_PD as well as untreated cells (EGFR PM staining) did not show a 14-3-3ζ redistribution (Fig. 2A). Quantification of the 14-3-3ζ-redistribution revealed that the cell binding variant LIPP BD and the membrane penetrating deficient variant rLIPP ΔTM were unable to mediate 14-3-3ζ redistribution to the PM. A similar effect could also be observed when the incubation with rLIPP was performed at 4 °C (Fig 2B). Biochemical pulldown assays performed with Ni-NTA coated agarose beads confirmed the microscopical findings (Fig. 2C). Exclusively full-length rLIPP, bound to epithelial cells at 37 °C, was able to pull endogenous 14-3-3 ζ from the human cell lysate. Neither incubation at 4°C, nor treatment with rLIPP deletion variants or rPmp21 showed a 14-3-3ζ pulldown. When rLIPP was added to human cells directly before cell lysis, the subsequent pulldown by anti-LIPP-antibodies did not bring down 14-3-32, indicating that LIPP adhesion to the PM of the host cell and the subsequent relocalization of 14-3-3 ζ to the PM is required for the interaction (Fig. 2C).



Figure 2: LIPP and 14-3-3ζ interact with each other through the barrier of the plasma membrane

44

(A) Redistribution of host 14-3-3ζ in rLIPP-treated HEp-2 cells. 50% confluent grown HEp-2 cells were incubated with 100 µg/ml FITC labeled rProtein for 1h at 37 °C or with FITC labeled rLIPP at 4 °C (rLIPP 4 °C), fixed with PFA and observed by confocal microscopy.
(B) Quantification of 14-3-3ζ-redistribution to the host PM. Quantification was performed by ImageJ software (Script by Sebastian Hänsch, HHU)) (n=3) Scale bar: 10 µm. Statistical significance of differences is denoted by *** (p≤0.001), ** (p≤0.01) and * (p≤0.05). ns, not significant. Analysis was performed via the software GraphPad Prism (unpaired t-test, Mann-Whitney corrected).

(C) Co-purification of rLIPP and host 14-3-3 ζ from HEp-2 cell lysates. Fully confluent layers of HEp-2 cells in 75 cm² flasks were incubated with 1 mg rProtein-HIS for 1h at 37 °C, rLIPP was additionally incubated at 4 °C (rLIPP 4 °C). After extensive washing cells were lysed and lysate was incubated with Ni-NTA coated latex beads for 2h. After collection of the flow through (FT), the beads were washed six times (W) and interaction of the purified proteins (E) was analyzed on a Western blot using anti-HIS (α -HIS) and anti-14-3-3 ζ (α -14-3-3 ζ) specific antibodies. Estimated running height of elution is marked by asterisk (*). HIS-PD= pulldown via Ni-NTA agarose beads, I= input, FT= flow through, W= wash, E= elution.

LIPP recruits 14-3-3 to synthetic membranes

Thus far, our data indicated that LIPP and 14-3-3 ζ interact in solution *in vitro*. Moreover, LIPP adhesion to the PM relocates 14-3-3 ζ to the inner leaflet of the PM. Next, we tested whether LIPP and 14-3-3 ζ interact directly at synthetic membranes without a cellular context.

We filled GUVs with DyLight 594-labelled rGST-14-3-3ζ and added FITC-labeled rLIPP from the outside. After 7 min incubation with rLIPP, a localization of rGST-14-3-3ζ to the inner membrane leaflet of the GUV could be observed (Supplement Fig. 1A). Over time significant amounts of rGST-14-3-3ζ could be detected at the GUV membrane (Fig. 3 A+B) indicating a direct interaction of both proteins at the GUV membrane. Importantly, no rGST-14-3-32 recruitment to the GUV membrane could be detected in rLactC2-treated GUVs (Fig. 3C). Of note, while rLIPP ΔTM and rLIPP BD did not show any rGST-14-3-3ζ redistribution, rLIPP_N, responsible for PS binding and -translocation (Galle et al., 2019) did show rGST-14-3-3ζ relocalization to the GUV membrane (Fig. 3C). Soluble rLIPP binds all over the host PM and recruits host 14-3-3ζ. Considering that infection by a chlamydial EB is a local event we coated latex beads with FITC labeled rLIPP, mimicking the EB in size (EB = $0.3 - 0.4 \mu$ m; latex bead = 1μ m), and incubated them with HEp-2 cells. rLIPP-coated latex beads showed accumulation of endogenous 14-3-3ζ at the PM underneath the adhered beads (Fig 3D). Finally the subcellular localization of 14-3-3ζ during infection of HEp-2 cells was analyzed: At 15 min post infection (p.i.) host endogenous 14-3-3ζ could be detected at adhering chlamydial EBs (Fig. 3E). To confirm the association of adhering EBs and 14-3-3ζ pulldown assays on Cpn infected human HEp-2 cells using Protein-G beads coupled with either αLIPP or α14-3-3ζ antibody were performed. About 15 min p.i. host 14-3-3ζ could be pulled via LIPP and vice versa (Fig. 3F), showing that endogenous LIPP located on adherend Cpn EBs interacts with 14-3-3ζ at the PM of human cells.



Figure 3: LIPP recruits 14-3-3 to the inner leaflet of synthetic membranes.

(A) Redistribution of r14-3-3ζ to the GUV membrane in rLIPP-treated PS-GUVs. PS-GUVs filled with Dylight[™]594 NHS labeled rGST-14-3-3ζ were created via the "Polyvenylalcohol (PVA) assisted swelling method" (Weinberger *et al.*, 2013). Therefore, 100µl 5%-PVA solution was mixed with 2µg Dylight[™]594 NHS labeled rGST-14-3-3ζ prior GUV-formation. Filled PS-GUVs were incubated with FITC labeled full-length rLIPP for 45-75 min.

(B) Quantification of r14-3-3ζ-redistribution to the GUV membrane. r14-3-3ζ-redistribution was quantified using ImageJ software (Script by Sebastian Hänsch, HHU)) r14-3-3ζ-redistribution at timepoint 45 min was set to 100%. (n=3). Statistical significance of differences is denoted by *** ($p \le 0.001$), ** ($p \le 0.01$) and * ($p \le 0.05$). ns, not significant. Analysis was performed via the software GraphPad Prism (unpaired t-test, Mann-Whitney corrected).

(C) Redistribution of r14-3-3ζ to the GUV membrane in rProtein treated PS-GUVs. FITC labeled rLIPP variants or exclusively PSbinding FITC labeled rLactC2 were incubated for 60 min with PS-GUVs.

(D) Redistribution of host 14-3-3ζ in HEp-2 cells treated which rLIPP-coated agarose beads. Blue fluorescent agarose beads (~1µm) were coated with FITC- labeled rLIPP. Coated beads were incubated with 50% confluent HEp-2 cells for 1 h at 37 °C. Scale bar: 1 µm. Successful rLIPP-coating of agarose beads is shown on Western-blot.

(E) Interaction of host 14-3-3ζ and *Cpn* EBs in infected HEp-2 cells. *Cpn* EBs (MOI = 10) were incubated for 15 min on 50% confluent HEp-2 cells sequential to a 10 min centrifugation, fixed with PFA and observed by confocal microscopy.

(F) Co-purification of endogenous LIPP and host 14-3-3 ζ out of *Cpn* infected HEp-2 cells. After cell lysis with phospholysis-buffer anti-LIPP (α -LIPP) or anti-14-3-3 ζ (α -14-3-3 ζ) coated Protein-G beads were used to co-purify LIPP and 14-3-3 ζ out of HEp 2 cells lysate sequential to the *Cpn* infection. After collection of the flow through (FT), the beads were washed six times (W1-W6), bound protein was eluted (E) and analyzed by Western-Blots. PD= pulldown, FT= flow through, W1= first wash, W6= sixth wash, E= elution. Scale Bar: 10 µm.

14-3-3ζ is beneficial for the chlamydial infection

In order to find out at which timepoint during the EB entry process the host 14-3-3 ζ is recruited to the invading bacteria, a time kinetic experiment was performed. Starting at the initial EB contact (0 min) up to 30 min p.i. 14-3-3 ζ was found to be EB associated with a peak at 10 - 15 min p.i. (Fig. 4A-C). At 60 min p.i. no significant recruitment of 14-3-3 ζ could be detected. Heat killed bacteria (15 min or 30 min p.i.) did not show significant 14-3-3 ζ recruitment (Fig. 4C). We therefore conclude that the interaction between LIPP and 14-3-3 ζ takes place in the early infection/adhesion step of the infection. Since endogenous LIPP recruits host 14-3-3 ζ to the EB adhesion site, we assumed that a change in the overall 14-3-3 ζ concentration within the host cell would influence the *Cpn*. infectivity. Unfortunately, all approaches to downregulate 14-3-3 ζ levels within the host cell failed. We therefore upregulated the 14-3-3 ζ protein level via transfection of a 14-3-3 ζ -GFP. Interestingly, a raise of the 14-3-3 ζ -protein levels led to a significant increase in the EB internalization rate measured 2h p.i. (183,74 + 8,24%) as well as in the number of inclusions per cell 48h p.i. (163,4% +-11,77%) compared to untransfected- and GFP transfected control cells (Fig 4D).





(A) Redistribution of host 14-3-3ζ to the *Cpn* EB attachment site on HEp-2 cells. *Cpn* EBs (MOI = 10) were incubated for 0 - 240 min with 50% confluent HEp-2 cells, after a centrifugation for 10 min at 2920 rpm at 30 °C, fixed with PFA and observed by confocal microscopy. Exemplary pictures of 0, 10, 15 and 60 min post infection (p.i.) timepoints are shown. HEp-2 cells have also been incubated with heat killed (hk) EBs for 15-60 min (shown in 15 min timepoint) Bacterial and human DNA was stained via DAPI, human EGFR and 14-3-3ζ were stained *via* specific antibodies. Scale bar: 10µm.

(**B** + **C**) Quantification of 14-3-3 ζ redistribution to adherent vital and hk EBs. Quantification was performed by ImageJ software (Script by Sebastian Hänsch, HHU)) (n=3). Therefor the 14-3-3 ζ signal intensity was measured in the extracellular space, at the EB attachment site and within the cytosol. The relative fluorescence intensity of the 14-3-3 ζ signal was calculated by subtracting the value measured in the cytosol from the value measured at the EB. Statistical significance of differences is denoted by *** (p≤0.001), ** (p≤0.01) and * (p≤0.05). ns= not significant. Analysis was performed via the software GraphPad Prism (unpaired t-test, Welch corrected).

(D) 2 h and 48 h *Cpn* infection on transfected HEp-2 cells. HEp-2 cells were transfected with either GFP or 14-3-3 ζ -GFP for 16 h, subsequent infected with *Cpn* EBs (MOI = 5) for 2 h or (MOI = 0,5) for 48 h. Inclusions were counted manually (n=3). The Western-Blot shows endogenous 14-3-3 ζ -levels in HEp-2 cells and endogenous 14-3-3 ζ - + recombinant 14-3-3 ζ -GFP-levels in 14-3-3 ζ -GFP transfected cells. Transfection rate ~ 30%. Internalized EBs (2 h p.i) or inclusions (48 h p.i.) were counted exclusively in transfected/ non-transfected cells.

EB internalization rate 2 h p.i.: in non-transfected cells (HEp-2 cells) was set to 100%. GFP-transfected cells: 76,17 ± 10,72 % EB internalization rate, 14-3-3ζ-transfected cells: 139,95 ± 8,24 % EB internalization rate.

48 h p.i.: non-transfected cells (HEp-2 cells): 0,45 \pm 0,09 inclusions/ cell, GFP-transfected cells: 0,52 \pm 0,09 inclusions/ cell, 14-3-3 ζ -transfected cells: 0,84 \pm 0,1 inclusions/ cell.

Taken together, our data show that LIPP redirects $14-3-3\zeta$ to the membrane in human HEp-2 cells and GUVs. In a *Cpn* infection the interaction takes place early in infection (0 – 30 min p.i.) leading to a significant enhancement of chlamydial infectivity. This is the first known interaction of a chlamydial adhesin with a member of the human 14-3-3 family.

Discussion

Chlamydiae have developed a variety of strategies to infect the host cell. Before forming the protective membrane-bound inclusion within the host cell, in which chlamydia replicates, the EB is internalized in the host cell without inducing apoptosis. *C. pneumoniae* (*Cpn*) uses several adhesins to adhere to the human cell and promote the internalization process (Moelleken and Hegemann, 2008; Mölleken, Becker and Hegemann, 2013; Luczak *et al.*, 2016). The recently described LIPP is an adhesin with unique features in the adhesion and early infection process. It binds specifically to lipid raft domains on the human PM, translocates host phosphatidylserine and boosts the *Cpn* infection by enhancing internalization of EBs (Fechtner, Galle and Hegemann, 2016; Galle *et al.*, 2019).

So far, no proteinaceous interaction partner for LIPP was identified. We have successfully utilized the Y2H system to identify the interaction between the *Cpn* LIPP and the human 14-3-3 ζ protein. The 14-3-3 protein family has been described extensively in literature interacting with several hundred human, bacterial and viral proteins, being involved in cytoskeletal regulation, cellular organization and apoptosis (Fu, Coburn and Collier, 1993; Robert K. Andrews *et al.*, 1998; Hanahan and Weinberg, 2000; Jin *et al.*, 2004; Meek, Lane and Piwnica-Worms, 2004; Pozuelo Rubio *et al.*, 2004; Benzinger *et al.*, 2005; Aitken, 2006; Tzivion *et al.*, 2006). Interestingly, both, *Cpn* and human 14-3-3 proteins are linked to a wide range of neurodegenerative diseases like Alzheimer and Parkinson. Furthermore, 14-3-3 proteins have been described to interact with the *C. trachomatis* (*Ctr*) inclusion membrane. The *Ctr* inclusion membrane protein IncG was shown to interact with 14-3-3 β while InaC (CT813) redirects 14-3-3 β and ϵ to the chlamydial inclusion 30-hour post infection (hpi). Since both proteins do not have a *Cpn* homolog and the interaction is crucial for a stable *Ctr*

infection cycle we chose to further characterize the interaction between 14-3-3 ζ and LIPP (Layfield *et al.*, 1996; Ostrerova *et al.*, 1999; Scidmore and Hackstadt, 2001; Chen *et al.*, 2006; Kokes *et al.*, 2015; Ashraf *et al.*, 2019). The human 14-3-3 family consists of seven isoforms of which two are phosphorylated (Aitken *et al.*, 1995). Although we identified the full length, non-phosphorylated ζ isoform multiple times but none of the other isoforms, it remains unclear if other isoforms may similarly interact with LIPP or if the interaction is exclusively 14-3-3 ζ related.

14-3-3 (is a cytosolic protein while LIPP is an adhesin located of the surface of the chlamydial particle (Fechtner, Galle and Hegemann, 2016). To interact, both proteins must get in close proximity to each other. This can only be established when either LIPP or 14-3-3ζ somehow overcomes the barrier of the human PM. In earlier studies we already describe several domains of function within LIPP including the binding domain (LIPP BD, Fig 1A) and a potential transmembrane domain, suggesting that the very C-Terminus of LIPP is located in the host cytoplasm of the human cell when stable bound to the human PM (Fechtner, Galle and Hegemann, 2016; Galle et al., 2019). Our analysis in this study revealed that in vitro next to full length rLIPP, the N-terminal as well as the C-terminal half do form a stable interaction with 14-3-3ζ when transfected and expressed within the human cell (Fig. 1C). We could further show that, when bound to the surface of the cell the binding domain of rLIPP alone as well as rLIPP lacking the transmembrane domain (LIPP_ΔTM) are not able to recruit 14-3-3ζ to the PM (Fig. 2), suggesting that binding to the host cell via the binding domain as well as penetration of the host PM by the transmembrane domain is essential for 14-3-3ζ recruitment (Galle et al., 2019). Interestingly, when rLIPP was incubated at 4 ℃ with the human cells, a significant reduction in recruitment of the 14-3-3ζ could be observed (Fig. 2B), even though binding of rLIPP was unaffected (Fechtner, Galle and Hegemann, 2016). The interaction of LIPP with the human PM is highly depend on the integrity of lipid rafts (Fechtner, Galle and Hegemann, 2016). Lipid rafts are cholesterol-rich microdomains within the PM that form a signaling platform and are involved in endocytosis (Simons and Ikonen, 1997; Simons and Toomre, 2000). Furthermore, lipid rafts are proposed to promote pore activity by acting as concentration platforms or alternatively in lowering the energy barrier for pore formation (Bischofberger, Gonzalez and van der Goot, 2009; García-Sáez et al., 2011). Since at 4 °C all endocytic and biochemical processes are inhibited we embrace that the interaction between both proteins underlies either an pore formation- or a endocytic related process through the PM (Jiao et al., 2009).

14-3-3 proteins were long thought to only interact with Serine/Threonine (Ser/Thr) phosphorylated proteins via an amphipathic groove. Further studies showed that 14-3-3 proteins do also interact with non-phosphorylated proteins via the amphipathic groove or via the very C-terminus of the interaction partner. Additionally for several analyzed interaction partners none of the above described methods seemed to be correct, leading to the assumptions that there is at least one more, so far undescribed mode of action (Yaffe *et al.*, 1997; Masters, S.C. *et al.*, 1999; Fu, Subramanian and Masters, 2000; Ganguly *et al.*, 2005). Since chlamydial protein can be phosphorylated by three Ser/Thr protein kinases (PknD, Pkn5 and Pkn1) we performed a mass spectrometry assay, searching for *in vivo* phosphorylated proteins 15 min post a *Cpn* infection (data not shown) (Johnson and Mahony, 2007; Johnson *et al.*, 2009; Claywell, Matschke and

Fisher, 2016). The analysis did not show any upregulation for LIPP. Those findings suggest that LIPP does not get phosphorylated by human or chlamydial kinases and that therefore the interaction with 14-3-3 ζ takes place via a different mechanism. How the interaction between LIPP and 14-3-3 ζ takes place in detail remains elusive.

14-3-3 ζ usually forms a dimer to interact with its interaction partners (Messaritou, Grammenoudi and Skoulakis, 2010). Thereby, both monomers are capable of binding one or several interacting proteins. rLIPP was able to redirect r14-3-3 ζ to the GUV membrane showing that no other interaction partner is necessary for the redistribution of 14-3-3 ζ to the membrane (Fig. 3A-C). To our surprise, the LIPP N-terminus did show a change in rGST-14-3-3 ζ redistribution while next to our rLactC2 control, rLIPP_ Δ TM and the rLIPP_BD did not show any r14-3-3 ζ redistribution in the GUV assay (Fig. 3C). In earlier studies the N-terminus did also show PS binding suggesting that not only the transmembrane domain but also specific domains within the N-terminus are relevant for the LIPP membrane perturbation and the 14-3-3 ζ interaction (Galle *et al.*, 2019).

Since LIPP is located on the surface of the *Cpn* EB, acting as an adhesin and PS translocase it was of high interest to analyze the interaction between 14-3-3 ζ and the *Cpn* EB in the early infection. A time dependent kinetic revealed the relevance of the LIPP-14-3-3 ζ interaction in the early infection (0 - 30 min p.i.) (Fig. 4A-C). Unlike 14-3-3 β in *Ctr* IncG and 14-3-3 β + ϵ in *Ctr* InaC which redistribute the 14-3-3 proteins in the late infection cycle (IncG: 36 hpi / InaC: 30 hpi), the interaction between LIPP and 14-3-3 ζ most likely takes place before the EB is internalized. Overexpression studies revealed that a higher availability of 14-3-3 ζ correlates with an enhanced infection capacity and EB internalization rate for *Cpn* showing that the interaction between both proteins is beneficial for the chlamydial infection (Fig. 4D) (Scidmore and Hackstadt, 2001; Kokes *et al.*, 2015).

Taken together, the interaction of LIPP with 14-3-3 ζ is independent of any other protein, takes place in the first 30 min of a *Cpn* infection and overexpression of 14-3-3 ζ leads to an enhancement of *Cpn* EB internalization. 14-3-3 ζ protein levels are limited within the cell. Therefore, 14-3-3 ζ proteins are unable to interact with all possible binding partners at the same time. Because large amounts of 14-3-3 ζ are localized to the PM during the first 30 min of infection, the cytoplasmatic 14-3-3 ζ level is most probably reduced possibly altering other host-14-3-3 ζ interactions. As a first mode this alteration in 14-3-3 ζ associations which alters host signal transduction pathways could contribute positively to the chlamydial pathogenesis. If this is the mode of action an overexpression of 14-3-3 ζ should have influenced the infection capacity negatively. Since 14-3-3 ζ overexpression boosts the *Cpn* infection capacity we postulate that the LIPP-14-3-3 ζ interaction (Fig. 5). This is likely since the scaffold protein 14-3-3 ζ has been described intensively as being directly involved in several signaling complexes and neurodegenerative diseases (Layfield *et al.*, 1996; Ostrerova *et al.*, 1999; Darling, Yingling and Wynshaw-Boris, 2005; Neal and Yu, 2010b; Ashraf *et al.*, 2019). It was shown that 14-3-3 ζ can bind Akt-phosphorylated BAD, FKHRL1 (forkhead transcription factor) and

Cdc25, preventing the redistribution to either the nucleus (FKHRL1 and Cdc25) or the mitochondria (BAD) and therefore directly regulating apoptosis negatively (Zha et al., 1996; Brunet et al., 1999; Yang et al., 1999; Scidmore and Hackstadt, 2001). Studies on Ctr and Cpn infection suggested the blockage of the apoptotic pathway upstream from mitochondria mediated by activated BAK and BAX (Fan et al., 1998; Dean and Powers, 2001; Fischer et al., 2001, 2004; Rajalingam et al., 2001; Bouillet P, 2002; Verbeke et al., 2006). In Ctr the interaction of IngG and 14-3-3ß shows a similar anti-apoptotic effect during infection (Scidmore and Hackstadt, 2001; Verbeke et al., 2006) In Cpn LIPP induces PS externalization without an activation of apoptotic processes. The anti-apoptotic effect could consequently be triggered by the LIPP-14-3-3ζ interaction (Verbeke et al., 2006; Galle et al., 2019) (Fig. 5). Furthermore, it was shown that 14-3-3ζ plays an important role in Raf-1 activation and Erk1/2 phosphorylation similar to the Cpn Pmp21 induced EGFR activation (Fantl et al., 1994; Thorson et al., 1998; Mölleken, Becker and Hegemann, 2013; Yang et al., 2017). 14-3-3 ζ recruits Tiam1 to β 1-integrin complexes which at the end of the signal cascade activates a remodulation of the cytoskeleton (O'Toole et al., 2011; Tong et al., 2016) (Fig. 5). Cpn EBs also actively modulate the actin cytoskeleton to invade the human host cell (Braun et al., 2019). Interestingly 14-3-3ζ also interacts with Rho-GTPases. An integrin induced Cdc42 and Rac1 activation was found to be 14-3-3ζ mediated (Bialkowska et al., 2003). It is therefore highly possible that 14-3-3ζ is recruited to the chlamydial entry site by LIPP to modulate host signaling cascades which are beneficial for the EB internalization process and inhibit those who would otherwise harm the bacteria. Further analysis of the LIPP-14-3-3(interaction and the signaling cascades affected by this interaction will help to prevent not only infection by Cpn, but also infection by other pathogens.



Figure 5: Proposed four step model for LIPP and 14-3-3 ζ interaction.

We propose a four-step model for LIPP binding and 14-3-3 ζ interaction. In close proximity to the PM (1) LIPP binds stable to a yet unknown interaction partner in or associated to the PM (2). LIPP overcomes the barrier of the PM, externalizes PS locally to the outer layer of the membrane (Fechtner, Galle and Hegemann, 2016; Galle *et al.*, 2019) and recruits 14-3-3 ζ from the cytosol to adhesion site where both proteins form a stable complex (3). We suggest two different possible 14-3-3 ζ related signaling events subsequently to LIPP-14-3-3 ζ interaction. 14-3-3 ζ could either stabilize the phosphorylation of MAPK signaling pathways members (Ras, Raf1, MEK, Erk1/2, BAD) to prevent apoptosis and support cell proliferation and/ or act as a regulator of the cytoskeleton modulation via Tiam1 inducing F-actin polymerization close to the PM supporting the EB uptake into the host cell (Clark *et al.*, 1997; Fanger *et al.*, 1998; O'Toole *et al.*, 2011; Toyo-oka *et al.*, 2014; Tong *et al.*, 2016; Pennington *et al.*, 2018b). Both potential signaling responses have to be examined intensively.

Materials/Methods

Chemicals and antibodies

Cell Dissociation Solution Non-enzymatic 1x was obtained from Sigma-Aldrich, the lipids DOPS, Cholesterol and DOPC from Avanti. Gentamicin, Texas Red DHPE and Trypsin was sourced from Invitrogen. Annexin was obtained from Roche. 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), Glutathion Agarose 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP), Nitro Blue Tetrazolium (NBT) and Polyninylalcohol (PVA) were obtained by Sigma. Bovines Serumalbumin (BSA) was sourced from Serva, Complete Protease-Inhibitor-Cocktail by Roche. TurboFect[™], Dylight 488- Ester, Dylight 594 NHS-Ester, NHS-Fluorescein (FITC) were sourced from Thermo Scientific. Latex-Beads Fluoesbrite Carboxy BB (1 µm) were obtained by Polyscience. Macs, anti-GFP-Beads and Macs, anti-Protein G-Beads were purchased from Miltenyi Biotec. Commercially available antibodies were obtained from the following sources: Alexa488-, Alexa594- and Alexa647-conjugated antirabbit and anti-mouse antibodies from Life Technologies; anti-GST (#C2309) from Santa Cruz; anti-PentaHis (#34660) from Qiagen; AP-conjugated anti-mouse (#S372) and anti-rabbit (#S3731) from Promega, AP-conjugated anti-rat (#A8438) from Sigma, anti EGFR (# MA5-13269) from Invitrogen. The anti-Pmp21, anti-GID and anti-CPn0473 antibodies were produced in rabbit by Eurogentec. PBS buffer used in the experiments consists of 137 mM NaCI, 2.7 mM KCI, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄. HBSS buffer (Thermo Scientific, #14175-053) used in this work consists of 5.3 mM Potassium Chloride (KCI), 0.4 mM Potassium Phosphate monobasic (KH2PO4), 4.2 mM sodium bicarbonate (NaHCO3), 137.9 mM sodium chloride (NaCl), 0.3 mM sodium phosphate dibasic (Na2HPO4), 5.6 mM D-Glucose (Dextrose). Chloroform was obtained by Fisher Chemicals in analytic grade and Sucrose from Roth.

DNA manipulations and protein expression

Escherichia coli XL₁ blue (Stratagene) was used for plasmid amplification and the BL21 strain (Invitrogen) for protein expression. Plasmids were constructed by *in vivo* homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae* strain Cen/PK2 and then transformed into *Escherichia coli* XL₁ blue. The binding domain of OmcB (aa 40-100) from *C. pneumoniae* was expressed with a C-terminal His-tag and fused N-terminally to the LIPP N-terminus. GST, Pmp21_PD, LIPP and the deletion variants were expressed as C-terminally His-tagged proteins. The human 14-3-3 ζ was C-terminally fused with mCherry. The CD58 GPI anchor plasmid (kindly provided by AG Römer, University of Freiburg im Breisgau, Germany) was N-terminally fused with mCherry. The PS binding domain of lactadherin (expression clone kindly provided by Dr. S. Grinstein, University of Toronto, Toronto, Canada (Addgene Plasmid # 15247)) was C-terminally tagged with GST. GST- and His-tagged proteins were purified using the protocols supplied by Sigma Aldrich and Qiagen respectively and analyzed on SDS Gels/ Western blots.

Cultivation of human epithelial cells

HEp-2 cells (epithelial larynx carcinoma, ATCC No.: CCL-23) were cultivated in DMEM GlutaMax with FCS, non-essential amino acids, vitamins, amphotericin B (2.5 μ g/ml) and gentamicin (50 μ g/ml) at 37 °C in an atmosphere containing 6 % CO₂.

Propagation of chlamydial strains

The HEp-2 cell line was used for propagation of chlamydial strains and infection experiments. The cells were as described above. *C. pneumoniae* GiD was propagated in HEp-2 cells in the presence of 1.2 μg/ml cycloheximide, EBs were purified using 30 % gastrografin (Schering).

Immunofluorescence microscopy

Microscopy was performed with a Nikon Eclipse Ti-E C2 confocal microscope (DS-Qi1MC Camera). Confocal images were assembled using NIS Element software (Nikon). Infected cells were fixed either with 96 % methanol for 5 min at room temperature or with 3 % paraformaldehyde for 10 min at 4 °C. Where necessary, cells were permeabilized with 0,1% Tween, 0.3 % Triton prior to antibody staining. Unspecific binding sites were blocked with 5 % BSA and antibodies were dissolved in permeabilization solution with 5% BSA.

Transfection of HEp-2 cells

HEp-2 cells were cultivated in antibiotic free medium in 24-well plates with glass slides for 24 h pre transfection to a confluency of 50-70% at 37 °C and 6% CO₂. 1 h before transfection the medium was replaced by fresh antibiotica free medium. 0,5 μ g vector DNA (per transfected construct) was vortexed for 10 sec in 100 μ l serum- antibiotic free medium, 2 μ l of TurbofectTM were added, vortexed for 1 min, spinned down for 10 sec at 5000 rpm and incubated for 20 min at RT. The transfection mix was then added dropwise to the cells, which were then incubated for 16 h at 37 °C and 6 % CO₂.

Fluorescent labeling of rProtein

NHS Fluorescein (Dylight[™] 488/594 NHS Ester) (10 mg/ ml in DMSO) was used in 20-fold excess compared to rProtein and incubated at 0 °C for 1 h using the following equation:

$$\frac{mg \, rprotein}{MW \, rprotein \, [Da]} * x * 47,340 = \mu l \, NHS \, Fluorescein$$

MW = molecular weight, x = excess NH -Fluorescein

After deactivation of unbound NHS Fluorescein by addition of 1M Tris/HCL pH8 in a final concentration of 50 mM, the mix was incubated additional 2 h at 0 °C. The labeled rProtein was dialyzed in PBS overnight at 4 °C. Successful labeling was controlled via UV after an SDS PAGE the next day.

Adhesion assay with rProtein

Adhesion assays were carried out with fully confluent layers of 10^6 HEp-2 cells grown at $37 \,^\circ$ C and $6 \,^\circ$ CO₂. Binding of soluble rProteins was assessed by overlaying confluent cells with 250 µl of culture medium containing the soluble rProtein of interest (100 µg/ml) at $37 \,^\circ$ C for 60 min. After extensive washing, cells were fixed and observed under the microscope.

Pulldown assay with rProtein (in vitro)

Pulldown assays were carried out with 200 µl agarose (Ni-NTA-/ gluthation-) and 150 µg per rProtein. The agarose was washed extensively, then incubated with the first purified rProtein (His tagged, when Ni-NTA-agarose was used/ GST tagged, when gluthation-agarose was used) for 2 h at 4°C to ensure a stable binding to the agarose. Next the second rProtein was added for 2 h at 4°C. The mix is transferred in spin columns (ThermoScientific) and centrifuged for 1 min at 2000 rpm (FT), then washed six times with 100 µl

PBS (W1-6) and eluted with 100 µl either 500 mM imidazole (Ni-NTA Agarose) or 50 mM TRIS/HCL pH 8 +10 mM reduced glutathione (glutathione-agarose) at 3000 rpm for 2 min after a 10 min incubation on ice (E). The samples were then analyzed in a Western Blot.

Pulldown assay on HEp-2 cells (in vivo)

Pulldown assays were carried out with fully confluent layers of HEp-2 cells in 75 cm² flasks grown at 37 °C and 6 % CO₂. The cells were washed extensively with HBSS and incubated with 1 mg of rProtein in 4 ml PBS + 8 ml DMEM for 1 h at 37 °C/4 °C. After washing, the cells were detached by scraping them with a cell scraper, washed again and centrifuged at 500 rpm for 1 min. The pellet was treated with 500 µl phopsholysis buffer + 1:25 protease inhibitor cocktail, sonificated 5 times for 2 seconds and incubated for 30 min of ice. All cell fragments were pelleted for 10 min at 13000 rpm and 4 °C and the supernatant was incubated with 200µl Ni-NTA agarose for 2 h at 4 °C. The next steps were performed as described in "Pulldown assay with rProtein (*in vitro*)".

Pulldown assay on transfected HEp-2 cells

The assay performed as described in "Pulldown assay on HEp-2 cells". Prior the cells were transfected as described in "Transfection of HEp-2 cells". Instead of Ni-NTA- agarose beads GFP-beads were used, the elution was performed by incubation the sample for 10 min at 95 ℃.

Pulldown assay with rProtein on HEp-2 cells

After the adhesion of the rProtein a pulldown assay on HEp-2 is performed as described.

Coupling of rProtein to fluorescent latex beads

1 x 10⁹ latex beads were dissolved in 1 ml PBS (Fluorescent Microspheres, Polysciences Inc.) and centrifuged at 10,000 rpm for 5 min at RT, then washed the 2 times with 1 ml PBS and centrifuge at 13,000 rpm for 10 min at RT. The beads were washed 2 times with coupling buffer (0,5 M NaCl, 0,2 M NaHCO3 in ddH₂O pH 8,6) and centrifuged again at 13,000 rpm and RT for 10 min. After the latex beads have been resuspended in 100 μ l coupling buffer, 100 μ g/ml rProtein in a final volume of 200 μ l was given to the latex beads and incubated at 37 °C for 1 h shaking. 500 μ l coupling buffer were added and the mix was treated for 3 min in an ultrasonic water bath. 500 μ l coupling buffer (+ 40 mg/ml BSA) were added and incubated at 37 °C for 1 h shaking. The latex beads were centrifuged at 13,000 rpm and RT for 10 min and washed with 1 ml PBS (+ 1 mg/ml BSA). Pelleted latex beads were resuspended in 500 μ l PBS (+ 0.2 mg/ml BSA) and stored at 4 °C and checked via Western Blot.

Adhesion of coated latex beads on HEp-2 cells

Adhesion assays with coated latex beads were carried out with 70 % confluent layers of HEp-2 cells grown at 37 °C and 6 % CO₂. Binding of coated latex beads was assessed by overlaying confluent cells with 50 μ l of fluorescent latex beads in 300 μ l culture medium 37 °C for 60 min after centrifugation at 700 rpm for 5 min at RT. After extensive washing, cells were fixed and observed under the microscope.

Cpn infection for 2h

50%-70% confluent grown HEp-2 cells in 24 well plates were centrifuged for 10 min with gradient purified *Cpn* (MOI= 5) at 2920 rpm and 30 °C. The cells were then incubated for 2 h at 37 °C. After incubation cells were washed three times with HBSS and fixed with 3% PFA for 10 min. The cells were blocked with 5%

BSA + HBSS for 30 min at RT prior to antibody staining with anti-GID (1:40) and (anti-EGFR 1:400) in 5% BSA + HBSS. After 1h incubation at RT cells were washed three times with HBSS and then stained with secondary antibody for 1 h at RT in 5%BSA + HBSS. The cells were again washed three times with HBSS and then stained with DAPI for 10 min at RT.

Cpn infection for 48h

50%-70% confluent grown HEp-2 cells in 24 well plates were incubated with gradient purified *Cpn* (MOI= 0,5) for 2h at 37 °C. The cell medium was changed to 1 ml fresh DMEM + 12 μ l Cylcohexamid (1,2 μ g/ml). The cells were then incubated for 48h at 37 °C and 6% CO₂. After incubation cells were washed three times with HBSS and fixed with 3% PFA for 10 min. The cells were blocked with 5% BSA + HBSS for 30 min at RT prior to antibody staining with Pathfinder 1:6 in HBSS. After 30 min incubation at 30 °C cells were washed three times with HBSS and then stained with DAPI for 10 min at RT.

Coprecipitation of human proteins after a Cpn infection (protein G pulldown)

Confluently grown HEp-2 cells in a 25 cm² cell culture flask were infected with gradient purified *Cpn* for 15 min. Subsequently HEp-2 cells were washed carefully twice with HBSS. Cells were resuspended in 5 ml HBSS after being scraped off by a cell scraper. The cell suspension was centrifuged at 500 rpm for 15 min at RT, the pellet resuspended in 1 ml phospholysis buffer (+ 1:25 protease inhibitor) and incubated for 30 min at 0 °C. Protein G beads were coated with the "capture" antibody (antibody is bound to the magnetic protein G-Beads and serves as carrier material). The protein G beads were coated with an antibody against a chlamydial protein and an antibody against the human interaction partner. The cell suspension was centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4 °C and the supernatant was transferred to a new reaction vessel. The suspension was rotated ü/N at 4 °C with the antibody coated protein G-Beads. The coprecipitation was performed the following morning.

$r14-3-3\zeta$ filled GUV binding assay

Giant unilamellar vesicles (GUVs) were prepared via the swelling method modified after (Weinberger *et al.*, 2013). All steps were performed under the fume hood. Microscopy slides were cleaned twice with 96 % ethanol and then twice with chloroform. 5 % (w/w) PVA solution was prepared by stirring PVA in water while heating at 100 °C until solution is clear. After cooling down 100 μ I 5 % PVA solution were mixed with 2 μ g DylightTM 594 NHS labeled r14-3-3 ζ and then evenly distributed on the glass slide by dropping the solution in the center of the chamber. After the PVA was dried, 20 μ I of lipid mixture (in mol%) (DOPC/ Cholesterol/DOPS: 55.0/ 25.0/ 20.0 in chloroform) were spread on the PVA film with a HamiltonTM syringe. After the lipids have been dried under the fume hood, a chamber was built around the PVA/lipid film with VitrexTM and then filled with 500 μ I sucrose-solution (10% w/w in water). The chambers were incubated for 2 h at RT, then the 14-3-3 ζ GUVs were harvested, washed 7 times with 1,5 mI 10 % sucrose-solution, spinned down at 2000 rpm for 60 sec and stored at 4 °C. GUVs were added at room temperature to 2 μ g FITC-labeled rProtein and immediately observed on a confocal fluorescence microscope (Nikon Eclipse Ti-E with A1R confocal laser scanner, 60x oil objective, NA=1.49). Image acquisition was performed with NIS-Elements (Nikon).

Acknowledgements

We thank S. Grinstein (University of Toronto) for the GST-Lactadherin-C2 expression vector. We are grateful to S. Hänsch (CRC1208, University of Düsseldorf) for providing us with the Macro Scripts for microscopic analysis of the GUVs (ImageJ software). PTH was funded by the CRC1208. DKS was a scholarship holder funded by the Jürgen Manchot Foundation. This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, CRC 1208, project A05 to JHH.



Supplementary Figure 1: LIPP time-dependently redirects 14-3-3 from lumen to the membrane in GUVs

Redistribution of r14-3-3ζ in rLIPP-treated PS-GUVs. PS-GUVs filled with Dylight[™] 594 NHS labeled rGST-14-3-3ζ were created via the "Polyvenylalcohol (PVA) assisted swelling method" (Weinberger *et al.*, 2013). Therefore, 100µl 5%-PVA solution was mixed with

2µg Dylight[™] 594 NHS labeled rGST-14-3-3ζ prior GUV-formation. Filled PS-GUVs were incubated with FITC labeled full-length rLIPP for 1-30 min and then analyzed by confocal microscopy.

References

AbdelRahman, Y. M. and Belland, R. J. (2005) 'The chlamydial developmental cycle: Figure 1', *FEMS Microbiology Reviews*, 29(5), pp. 949–959. doi: 10.1016/j.femsre.2005.03.002.

Aitken, A. *et al.* (1995) '14-3-3 alpha and delta are the phosphorylated forms of raf-activating 14-3-3 beta and zeta. In vivo stoichiometric phosphorylation in brain at a Ser-Pro-Glu-Lys MOTIF.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 270(11), pp. 5706–9. doi: 10.1074/jbc.270.11.5706.

Aitken, A. (2006) '14-3-3 proteins: A historic overview', *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press, 16(3), pp. 162–172. doi: 10.1016/J.SEMCANCER.2006.03.005.

Ashraf, G. M. *et al.* (2019) 'The Possibility of an Infectious Etiology of Alzheimer Disease', *Molecular Neurobiology*, 56(6), pp. 4479–4491. doi: 10.1007/s12035-018-1388-y.

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*. Wiley-Blackwell, 3(4), pp. 544–56. doi: 10.1002/mbo3.186.

Belland, R. J. *et al.* (2004) 'Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis.', *Cellular microbiology*, 6(2), pp. 117–27. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14706098 (Accessed: 6 August 2019).

Belland, R., Ojcius, D. M. and Byrne, G. I. (2004) 'Focus: Chlamydia', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 2(7), pp. 530–530. doi: 10.1038/nrmicro931.

Benzinger, A. *et al.* (2005) 'Targeted proteomic analysis of 14-3-3 sigma, a p53 effector commonly silenced in cancer.', *Molecular & cellular proteomics : MCP*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 4(6), pp. 785–95. doi: 10.1074/mcp.M500021-MCP200.

Bialkowska, K. *et al.* (2003) '14-3-3 zeta mediates integrin-induced activation of Cdc42 and Rac. Platelet glycoprotein Ib-IX regulates integrin-induced signaling by sequestering 14-3-3 zeta.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 278(35), pp. 33342–50. doi: 10.1074/jbc.M301217200.

Bischofberger, M., Gonzalez, M. R. and van der Goot, F. G. (2009) 'Membrane injury by pore-forming proteins', *Current Opinion in Cell Biology*, 21(4), pp. 589–595. doi: 10.1016/j.ceb.2009.04.003.

Blasi, F. (1996) 'Clinical features of Chlamydia pneumoniae acute respiratory infection.', *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 1 Suppl 1, pp. S14–S18. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11866789 (Accessed: 6 August 2019).

Blasi, F., Tarsia, P. and Aliberti, S. (2009) 'Chlamydophila pneumoniae', *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier, 15(1), pp. 29–35. doi: 10.1111/J.1469-0691.2008.02130.X.

Bouillet P, S. A. (2002) 'BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. - PubMed - NCBI', *jCell Sci*, 115 (Pt 8), pp. 1567–74. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11950875 (Accessed: 22 August 2019).

Braun, C. *et al.* (2019) 'CPn0572, the C. pneumoniae ortholog of TarP, reorganizes the actin cytoskeleton via a newly identified F-actin binding domain and recruitment of vinculin.', *PloS one*. Public Library of Science, 14(1), p. e0210403. doi: 10.1371/journal.pone.0210403.

Brunet, A. *et al.* (1999) 'Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor', *Cell*. Cell Press, 96(6), pp. 857–868. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80595-4.

Celis, J. E. *et al.* (1990) 'Comprehensive two-dimensional gel protein databases offer a global approach to the analysis of human cells: The transformed amnion cells (AMA) master database and its link to genome DNA sequence data', *Electrophoresis*, 11(12), pp. 989–1071. doi: 10.1002/elps.1150111202.

Chen, C. *et al.* (2006) 'The Hypothetical Protein CT813 Is Localized in the Chlamydia trachomatis Inclusion Membrane and Is Immunogenic in Women Urogenitally Infected with C. trachomatis', *Infection and Immunity*, 74(8), pp. 4826–4840. doi: 10.1128/IAI.00081-06.

Clark, G. J. *et al.* (1997) '14-3-3 ζ Negatively Regulates Raf-1 Activity by Interactions with the Raf-1 Cysteine-rich Domain', *Journal of Biological Chemistry*, 272(34), pp. 20990–20993. doi: 10.1074/jbc.272.34.20990.

Claywell, J. E., Matschke, L. M. and Fisher, D. J. (2016) 'The Impact of Protein Phosphorylation on Chlamydial Physiology.', *Frontiers in cellular and infection microbiology*. Frontiers Media SA, 6, p. 197. doi: 10.3389/fcimb.2016.00197.

Dahlén, G. H. *et al.* (1995) 'Lp(a) lipoprotein, IgG, IgA and IgM antibodies to Chlamydia pneumoniae and HLA class II genotype in early coronary artery disease', *Atherosclerosis*, 114(2), pp. 165–174. doi: 10.1016/0021-9150(94)05480-7.

Darling, D. L., Yingling, J. and Wynshaw-Boris, A. (2005) 'Role of 14–3–3 Proteins in Eukaryotic Signaling and Development', in *Current topics in developmental biology*, pp. 281–315. doi: 10.1016/S0070-2153(05)68010-6.

Dean, D. and Powers, V. C. (2001) 'Persistent Chlamydia trachomatis Infections Resist Apoptotic Stimuli', *Infection and Immunity*, 69(4), pp. 2442–2447. doi: 10.1128/IAI.69.4.2442-2447.2001.

Fadel, S. and Eley, A. (2007) 'Chlamydia trachomatis OmcB protein is a surface-exposed glycosaminoglycan-dependent adhesin', *Journal of Medical Microbiology*. Microbiology Society, 56(1), pp. 15–22. doi: 10.1099/jmm.0.46801-0.

Fan, T. *et al.* (1998) 'Inhibition of Apoptosis in Chlamydia-infected Cells: Blockade of Mitochondrial Cytochrome c Release and Caspase Activation', *The Journal of Experimental Medicine*, 187(4), pp. 487–496. doi: 10.1084/jem.187.4.487.

Fanger, G. R. *et al.* (1998) '14-3-3 proteins interact with specific MEK kinases.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 273(6), pp. 3476–83. doi: 10.1074/jbc.273.6.3476.

Fantl, W. J. *et al.* (1994) 'Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins', *Nature*. Nature Publishing Group, 371(6498), pp. 612–614. doi: 10.1038/371612a0.

Fechtner, T., Galle, J. N. and Hegemann, J. H. (2016) 'The novel chlamydial adhesin CPn0473 mediates the lipid raft-dependent uptake of Chlamydia pneumoniae.', *Cellular microbiology*, 18(8), pp. 1094–105. doi: 10.1111/cmi.12569.

Fischer, S. F. *et al.* (2001) 'Characterization of Antiapoptotic Activities of Chlamydia pneumoniae in Human Cells', *Infection and Immunity*, 69(11), pp. 7121–7129. doi: 10.1128/IAI.69.11.7121-7129.2001.

Fischer, S. F. *et al.* (2004) 'Protection against CD95-induced apoptosis by chlamydial infection at a mitochondrial step.', *Infection and immunity*, 72(2), pp. 1107–15. doi: 10.1128/iai.72.2.1107-1115.2004.

Freed, E., McCormick, F. and Ruggieri, R. (1994) 'Proteins of the 14-3-3 family associate with Raf and contribute to its activation.', *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 59, pp. 187–93. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7587069 (Accessed: 8 August 2019).

Fu, H., Coburn, J. and Collier, R. J. (1993) 'The eukaryotic host factor that activates exoenzyme S of Pseudomonas aeruginosa is a member of the 14-3-3 protein family.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 90(6), pp. 2320–4. doi: 10.1073/pnas.90.6.2320.

Fu, H., Subramanian, R. R. and Masters, S. C. (2000) '14-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA , 40(1), pp. 617–647. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.40.1.617.

Galle, J. N. *et al.* (2019) 'A Chlamydia pneumoniae adhesin induces phosphatidylserine exposure on host cells', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 10(1), p. 4644. doi: 10.1038/s41467-019-12419-8.

Ganguly, S. *et al.* (2005) 'Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N-acetyltransferase mediated by phosphoserine-205', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(4), pp. 1222–1227. doi: 10.1073/pnas.0406871102.

Garcia-Guzman, M. *et al.* (1999) 'Cell adhesion regulates the interaction between the docking protein p130(Cas) and the 14-3-3 proteins.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 274(9), pp. 5762–8. doi: 10.1074/jbc.274.9.5762.

García-Sáez, A. J. *et al.* (2011) 'Oligomerization and pore formation by equinatoxin II inhibit endocytosis and lead to plasma membrane reorganization.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 286(43), pp. 37768–77. doi: 10.1074/jbc.M111.281592.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000) 'The Hallmarks of Cancer', *Cell*. Cell Press, 100(1), pp. 57–70. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.

Jiao, C.-Y. *et al.* (2009) 'Translocation and Endocytosis for Cell-penetrating Peptide Internalization', *Journal of Biological Chemistry*, 284(49), pp. 33957–33965. doi: 10.1074/jbc.M109.056309.

Jin, J. *et al.* (2004) 'Proteomic, Functional, and Domain-Based Analysis of In Vivo 14-3-3 Binding Proteins Involved in Cytoskeletal Regulation and Cellular Organization', *Current Biology*. Cell Press, 14(16), pp. 1436–1450. doi: 10.1016/J.CUB.2004.07.051.

Johnson, D. L. *et al.* (2009) 'A novel inhibitor of Chlamydophila pneumoniae protein kinase D (PknD) inhibits phosphorylation of CdsD and suppresses bacterial replication.', *BMC microbiology*. BioMed Central, 9, p. 218. doi: 10.1186/1471-2180-9-218.

Johnson, D. L. and Mahony, J. B. (2007) 'Chlamydophila pneumoniae PknD exhibits dual amino acid specificity and phosphorylates Cpn0712, a putative type III secretion YscD homolog.', *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology Journals, 189(21), pp. 7549–55. doi: 10.1128/JB.00893-07.

Kokes, M. *et al.* (2015) 'Integrating chemical mutagenesis and whole-genome sequencing as a platform for forward and reverse genetic analysis of Chlamydia.', *Cell host & microbe*. NIH Public Access, 17(5), pp. 716–25. doi: 10.1016/j.chom.2015.03.014.

Layfield, R. *et al.* (1996) 'Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease brains contain 14-3-3 proteins', *Neuroscience Letters*. Elsevier, 209(1), pp. 57–60. doi: 10.1016/0304-3940(96)12598-2.

Leffers, H. *et al.* (1993) 'Molecular Cloning and Expression of the Transformation Sensitive Epithelial Marker Stratifin: A Member of a Protein Family that has been Involved in the Protein Kinase C Signalling Pathway', *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 231(4), pp. 982–998. doi: 10.1006/JMBI.1993.1346.

Luczak, S. E. T. *et al.* (2016) 'The Chlamydia Pneumoniae Adhesin Pmp21 forms oligomers with adhesive properties', *Journal of Biological Chemistry*, 291(43), pp. 22806–22818. doi: 10.1074/jbc.M116.728915.

Masters, S.C., ‡ *et al.* (1999) 'Interaction of 14-3-3 with a Nonphosphorylated Protein Ligand, Exoenzyme S of Pseudomonas aeruginosa†'. American Chemical Society. doi: 10.1021/BI982492M.

Meek, S. E. M., Lane, W. S. and Piwnica-Worms, H. (2004) 'Comprehensive proteomic analysis of interphase and mitotic 14-3-3-binding proteins.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 279(31), pp. 32046–54. doi: 10.1074/jbc.M403044200.

Messaritou, G., Grammenoudi, S. and Skoulakis, E. M. C. (2010) 'Dimerization is essential for 14-3-3zeta stability and function in vivo.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 285(3), pp. 1692–700. doi: 10.1074/jbc.M109.045989.

Moelleken, K. and Hegemann, J. H. (2008) 'The Chlamydia outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding.', *Molecular microbiology*. Wiley-Blackwell, 67(2), pp. 403–19. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.06050.x.

Mölleken, K., Becker, E. and Hegemann, J. H. (2013) 'The Chlamydia pneumoniae Invasin Protein Pmp21 Recruits the EGF Receptor for Host Cell Entry', *PLoS Pathogens*. Edited by G. T. Van Nhieu, 9(4), p. e1003325. doi: 10.1371/journal.ppat.1003325.

Mölleken, K., Schmidt, E. and Hegemann, J. H. (2010) 'Members of the Pmp protein family of Chlamydia pneumoniae mediate adhesion to human cells via short repetitive peptide motifs.', *Molecular microbiology*. Wiley-Blackwell, 78(4), pp. 1004–17. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07386.x.

Neal, C. L. and Yu, D. (2010) '14-3-3ζ as a prognostic marker and therapeutic target for cancer', *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. Taylor & Francis, 14(12), pp. 1343–1354. doi: 10.1517/14728222.2010.531011.

O'Toole, T. E. *et al.* (2011) 'Tiam1 is recruited to β1-integrin complexes by 14-3-3ζ where it mediates integrin-induced Rac1 activation and motility', *Journal of Cellular Physiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 226(11), pp. 2965–2978. doi: 10.1002/jcp.22644.

Ostrerova, N. *et al.* (1999) 'alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(14), pp. 5782–91. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10407019 (Accessed: 8 August 2019).

Pawson, T. and Scott, J. D. (1997) 'Signaling Through Scaffold, Anchoring, and Adaptor Proteins', *Science*, 278(5346), pp. 2075–2080. doi: 10.1126/science.278.5346.2075.

Pennington, K. *et al.* (2018) 'The dynamic and stress-adaptive signaling hub of 14-3-3: emerging mechanisms of regulation and context-dependent protein–protein interactions', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 37(42), pp. 5587–5604. doi: 10.1038/s41388-018-0348-3.

Pozuelo Rubio, M. *et al.* (2004) '14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking.', *The Biochemical journal.* Portland Press Ltd, 379(Pt 2), pp. 395–408. doi: 10.1042/BJ20031797.

Rajalingam, K. *et al.* (2001) 'Epithelial Cells Infected with Chlamydophila pneumoniae (Chlamydia pneumoniae) Are Resistant to Apoptosis', *Infection and Immunity*, 69(12), pp. 7880–7888. doi: 10.1128/IAI.69.12.7880-7888.2001.

Robert K. Andrews, * *et al.* (1998) 'Binding of Purified 14-3-3 ζ Signaling Protein to Discrete Amino Acid Sequences within the Cytoplasmic Domain of the Platelet Membrane Glycoprotein Ib-IX-V Complex†'. American Chemical Society . doi: 10.1021/BI970893G.

Schramm, N., Bagnell, C. R. and Wyrick, P. B. (1996) 'Vesicles containing Chlamydia trachomatis serovar L2 remain above pH 6 within HEC-1B cells.', *Infection and immunity*, 64(4), pp. 1208–14. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8606080 (Accessed: 6 August 2019).

Scidmore, M. A. and Hackstadt, T. (2001) 'Mammalian 14-3-3beta associates with the Chlamydia trachomatis inclusion membrane via its interaction with IncG', *Molecular Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 39(6), pp. 1638–1650. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02355.x.

Simons, K. and Ikonen, E. (1997) 'Functional rafts in cell membranes', *Nature*. Nature Publishing Group, 387(6633), pp. 569–572. doi: 10.1038/42408.

Simons, K. and Toomre, D. (2000) 'Lipid rafts and signal transduction', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 1(1), pp. 31–39. doi: 10.1038/35036052.

Sriram, S. *et al.* (1999) 'Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis.', *Annals of neurology*, 46(1), pp. 6–14. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10401775 (Accessed: 6 August 2019).

Stephens, R. (1999) 'Chlamydia: intracellular biology, pathogenesis, and immunity'. Available at: https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Chlamydia:+Intracellular+Biology,+Pathogenesis,+and+I mmunity&author=J.+Schachter&publication_year=1999& (Accessed: 6 August 2019).

Stephens, R. S. *et al.* (2001) 'Heparin-binding outer membrane protein of chlamydiae', *Molecular Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 40(3), pp. 691–699. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02418.x.

Takahashi, Y. (2003) 'The 14-3-3 Proteins: Gene, Gene Expression, and Function', *Neurochemical Research*. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 28(8), pp. 1265–1273. doi: 10.1023/A:1024296932670.

Tang, S. J. *et al.* (1998) 'Association of the TLX-2 homeodomain and 14-3-3eta signaling proteins.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 273(39), pp. 25356–63. doi: 10.1074/jbc.273.39.25356.

Thorson, J. A. *et al.* (1998) '14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1 phosphorylation and kinase activity.', *Molecular and cellular biology*, 18(9), pp. 5229–38. doi: 10.1128/mcb.18.9.5229.

Tong, J. *et al.* (2016) 'Phosphorylation and Activation of RhoA by ERK in Response to Epidermal Growth Factor Stimulation.', *PloS one*. Public Library of Science, 11(1), p. e0147103. doi: 10.1371/journal.pone.0147103.

Toyo-oka, K. *et al.* (2014) '14-3-3 and Regulate Neurogenesis and Differentiation of Neuronal Progenitor Cells in the Developing Brain', *Journal of Neuroscience*, 34(36), pp. 12168–12181. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2513-13.2014.

Tzivion, G. *et al.* (2006) '14-3-3 proteins as potential oncogenes', *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press, 16(3), pp. 203–213. doi: 10.1016/J.SEMCANCER.2006.03.004.

Verbeke, P. *et al.* (2006) 'Recruitment of BAD by the Chlamydia trachomatis Vacuole Correlates with Host-Cell Survival', *PLoS Pathogens*, 2(5), p. e45. doi: 10.1371/journal.ppat.0020045.

Weinberger, A. *et al.* (2013) 'Gel-Assisted Formation of Giant Unilamellar Vesicles', *Biophysical Journal*, 105(1), pp. 154–164. doi: 10.1016/j.bpj.2013.05.024.

Woodcock, J. M. *et al.* (2003) 'The dimeric versus monomeric status of 14-3-3ζ is controlled by phosphorylation of Ser58 at the dimer interface', *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), pp. 36323–36327. doi: 10.1074/jbc.M304689200.

Yaffe, M. B. *et al.* (1997) 'The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity.', *Cell*, 91(7), pp. 961–71. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80487-0.

Yang, J. *et al.* (1999) 'Maintenance of G2 arrest in the Xenopus oocyte: a role for 14-3-3-mediated inhibition of Cdc25 nuclear import', *The EMBO Journal*, 18(8), pp. 2174–2183. doi: 10.1093/emboj/18.8.2174.

Yang, J. *et al.* (2017) '14-3-3η loss leads to neonatal lethality by microRNA-126 downregulation-mediated developmental defects in lung vasculature', *Cell and Bioscience*. BioMed Central, 7(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s13578-017-0186-y.

Zha, J. *et al.* (1996) 'Serine Phosphorylation of Death Agonist BAD in Response to Survival Factor Results in Binding to 14-3-3 Not BCL-XL', *Cell.* Cell Press, 87(4), pp. 619–628. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81382-3.

6 Teil II: Manuskript II

The *Chlamydia pneumoniae* adhesin LIPP utilizes amphipathic helices for phosphatidylserine externalization and *Chlamydia* uptake

Philipp T. Hanisch and Johannes H. Hegemann

Erstautor

Beteiligungen:

Philipp Hanisch 90 %, Prof. Dr. Johannes H. Hegemann: 10 %

Philipp T. Hanisch (PTH) plante alle Experimente, die in diesem Manuskript dargestellt sind. PTH schrieb das gesamte Manuskript, wertete die Daten aus und stellte alle Figuren und Figurlegenden zusammen. PTH erbrachte die experimentellen Daten zu allen Figuren.

Prof. Johannes H. Hegemann (JHH) übernahm als korrespondierender Autor Korrekturarbeiten am Manuskript und den Figuren. JHH nahm während der Entstehungsphase dieses Manuskripts als Betreuer der Doktorarbeit Einfluss auf die Experimentwahl und die Diskussion über die gesamte Laufzeit des Projekts.

Hiermit bestätige ich, dass diese Angaben korrekt sind. Düsseldorf, den 15.11.2019

Philipp T. Hanisch

6.1 Zusammenfassung

Im vorangegangenen Manuskript wurde gezeigt, dass chlamydiales LIPP mit humanem 14-3-3ζ interagiert und eine Erhöhung des zellulären 14-3-3ζ Levels einen positiven Effekt auf eine *Cpn* Infektion hat. Um mit dem zytosolischen Adapterprotein zu interagieren und PS zu externalisieren, muss LIPP mit der humanen Plasmamembran interagieren. Die potenzielle, C-terminale LIPP Transmembrandomäne (TM) konnte bereits als relevant für die 14-3-3ζ Interaktion beschrieben werden. Interessanterweise interagierte der N-terminale, TM defiziente Teil von LIPP ebenfalls mit 14-3-3ζ. Eine bioinformatische Analyse von LIPP zeigte, dass innerhalb der ersten 260 Aminosäuren drei amphipathische Helices (APHs) lokalisiert sind. APHs liegen in aquatischen Lösungen meist ungeordnet vor. Bei Membrankontakt bilden diese alpha-helikale Strukturen aus, welche dann mit der Membran interagieren. In diesem Manuskript konnte gezeigt werden, dass die APHs für die Membranbindung, Phosphatidylserin (PS) Externalisierung, den LIPP mediierten Infektions-erhöhenden Effekt und die 14-3-3ζ Rekrutierung unerlässlich sind.

Bindestudien an GUVs und Humanzellen zeigten, dass die ersten beiden APHs essenziell für die PS Bindung und -Externalisierung sind, während die dritte APH einen regulativen Effekt vermittelt und die Membranpenetration fördert. Eine Deletion der ersten APH führte zudem zum Verlust des Infektionserhöhenden Effekts und der 14-3-3ζ-Interaktion, womit sie unerlässlich für die erhöhte Aufnahme der *Cpn* EBs ist. Die zuvor identifizierte Infektions-erhöhende Domäne (IED, Aminosäure 1-150) konnte so auf die APH1 (Aminosäure 84-100) eingegrenzt werden.

Dies ist das erste Beispiel eines bakteriellen Adhäsins, welches mittels dreier APHs und einer TM selbstständig die humane Plasmamembran überwindet, um PS zu externalisieren und mit einem zytosolischen Adapterprotein zu interagieren.

The *Chlamydia pneumoniae* adhesin LIPP utilizes three amphipathic helices to externalize phosphatidylserine and mediate the uptake of the chlamydial EB

Philipp T. Hanisch and Johannes H. Hegemann

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

Abstract

The Gram-negative, obligate intracellular bacterium *Chlamydia pneumoniae* (*Cpn*) causes acute and chronic diseases of the upper and lower respiratory tract representing a serious threat to public health worldwide. One of the adhesins used by *Cpn* to gain excess to the host cell is LIPP which was identified to mediate adhesion and internalization via an unique mechanism in which LIPP acts as a bacterial phosphatidylserine (PS) translocase capable of PS externalization. The human 14-3-3 ζ scaffold protein was identified as interaction partner of LIPP.

Here, we report that three N-terminally located predicted amphipathic helices are essential for LIPP membrane binding, PS externalization, enhancement of EB internalization and 14-3-3 ζ redistribution. Via binding studies on giant unilamellar vesicles (GUV) and human cells we show that LIPP utilizes the first two amphipathic helices to mediate the PS binding and externalization, while the third amphipathic helix is involved in the LIPP mediated pore forming process previously described and exhibits a regulatory function in the process of PS binding and externalization. Moreover, deletion of the first amphipathic helix additionally leads to a loss of infection boost capacity and interaction with the human, cytosolic interaction partner 14-3-3 ζ , showing that it is crucial for the enhancement of EB internalization.

This is the first example of a bacterial adhesin self-governing piercing the plasma membrane via amphipathic helices to externalize PS and interact with cytosolic 14-3-3 ζ to support *Cpn* internalization.

Introduction

All *Chlamydia* share a unique biphasic lifecycle in which they alternate between two distinct developmental forms, the infectious but metabolic inactive elementary body (EB) and the non-infectious but metabolic active reticulate body (RB). The initial contact of the obligate intracellular *Chlamydia* to the host cell is mediated by several adhesins, coating the EB. After internalization into a host plasma membrane inclusion the EB transforms to the RB which starts the chlamydial replication cycle (Schramm, Bagnell and Wyrick, 1996; Belland, Ojcius and Byrne, 2004; AbdelRahman and Belland, 2005).

Within the human pathogens, Chlamydia pneumoniae (Cpn) is one of the most prevalent, 70- 80 % of the adult human population are antibody positive to Cpn. Furthermore, Cpn is implicated in atherosclerosis, cardiovascular illnesses and diseases of the central nervous system (Dahlén *et al.*, 1995; Blasi, 1996; Sriram *et al.*, 1999; Belland *et al.*, 2004; Blasi, Tarsia and Aliberti, 2009). The Cpn adhesion and internalization is a multi-step process. After the first attachment of the EB to the human cell via OmcB binding to heparan sulfate-like proteoglycans (HS-GAGs) of the mammalian extracellular matrix (ECM) more

adhesins, e.g. members of the polymorphic membrane protein (Pmp) adhesin family bind to the cell (Moelleken and Hegemann, 2008; Fechtner *et al.*, 2013). The stable adhesion to the cell combined with type-three secreted effector proteins then mediates the internalization of the EB into the host cell (Mölleken, Schmidt and Hegemann, 2010; Mölleken, Becker and Hegemann, 2013; Becker and Hegemann, 2014). Next to OmcB and Pmp21, the *Cpn* exclusive surface located adhesin LIPP (Cpn0473) is crucial for a successful chlamydial infection. Pre-treatment of human cells with recombinant LIPP (rLIPP) promotes the *Cpn* EB internalization dose-dependently generating a unique infection boosting effect while typical adhesins constricts adhesion and therefore EB internalization in such assays. This suggests an unusual mode of action. Furthermore, LIPP directly interacts with negatively charged phospholipids of the human plasma membrane (PM) in a lipid raft dependent manner, autonomously inducing pore formation which subsequently leads to phosphatidylserine (PS) externalization from the inner to the outer leaflet without inducing apoptosis (Galle *et al.*, 2019). Consequently, LIPP mediates the redistribution of the human cytosolic 14-3-3 ζ to the EB attachment sites (Hanisch *et al.*, 2019). The adaptor protein 14-3-3 ζ is part of the 14-3-3 protein family, key players that integrate and control multiple signaling pathways in the cell. 14-3-3 ζ mediates anti-apoptotic effects and is beneficial for the cell-proliferation in human cells which are linked

to the ERK/MAP kinase pathway (Xing *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2009; Neal and Yu, 2010a; Xu *et al.*, 2015). LIPP redirects the anti-apoptotic adaptor protein to the PM independent of other proteins, forming a stable interaction during the first 30 min of a *Cpn* infection. Overexpression of 14-3-3 ζ mediates a significant enhancement of *Cpn* infectivity. These data describe LIPP as a bacterial PS translocase that recruits 14-3-3 ζ to bacterial entry sites revealing a novel mechanism by which intracellular pathogens enter host cells. However, it remains unclear how the PM binding as well as the pore formation are accomplished, and which

domain exactly is responsible for the PS externalization.

To directly interact with phospholipids of the PM bacterial pathogens use different techniques. *Salmonella sp.* interacts with cholesterol of the PM via FliC during biofilm-formation, *Vibrio parabaemolyticus* uses MAM7 to interact with phosphatidic-acid and the ECM-related fibronectin while *Helicobacter pylori* interacts with phosphatidylserine (PS) via CagA (Heise and Dersch, 2006; Hase *et al.*, 2009; Crawford, Reeve and Gunn, 2010; Murata-Kamiya *et al.*, 2010; Krachler, Ham and Orth, 2011; Dreux *et al.*, 2013; Foster *et al.*, 2014; Lillington, Geibel and Waksman, 2015; Stones and Krachler, 2015). Unlike LIPP those bacterial proteins do not autonomously form a pore on their own to interact with - or externalize phospholipids of the human PM. The most studied, extracellular proteins spanning the membrane without using a proteinaceous interaction partner associated to the PM are toxins. When in contact with the PM, two possible conformations occur. The protein can either form a β-barrel structure within the PM of the host cell or utilize amphipathic helices to overcome the membrane barrier. Amphipathic helices often have a disordered structure in aqueous solution. On contact with a lipidic surface this conformation is converted into a α -helical wheel-structure in which the polar amino acids face the membrane and the hydrophilic amino acids face the aqueous solution. Amphipathic helices can insert into or span a membrane (Dong *et al.*, 2012; Giménez-Andrés, Čopič and Antonny, 2018).

While the α -toxin of *Staphylococcus aureus* forms a cholesterol-dependent β -barrel in the pore, the lytic proteins Equinatoxin II (EqtII) and Sticholysin I/ II (StI, StII), from the sea anemone *Actinia equina* and *Stichodactyla helianthus* respectively, use an amphipathic helix to form a pore of in the PM (Heuck, Tweten and Johnson, 2001; Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2004; Schön *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2012; Pedrera *et al.*, 2014).

In this study we show that the *C. pneumoniae* adhesin LIPP employs three predicted amphipathic helices (APHs) located within the N-terminal half of the protein to interact with the human PM and mediate the key factors of the unique adhesin. Binding studies on GUVs and human cells display that the first two APHs mediate the PS-translocase activity of LIPP. The unique infection boosting capacity, as well as the 14-3-3 ζ interaction is conveyed via the first APH. A deletion of the third APH leads to an increase in PS binding and externalization as well as a reduced pore formation in GUVs which implies a regulatory function mediated by this domain of the protein. It is very likely that LIPP uses the amphipathic helices to autonomously overcome the barrier of the PM.

We show for the first time that a bacterial adhesin pierces the PM, in a self-governing manner, via amphipathic helices to externalize PS and interact with cytosolic 14-3-3 ζ without inducing apoptosis.

Results

LIPP harbors three predicted amphipathic helices in its N-terminus

In previous studies we identified several domains lacking either one or several of the LIPP-mediated features: cell binding, phosphatidylserine (PS)-binding and -externalization, pore formation, 14-3-3 redistribution and infection boost capacity (Fig. 1A) (Fechtner, Galle and Hegemann, 2016; Galle et al., 2019; Hanisch et al., 2019). It was shown that the initial binding of LIPP to the human cell is mediated by its C-terminal binding domain (BD), although the human interaction partner remains undefined (Fechtner, Galle and Hegemann, 2016). A preincubation of human cells with recombinant LIPP followed by a Cpn infection leads to an enhancement in EB entry (infection boost). We showed that this effect is arbitrated by the Nterminal infection enhancing domain (Fig 1A, IED, aa 1-150) (Fechtner, Galle and Hegemann, 2016). Via a predicted C-terminal located transmembrane domain (TM) LIPP can furthermore generate a pore within membranes which subsequently can lead to 14-3-3ζ-recruitment via LIPP to the PM. Interestingly, a 14-3-3ζ interaction could be established by the N- as well as the C-terminal half of LIPP, whereas a deletion of the TM lead to a loss in 14-3-3ζ redistribution (Fig. 1A) (Galle et al., 2019; Hanisch et al., 2019). Upon contact to the human PM LIPP binds to negatively charged phospholipids and externalizes phosphatidylserine (PS) from the inner to the outer leaflet of the membrane. A variant lacking the first 171 amino acids (aa) was unable to bind and externalize PS while a variant lacking aa 150-255 retained the PS externalization capacity (Fig. 1A). We concluded therefore that PS binding and -externalization are potentially mediated by a domain within the first 255 amino acids (aa) of the protein (Galle et al., 2019). In order to gain insight into the mechanism of the observed LIPP function we performed a bioinformatical

screen, which revealed three predicted amphipathic helices in the N-terminal domain of LIPP (aa 84-100,

182-198, 242-258, Fig 1B). A detailed analysis of those as sequences using Heliquest (Gautier *et al.*, 2008) supported the initial findings, showing strong hydrophobic faces and a hydrophobic moment (μ H) of more than 0,3 for all three analyzed domains. APHs are often disordered in aqueous solution but go through a conformational change to an α -helix upon membrane contact. They can bind to and insert into lipid bilayers.





(A) Scheme of LIPP and characterized LIPP fragments. The table summerizes all described LIPP-mediated features (Fechtner, Galle and Hegemann, 2016; Galle *et al.*, 2019). IED: infection enhancing domain (amino acid (aa) 1-150), BD: binding domain (aa 307-356), TM: predicted transmembrane domain (aa 391-424), PS: phospatidylserine

(B) Detailed analysis of LIPP amphipathic helices (APHs) via Heliquest (Gautier *et al.*, 2008). LIPP harbors three predicted APHs in its N-terminus. The individual hydrophobic faces are shown below the respective projections. APHs are often disordered in aqueous solution but go through a conformational change to form an α -helix upon membrane contact. They can bind to and insert into lipid bilayers. Non-polar residues: yellow, polar residues: purple, proline: green, basic residues: dark blue, alanine/glycine = grey, histidine = light blue, glutamine = light red

(C) Scheme of APH sites and used LIPP fragments. APHs were deleted in full length either alone or in combination \pm 4 flanking amino acids (aa) resulting in \triangle APH1: \triangle aa 80-104, \triangle APH2: \triangle aa 178-202, \triangle APH3: \triangle aa 238-262.

The LIPP APHs are crucial for phosphatidylserine binding

Thus, we created different deletion variants lacking one, two or all three amphipathic helices alone or in combination within the full length protein. We tested those variants for their membrane binding properties on giant unilamellar vesicles (GUVs) containing PS and cholesterol as previously described (Galle *et al.*, 2019) (Fig 2). Interestingly, deletion of the predicted APHs influenced the GUV binding capacity. Deletion of the first APH (r Δ APH1, Δ aa 84-100, Fig. 1B) led to a significant reduction in GUV binding (42,1 ± 2,2%) while deletion of the second APH (r Δ APH2, Δ aa 178-202, Fig. 1B) led to a complete abolishment of binding (0%) compared to full length rLIPP (100 %, Fig. 1B). Surprisingly, deletion of the third APH (r Δ APH3, Δ aa 238-262, Fig. 1B) resulted in a 20 % significant enhancement of the binding capacity (123,2 %). The mediated significant enhancement also occurred when the third APH was deleted in combination with another APH (r Δ APH2/3 = 27,6 % and r Δ APH1/3 = 73,4 %), only a deletion of all three APHs resulted in an abolishment of binding as did deletion of APH2 (0%) (Fig. 2B).





(A) Binding capacity of FITC labeled recombinant LIPP-APH (rLIPP-APH) deletion fragments to 20 mol% phospatidylserine (PS)-GUVs (PS-GUVs). GUVs were produced via electroformation (Römer *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2017). 2 µg of different FITC labeled rLIPP variants were incubated with either PS- or phosphatidylcholine (PC)-GUVs, each containing 25 mol% cholesterol for 30 min and subsequently observed via confocal microscopy. As previously described rLIPP does not bind to PC-GUVs, but strongly to PS-GUVs (Galle *et al.*, 2019). Lack of binding to PC-GUVs is shown exemplary for rLIPP full-length. All rLIPP fragments are color coded for better distinguishability. Scale bar: 10 µm.
(B) Quantification of rLIPP fragments binding to PS-GUVs. Binding capacity was quantified by ImageJ software (Script by Sebastian Hänsch, HHU) and GraphPad Prism (unpaired t-test, n=3). Statistical significance of differences is denoted by *** ($p\leq0.001$), ** ($p\leq0.01$) and * ($p\leq0.05$). ns, not significant.

The third APH has a regulatory effect on phosphatidylserine binding and membrane perturbation.

To investigate the binding ability of the APH deletion variants in closer detail we performed time kinetic binding studies to PS-GUVs from 0 to 35 min (Fig. 3A). The binding of the different APH-variants to the GUV membrane turned out to be a time dependent event, reaching a plateau after 30 min. Of note, the lower the overall binding to the membrane is, the earlier the plateau is reached (Fig. 3A). Here, we also observed a significant, regulatory effect mediated by the third APH. When deleted, it consequently increased the binding capacity between 15% and 35% depending on timepoint and APH deletion variant.

Membrane bound rLIPP penetrates the GUV membrane via its C-terminal TM domain ((Galle *et al.*, 2019), Fig. 1A). During the time dependent kinetics, we also observed GUVs becoming leaky and fluorescent labeled rLIPP diffusing inside the GUV lumen (Fig. 3B). We quantified this membrane penetrating feature for all described LIPP Δ APH variants. While rLIPP could penetrate 85% of all observed GUVs after 30 min, r Δ APH3 was only able to penetrate 70% of the GUVs even though it showed a 20% increased binding capacity. 80% of the observed GUVs, incubated with the non-PS binding variants r Δ APH2 and r Δ APH1-3 remained unchanged. The low PS binding variants were able to penetrate up to 50% of all observed GUVs. Interestingly, an additional deletion of APH3 also results in a reduction of membrane penetration in the low binding LIPP variant APH1 (r Δ APH1 = 50%, r Δ APH1/3 = 33,3%) suggesting that next to its regulatory function in PS binding the third APH also supports the LIPP mediated membrane penetration.





(A) Binding capacity of rLIPP fragments to PS-GUVs over time. 2 μg of FITC labeled rLIPP and rLIPP-APH deletion variants were incubated with 20 mol% PS-GUVs for 5 – 35 min. Binding capacity was quantified by ImageJ software (Script by Sebastian Hänsch, HHU) and GraphPad Prism (unpaired t-test, n=3). Left graph: rLIPP fragments representing high PS binding, right graph: rLIPP fragments representing low or no PS binding. rLIPP binding capacity at 30 min represents 100% PS-GUV binding. Deletion of APH3 results in enhanced PS binding. All rLIPP variants are color coded for better distinguishability.

(B) Penetration of PS-GUV membranes by rLIPP-APH fragments over time. 2µg of FITC labeled rLIPP-APH fragments were incubated with PS-GUVs for up to 40 min. Every 5 min 60 GUVs were observed and grouped as 'intact' (non-leaky, shown in green), or 'not intact' (leaky, shown in red).

LIPP APHs are crucial for phosphatidylserine externalization on HEp-2 cells

Since the APHs turned out to be essential for PS binding on artificial membranes we examined the effect of the APHs on PS translocation in human cells. While rLIPP can externalize PS to the outer leaflet of the PM (Galle *et al.*, 2019), the APH variants showed comparable effects on the PS-translocase activity as on the PS binding in the GUV experiments (Fig. 2+3). While incubation with r∆APH1 reduced the PS binding and

PS externalization rate significantly (43,3 %, Fig. 4B), the non-PS binding variants r Δ APH2 and r Δ APH1-3 showed significantly reduced PS externalization rate of compared to full length rLIPP (r Δ APH2= 10,7 %, r Δ APH1-3= 8,6 %). A deletion of APH3 additionally increased the PS externalization, just as the PS binding ~20% in the variants r Δ APH3 and r Δ APH2/3 (Fig. 4B, right graph) while in r Δ APH1/3 no enhancement could be detected compared to r Δ APH1. The variants lacking two APHs show a general reduction in PS externalization of ~60% to ~80%, comparable to their reduction in PS binding. Of note, the difference in PS externalization of r Δ APH2/3 to r Δ APH1/2 and r Δ APH1/3 is not significant.



APH2/3

Fig. 4: LIPP APHs are crucial for phosphatidylserine externalization on HEp-2 cells.

(A) PS externalization capacity of rProtein treated HEp-2 cells. HEp-2 cells were incubated with rGST or rLIPP-APH fragments for 1h at 37 °C. After extensive washing annexin-V was used to visualize externalized PS on the cell surface. Cells were fixed with PFA, stained with DAPI and observed microscopically (n=6).

(B) Quantification of PS externalization capacity on HEp-2 cells. PS externalization (annexin-V signal intensity) was quantified using Image J software (Script by Sebastian Hänsch) and GraphPad Prism (unpaired t-test, Mann-Whitney corrected). Statistical significance of differences is denoted by *** ($p \le 0.001$), ** ($p \le 0.01$) and * ($p \le 0.05$). ns, not significant. Right graph shows the effect of APH3 deletion on PS externalization in different LIPP variants.

LIPP APH1 mediates the boost of infectivity on Cpn infected HEp-2 cells

In consideration of r Δ APH1 showing a significant reduction effect in PS binding and -externalization and the fact that APH1 is located within the previous identified IED (Fechtner, Galle and Hegemann, 2016), we tested the Δ IED variant of LIPP for its PS externalization capacity. Interestingly, the IED showed no significant difference in PS externalization compared to the r Δ APH1 variant (Fig. 4B) indicating that APH1 is essential for the function of the IED domain. Therefore, it was of high interest to also analyze the APHs for their effect on the infection boosting capacity.

Indeed, while a preincubation of one hour with rLIPP mediates a significant boost in a following *Cpn* infection, the deletion of APH1 leads to a loss of this boost (Fig. 5). Every tested fragment, lacking APH1 did not show a boosting effect while every tested fragment containing APH1 boosted the chlamydial infection significantly indicating that APH1 is indispensable to convey this protein function (Fig. 5).



Fig. 5: LIPP APH1 mediates the boost of infectivity on Cpn infected HEp-2 cells

Infectivity of *Cpn* EBs on HEp-2 cells preincubated with rProtein. HEp-2 cells were preincubated with different rProteins (100 µg/ml) for 1h at 37 °C. After extensive washing cells were infected with *Cpn* (MOI=5) for 48h. Cells were then fixed with PFA and infectivity was determined via confocal microscopy (n=3). Infectivity after PBS preincubation was set to 100%. Statistical significance of

differences is denoted by *** (p≤0.001), ** (p≤0.01) and * (p≤0.05). ns, not significant. Analysis was performed via the software GraphPad Prism (unpaired t-test).

LIPP APH1 and TM are essential for 14-3-3ζ-recruitment in HEp-2 cells

LIPP autonomously interacts with and recruits human, cytoplasmic 14-3-3 ζ through the barrier of the PM to its adhesion site. Deletion of the LIPP TM (Δ TM) abolished the recruitment of r14-3-3 ζ in HEp-2 cells and through the GUV membrane. Interestingly, an incubation with N-terminal LIPP still led to a r14-3-3 ζ redistribution although this variant lacks the TM (Hanisch *et al.*, 2019), leading to the assumption that one or several domains within the N-terminal part of the protein contribute to the 14-3-3 ζ recruitment in the chlamydial infection process. We therefore examined the APHs further in terms of 14-3-3 ζ recruitment on HEp-2 cells and on artificial membrane systems.

As previously shown untreated HEp-2 cells as well as cells pretreated with rLIPP lacking the TM domain (r Δ TM) showed no recruitment of endogenous 14-3-3 ζ to the PM (Hanisch *et al.*, 2019) (Fig 6 A+B). Interestingly, LIPP lacking the first or all three APH (r Δ APH1/ r Δ APH1-3) showed no recruitment of native 14-3-3 ζ either. Preincubation with rLIPP, r Δ APH2 or r Δ APH3 on the other hand resulted in a significant recruitment to the rProtein adhesion site on the PM (Fig. 6A+B).

To stress the point that recruitment of endogenous 14-3-3 ζ to the LIPP binding sites on the PM is solely due to LIPP penetrating and recruiting function, we performed GUV assays in which NHS-Alexa594-labeled r14-3-3 ζ was retained in the lumen of PS-GUVs and incubated with NHS-FITC-labeled protein from the outside (Fig. 6C). Here, the control PS binding rLactC2 bound to the surface of the GUV but only LIPP is able to bind and penetrate the synthetic membrane and recruit 14-3-3 ζ . A similar effect could be observed for GUVs incubated with r Δ APH3. Although r Δ APH1 and r Δ TM are able to bind to the surface of the GUVs both are unable to recruit 14-3-3 ζ (Fig. 6C). Those observations show an involvement of the first APH in the 14-3-3 ζ interaction.

In conclusion we showed that LIPP harbors three predicted amphipathic helices in its N-terminal part responsible for PS binding, PS externalization, the boost of infectivity and 14-3-3 ζ recruitment. Our data show that APH1 and APH2 are crucial for PS binding and externalization, which is essential for the infection boost and 14-3-3 ζ recruitment. The third APH seems to convey a regulating effect as deletion increased PS binding and -externalization and is essential for LIPP mediated membrane penetration.



Fig. 6: LIPP APH1 and TM are essential for 14-3-3ζ-recruitment in HEp-2 cells.

(A) Redistribution of host 14-3-3ζ to the host plasma membrane of rProtein treatment. HEp-2 cells were preincubated with different FITC-labeled rProteins for 1h at 37 °C. After extensive washing cells were fixed with PFA, stained with DAPI and anti-14-3-3ζ antibody and observed by confocal microscopy. Scale bar: 10 μm.

(B) Quantification of host 14-3-3ζ-redistribution. 14-3-3ζ-redistribution was quantified using ImageJ software (Script by Sebastian Hänsch, HHU)) (n=3). Statistical significance of differences is denoted by *** (p≤0.001), ** (p≤0.01) and * (p≤0.05). ns, not significant. Analysis was performed via the software GraphPad Prism (unpaired t-test, Mann-Whitney corrected).

(C) Redistribution of r14-3-3ζ in rProtein-treated PS-GUVs. r14-3-3ζ-GST filled GUVs were either incubated with FITC labeled rLIPP variants or rLactC2 for 60 min. r14-3-3ζ-redistribution was quantified using ImageJ software (Script by Sebastian Hänsch, HHU)) (n=3).

Statistical significance of differences is denoted by *** ($p \le 0.001$), ** ($p \le 0.01$) and * ($p \le 0.05$). ns, not significant. Analysis was performed via the software GraphPad Prism (unpaired t-test, Mann-Whitney corrected). Scale bar: 10 μ m.

Discussion

Chlamydiae evolutionary developed an assortment of infection strategies. Before internalization into the host cell the EB must adhere stable to overcome the barrier of the PM. *Cpn* utilizes several adhesins to mediate adhesion and internalization (Moelleken and Hegemann, 2008; Mölleken, Becker and Hegemann, 2013; Luczak *et al.*, 2016). The recently described adhesin LIPP combines unique features in the adhesion and internalization process. After a stable binding to the human cell is accomplished, LIPP interacts with negatively charged phospholipids in the PM, forms a pore in the membrane without the use of ATP or Ca²⁺, externalizes exclusively PS, and autonomously boosts the EB internalization (Fechtner, Galle and Hegemann, 2016; Galle *et al.*, 2019). LIPP was therefore classified as the first known lipid translocator protein to obtain access to the inner leaflet of the PM from the extracellular space.

In this study we show that LIPP uses three specific domains, predicted to form APHs when in contact with membranes, to mediate the LIPP key factors: PS binding (Fig. 2+3), PS externalization (Fig. 4) and the boost of infection (Fig. 5). The first two amphipathic helices mediate the PS-translocase activity of LIPP (Fig. 4). The unique infection boosting capacity, as well as the 14-3-3ζ interaction is conveyed via the first amphipathic helix (Fig. 5+6). A deletion of the third amphipathic helix furthermore leads to an increase in PS binding and -externalization as well as a reduced pore formation in GUVs (Fig. 3). Since PS is located on the inner leaflet of the PM it seems likely that LIPP overcomes the membrane independent of the TM domain. This then triggers PS externalization and enhanced intake of chlamydial EBs. Previously it was already shown that enhancement of EB intake and PS externalization are associated (Galle et al., 2019). In pathogen biology, pore forming proteins, adhering to the plasma membrane from the extracellular site are rarely described. A group of proteins using those features are the actinoporins of sea anemones. Sticholysin I, II (StI, StII) from Stichodactyla helianthus and Equinatoxin II (EqtII) from Actinia equina are structural highly similar and use predicted APHs in their N-terminal domain to bind to sphingomyelin in the plasma membrane of the target cell to form a pore (Schön et al., 2008; Garcia et al., 2012; Pedrera et al., 2014). The proteins show a β -sandwich conformation flanked by two α -helical segments, one in the N-terminal region, one mid-protein. In all three proteins the first 13 residues are essentially unordered, followed by a segment in amphipathic α-helical conformation which is disordered in aqueous surroundings (Menestrina, Cabiaux and Tejuca, 1999; Athanasiadis et al., 2001; Mancheño et al., 2001, 2003; Hinds et al., 2002; Alvarez et al., 2003; Castrillo et al., 2010b; Carretero et al., 2018). The major conformational change upon membrane contact takes place in the APH region, expending the existing α -helix towards the N-terminus. Meanwhile the β-sandwich and second helical segment remain in structure, promoting membrane binding and scaffolding on the PM surface (Mancheño et al., 2003; Alegre-Cebollada et al., 2007; Carretero et al., 2018). After plasma membrane binding, the N-terminal APH is believed to be released from the β -sandwich core to interact with the membrane in a parallel orientation towards the interface of lipid headgroups and aqueous solution by forming the α -helical conformation. In the next step, four monomers interact to promote lipid reorganization by pore formation while the first residues anchores the protein in the membrane. The hydrophilic inside of the pore is most probably formed by the hydrophilic APH residues while the APHs hydrophobic face interacts with the phospholipid head-groups (Anderluh *et al.*, 1997; Heuck, Tweten and Johnson, 2001; Hong *et al.*, 2002; Malovrh *et al.*, 2003; Mancheño *et al.*, 2003; Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2012; Carretero *et al.*, 2018; Giménez-Andrés, Čopič and Antonny, 2018).



Fig. 7: LIPP adhesion and pore formation.

Proposed LIPP binding model. After binding to the host cell via the LIPP_BD (1), the adhesin gets in close contact to the PM where it oligomerizes (monomer shown in side view). Membrane contact of the APH domains will induce their conformational change into an α -helical shape. The APHs will penetrate the membrane and form a pore which then leads to an externalization of PS to the outer leaflet of the PM (2). The externalized PS subsequently gets bound by the second APH in the outer leaflet to prevent a re-translocation via cellular processes. Through the pore, stabilized by the LIPP transmembrane domain, an undefined part of LIPP interacts and redistributes 14-3-3 ζ to the LIPP adhesion site. PS= green.

We hypothesize that LIPP could mediate the PS binding and -externalization via a similar mechanism (Fig. 7). Since the boost of infection is abolished and PS externalization is significantly reduced after deletion of APH1 and PS binding as well as PS externalization are abrogated after APH2 deletion (Fig. 2-4) we assume that after membrane contact APH1 could bind to the membrane and mediate pore formation, potentially by oligomerization of LIPP. Externalized PS, channeled either through or around the pore, could then be bound locally at the outside of the cell by APH2 to prevent a re-internalization due to cellular translocation processes. We propose this organization since a deletion of APH2 has a strong effect on PS binding and - externalization but not on 14-3-3 ζ reorganization and infection boost (Fig. 2-6). The pore forming process could furthermore be stabilized by the TM domain, leading to either a partly translocation of LIPP through the pore to interact with 14-3-3 ζ or a direct interaction of the first APH with 14-3-3 ζ . We propose this since a deletion of 14-3-3 ζ recruitment (Fig. 6). Interestingly deletion of APH3 results in a boost of PS binding and -externalization as well as reduction leaky GUVs (Fig. 3). This could point to a regulative effect mediated by the third APH. Though, how exactly the different APHs

are organized *in vivo*, how the formation of the pore is executed and what part of LIPP mediates the 14-3- 3ζ recruitment will be a matter of future studies.

Materials/Methods

Chemicals and antibodies

Pathfinder was obtained by Bio-Rad. Cell Dissociation Solution Non-enzymatic 1x was obtained from Sigma-Aldrich, the lipids DOPS, Cholesterol and DOPC from Avanti. Gentamicin and Texas Red DHPE were sourced from Invitrogen. Annexin-V was obtained from Roche. 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), Glutathion Agarose 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP), Nitro Blue Tetrazolium (NBT) and Polyvinylalcohol (PVA) were obtained by Sigma. Bovines Serumalbumin (BSA) was sourced from Serva, Complete Protease-Inhibitor-Cocktail by Roche. Dylight 594 NHS-Ester and NHS-Fluorescein (FITC) were sourced from Thermo Scientific. Commercially available antibodies were obtained from the following sources: Alexa488- and Alexa594-conjugated anti-rabbit and anti-mouse antibodies from Life Technologies; anti-GST (#C2309) from Santa Cruz; anti-PentaHis (#34660) from Qiagen; AP-conjugated anti-mouse (#S372) and anti-rabbit (#S3731) from Promega. PBS buffer used in the experiments consists of 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄. HBSS buffer (Thermo Scientific, #14175-053) used in this work consists of 5.3 mM Potassium Chloride (KCl), 0.4 mM Potassium Phosphate monobasic (KH2PO4), 4.2 mM sodium bicarbonate (NaHCO3), 137.9 mM sodium chloride (NaCl), 0.3 mM sodium phosphate dibasic (Na2HPO4), 5.6 mM D-Glucose (Dextrose). Chloroform was obtained by Fisher Chemicals in analytic grade, sucrose and cycloheximide from Roth.

DNA manipulations and protein expression

Escherichia coli XL₁ blue (Stratagene) was used for plasmid amplification and the BL21 strain (Invitrogen) for protein expression. Plasmids were constructed by *in vivo* homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae* strain Cen/PK2 and then transformed into *Escherichia coli* XL₁ blue. The binding domain of OmcB (OmcB_BD, aa 40-100) from *Cpn* was expressed with a C-terminal His-tag. GST and all LIPP variants were expressed as C-terminally His-tagged proteins. The human 14-3-3ζ was C-terminally fused with mCherry or N-terminally fused to a GST. GST- and His-tagged proteins were purified using the protocols supplied by Sigma Aldrich and Qiagen respectively and analyzed on SDS Gels/ Western blots.

Cultivation of epithelial cells

Human HEp-2 (epithelial larynx carcinoma, ATCC No.: CCL-23) and CHO cells (Chinese hamster ovary, ATCC No.: CCL. 61) were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) GlutaMax with fetal calf serum (FCS), vitamins, non-essential amino acids, amphotericin B ($2.5 \mu g/ml$) and gentamicin ($50 \mu g/ml$) at 37 °C in an atmosphere containing 6% CO₂.

Propagation of chlamydial strains

The HEp-2 cell line was used for propagation of chlamydial strains and infection experiments. The cells were treated as described above. *Cpn* GiD was propagated in HEp-2 cells in the presence of 1.2 μg/ml cycloheximide, EBs were purified using 30 % castrografin (Schering).

Immunofluorescence microscopy

Microscopy was performed with a Nikon Eclipse Ti-E C2 confocal microscope (DS-Qi1MC Camera). Confocal images were assembled using NIS Element software (Nikon). Infected cells were fixed either with 96 % methanol for 5 min at room temperature or with 3 % paraformaldehyde (PFA) for 10 min at 4 $^{\circ}$ C. When necessary, cells were permeabilized with 0,1% Tween, 0.3 % Triton prior to antibody staining. Unspecific binding sites were blocked with 5 % BSA and antibodies were dissolved in permeabilization solution with 5% BSA.

Fluorescent labeling of rProtein

NHS Fluorescein (FITC/ Dylight[™] 594 NHS Ester) (10 mg/ ml in DMSO) was used in 20-fold excess compared to rProtein and incubated at 0 °C for 1 h using the following equation:

$$\frac{mg \, rprotein}{MW \, rprotein \, [Da]} * x * 47,340 = \mu l \, NHS \, Fluorescein$$

MW = molecular weight, x = excess NH -Fluorescein

After deactivation of unbound NHS Fluorescein by addition of 1M Tris/HCL pH8 in a final concentration of 50 mM, the mix was incubated additional 2 h at 0 °C. The labeled rProtein was dialyzed in PBS overnight at 4 °C. Successful labeling was controlled via UV after an SDS PAGE the next day.

Infection blocking/boosting assay

Infection blocking/boosting assays were carried out with half confluent layers of HEp-2 cells grown on glass cover slips (\emptyset 1 cm) at 37 °C and 6% CO₂. Binding of soluble rProteins was assessed by overlaying cells with 250 µl of culture medium containing the soluble rProtein of interest (100 µg/ml) at 37 °C for 60 min. After extensive washing, chlamydial EBs (MOI = 5) were thawed, sonificated for 5 x 5 seconds in a RT water bath, vortexed and then given to the HEp-2 cells in 250 µl cell culture medium. The mixture was incubated for 2 h at 37 °C and 6 % CO₂. Then medium was changed to 1 ml fresh cell culture medium + 12 µl cycloheximide. After incubation for 48 h at 37 °C and 6 % CO₂ the cells were washed extensively and fixed with methanol. After staining with Pathfinder (1:6) for 30 min at 30 °C and DAPI (1:1000) for 10 min at RT the cells were observed via immunofluorescence microscopy.

GUV binding/ penetration assay

Giant unilamellar vesicles (GUVs) were prepared as essentially described previously (Römer et al., 2007; Singh et al., 2017) via electroformation with some modifications. Lipid-coated ITO-slides were dried under the fume hood and GUVs were grown for 1.5 h at room temperature. The following lipid mixtures (in mol%) were used for the preparation of the GUVs, the fluorescent lipid Texas Red-DHPE (Life Technologies) was imaging purposes: DOPC/TexasRed-DHPE/cholesterol: 74.75/0.25/25, added for DOPC/TR-DHPE/DOPS/cholesterol, 54.75/0.25/20/25. GUVs were added at room temperature to FITC-labeled rLIPP /rLIPP variants (2 µg) and observed for up to 35 min on a confocal fluorescence microscope (Nikon Eclipse Ti-E with A1R confocal laser scanner, 60x oil objective, NA=1.49). Image acquisition was performed with NIS-Elements (Nikon). Binding capacity was quantified by ImageJ software (Script by Sebastian Hänsch, HHU) and GraphPad Prism (unpaired t-test, n=3). FITC signal intensity was measured in the extracellular space, at the GUV-membrane and in the middle of the GUV-lumen. The relative fluorescence intensity of the FITC signal (PS binding) was calculated by substracting the value measured in the GUV-lumen from the value measured at the membrane.

Penetration of PS-GUV membranes

GUVs were prepared as described. Every 5 min 60 GUVs per rLIPP-variant were observed and grouped by intact (non-leaky, shown in green), or not intact (leaky, shown in red).

GUVs assay with incorporated r14-3-3ζ protein

Giant unilamellar vesicles (GUVs) were prepared via the swelling method modified after Weinberger *et al.*, all steps were performed under the fume hood. Microscopy slides were cleaned twice with 96% ethanol and then twice with chloroform. 5% (w/w) PVA solution was prepared by stirring PVA in water while heating at 100 °C until solution is clear. After cooling down 100µl 5% PVA solution were mixed with 2 µg Dylight[™] 594 NHS labeled rGST-14-3-3ζ and then evenly distributed on the glass slide by dropping the solution in the center of the chamber. After the PVA was dried, 20µl of lipid mixture (in mol%) (DOPC/ Cholesterol/ DOPS: 55.0/ 25.0/ 20.0 in chloroform) were spread on the PVA film with a Hamilton[™] syringe. After the lipids have been dried under the fume hood, a chamber was built around the PVA/lipid film with Vitrex[™] and then filled with 500 µl sucrose-solution (10% w/w in water). The chambers were incubated for 2 h at RT, then the 14-3-3ζ GUVs were harvested, washed 7 times with 1,5 ml 10% sucrose-solution, spinned down at 2000 rpm for 60 sec and stored at 4 °C. GUVs were added at room temperature to DyLight488-labeled rProtein (2 µg) and immediately observed on a confocal fluorescence microscope (Nikon Eclipse Ti-E with A1R confocal laser scanner, 60x oil objective, NA=1.49). Image acquisition was performed with NIS-Elements (Nikon).

PS externalization assay

PS externalization assays were carried out with half confluent layers of HEp-2 cells grown on glas cover slips at 37 °C and 6 % CO₂. Binding of soluble FITC labeled, rProteins was assessed by overlaying cells with 250 μ l of culture medium containing the soluble rProtein of interest (100 μ g/ml) at 37 °C for 60 min. After extensive washing with annexin-buffer (0.1 M HEPES pH 7.4, 4.4 M NaCl, 5 mM CaCl₂), cells were equilibrated in 500 μ l annexin-buffer for 20 sec. Buffer was exchanged to 30 μ l annexin-buffer + 0,6 μ l annexin-V and incubated at 4 °C for 20 min. After washing the cells with HBSS they were fixed with 3 % PFA and observed via confocal fluorescence microscope (Nikon Eclipse Ti-E with A1R confocal laser scanner, 60x oil objective, NA=1.49). Image acquisition and analysis was performed with NIS-Elements (Nikon) and GraphPad Prism. PS externalization was quantified using Image J software (Script by Sebastian Hänsch). Annexin-V signal intensity was measured in the extracellular space, at the LIPP attachment site and in the cytosol of the HEp-2 cells. The relative fluorescence intensity of the annexin-V signal (externalized PS) was calculated by substracting the value measured in the cytosol from the value measured at the LIPP attachment site.

Author's contribution

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

Acknowledgements

We are grateful to Stephan Schott-Verdugo (AG Gohlke, University of Düsseldorf) for the help with the APH prediction and to S. Hänsch (CAi, University of Düsseldorf) for providing us with the macro for microscopic analysis of the GUVs (ImageJ software). We thank S. Grinstein (University of Toronto) for the GST-Lactadherin-C2 expression vector. PTH was funded by the CRC1208. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, CRC 1208, project A05 to JHH.

References

AbdelRahman, Y. M. and Belland, R. J. (2005) 'The chlamydial developmental cycle: Figure 1', *FEMS Microbiology Reviews*, 29(5), pp. 949–959. doi: 10.1016/j.femsre.2005.03.002.

Alegre-Cebollada, J. *et al.* (2007) 'Infrared Spectroscopy Study on the Conformational Changes Leading to Pore Formation of the Toxin Sticholysin II', *Biophysical journal*. The Biophysical Society, 93(9), pp. 3191–3201. doi: 10.1529/BIOPHYSJ.106.102566.

Alvarez, C. *et al.* (2003) 'Binding of sea anemone pore-forming toxins sticholysins I and II to interfaces-modulation of conformation and activity, and lipid-protein interaction.', *Chemistry and physics of lipids*, 122(1–2), pp. 97–105. doi: 10.1016/s0009-3084(02)00181-0.

Anderluh, G. *et al.* (1997) 'N-terminal truncation mutagenesis of equinatoxin II, a pore-forming protein from the sea anemone Actinia equina', *Protein Engineering Design and Selection*, 10(7), pp. 751–755. doi: 10.1093/protein/10.7.751.

Athanasiadis, A. *et al.* (2001) 'Crystal structure of the soluble form of equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone Actinia equina.', *Structure (London, England : 1993)*, 9(4), pp. 341–6. doi: 10.1016/s0969-2126(01)00592-5.

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*. Wiley-Blackwell, 3(4), pp. 544–56. doi: 10.1002/mbo3.186.

Belland, R. J. *et al.* (2004) 'Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis.', *Cellular microbiology*, 6(2), pp. 117–27. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14706098 (Accessed: 6 August 2019).

Belland, R., Ojcius, D. M. and Byrne, G. I. (2004) 'Focus: Chlamydia', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 2(7), pp. 530–530. doi: 10.1038/nrmicro931.

Blasi, F. (1996) 'Clinical features of Chlamydia pneumoniae acute respiratory infection.', *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 1 Suppl 1, pp. S14–S18. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11866789 (Accessed: 6 August 2019).

Blasi, F., Tarsia, P. and Aliberti, S. (2009) 'Chlamydophila pneumoniae', *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier, 15(1), pp. 29–35. doi: 10.1111/J.1469-0691.2008.02130.X.

Carretero, G. P. B. *et al.* (2018) 'Dissecting the mechanism of action of actinoporins. Role of the Nterminal amphipathic α -helix in membrane binding and pore activity of sticholysins I and II', *PLOS ONE*. Edited by P. van der Wel. Public Library of Science, 13(8), p. e0202981. doi: 10.1371/journal.pone.0202981. Castrillo, I. *et al.* (2010) 'Specific interactions of sticholysin I with model membranes: An NMR study', *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78(8), p. NA-NA. doi: 10.1002/prot.22712.

Chung, J.-J. *et al.* (2009) 'PI3K/Akt signalling-mediated protein surface expression sensed by 14-3-3 interacting motif', *FEBS Journal*, 276(19), pp. 5547–5558. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07241.x.

Crawford, R. W., Reeve, K. E. and Gunn, J. S. (2010) 'Flagellated but Not Hyperfimbriated Salmonella enterica Serovar Typhimurium Attaches to and Forms Biofilms on Cholesterol-Coated Surfaces', *Journal of Bacteriology*, 192(12), pp. 2981–2990. doi: 10.1128/JB.01620-09.

Dahlén, G. H. *et al.* (1995) 'Lp(a) lipoprotein, IgG, IgA and IgM antibodies to Chlamydia pneumoniae and HLA class II genotype in early coronary artery disease', *Atherosclerosis*, 114(2), pp. 165–174. doi: 10.1016/0021-9150(94)05480-7.

Dong, H. *et al.* (2012) 'Glycines: role in α-helical membrane protein structures and a potential indicator of native conformation.', *Biochemistry*. NIH Public Access, 51(24), pp. 4779–89. doi: 10.1021/bi300090x.

Dreux, N. *et al.* (2013) 'Point Mutations in FimH Adhesin of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli Enhance Intestinal Inflammatory Response', *PLoS Pathogens*. Edited by M. A. Mulvey, 9(1), p. e1003141. doi: 10.1371/journal.ppat.1003141.

Fechtner, T. *et al.* (2013) 'Characterization of the interaction between the chlamydial adhesin OmcB and the human host cell.', *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 195(23), pp. 5323–33. doi: 10.1128/JB.00780-13.

Fechtner, T., Galle, J. N. and Hegemann, J. H. (2016) 'The novel chlamydial adhesin CPn0473 mediates the lipid raft-dependent uptake of Chlamydia pneumoniae.', *Cellular microbiology*, 18(8), pp. 1094–105. doi: 10.1111/cmi.12569.

Foster, T. J. *et al.* (2014) 'Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus', *Nature Reviews Microbiology*, 12(1), pp. 49–62. doi: 10.1038/nrmicro3161.

Galle, J. N. *et al.* (2019) 'A Chlamydia pneumoniae adhesin induces phosphatidylserine exposure on host cells', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 10(1), p. 4644. doi: 10.1038/s41467-019-12419-8.

Garcia, P. S. *et al.* (2012) 'Sticholysin II: A pore-forming toxin as a probe to recognize sphingomyelin in artificial and cellular membranes', *Toxicon*, 60(5), pp. 724–733. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.05.018.

Gautier, R. *et al.* (2008) 'HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific -helical properties', *Bioinformatics*, 24(18), pp. 2101–2102. doi: 10.1093/bioinformatics/btn392.

Giménez-Andrés, M., Čopič, A. and Antonny, B. (2018) 'The Many Faces of Amphipathic Helices.', *Biomolecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 8(3). doi: 10.3390/biom8030045.

Gutiérrez-Aguirre, I. *et al.* (2004) 'Membrane insertion of the N-terminal alpha-helix of equinatoxin II, a sea anemone cytolytic toxin.', *The Biochemical journal*. Portland Press Ltd, 384(Pt 2), pp. 421–8. doi: 10.1042/BJ20040601.

Hanisch, P. *et al.* (2019) 'Chlamydia pneumoniae adhesin LIPP recruits and interacts with host cell 14-3-3ζ in early infection', *unpublished*

Hase, K. *et al.* (2009) 'Uptake through glycoprotein 2 of FimH+ bacteria by M cells initiates mucosal immune response', *Nature*, 462(7270), pp. 226–230. doi: 10.1038/nature08529.

Heise, T. and Dersch, P. (2006) 'Identification of a domain in Yersinia virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(9), pp. 3375–3380. doi: 10.1073/pnas.0507749103.

Heuck, A. P., Tweten, R. K. and Johnson, A. E. (2001) 'β-Barrel Pore-Forming Toxins: Intriguing Dimorphic Proteins [†]', *Biochemistry*, 40(31), pp. 9065–9073. doi: 10.1021/bi0155394.

Hinds, M. G. *et al.* (2002) 'Solution structure of the eukaryotic pore-forming cytolysin equinatoxin II: implications for pore formation', *Journal of Molecular Biology*, 315(5), pp. 1219–1229. doi: 10.1006/jmbi.2001.5321.

Hong, Q. *et al.* (2002) 'Two-step Membrane Binding by Equinatoxin II, a Pore-forming Toxin from the Sea Anemone, Involves an Exposed Aromatic Cluster and a Flexible Helix', *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), pp. 41916–41924. doi: 10.1074/jbc.M204625200.

Krachler, A. M., Ham, H. and Orth, K. (2011) 'Outer membrane adhesion factor multivalent adhesion molecule 7 initiates host cell binding during infection by Gram-negative pathogens', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(28), pp. 11614–11619. doi: 10.1073/pnas.1102360108.

Lillington, J., Geibel, S. and Waksman, G. (2015) 'Reprint of "Biogenesis and adhesion of type 1 and P pili", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850(3), pp. 554–564. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.07.009.

Luczak, S. E. T. *et al.* (2016) 'The Chlamydia Pneumoniae Adhesin Pmp21 forms oligomers with adhesive properties', *Journal of Biological Chemistry*, 291(43), pp. 22806–22818. doi: 10.1074/jbc.M116.728915.

Malovrh, P. *et al.* (2003) 'A Novel Mechanism of Pore Formation', *Journal of Biological Chemistry*, 278(25), pp. 22678–22685. doi: 10.1074/jbc.M300622200.

Mancheño, J. M. *et al.* (2001) 'Partially folded states of the cytolytic protein sticholysin II.', *Biochimica et biophysica acta*, 1545(1–2), pp. 122–31. doi: 10.1016/s0167-4838(00)00269-7.

Mancheño, J. M. *et al.* (2003) 'Crystal and Electron Microscopy Structures of Sticholysin II Actinoporin Reveal Insights into the Mechanism of Membrane Pore Formation', *Structure*, 11(11), pp. 1319–1328. doi:

10.1016/j.str.2003.09.019.

Menestrina, G., Cabiaux, V. and Tejuca, M. (1999) 'Secondary Structure of Sea Anemone Cytolysins in Soluble and Membrane Bound Form by Infrared Spectroscopy', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 254(1), pp. 174–180. doi: 10.1006/bbrc.1998.9898.

Moelleken, K. and Hegemann, J. H. (2008) 'The Chlamydia outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding.', *Molecular microbiology*. Wiley-Blackwell, 67(2), pp. 403–19. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.06050.x.

Mölleken, K., Becker, E. and Hegemann, J. H. (2013) 'The Chlamydia pneumoniae Invasin Protein Pmp21 Recruits the EGF Receptor for Host Cell Entry', *PLoS Pathogens*. Edited by G. T. Van Nhieu, 9(4), p. e1003325. doi: 10.1371/journal.ppat.1003325.

Mölleken, K., Schmidt, E. and Hegemann, J. H. (2010) 'Members of the Pmp protein family of Chlamydia pneumoniae mediate adhesion to human cells via short repetitive peptide motifs.', *Molecular microbiology*. Wiley-Blackwell, 78(4), pp. 1004–17. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07386.x.

Murata-Kamiya, N. *et al.* (2010) 'Helicobacter pylori Exploits Host Membrane Phosphatidylserine for Delivery, Localization, and Pathophysiological Action of the CagA Oncoprotein', *Cell Host & Microbe*, 7(5), pp. 399–411. doi: 10.1016/j.chom.2010.04.005.

Neal, C. L. and Yu, D. (2010) '14-3-3 ζ as a prognostic marker and therapeutic target for cancer', *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 14(12), pp. 1343–1354. doi: 10.1517/14728222.2010.531011.

Pedrera, L. *et al.* (2014) 'Sticholysin I–membrane interaction: An interplay between the presence of sphingomyelin and membrane fluidity', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. Elsevier, 1838(7), pp. 1752–1759. doi: 10.1016/J.BBAMEM.2014.03.011.

Römer, W. *et al.* (2007) 'Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells', *Nature*, 450(7170), pp. 670–675. doi: 10.1038/nature05996.

Schön, P. *et al.* (2008) 'Equinatoxin II Permeabilizing Activity Depends on the Presence of Sphingomyelin and Lipid Phase Coexistence', *Biophysical Journal*, 95(2), pp. 691–698. doi: 10.1529/biophysj.108.129981.

Schramm, N., Bagnell, C. R. and Wyrick, P. B. (1996) 'Vesicles containing Chlamydia trachomatis serovar L2 remain above pH 6 within HEC-1B cells.', *Infection and immunity*, 64(4), pp. 1208–14. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8606080 (Accessed: 6 August 2019).

Singh, P. K. *et al.* (2017) 'Dynein light chain 1 induces assembly of large Bim complexes on mitochondria that stabilize Mcl-1 and regulate apoptosis', *Genes & Development*, 31(17), pp. 1754–1769. doi: 10.1101/gad.302497.117.

Sriram, S. *et al.* (1999) 'Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis.', *Annals of neurology*, 46(1), pp. 6–14. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10401775 (Accessed: 6 August 2019).

Stones, D. H. and Krachler, A.-M. (2015) 'Fatal attraction: how bacterial adhesins affect host signaling and what we can learn from them.', *International journal of molecular sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 16(2), pp. 2626–40. doi: 10.3390/ijms16022626.

Xing, H. *et al.* (2000) '14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades.', *The EMBO journal.* European Molecular Biology Organization, 19(3), pp. 349–58. doi: 10.1093/emboj/19.3.349.

Xu, J. *et al.* (2015) '14-3-3ζ Turns TGF-β's Function from Tumor Suppressor to Metastasis Promoter in Breast Cancer by Contextual Changes of Smad Partners from p53 to Gli2', *Cancer Cell*, 27(2), pp. 177–192. doi: 10.1016/j.ccell.2014.11.025.

7 Teil III: weitere Ergebnisse

7.1 Einleitung und Zusammenfassung bisheriger Daten

Durch die vorangegangenen Experimente konnte gezeigt werden, dass LIPP das humane, zytosolische Adapterprotein 14-3-3ζ über die Plasmamembran rekrutiert. Die Interaktion findet innerhalb der ersten 30 min einer Cpn Infektion statt und ist unabhängig von anderen Proteinen. Die Interaktion von LIPP und 14-3-3 vermittelt einen positiven Effekt auf die chlamydiale Infektion. Zellen, die durch Transfektion eine erhöhte Menge an 14-3-3⁽ beinhalten, zeigen eine signifikant höhere Anzahl internalisierter EBs 2 h nach der Infektion (p.i.) sowie signifikant mehr Cpn Inklusionen 48 h p.i.. Dies ist das erste Mal, dass die Interaktion mit dem anti-apoptotischen Protein 14-3-3ζ durch ein bakterielles Adhäsin gezeigt werden konnte. Welche Domäne von LIPP an 14-3-3ζ bindet konnte jedoch bisher nicht aufgeklärt werden (Manuskript I). Um mit 14-3-3ζ zu interagieren, muss LIPP die humane Plasmamembran (PM) überwinden. In vorherigen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass LIPP an negativ geladene Phospholipide innerhalb Cholesterol-reichen Membranen (Lipid Rafts) bindet und Phosphatidylserin (PS) selbstständig externalisieren kann. Zudem hat eine Vorinkubation von humanen Zellen mit rLIPP einen Infektionserhöhenden Effekt. Dieser wird durch die ersten 150 Aminosäuren von LIPP vermittelt und ist ebenfalls auf eine erhöhte Aufnahme chlamydialer EBs zurückzuführen (Fechtner, Galle und Hegemann, 2016; Galle et al., 2019). Welche Domänen oder Strukturen für die PS Bindung und Externalisierung aber genau verantwortlich sind, war bis dato ungeklärt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass innerhalb der N-terminalen Hälfte von LIPP drei vorhergesagte amphipathische Helices (APHs) lokalisiert sind. Eine Charakterisierung dieser APHs ergab, dass sie für viele der LIPP-vermittelten Funktionen unabdingbar sind. Bindestudien an GUVs und Humanzellen zeigten, dass die ersten beiden APHs essenziell für die PS Bindung und -Externalisierung sind, während die dritte APH einen regulativen Effekt vermittelt und die Membranpenetration fördert. Eine Deletion der ersten APH führte zudem zum Verlust des Infektionserhöhenden Effekts und der 14-3-3ζ-Interaktion, womit sie unerlässlich für die erhöhte Aufnahme der Cpn EBs ist. Da Membran-verformende Proteine und Porenbildner häufig APHs zur Verformung/ Überwindung der Membran nutzen und sowohl die Interaktion mit 14-3-3ζ als auch der Infektions-erhöhende Effekt auf eine Überwindung der Plasmamembran zurückzuführen ist, wird postuliert, dass LIPP über die APHs eine Porenformation innerhalb der PM induziert. Die hydrophilen Seiten der APHs könnten dabei die Innenseite der Pore abbilden, während die hydrophoben Seiten mit den Fettsäureschwänzen der PM interagieren. Ein nicht identifizierter Teil von LIPP reicht daraufhin wahrscheinlich ins Zytoplasma der Humanzelle und rekrutiert 14-3-3 ζ zur Membran, wo es dann mit diesem interagiert. Zudem könnte über die gebildete Pore das PS auf die Außenseite der Membran gebracht werden. Voraussetzung dafür ist, dass LIPP die Membranpenetration induziert (Manuskript II).

7.2 Zielsetzung

Einer LIPP-vermittelten Membranpenetration geht initial eine Verformung der Plasmamembran voraus. Diese Funktion konnte für LIPP bisher nicht gezeigt werden. Ziel des dritten Teils dieser Arbeit war es daher neben der Oligomerisierung eine potenzielle LIPP-vermittelte Membranverformung zu untersuchen. rLIPP zeigt in Adhäsionsexperimenten eine APH unabhängige Bindung an humane Zellen. Auf Grund der Stärke der Bindung wird postuliert, dass der initiale Kontakt von LIPP mit der humanen Zelle entweder über einen proteinösen Interaktionspartner auf der humanen Zelloberfläche, oder über Teile der humanen extrazellulären Matrix, wie zum Beispiel Proteoglykan-Strukturen vermittelt wird. Der Interaktionspartner auf der Zelloberfläche konnte bisher nicht identifiziert werden. Die initiale Bindung von LIPP an die Humanzelle sollte daher näher untersucht werden.

7.3 Material

7.3.1 Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterialien	Hersteller	
1,5 ml Reaktionsgefäß	Eppendorf	
2,0 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt	
Dialyseklammern	Pierce	
Dialyseschlauche (Ausschlussgröße 12-14 kDa)	Serva	
Einmalspritzen Luer-Gewinde (50 ml)	Braun	
Elektroporations-Küvetten	Bio-Rad	
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	
Glasplättchen für Zellkultur (Deckgläschen ø 12 mm)	Roth	
Glaskolben (5 L, 350 ml, 100 ml)	Duran	
Glasflaschen (1 L, 500 ml, 250 ml, 100 ml)	Duran	
HiTrap™ 5 ml Chelating HP	GE Healthcare	
Kupfer-Grid (G400C)	Agar Scientific	
Küvette, Polystyrol	Sarstedt	
Latexhandschuhe	Meditrade	
Glasbecher (1L)	DURAN Group GmbH	
Native PAGE Novex Bis Tris Gele	Life Technologies	
PD-10-Säule	GE Healthcare	
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	
PVDF Transfer Membran	Millipore	
Reagenzglas	DURAN Group GmbH	
Sterilfilter 0,2 µm	Nalgene	
Superdex 200 Increase 10/300 GL Säule	GE Healthcare	
Ultrazentrifugationsröhrchen	Beckmann	
Zellkulturflasche (25 cm ²)	Thermo Scientific	

Gebrauchsmaterialien	Hersteller
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

7.3.2 Geräte und Maschinen

Geräte/Maschinen	Hersteller	
- 80 °C Freezer Modell 720	Thermo Electron Corporation	
ÄKTA Prime plus	GE Healthcare	
Analysenwaage Cubis H110	Satorius	
Bio Photometer-plis	Eppendorf	
Brutschrank HEPA-Class 100	ThermoEleectron Corporation	
Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Biosciences	
Electrophoresis Power Supply EPS 601	Amersham Biosciences	
Elektroporationsapparatur Gene Pulser	Bio Rad	
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	
Inkubator (37 °C)	Heraeus	
Inkubator (30 °C)	Memmert	
Laborwaage TE3102S	Satorius	

Geräte/Maschinen	Hersteller
Magnetrührer KMO 2 basic IKA-Werke GmbH & CO.	
Mikropipette Pipetman (2-20 µl)	Gilson
Mikropipette Pipetman (20-200 µl)	Gilson
Mikropipette Pipetman (200-1000 μl)	Gilson
Mikroskop Eclipse Ti-E mit A1R confocal laser	Nikon
Mikrowelle	Bosch
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	
Thermoblock West 6100 West Instruments	
Transelektronenmikroskop 120 kV JEM-1400	JEOL
Ultraschallstab Sonoplus HD2200	Bandelin
Vibrax VXR	IKA
Vortex-Genie 2	Scientific industries
XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System	Thermo
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

Geräte/Maschinen

Zentrifuge Rotanta 460R

Hettich

Hersteller

7.3.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	
Acrylamid (Rodiphorese Gel 30)	Roth	
Agar	Difco	
Agarose	Biozym	
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck	
Ammoniumsulfat	Roth	
Ampicillin	Sigma	
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva	
Bradford-Reagenz	Biorad	
Bromphenolblau	Fluka	
Calciumchlorid	Riedel-deHaën	
Chondroitinsulfat	Sigma	
Chloroform	Serva	
Coomasssie Brilliant Blau G250	Merck	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma	
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem	
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem	
Ethanol (96 %)	VWR	
Fötales Kälberserum (FKS)	Invitrogen	
Fungizone (Amphotericin B)	Invitrogen	
Glycerin	Roth	
Glutathion-Agarose	Sigma	
Hanks' Salzlösung (HBSS)	Invitrogen	
Heparin	Sigma	
Imidazol	AppliChem	
Inositol	Sigma	
Isopropanol	Roth	
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Thermo Scientific	
Kaliumacetat	Grüssing	
Kaliumchlorid	Roth	
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	

Chemikalie	Hersteller	
Lysozym	Sigma	
Magnesiumchlorid	Roth	
MEM Vitaminlösung	Invitrogen	
MEM Nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen	
Methanol	Riedel-deHaën	
Milchpulver	Roth	
N-Lauroylsarcosine (Sarkosyl)	Sigma	
Natriumacetat (NaAc)		
Natriumchlorid	VWR	
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem	
Natriumdodecylsulphat (SDS)	Roth	
Natriumhydrogencarbonat	Riedel-deHaën	
Natriumhydroxid	VWR	
Ni-NTA-Agarose	Qiagen	
Para-Formaldehyd (PFA)	Fluka	
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma	
Phospholipid 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC)	Life Technologies	
Phospholipid TexasRed-1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-	Life Technologies	
Phosphoethanolamine (DOPE)		
Phospholipid 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (DOPS)	Life Technologies	
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma	
Proteaseinhibitor-Cocktail (EDTA frei)	Roche	
Reduziertes L-Glutathion	Sigma	
Salzsäure (HCI)	Roth	
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva	
Tetracyclin	Sigma	
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth	
Triton X-100	Merck	
TurboFect™	Thermo Scientific	
Tween 20	Merck	
Vectashield (Anti-fade, mountig fluid)	Linaris	
Zelldissoziations-Lösung	Sigma	

7.3.4 Lösungen und Puffer

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
4 x Sammelgelpuffer (für Protein-Gele)	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
	0,4 % (w/v) SDS
4 x Trenngelpuffer (für Protein-Gele)	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
	0,4 % (w/v) SDS
Annexin Puffer (10 x)	100 mM Hepes/NaOH pH 7,4
	1,4 M NaCl
	5 mM CaCl ₂
Pleekierunge Läsung	2 % Milabaulyar
Diockleiungs-Losung	0,05 % Tween 20
	in PBS
Coomassie-Lösung	0.008 % (w/v) Coomassie-Brilliant-
	Blau-G-250
	35 mM HCl
	in ddH2O
Detektionspuffer (Westernblot)	0,1 M Tris/HCl pH9,5
	50 mM MgCl ₂
	in ddH₂Oັ
Farheubetratouffer	0.33 % BCIP
	0,33 % NBT
	in Detektionspuffer
Laufpuffer	0,05 M Tris
	0,2 M Glycin
	in ddH ₂ O
Lyseputfer	1 mM PMSF
	0,2 mg/ml Lysozym
	0,4 % Sarkosyl steril filtriert

0.4 % Triton X100 steril filtriert 0,01 % Protease Inhibitor in PBS Native PAGE Anoden Puffer 1 ml Kathoden Additive ad 200 ml ddH2O Native PAGE Laufpuffer (20 x) 90 ml Z0x Native PAGE S0 mM Bis Tris 1 ml Kathoden Additive ad 200 ml ddH2O Native PAGE Kathoden Puffer ad 1 L ddH2O Native PAGE Kathoden Puffer ad 1 L ddH2O Native PAGE Froben Puffer (4 x) 10 % Glycerol 0.001 % Ponceau S 50 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na2HPO4 1,8 mM KH2PO4 in ddH2O PFA Stocklösung 200 mM Tris/HCl pH 6,9 8 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 20 % Glycerin Puffer P1 50 mM Tris/HCl pH 8,0	Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
0,01 % Protease Inhibitor in PBSNative PAGE10 ml 20x Native PAGE Laufpuffer 1 ml Kathoden Additive ad 200 ml ddH ₂ ONative PAGE Laufpuffer (20 x)50 mM Bis Tris 50 mM Tricine pH 6.8Native PAGE Kathoden Puffer50 ml 20x Native PAGE Laufpuffer 4.8Native PAGE Kathoden Puffer60 N HCl 50 mM NaCl 10 % Glycerol 0.001 % Ponceau S 50 mM NaCl 10 % Glycerol 0.001 % Ponceau S 50 mM NaCl 10 % Glycerol 10.001 % Ponceau S 50 mM NaCl 10 % Glycerol 0.001 % Ponceau S 50 mM NaCl 10 mM Na2HPO4 1.8 mM KH2PO4 in ddH ₂ OPhosphate Buffered Saline (PBS)33 % (wiv) PFA 60 mM NaOH in PBSProtein-Ladepuffer (4-fach)200 mM Tris/HCl pH 6.9 8 % SDS 0.2 % Bromphenolblau 20 % GlycerinPuffer P150 mM Tris/HCl pH 8.0 10 mM FDTA pH 8.0		0,4 % Triton X100 steril filtriert
In PBSNative PAGE10 ml 20x Native PAGE LaufpufferAnoden Puffer1 ml Kathoden Additive ad 200 ml ddH20Native PAGE50 mM Bis Tris 50 mM Trioine pH 6.8Laufpuffer (20 x)50 ml 20x Native PAGE Laufpuffer ad 1 L ddH20Native PAGE50 ml 20x Native PAGE Laufpuffer ad 1 L ddH20Native PAGE6 N HCl 50 mM NaCl 10 % Glycerol 0.001 % Ponceau S 50 mM Bis Tris pH 7,2Phosphate Buffered Saline (PBS)137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na2HP04 1,8 mM KH2P04 in ddH20PFA Stocklösung30 % (w/v) PFA 60 mM NaOH in PBSProtein-Ladepuffer (4-fach)200 mM Tris/HCl pH 6,9 8 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 20 % GlycerinPuffer P150 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM FDTA nH 8 0		0,01 % Protease Inhibitor
Native PAGE Anoden Puffer10 ml 20x Native PAGE Laufpuffer 1 ml Kathoden Additive ad 200 ml ddH2ONative PAGE Laufpuffer (20 x)50 mM Bis Tris 50 mM Tricine pH 6.8Native PAGE Kathoden Puffer50 ml 20x Native PAGE Laufpuffer ad 1 L ddH2ONative PAGE Proben Puffer (4 x)6 N HCI 10 % Glycerol 0.001 % Ponceau S 50 mM Bis Tris pH 7.2Phosphate Buffered Saline (PBS)137 mM NaCl 10 mM Na2HPO4 1,8 mM KH2PO4 in ddH2OPFA Stocklösung30 % (w/v) PFA 60 mM NaCH in PBSProtein-Ladepuffer (4-fach)200 mM Tris/HCI pH 6.9 8 % SDS 0.2 % Bromphenolblau 20 % GlycerinPuffer P150 mM Tris/HCI pH 8.0 10 mM EDTA pH 8.0		in PBS
Anoden Puffer1 ml Kathoden Additive ad 200 ml ddH2ONative PAGE50 mM Bis Tris 50 mM Tricine pH 6.8Native PAGE50 ml 20x Native PAGE Laufpuffer ad 1 L ddH2ONative PAGE6 N HCI 50 mM NaCl 10 % Glycerol 0.001 % Ponceau S 50 mM Bis Tris pH 7.2Phosphate Buffered Saline (PBS)137 mM NaCl 10 mM Na2HPO4 1.8 mM KH2PO4 in ddH2OPFA Stocklösung30 % (w/v) PFA 8 % SDS 0.2 % Bromphenolblau 20 % GlycerinPuffer P150 mM Tris/HCl pH 6.9 8 % SDS 0.2 % Bromphenolblau 20 % Glycerin	Native PAGE	10 ml 20x Native PAGE Laufpuffer
ad 200 ml ddH2ONative PAGE Laufpuffer (20 x)50 mM Bis Tris 50 mM Tricine pH 6.8 50 ml 20x Native PAGE Laufpuffer ad 1 L ddH2ONative PAGE Kathoden Puffer6 N HCl 50 mM NaCl 10 % Glycerol 0.001 % Ponceau S 50 mM Bis Tris pH 7,2Phosphate Buffered Saline (PBS)137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na2HPO4 1,8 mM KH2PO4 in ddH2OPFA Stocklösung30 % (w/v) PFA 60 mM NaOH in PBSProtein-Ladepuffer (4-fach)200 mM Tris/HCl pH 6,9 8 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 20 % GlycerinPuffer P150 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0	Anoden Puffer	1 ml Kathoden Additive
Native PAGE50 mM Bis TrisLaufpuffer (20 x)50 mM TricinePH 6.850 ml 20x Native PAGE LaufpufferKathoden Pufferad 1 L ddH2ONative PAGE6 N HCIProben Puffer (4 x)50 mM NaCl10 % Glycerol0.001 % Ponceau S50 mM Bis Tris pH 7,2Phosphate Buffered Saline (PBS)137 mM NaCl2,7 mM KCl10 mM Na2HPO41,8 mM KH2PO41,8 mM KH2PO4in ddH2OPFA Stocklösung30 % (w/v) PFA60 mM NaOHin PBSProtein-Ladepuffer (4-fach)200 mM Tris/HCl pH 6,98 % SDS0,2 % Bromphenolblau20 % GlycerinPuffer P150 mM Tris/HCl pH 8,0		ad 200 ml ddH ₂ O
Laufpuffer (20 x)50 mM Tricine pH 6.8Native PAGE Kathoden Puffer50 ml 20x Native PAGE Laufpuffer ad 1 L ddH2ONative PAGE Proben Puffer (4 x)6 N HCl 50 mM NaCl 10 % Glycerol 0.001 % Ponceau S 50 mM Bis Tris pH 7,2Phosphate Buffered Saline (PBS)137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na2HPO4 1,8 mM KH2PO4 in ddH2OPFA Stocklösung30 % (w/v) PFA 60 mM NaOH in PBSProtein-Ladepuffer (4-fach)200 mM Tris/HCl pH 6,9 8 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 20 % GlycerinPuffer P150 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM FDTA pH 8,0	Native PAGE	50 mM Bis Tris
PH 6.8Native PAGE50 ml 20x Native PAGE LaufpufferKathoden Pufferad 1 L ddH2ONative PAGE6 N HClProben Puffer (4 x)50 mM NaCl10 % Glycerol0.001 % Ponceau S0.001 % Ponceau S50 mM Bis Tris pH 7,2Phosphate Buffered Saline (PBS)137 mM NaCl2,7 mM KCl10 mM Na2HPO41,8 mM KH2PO41,8 mM KH2PO41,8 mM KH2PO4in ddH2OPFA Stocklösung30 % (w/v) PFAProtein-Ladepuffer (4-fach)200 mM Tris/HCl pH 6,98 % SDS0,2 % Bromphenolblau20 % Glycerin50 mM Tris/HCl pH 8,0Puffer P150 mM Tris/HCl pH 8,0	Laufpuffer (20 x)	50 mM Tricine
Native PAGE Kathoden Puffer50 ml 20x Native PAGE Laufpuffer ad 1 L ddH2ONative PAGE Proben Puffer (4 x)6 N HCI 50 mM NaCI 10 % Glycerol 0.001 % Ponceau S 50 mM Bis Tris pH 7.2Phosphate Buffered Saline (PBS)137 mM NaCI 2,7 mM KCI 10 mM Na2HPO4 1,8 mM KH2PO4 in ddH2OPFA Stocklösung30 % (w/v) PFA 60 mM NaOH in PBSProtein-Ladepuffer (4-fach)200 mM Tris/HCI pH 6,9 8 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 20 % GlycerinPuffer P150 mM Tris/HCI pH 8,0 10 mM FDTA pH 8,0		pH 6.8
Kathoden Pufferad 1 L ddH2ONative PAGE6 N HCIProben Puffer (4 x)50 mM NaCI10 % Glycerol0.001 % Ponceau S0.001 % Ponceau S50 mM Bis Tris pH 7,2Phosphate Buffered Saline (PBS)137 mM NaCI2,7 mM KCI10 mM Na2HPO41,8 mM KH2PO41,8 mM KH2PO41,8 mM KH2PO41,8 mM KH2PO41 m PBS30 % (w/v) PFA60 mM NaOH0 mM NaOHProtein-Ladepuffer (4-fach)200 mM Tris/HCI pH 6,98 % SDS0,2 % Bromphenolblau20 % Glycerin30 % (u/c) Glycerin	Native PAGE	50 ml 20x Native PAGE Laufpuffer
Native PAGE6 N HClProben Puffer (4 x)50 mM NaCl10 % Glycerol0.001 % Ponceau S0.001 % Ponceau S50 mM Bis Tris pH 7,2Phosphate Buffered Saline (PBS)137 mM NaCl2,7 mM KCl10 mM Na2HPO41,8 mM KH2PO41,8 mM KH2PO41,8 mM KH2PO40 % (w/v) PFA60 mM NaOH98 % SDS0,2 % Bromphenolblau20 % GlycerinPuffer P150 mM Tris/HCl pH 8,0	Kathoden Puffer	ad 1 L ddH2O
Proben Puffer (4 x)50 mM NaCl 10 % Glycerol 0.001 % Ponceau S 50 mM Bis Tris pH 7,2Phosphate Buffered Saline (PBS)137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na2HPO4 1,8 mM KH2PO4 in dHzOPFA Stocklösung30 % (w/v) PFA 60 mM NaOH in PBSProtein-Ladepuffer (4-fach)200 mM Tris/HCl pH 6,9 8 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 20 % GlycerinPuffer P150 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0	Native PAGE	6 N HCI
10 % Glycerol 0.001 % Ponceau S 50 mM Bis Tris pH 7,2Phosphate Buffered Saline (PBS)137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na2HPO4 1,8 mM KH2PO4 in ddH2OPFA Stocklösung30 % (w/v) PFA 60 mM NaOH in PBSProtein-Ladepuffer (4-fach)200 mM Tris/HCl pH 6,9 8 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 20 % GlycerinPuffer P150 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0	Proben Puffer (4 x)	50 mM NaCl
0.001 % Ponceau S 50 mM Bis Tris pH 7,2Phosphate Buffered Saline (PBS)137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na2HPO4 1,8 mM KH2PO4 in dH2OPFA Stocklösung30 % (w/v) PFA 60 mM NaOH in PBSProtein-Ladepuffer (4-fach)200 mM Tris/HCl pH 6,9 8 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 20 % GlycerinPuffer P150 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM FDTA pH 8,0		10 % Glycerol
50 mM Bis Tris pH 7,2Phosphate Buffered Saline (PBS)137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na2HPO4 1,8 mM KH2PO4 in ddH2OPFA Stocklösung30 % (w/v) PFA 60 mM NaOH in PBSProtein-Ladepuffer (4-fach)200 mM Tris/HCl pH 6,9 8 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 20 % GlycerinPuffer P150 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM FDTA pH 8,0		0.001 % Ponceau S
Phosphate Buffered Saline (PBS)137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na2HPO4 1,8 mM KH2PO4 in ddH2OPFA Stocklösung30 % (w/v) PFA 60 mM NaOH in PBSProtein-Ladepuffer (4-fach)200 mM Tris/HCl pH 6,9 8 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 20 % GlycerinPuffer P150 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0		50 mM Bis Tris pH 7,2
2,7 mM KCI 10 mM Na2HPO4 1,8 mM KH2PO4 in ddH2OPFA Stocklösung30 % (w/v) PFA 60 mM NaOH in PBSProtein-Ladepuffer (4-fach)200 mM Tris/HCl pH 6,9 8 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 20 % GlycerinPuffer P150 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0	Phosphate Buffered Saline (PBS)	137 mM NaCl
10 mM Na2HPO4 1,8 mM KH2PO4 in ddH2OPFA Stocklösung30 % (w/v) PFA 60 mM NaOH in PBSProtein-Ladepuffer (4-fach)200 mM Tris/HCl pH 6,9 8 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 20 % GlycerinPuffer P150 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM FDTA pH 8,0		2,7 mM KCl
1,8 mM KH2PO4 in ddH2OPFA Stocklösung30 % (w/v) PFA 60 mM NaOH in PBSProtein-Ladepuffer (4-fach)200 mM Tris/HCl pH 6,9 8 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 20 % GlycerinPuffer P150 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0		10 mM Na2HPO4
in ddH ₂ O PFA Stocklösung Protein-Ladepuffer (4-fach) Puffer P1 in PBS in ddH ₂ O 30 % (w/v) PFA 60 mM NaOH in PBS 200 mM Tris/HCI pH 6,9 8 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 20 % Glycerin 50 mM Tris/HCI pH 8,0 10 mM EDTA pH 8.0		1,8 mM KH2PO4
PFA Stocklösung30 % (w/v) PFA 60 mM NaOH in PBSProtein-Ladepuffer (4-fach)200 mM Tris/HCl pH 6,9 8 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 20 % GlycerinPuffer P150 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM FDTA pH 8,0		in ddH ₂ O
Protein-Ladepuffer (4-fach) 200 mM Tris/HCl pH 6,9 8 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 20 % Glycerin 20 % Glycerin	PFA Stocklösung	30 % (w/v) PFA 60 mM NaOH in PBS
8 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 20 % Glycerin 50 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM FDTA pH 8 0	Protein-Ladepuffer (4-fach)	200 mM Tris/HCl pH 6,9
Puffer P1 50 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM FDTA pH 8 0		8 % SDS
20 % Glycerin Puffer P1 50 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM FDTA pH 8.0		0,2 % Bromphenolblau
Puffer P1 50 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM FDTA pH 8.0		20 % Glycerin
10 mM FDTA nH 8 0	Puffer P1	50 mM Tris/HCl pH 8 0
		10 mM EDTA pH 8.0

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung		
	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 ddH2O		
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		

7.3.5 Agarosen

Agarose	Hersteller
Glutathion Agarose	Sigma
Nickel-NTA-Agarose	Qiagen

7.3.6 Antikörper

7.3.6.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezifität	Ursprung	Verdünnung	Referenz
Anti-β-Aktin	Humanes Aktin	Maus	1:1000 (WB)	Sigma
Anti-GST	Glutathion-S-Transferase	Kaninchen	1:1000 (WB)	Santa Cruz
Anti-Penta-His	6x und 10x Histidin	Maus	1:2500 (WB)	Quiagen
Pathfinder	Chlamydiales LPS	Maus	1:6 (IF)	Biorad

IF=Immunofluoreszenz, WB=Westernblot

7.3.6.2 Sekundäre Antikörper

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

IF=Immunofluoreszenz, WB=Westernblot

7.3.7 Färbemittel

Färbemittel	Hersteller
Annexin V Fluos	Roche
DAPI	Sigma
DyLight 594 NHS Ester	Thermo Scientific
NHS- Fluorescein	Thermo Scientific

7.3.8 Kits

Kit	Hersteller	
Plasmid MIDI Kit	Quiagen	

7.3.9 Größenstandards

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

7.3.10 Plasmide

Interne Nr	Name	Vektor	Konstruktion
		VERIO	
# 1612	pFT8	рКМ32	Expressionsvektor: GST-Tag und C-terminaler 6x Histidin-Tag für <i>E. coli</i> (T. Fechtner)
# 1613	pFT9	pFT8	Expressionsvektor: <i>Cpn</i> OmcB_BD (AS 40-100) Mit N- terminalem GST-Tag und C-terminaler 6x Histidin-Tag für <i>E. coli</i> (T. Fechtner)
# 1740	pKM50	pKM23	Expressionsvektor: Invasin aus <i>Yersinia spp</i> . und C-terminaler 6x Histidin-Tag für <i>E. coli</i> (K. Mölleken)
# 1924	pFT25	pKM32	Expressionsvektor: C-terminaler 10x Histidin-Tag für <i>E. coli</i> (T. Fechtner)
# 1644	pKM36	pGEX-3X	Expressionsvektor: GST-Tag (K. Mölleken)
# 2138	pFT34	pFT25	Expressionsvektor: LIPP mit C-terminalen 10x Histidin-Tag für <i>E. coli</i> (T. Fechtner)
# 2510	pJG29	pFT8	Expressionsvektor: LIPP_BD mit 120 Bp flank N- + C-terminal mit GST und C-terminalen 10x Histidin-Tag für <i>E. coli</i> (J. Galle)
# 2732	pJG32	pFT8	Expressionsvektor: LIPP_IED (AS 1-176) 10x Histidin-Tag für <i>E. coli</i> (J. Galle)

# 2736	pJG34	pFT25	Expressionsvektor: LIPP ohne Transmembrandomäne (TM, Bp1174-1287, AS 392-429) (J. Galle)
# 2895	pPH16	pFT34	Expressionsvektor: LIPP ohne APH1 (Bp 364-414)
# 2896	pPH17	pFT34	Expressionsvektor: LIPP ohne APH2 (Bp 634-708)
# 2897	pPH18	pFT34	Expressionsvektor: LIPP ohne APH3 (Bp 823-888)
# 2898	pPH19	pFT34	Expressionsvektor: LIPP ohne APH1-3 (Bp 364-414, 634-708, 823-888)
# 2830	pDS12	рКМ36	Expressionsvektor: 14-3-3ζ mit N-terminalem GST-Tag (D. Spona)

7.3.11 Zellen und Zelllinien

7.3.11.1 Prokaryotische Zellen und Zelllinien

Escherichia coli:

BL21 (DE3)	<i>F- ompT hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal dcm</i> (DE3) (Invitrogen)
XL ₁ -blue	supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac-[F'
	proAB laclq ZM15 Tn10(tetr)] (Stratagene)

7.3.1 Eukaryotische Zelllinien

Epithelzellen:

HEp-2 Zelllinie:	epitheliales Larynxkarzinom-Zelllinie menschlichen Ursprungs,		
	HeLa-Morphologie, 46 Chromosomen (ATCC Nr.: CCL-23)		
CHO K1	Ovarien-Zelllinie, chinesischer Hamster (<i>Cricetulus griseus</i>), Epitheliale Morphologie, 22 Chromosomen (ATCC Nr.: CCL-61)		
CHO psgA-745	Ovarien-Zelllinie, chinesischer Hamster (<i>Cricetulus griseus</i>), Epitheliale Morphologie, 22 Chromosomen. Proteoglycan defizient (ATCC CRL-2242)		

CHO psgD-677	Ovarien-Zelllinie,		chinesischer		Hamster		(Cricetulus
	griseus),	Epitheli	iale	Morpholo	gie, 2	22 Ch	iromosomen
	Heparans	ulfat defiz	zient	(ATCC CR	L-2244	4)	

7.3.2 Medien:

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

7.3.2.1 Medien für Escherichia coli (E. coli)

In 1 Liter deionisiertem Wasser lösen und autoklavieren.

Selektion: Zugabe der Antibiotika Ampicillin (50 µg/ml) oder Kanamycin (15 µg/ml) nach Abkühlung des Mediums auf etwa 40 °C.

7.3.2.2 Zellkulturmedium

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

- 50 ml FKS (hitzeinaktiviert) Endkonzentration: 10 %
- 5 ml MEM nicht essenzielle 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 gemischt und bei 4℃ gelagert. Zellkulturzusätze wurden von der Firma Invitrogen bezogen. Die Zugabe von 25 µg/ml Plasmocyin während des Passagierens und Auftauens von Epithelzellen verhinderte eine mögliche Mykoplasmen-Kontaminationen.

7.4 Methoden

7.4.1 Molekularbiologische Methoden

7.4.1.1 Kultivierung von E. coli

Die Kultivierung der verwendeten *E. coli* Stämme erfolgte bei 37 ℃ unter aeroben Bedingungen und ständigem Schütteln in LB-Medium. Die Selektion von Transformanten wurde durch Zugabe von 50 µg/ml Ampicillin oder 15 µg/ml Kanamycin ins LB-Medium realisiert.

7.4.1.1.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Um Plasmid-DNA zur Produktion des Proteins-von-Interesse in *E. coli* Zellen einzubringen, werden elektrokompetente Zellen benötigt. Die Transformation von Plasmiden zur Vervielfältigung/Proteinexpression erfolgte in elektrokompetente *E. coli* XL1-blue/BL21-(DE3) Zellen:

- Zellen (aus der Stammsammlung) werden auf einer LB-Platte ausgestrichen und ü/N bei 37 °C inkubiert.
- Zwei 5 ml ü/N-Kulturen, aus denen am darauffolgenden Tag je eine 1 Liter Kultur in LB-Medium angeimpft wird, werden angesetzt (Start OD=0,1).
- Die Ernte der Zellen erflogt bei einer OD600 von 0,7 0,8 nach Inkubation bei 37 ℃ unter ständigem Schütteln.
- Die Kulturen werden auf Eis heruntergekühlt und bei 4 °C, 4000 Upm für 15 min (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 min zentrifugiert (Beckmann J2-21).
- Die Resuspendierung der elektrokompetenten Kulturen erfolgt in je 3 ml 10 %igem Glycerin.
 Aliquots (45 µl) werden für 1 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und elektrokompetenten Zellen bei -80 ℃ gelagert.

7.4.1.1.2 Transformation in *E. coli* durch Elektroporation

Bei der Transformation *via* Elektroporation werden die kompetenten Zellen elektrischer Spannung ausgesetzt, um sie für die Aufnahme von DNA vorzubereiten.

- Die Elektroporationsküvetten werden vorgekühlt und 10 μl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut.
- 1 μl der gereinigten Plasmid-DNA (10 ng/μl) werden mit 90 μl ddH2O und den *E. coli* Zellen auf Eis gemischt.

- Den Elektroporationsansatz in die Küvette geben und im Gene Pulser elektroporieren (Geräteparameter: Spannung 2,1 kV, 100 Ohm, 25 μF).
- 1 ml LB-Medium hinzugeben, das Gemisch in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen und anschließend für 1 h bei 37 ℃ unter ständigem Schütteln inkubieren.
- Die Zellen werden für 5 sek bei 13.000 Upm herunter zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in 100 µl LB resuspendiert und auf LB- Platten mit entsprechender Antibiotika-Selektion ausgestrichen.
- Die Platten werden ü/N bei 37 °C inkubiert.

7.4.1.1.3 Plasmid-DNA Präparation aus E. coli

Plasmide aus E. coli-Zellen können für weitere experimentelle Anwendungen aus diesen isoliert werden.

Plasmid-Midi-Präparation

Die Midi-Präparation dient der Plasmid-Gewinnung aus einer 50 ml *E. coli* Kultur. Puffer und etwaige Verbrauchsmaterialien stammen aus dem Qiagen Plasmid MIDI-Kit. Die Zentrifugation-Schritte erfolgen bei 4 ℃ (Megafuge 1.0R).

- Eine *E. coli*-Kultur wird in 50 ml LB-Medium + entsprechendes Antibiotikum inokuliert und ü/N bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert.
- Die Kultur wird in einem 50 ml Falcon f
 ür 15 min bei 6.000 Upm zentrifugiert und das Pellet dann in 4 ml eiskaltem Puffer P1 mit RNase (100 µg/ml) resuspendiert.
- 4 ml Puffer P2 zur Zellsuspension hinzufügen, sechsmal vorsichtig invertieren und 5 min bei RT inkubieren.
- 4 ml Puffer P3 zum Ansatz geben, 6-mal invertieren und 15 min auf Eis inkubieren.
- Die Probe wird erneut invertiert und anschließend für 30 min bei 6.000 Upm zentrifugiert.
- Der Überstand wird in ein 15 ml Falcon gegeben und erneut für 15 min zentrifugiert.
- Ein Qiagen tip100-Röhrchen mit 4 ml Puffer QBT equilibrieren und den Überstand in das tip100-Röhrchen geben.
- Nach Durchlaufen des Überstands das Röhrchen zwei-fach mit 10 ml Puffer QC waschen.
- Enthaltene DNA durch Zugabe von 5 ml Puffer QF in ein 15 ml Falcon eluieren.
- 3,5 ml Isopropanol hinzugeben, vortexen und für 15 min bei -20 °C inkubieren.
- Eluierte DNA bei 13.000 Upm und RT 30 min zentrifugieren.
- DNA mit 70 % igem Ethanol waschen und im Vakuum-Konzentrator (SpeedVac) trocknen.
- Die DNA in 100 µl ddH2O lösen und bei -20 °C lagern.

7.4.1.2 Kultivierung eukaryotischer Epithelzellen

7.4.1.2.1 Herstellung der Lösungen und Medien für die Zellkultur

Fötales Kälber-Serum (FKS) enthält eine Vielzahl verschiedener Proteine wie Wachstumsfaktoren, die für die Kultivierung von Zellen in einer Zellkultur essenziell sind. Das Enzym Trypsin ist eine Sequenzunspezifische Protease. Sie dient der Ablösung humaner Zellen von der Oberfläche der Zellkulturflaschen. Nach der Zellablösung durch Trypsin bietet FKS alternative Substrate für die Reaktion und stoppt diese damit.

- FKS wird bei RT aufgetaut.
- Das Serum bei 56 °C für 60 min im Wasserbad hitzeinaktivieren.
- Das hitzeinaktivierte Serum steril aliquotieren (50 ml) und bei -20 °C lagern.
- Vitamine ebenfalls steril aliquotiert (5 ml) und bei -20 °C lagern.
- 10 x Trypsin/EDTA (Invitrogen) in 5 ml Aliquots bei -20 ℃ 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.

7.4.1.2.2 Herstellung des Zellkulturmediums

Alle genutzten Zellinien werden in Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM + GlutaMAX) kultiviert. Zu 500 ml des entsprechenden Mediums werden folgende Zusätze hinzugegeben:

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

7.4.1.2.3 Trypsin Behandlung von Epithelzellen

Zellen werden mit der Proteinase Trypsin von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgelöst. Die Inkubationsdauer sollte hierbei 10 min bei RT nicht überschreiten, um Schäden Zellen zu vermeiden.

- Das Zellkulturmedium aus einer 75 cm2 abnehmen und mit 10 ml HBSS waschen.
- 5 ml der 0,5 x Trypsin-Lösung in die Zellkulturflasche geben, bei 37 ℃ inkubieren und die Zellen unter gelegentlichem Schwenken lösen.
- Die Reaktion durch Zugabe von 5 ml Zellkulturmedium abstoppen.
- Zellsuspension abnehmen und in ein 12 ml Zentrifugations-Röhrchen überführen.
- 10 min bei 43.3 g (500 Upm/Rotanta 460R) und 25 °C zentrifugieren.
- Das Zellpellet in 5 ml Zellkulturmedium resuspendieren.
7.4.1.2.4 Auftauen von Epithelzellen

Zellen können in Biofreeze resuspendiert und anschließend bei -80 °C gelagert werden.

- Aliquot bei RT auftauen.
- Zellen und 15 ml Zellkulturmedium in eine 75 cm2 Zellkulturflasche geben.
- Die Zellkulturflasche bei 37 °C und 6 % CO2 inkubieren.

7.4.1.2.5 Passagieren von Epithelzellen in große Flaschen (75 cm²)

Die Kultivierung von 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) zugegeben.

- 15 ml Zellkulturmedium in eine Zellkulturflasche pipettieren.
- 500 µl der Trypsin-behandelte Zellen zuführen.
- Zellen für 2 Tage bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubieren.

7.4.1.2.6 Passagieren von Epithelzellen in kleine Flaschen (25 cm²)

Die Herstellung Gradienten-gereinigter Chlamydien erfolgt in 25 cm² Zellkulturflaschen. In einer 25 cm² Zellkulturflasche befinden sich bei konfluentem Wachstum etwa $2,5 \times 10^7$ Epithelzellen.

- 5 ml Zellkulturmedium in die Zellkulturflasche pipettieren.
- 250 µl der Trypsin-behandelten HEp-2 Zellen ins Medium überführen.
- Inkubation für 2 Tage bei 37 °C und 6 % CO².

7.4.1.2.7 Passagieren von Epithelzellen in 24-Well Platten

Für die Bindungsstudien und Infektionsexperimente werden die Epithelzellen in einer 24-Well Platte ausgesät. Bei nachfolgender Mikroskopie wird je ein Deckgläschen (ø 12mm) pro Well vorgelegt. Ein Well beherbergt bei konfluentem Wachstum etwa 1 x 10⁶ Epithelzellen.

- Die Trypsin-behandelten Zellen je nach Bedarf in Zellkulturmedium verdünnen.
- 1 ml der verdünnten Suspension/Well pipettiert.
- Mögliche Luftblasen unter den Glasplättchen mit einer sterilen Spitze herausdrücken.
- Die 24-Well Platte für 1-2 Tage bei 37 ℃ und 6 % CO² inkubieren.

7.4.1.3 Kultivierung von Cpn

Chlamydien sind obligat intrazelluläre Bakterien, die sich ausschließlich innerhalb ihrer Wirtszelle vermehren. Zur Verbesserung und Synchronisation der Infektion werden die EBs auf die HEp-2 Wirtszellen

zentrifugiert. Ein Medienwechsel mit Zellkulturmedium inklusive Cyclohexamid verbessert die Infektion durch Hemmung der wirtszelleigenen Proteinbiosynthese bei gleichzeitiger Erhöhung der ATP-Synthese.

7.4.1.3.1 Primärinfektion von Chlamydien

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

- Eine Chlamydien-Suspension aus dem -80 ℃-Schrank bei 37 ℃ im Brutschrank auftauen.
- Mit 1 ml aufgetauter Chlamydiensuspension können bis zu vier konfluent bewachsene 25 cm²
 Zellkulturflaschen infiziert werden.
- Die aufgetaute Suspension durch Zugabe von Zellkulturmedium auf ein Volumen von 5 ml pro 25 cm² Zellkulturflasche verdünnen.
- 8 konfluent bewachsenen Zellkulturflaschen einfach mit HBSS waschen.
- Das Medium inklusive der infektiösen Chlamydien vorsichtig in die Flaschen pipettieren.
- Die Flaschen f
 ür 60 min bei 30 °C und 1560 g (2920 Upm/Rotanta 460R) zentrifugieren und f
 ür 1 h bei 37 °C und 6 % CO² inkubieren.
- Das Medium abnehmen und die infizierten Zellen mit 5 ml Zellkulturmedium + 1,2 µg/ml Cyclohexamid überschichtet.
- Die Flaschen erneut bei 37°C und 6 % CO2 für 72 h inkubieren.
- Die infizierten Zellen nun mit einem sterilen Zellschaber vom Flaschenboden lösen.
- Die Suspension (40 ml, vereint in einem Falcon-Röhrchen) für 45 sek bei 40 % Leistung mit dem Ultraschallstab (Sonoplus HD2200) sonifizieren.
- Die Suspension für 10 min bei 2670 Upm (Rotanta 460R) und 20 °C zentrifugieren (Differentialzentrifugation).
- Der Überstand in ein neues Röhrchen überführen und erneut zentrifugieren.
- Der Überstand des zweiten Zentrifugationsschrittes kann zur weiteren Infektion neuer konfluent bewachsener 25 cm2 Zellkulturflaschen verwendet oder eingefroren werden.

7.4.1.3.2 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.

- Den Überstand einer primären Chlamydien-Infektion mit 5 ml Zellkulturmedium pro 25 cm² Zellkulturflasche mischen.
- Das Medium inklusive der infektiösen Chlamydien auf 32 konfluent bewachsene 25 cm2
 Zellkulturflaschen verteilen.
- Die Flaschen für 60 min bei 30 ℃ und 1560 g (2920 Upm/Rotanta 460R) zentrifugieren, anschließend für 1 h bei 37 ℃ und 6 % CO₂ inkubieren.

- Das Medium abnehmen und die infizierten Zellen mit 6 ml Zellkulturmedium + 1,2 μg/ml Cyclohexamid überschichten.
- Die Flaschen bei 37 ℃ und 6 % CO² für 72 h inkubieren.
- Die infizierten Zellen nun mit einem sterilen Zellschaber vom Flaschenboden lösen.
- Die Suspension in 50 ml Falcon-Röhrchen für 45 sek bei 40 % Leistung mit dem Ultraschallstab (Sonoplus HD2200) sonifizieren.
- Die Suspension nun für 10 min bei 2670 Upm (Rotanta 460R) und 20 ℃ zentrifugieren (Differentialzentrifugation).
- Den Überstand in ein neues Röhrchen überführen und erneut zentrifugieren.
- Der Überstand des zweiten Zentrifugationsschrittes kann anschließend *via* Dichtegradientenzentrifugation gereinigt werden.

7.4.1.3.3 Reinigung von Chlamydien durch Dichtegradientenzentrifugation

Durch die Dichtegradientenzentrifugation werden Chlamydien von eukaryotischen Zelltrümmern gereinigt. Die Gradienten-gereinigten Chlamydien können im Folgenden für Infektionsstudien verwendet werden.

- Den Überstand einer sekundären Infektion in ein steriles Ultrazentrifugationsröhrchen überführen.
- Anschließend das Röhrchen f
 ür 30 min bei 4 °C und 30.000 g (15.000 Upm/Beckmann Avanti J-25) zentrifugieren.
- Das Pellet in 1 ml HBSS resuspendieren und für 30 min bei 4 ℃ und 21885 g (15.000 Upm/Heraeus Biofuge Primo R) zentrifugieren.
- Das Pellet nun in 1 ml HBSS im Ultraschallwasserbad vollständig resuspendieren.
- Ein steriles Zentrifugationsröhrchen mit 9 ml 30 % Gastrographin in sterilem ddH2O befüllen.
- Der Gastrographin-Gradienten mit der Chlamydiensuspension überschichten und 1 h bei 4 ℃ und 30.000 g (15.000 Upm/Beckmann J2-21) zentrifugiert.
- Den Überstand abnehmen und das Chlamydienpellet in 1 ml HBSS resuspendieren.
- Mixtur für 30 min bei 4 °C und 21885 g (15.000 Upm/Heraeus Biofuge Primo R) zentrifugieren.
- Das Pellet in 1 ml HBSS resuspendieren und erneut zentrifugieren.
- Das Chlamydienpellet nun in 200 µl SPG-Puffer vollständig resuspendieren (Ultraschallwasserbad) und auf 1 ml mit SPG-Puffer aufgefüllen.
- Die Gradienten-gereinigten Chlamydien können in 200 µl Aliquots bei -80 °C gelagert werden.
- Die Infektiosität wird bei 63-facher Vergrößerung in einer 96 Well Platte durch Auszählen aller Zellen und darin eingeschlossener Inklusionen ermittelt.

7.4.2 Biochemische Methoden

7.4.2.1 Induktion der Genexpression in *E. coli*

Die Gene von Interesse auf den Expressionsvektoren, transformiert in den *E. coli*-Stamm BL21 stehen unter der Kontrolle eines lac-Operators. Die Induktion der Expression erfolgt durch die Zugabe von IPTG. Vorangehend wurden die entsprechenden Plasmide in die *E. coli* Zellen elektroporiert.

- Zuerst erfolgt die photometrische Bestimmung der Zellzahl einer 50 ml ü/N-Kultur (Eppendorf Photometer).
- Eine 1 L Induktionskultur wird anschließend mit einer OD600 = 0,1 in LB-Medium + entsprechender Antibiotika-Selektion angeimpft und bei 37 ℃ unter ständigem Schütteln inkubiert.
- Die Induktion der Genexpression wird mit 1 mM IPTG bei einer OD von 0,4 0,6 vorgenommen.
- Die Kultur f
 ür 4 h bei 37 ℃ sch
 üttelnd inkubieren. Alternativ kann die Induktion auch f
 ür 16 h bei 16 ℃ vorgenommen werden.
- Die Zellen werden anschließend bei 5.000 Upm und 4 °C f
 ür 10 Min abzentrifugiert und das Zellpellet mit 40 ml PBS gewaschen. Danach erneut f
 ür 5 min bei 4.600 Upm und 4 °C zentrifugieren.
- Das Pellet wird in 1 ml PBS resuspendiert und die Zellen lysiert.

7.4.2.2 Affinitätschromatographische-Reinigung von Proteinen

Durch die Affinitätschromatographische-Reinigung ist es möglich das, auf dem Plasmid exprimierte Proteine-von-Interesse spezifisch aus der Zellsuspension zu isolieren. Voraussetzung ist die Lysierung der Zelle und Fusion des Zielproteins mit einem Tag, welcher eine hohe Affinität zu einem spezifischen Trägermaterial besitzt. Über diesen kann das Zielprotein von Fremdproteinen und anderen Molekülen getrennt sowie schlussendlich durch Zugabe eines spezifischen Kompetitor des Trägermaterial isoliert und anschließend eluiert werden. Die Reinigung erfolgt unter nativen Bedingungen, um die natürliche Konformation und Funktionalität des Zielproteins nicht zu beeinflussen.

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

Die Lyse der *E. coli*-Zellen erfolgt durch eine Lysozym-Behandlung mit anschließender Sonifikation.

- Das Zellpellet der Induktionskultur in 50 ml Lysepuffer resuspendieren und ü/N auf Eis inkubieren.
- Am nächsten Tag das Lysat dreimal für 10 sek auf Eis sonifizieren und zwischen den einzelnen Sonifikationen 60 sek pausieren, um ein Überhitzen zu verhindern.
- Lysat dann bei 4 ℃ und 15.000 Upm (Avanti J-25) für 30 min zentrifugieren.
- Der klare Überstand kann für die Reinigung genutzt werden.

7.4.2.2.2 Native Reinigung über den His-Tag

Über Oligohistidine kann in einem Chelatkomplex eine Bindung mit zweiwertigen Nickel-Ionen initiiert werden. Bei der Aufreinigung von His-getaggten Proteinen wird diese Affinität genutzt. Innerhalb der Affinitätschromatographie-Säule sind Ni2+-Ionen über Nitrilotriessigsäure (NTA) an eine Agarose gebunden. Die Bindung durch die Histidine geschieht im Austausch mit Wassermolekülen, welche an die Ionen angelagert sind. Durch Zugabe des starken Kompetitors Imidazol wird die Bindung der HIS-getaggten Proteine mit der Nickel-NTA ersetzt und das Protein von Interesse eluiert. Die Reinigung wird bei 4 °C und mit vorgekühlten Puffern durchgeführt.

- 1 ml Nickel-NTA-Agarose zwei-fach mit 10 ml PBS waschen.
- Den geklärte Überstand für 2 h bei 4 ℃ mit der Agarose rotierend inkubieren.
- Eine Proteinsäule mit einem Gazestopfen sowie einem Stopfen versehen.
- Das Protein-Nickel-NTA-Agarose-Gemisch auf die Säule geben und durchlaufen gelassen.
- Proteine, fusioniert mit einem Oligo-Histidin-Tag und gebunden an die Nickel-NTA, verbleiben gebunden an die Agarose.
- Die Säule mit 10 ml Waschpuffer I (PBS, 40 mM Imidazol, Protease Inhibitor (1:100)) und 10 ml Waschpuffer II (PBS, 80 mM Imidazol, Protease Inhibitor (1:100)) waschen.
- Anschließend erfolgt die Elution der getaggten Proteine mit 4 x 1 ml Elutionspuffer (PBS, 500 mM Imidazol, Protease Inhibitor (1:100)).
- Jede Elution wird dabei 10 min mit der Agarose inkubiert.

7.4.2.2.3 Native Reinigung über den GST-Tag

Auch Proteine welche mit GST (Glutathion-S-Transferase) fusioniert sind, können über eine Affinitätschromatographie aus einem Zelllysat eluiert werden. Dabei wird die Affinität der Glutathion-S-Transferase zu Glutathion, ebenfalls gebunden an eine Agarose, genutzt. Als Kompetitor zur Elution der Fusionsproteine wird reduziertes Glutathion verwendet. Die Reinigung wird ebenfalls bei 4 °C und vorgekühlten Puffern durchgeführt, um eine Degradation des Proteins vorzubeugen.

- Zuerst 0,5 ml Glutathion-Agarose zwei-fach mit 10 ml PBS waschen.
- Den Überstand des Zelllysats mit der GST-Agarose f
 ür 2 h unter st
 ändigem Rotieren bei 4 °C inkubieren.
- Eine Proteinsäule mit einem Gazestopfen und mit einem Stopfen versehen.
- Das Protein-Agarose-Gemisch auf die Säule laden.
- Die Säule dreimal mit 10 ml PBS waschen.
- Die Fusionsproteine dann mit 5 x 1 ml TrisHCl (pH 8) + 150 mM NaCl und 10 mM red. Glutathion eluieren. Der pH muss nach Zugabe des Glutathions kontrolliert werden.
- Jede Elution wird dabei 10 min inkubiert.

7.4.2.2.4 Dialyse von Proteinen

Um etwaige Kompetitoren (Imidazol/reduziertes Glutathion) aus den gereinigten Proteinlösungen zu entfernen, müssen Proteine nach der Reinigung dialysiert werden.

- Pro Elutionsfraktion einen 5 cm langer Dialyseschlauch f
 ür 10 min in deionisiertem Wasser bei 100
 °C erhitzen.
- Die Dialyseschläuche werden auf Eis abgekühlt und einseitig mit einer Klemme verschlossen.
- Nun die Proteinlösung mit einer Pipette in den Dialyseschlauch überführen und die andere Seite ebenfalls mit einer Klemme verschließen.
- Die gefüllten Schläuche ü/N in 1 L PBS bei 4 ℃ dialysieren.
- Am nächsten Tag die Lösungen in ein neues Reaktionsgefäß überführen und Proteinmenge bestimmen.
- Die dialysierten Proteinlösungen können bei 4 °C auf Eis gelagert werden.

7.4.2.2.5 Proteinmengenbestimmung mittels Bradford-Reagenz

Bei der Konzentrationsbestimmung durch das Bradford-Reagenz wird die Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie-Brilliant-Blau (Coomassie) genutzt. In der ungebundenen, kationischen, roten Form hat der Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei 470 nm. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff in seiner deprotonierten, anionischen Sulfonat-Form stabilisiert, wodurch das Absorptionsmaximum auf 595 nm verschoben wird. Die Proteinkonzentration in einer Lösung kann so aus der optischen Dichte bei einer Wellenglänge von 595 nm berechnet werden.

- 780 µl Wasser mit 20 µl Proteinlösung und 200 µl Bradford-Reagenz mischen und für 10 min bei RT inkubieren. Als Kontrolle dient ein Mix aus 800 µl Wasser und 200 µl Bradford Reagenz.
- Die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch messen (Eppendorf Spektrometer).
- Über eine Eichkurve von 0,5-10 µg BSA kann ein Faktor für die folgende Formel zur Berechnung der Konzentration einer Proteinlösung aufgestellt werden: Konzentration = Absorption bei 595 nm/ (Faktor * Verdünnungsfaktor)

7.4.2.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Sauberkeit des gereinigten Proteins kann in der SDS-PAGE verifiziert werden. Im Polyacrylamid-Gel werden Proteine innerhalb eines Spannungsfeldes nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Dabei überlagert das enthaltene SDS die Eigenladung der Proteine mit einer konstant negativen Ladung (1,4 g SDS pro 1 g Protein) und lässt die Proteine in Richtung des positiven Pols durch das Gel wandern. Größere Proteine wandern dabei langsamer als kleinere Proteine.

7.4.2.3.1 Proteinproben-Vorbereitung

Vor Analyse der Proteine im Polyacrylamid-Gel werden diese durch Hitze und Dithiothreitol (DTT) denaturiert. Die Denaturierung löst die Tertiärstruktur von Proteinen auf damit diese besser durch das Gel wandern.

- Die Proben mit 100 mM DTT und 4 x Proteinladepuffer vermischen.
- Daraufhin wird das Gemisch für mindestens 10 min bei 100 ℃ gekocht und anschließend sofort auf Eis abgekühlt.
- Die Proteinprobe kann nun auf ein SDS-PAGE-Gel geladen werden.

7.4.2.3.2 Herstellung des SDS-Polyacrylamidgel

Ein SDS-Polyacrylamidgel besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel. Beide Teile haben einen unterschiedlichen pH und Einfluss auf die geladenen Proteinlösungen. Im Sammelgel werden die Proteine vor dem Trenngel in einer Ebene aufkonzentriert, bevor sie sich im Trenngel ihrer Größe nach auftrennen.

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):

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

- Eine Glasplatte wird, getrennt durch zwei Abstandshaltern, auf eine Teflon-Platte gelegt und in die Gießapparatur geklemmt.
- Das Trenngel in die vorgesehene Kammer zwischen Glasplatte und Teflonplatte gießen und sofort Isopropanol aufs Trenngel pipettieren.
- Nach Auspolymerisation der Gels, das Isopropanol abnehmen und dreimal mit ddH₂O waschen.
- Nun das flüssige Sammelgel auf das Trenngel geben und sofort einen Kamm in das Sammelgel drücken.
- Nach Auspolymerisation kann das Gel direkt verwendet, oder bei 4 °C aufbewahrt werden.

7.4.2.3.3 SDS-Gelelektrophorese

- Das Gel in die SDS-PAGE-Apparatur einspannen und diese mit Laufpuffer auffüllen.
- 15µl der Proteinproben in die vorgesehenen Taschen pipettieren.

- Die Elektrophorese bei 200 V und etwa 50 mA für 1 h und 20 min laufen lassen (Power Supplies Electrophoresis).

7.4.2.3.4 Färbung von Proteingelen mit Coomassie-Blau

Die im SDS-Gel separierten Proteine sind für das menschliche Auge unsichbar. Durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G-250 können Proteinbanden bis zu einer Konzentration von 500 ng sichtbar gemacht werden. Dafür lagert sich im Mix befindliches Coomassie an die Seitenketten basischer Aminosäuren an. Dies färbt damit das gesamte Protein.

- Das Proteingel drei-fach in Wasser in der Mikrowelle erhitzen (jeweils 30 sek bei 360 Watt) und daraufhin zwischen den Schritten für 10 min auf einem Schüttler waschen.
- Nun die Coomassie-Lösung auf das Gel geben und wieder f
 ür 30 sek bei 360 Watt in der Mikrowelle erhitzen.
- Die eigentliche Färbung erfolgt für 1 h unter RT auf dem Schüttler.
- Nach erfolgreicher Färbung die Coomassie Lösung abnehmen und das Gel in Wasser waschen.

7.4.2.4 Native Gelelektrophorese (NATIVE PAGE)

In der nativen Gelelektrophorese werden Proteine ebenfalls ihrer Größe nach aufgetrennt. Im Gegensatz zur SDS-PAGE finden die Auftrennung unter nativen Bedingungen statt, wodurch Proteinkomplexe analysiert werden können. Die verwendeten Gele (NativePAGE Novex Bis Tris Gele (Life technologies) sind mit einem Acrylamid Gradient von 3 % bis 12 % ausgestattet.

- Zuerst die Proteinprobe (2 µg) mit Native PAGE Probenpuffer (4 x) auf Eis mischen.
- Das NativePAGE Novex Bis Tris Gel aus der Verpackung entfernen, den Klebestreifen abziehen und es in die Native PAGE Apparatur einspannen.
- Den Bereich rückseitig zum Gel mit Native PAGE Kathoden-Puffer füllen.
- Der Bereich vor dem Gel mit Native PAGE Anoden-Puffer füllen.
- Die Proteinproben (maximal 20 µl) in die Taschen pipettieren.
- 5 μl des NativeMark Unstained Protein Standard in eine freie Tasche pipettieren und Apparatur schließen.
- Die Elektrophorese erfolgt nun bei 4 ℃ f
 ür 60 Min und 150 V (8-10 mA). Danach wird die Spannung f
 ür weitere 60 Min, oder bis der Marker durchgelaufen ist auf 250 V (2-4 mA) eingestellt.
- Das Gel anschließend mit Coomassie färben.

7.4.2.5 Westernblotanalyse

Proteine die *via* SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden können anschließend auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert, immobilisiert und durch sekundäre Antikörperfärbung detektiert werden.

7.4.2.5.1 Proteintransfer auf eine PVDF Membran

Vor Transfer der Proteine wird die hydrophobe PVDF-Membran zunächst in Methanol aktiviert. Auf Grund des amphipathischen Charakters von Methanol wird die Oberfläche der PVDF-Membran hydrophilisiert und somit für den Proteintransfer empfänglich.

- Zwei Filterpapiere (Blotting PADs) (7 x 10 cm) und eine PVDF-Transfermembran (7 x 9 cm) zurechtschneiden.
- Die Filterpapiere für 10 min in Transferpuffer inkubieren.
- Die Transfermembran für 10 Sek. in Methanol aktivieren, dann für 10 min in Transferpuffer equilibrieren.
- Das erste Filterpapier auf die untere Metallplatte einer G2 Fast Blotter Apparatur (Pierce) legen.
- Der Reihe nach dann die Transfermembran, das SDS-Gel und das zweite Filterpapier auflegen.
- Mit Hilfe einer Rolle Luftblasen aus den Zwischenräumen drücken.
- Die Blotapparatur schließen und in die Dockingstation setzen.
- Der Transfer der Proteine erfolgt bei 25 V und 1 A für 20 min.
- Die PVDF-Membran anschließend für 1 h unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur in Blockierungslösung inkubieren.

7.4.2.5.2 Farbentwicklung mittels Alkalischer Phosphatase

Bei der alkalischen Phosphatase (AP) werden Phosphate von ihrem Substrat gespalten. Die in dieser Arbeit genutzten Sekundärantikörper sind AP-konjugiert. Während der Inkubation mit BCIP (5-Brom-4chlor-3-indoxylphosphat) und NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) spaltet die AP die Phosphate von den Substraten ab, worauf BCIP und NBT miteinander reagieren. NBT oxidiert BCIP zu einem wasserunlöslichen blauen Indigo-Farbstoff, NBT wird zu einem wasserunlöslichen blauen Formazan-Farbstoff reduziert. Beide Farbstoffe fallen auf der Membran an der Position nieder, wo der AP-konjugiert Antikörper am Protein gebunden ist wodurch dieses detektiert werden kann.

- Die Antikörper-behandelte Membran wird für 10 min bei RT in Detektionspuffer equilibriert.
- Die Membran wird nun im Farbsubstratpuffer inkubiert, bis die Färbung eintritt.
- Anschließend wird die Farbreaktion durch mehrmaliges Waschen mit Wasser abgestoppt.
- Die Membran wird getrocknet und abschließend dokumentiert (Geldokumentationssystem).

7.4.2.6 Fluoreszenz-Markierung von rekombinant-hergestellten Proteinen

7.4.2.6.1 Markierung mit Fluorescein

Um rekombinant hergestellte Proteine ohne Antikörperfärbung in der Mikroskopie verwenden zu können, müssen diese mit fluoreszenten Farbstoffen sichtbar gemacht werden. Dies kann beispielsweise über N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ester, wie im NHS-Fluorescein, realisiert werden. Der Ester interagiert mit primären Aminogruppen innerhalb des Proteins und formt eine stabile Amidbindung unter Abspaltung des NHS aus. Fluorescein-markierte Proteine können bei einer Wellenlänge von 494 nm angeregt werden.

- Zuerst 1 mg NHS-Fluorescein in 100 µl DMSO lösen.

- Das Fluorescein nun in 20-fachem Überschuss (Berechnung siehe Formel) zur Proteinlösung geben.

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

MW=Molekulargewicht; x=Überschuss NHS-Fluorescein

- Die Inkubation erfolgt für mindestens 2 h auf Eis.
- Durch Zugabe von 1 M Tris/HCl pH8 in einer finalen Konzentration von 50 mM für 1 h wird die Reaktion abgestoppt (Quenching).
- Überschüssiges NHS-Fluorescein muss mittels Dialyse in 1 L PBS ü/N entfernt werden.
- Nach Auftrennung in einer SDS-PAGE kann die Fluorescein-Markierung *via* UV-Licht überprüft werden.

7.4.2.6.2 Markierung mit DyLight

Die DyLight Farbstoffe (Amine Reactive Dyes 594) besitzen, genau wie das Fluorescein NHS-Ester. Von Vorteil ist die vergleichsweise intensive und stabile Markierung verglichen mit Fluorescein. Dylight markierte Proteine können bei einer Wellenlänge von 594 nm angeregt werden.

- Zuerst 50 μg DyLight Farbstoff mit der 1,25 mg der aufgereinigten Proteinlösung für 2 h auf Eis inkubieren.
- Nun die Reaktion durch Zugabe von 1 M Tris/HCI pH8 in einer finalen Konzentration von 50 mM für 1 h abstoppen (Quenching).
- Überschüssiger Farbstoff muss *via* Dialyse in 1 L PBS ü/N entfernt werden.
- Auch DyLight-Markierung kann via UV-Licht nachgewiesen werden.

7.4.2.7 Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*;

SEC) zur Analyse löslicher Proteine

Um die Größe gereinigter Proteine ungefähr zu bestimmen kann die SEC genutzt werden. Im Gegensatz zur nativen Gelelektrophorese wird hier ein Säulenmaterial benutzt und die Größe potenzieller Proteinkomplexe anhand des Laufverhaltens von genormten Referenzproteinen abgeschätzt.

- Rekombinante Proteine durch 1 h Zentrifugation bei 100.000 g von Proteinaggregaten befreien.
- Die SEC erfolgt nun über eine 25 ml Superdex 200 HR 10/300 FPLC Säule mit einer Flussrate von

0,3 ml min⁻¹, eingespannt in einen ÄKTAprime plus.

- Das Programm für die SEC ist nachfolgend im Detail aufgeführt.

SEC (wash column before and after run; to wash EtOH from column, "wash column 1" Flow have to be reduced on 0.2)							
basic parameters:	sample volume:	0.5 ml					
	max. pressure:	1 Mpa					
	Column:	1 Mpa (25 ml Superdex 200 HR 10/300 FPLC)					

	Vol. [ml]	Conc. %B	Flow [ml min ⁻ ¹]	Fraction [ml]	Buffer valve	Inject valve	special hints
Wash A1	0	0	50	0	1	waste	
Wash column 1	25	0	0.4	0	1	load	
Sample application	62.5	0	0.3	0	1	inject	IMPORTANT, order: "autozero"
Elution	63	0	0.3	0.3	1	load	
Wash loop	87.5	0	0.3	0	1	inject	
Wash column 2	88.5	100	50	0	1	waste	
Wash fraction tube	113.5	100	0.4	0	1	load	
End method	151	100	0.3	0.3	1	load	

7.4.2.8 Elektronenmikroskopische Analyse

Mittels Elektronenmikroskopie können Strukturen, die in der konfokalen Mikroskopie nicht auflösbar sind, analysiert werden. Sämtliche Elektronenmikroskopie-Aufnahmen wurden im Max-Plank-Institut in Dortmund durch M.Sc. Evenly Schubert, AG Raunser durchgeführt.

- Das native, rekombinante Protein wird für 1 h bei 100.000 g in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert.
- Durch SEC werden übrige Proteinaggregate aus der Lösung entfernt.
- 4μl einer 0,01 mg/ml rProtein-Lösung werden auf einen Kupfer-Grid (Agar Scientific; G400C), überzogen mit einem dünnen Carbonfilm, übertragen und für 45 sek inkubiert.
- Die negative Färbung für die Elektronenmikroskopie erfolgt nun über 0.75% uranyl formate.
- Aufnahmen wurden an einem JEOL JEM-1400 Transelektronenmikroskop 120 kV, ausgestattet mit einem 4000 × 4000 CMOS Detektor F416 (TVIPS) und einer Pixelgröße von 1.33 Å/pixel generiert.

7.4.2.9 Interaktionsstudie von rekombinanten Proteinen mit Giant unilamellar

vesicles

Als *Giant unilamellar vesicles* (GUVs) werden 5-100 µm große Liposomen bestehend aus einer Doppellipidschicht bezeichner. Die Herstellung der GUVs erfolgt nach der *Swelling* Methode (Weinberger *et al.*, 2013).

- Alle Folgenden Schritte müssen unbedingt unter dem Abzug erfolgen.,
- Objektträger zwei-fach mit 96% Ethanol und anschließend zwei-fach mit Chloroform reinigen.
- Eine 5% (w/w) PVA-Lösung herstellen. Dazu PVA in 100 ℃ warmes ddH₂O geben und rührend inkubieren bis dieses gelöst ist.
- Nach abkühlen 100µl der 5%igen PVA-Lösung mit 2 µg Dylight[™] 594 NHS markierten rGST-14-3 3ζ mischen und kreisförmig mit einer Pipette auf dem Objektträger verteilen. Alternativ kann statt

des rot markierten rProteins auch TexasRed ® -1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine (TexasRed-DHPE) genutzt werden, um die GUV Membran direkt farblich zu markieren.

- Nach Trocknung 20µl der Lipid-Mixtur (in mol%) (DOPC/ Cholesterol/ DOPS: 55.0/ 25.0/ 20.0 in Chloroform) mit einer Hamilton[™] Pipette auf den PVA-Film verteilen.
- Nachdem die Lipidschicht vollständig getrocknet ist, wird eine Kammer um die Lipid/PVA-Schicht gebaut. Dazu wird Vitrex[™] genutzt. Die Kammer dient als Flüssigkeitsbarriere.
- Die Kammer nun mit 500 μl Sucrose-Lösung füllen (10% w/w in ddH₂O).
- Die Kammer für 2 h bei RT inkubieren.
- Nun die fertige GUV-Lösung entnehmen, sieben-fach mit 1,5 ml 10% Sucroselösung waschen und zwischendurch jeweils für 60 sek bei 2000 Upm zentrifugieren.
- Nun eine Beobachtungskammer mit 2 mg/ml Beta-Kaseinlösung für 10 min inkubieren.
- Anschließend 5μl der fertigen GUVs werden zu 2 μg FITC-markierten rProtein geben und direkt mikroskopiert (Nikon Eclipse Ti-E, 60x Öl-Obejektiv, NA=1.49).
- Die Auswertung der Mikroskopie wird mit dem Programm NIS-Elements (Nikon) durchgeführt.

7.4.3 Zellbiologische Methoden

7.4.3.1 Adhäsionsexperimente an HEp-2 und CHO-Zellen

Um das Adhäsionsverhalten von löslichem, rekombinant-hergestellten Proteinen an HEp-2 und CHO-Zellen zu untersuchen werden die Zellen zunächst mit den Proteinen bei 37 °C inkubiert. Das Adhäsionsvermögen der Proteine wird anschließend im Westernblot analysiert.

- Zellen werden 24 h vor 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 mit 1 ml HBSS gewaschen.
- 100 μg/ml der Proteine werden in 250 μl Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben.
- Die Zellen werden bei 37 °C mit der Proteinlösung inkubiert.
- Nach definierten Zeitpunkten (15 60 Min) wird die Proteinlösung von den Zellen genommen, die Zellen dreifach mit 1 ml HBSS gewaschen und mit 200 μl Zell-Dissoziation Lösung abgelöst.
- Die Zellen werden bei 3000 rpm (Thermo Biofuge pico17) für 5 min bei RT zentrifugiert.
- Anschließend werden die Zellen werden in 65 μl ddH2O, 25 μl Protein-Ladepuffer und 10 μl 1 M DTT resuspendiert und f
 ür 10 min bei 100 °C erhitzt.
- Die Adhäsion der Proteine an die HEp-2 Zellen wird im Westernblot analysiert.

 Als Ladekontrolle f
ür 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.

7.4.3.2 Infektion durch Chlamydien

Für *Cpn* Infektionsexperimente wurden 70 - 90 % konfluent bewachsene Wells mit Gradienten-gereinigten Chlamydien infiziert.

- HEp-2 oder CHO Zellen werden 24 h 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 überlagert.
- Gradienten-gereinigte Chlamydien werden aufgetaut, gevortext und kurz im Wasserbad sonifiziert.
- Die Chlamydien werden in das Zellkulturmedium der Wells gegeben und durch Schwenken gleichmäßig im Well verteilt.
- Die Inkubation der Platte erfolgt bei 37 °C und 6 % CO2 für bis zu 48 h.
- Abschließend werden die Zellen 5 min in Methanol oder 10 min in 3% PFA fixiert und anschließend zweimal mit HBSS gewaschen.
- Die Zellen können bis zur Färbung in 1 ml HBSS bei 4 °C gelagert werden.

7.4.3.3 Neutralisierungs-/Infektionsboost-Assay

Durch Vorinkubation von Zellen mit rProtein kann eine nachfolgende *Cpn* Infektion beeinflusst werden. Ist das rProtein ein klassisches Adhäsin, verringert die Zugabe des rProteins die Infektionsrate, da mögliche Bindestellen für die chlamydialen EBs durch das rProtein bereits blockiert werden. rProteine mit anderweitiger Funktion als Bindung an Wirtszellen zeigen in diesem Assay abweichende Phänotypen.

- HEp-2 Zellen werden so 24 h vor dem Start des Experiments in eine 24-Well Platte mit Deckgläschen ausgesät und bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert (HEPA Class 100), dass am Tag des Experiments ein etwa 50 %iger Zellrasen vorliegt.
- Die Zellen mit HBSS waschen und mit 100 μg/ml des rProteins in 250 μl Zellkulturmedium f
 ür 1 h bei 37 °C und 6 % CO2 inkubieren.
- Gradienten-gereinigten Chlamydien auftauen, vorsichtig vortexen, kurz im Wasserbad sonifizieren.
- Die Chlamydien in die Protein-Medium-Suspension der Wells geben und unter Schwenken im Well gleichmäßig verteilen.
- Inkubation der Platte für 48 h bei 37 ℃ und 6 % CO₂.
- Die Zellen abschließend 5 min in Methanol fixieren und anschließend zweimal mit HBSS waschen.
- Die Zellen können in 1 ml HBSS bei 4 °C bis zur Färbung gelagert werden.

7.4.4 Mikroskopie

Mikroskopischen Untersuchungen wurden am Zeiss Axioskop 50 Mikroskop oder am Nikon Eclipse Ti-E mit A1R confocal laser scanner mit der Software NIS-Elements durchgeführt. Die Datenauswertung wurde anschließend mit ImageJ durchgeführt.

7.4.4.1 Fixierung und Permeabilisierung von epithelialen Zellen

Damit die Zellen mikroskopische analysiert werden können, müssen diese zunächst mit Methanol oder 3% PFA fixiert werden. Da PFA die Zellmembran nicht durchdringt müssen PFA-fixierte Zellen zusätzlich vor der Färbung permeabilisiert werden um intrazelluläre Proteine markieren zu können. Methanol-fixierte Zellen sind bereits für Antikörper permeabel.

- Die Zellen werden dreifach mit HBSS gewaschen und mit 500 µl Methanol oder 3 % PFA überschichtet.
- Methanol-Fixierung: 5 min bei RT
- PFA-Fixierung: für 10 min bei RT.
- Die Fixierungslösung wird anschließend abgenommen und die Zellen dreifach mit HBSS gewaschen.
- Bis zur Färbung können die Zellen bei 4 °C in HBSS gelagert werden.
- Die PFA-fixierten Zellen werden mit 0,1 % Triton X-100 für 30 min bei 4 °C permeabilisiert.

7.4.4.2 Färbung für die Mikroskopie

7.4.4.2.1 Antikörperfärbung verschiedener Marker-Proteine

Zellproteine können mittels sekundärer Antikörperfärbung markiert werden. Der primäre Antikörper ist Protein-spezifisch, der sekundäre Antikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Dadurch lassen sich auch Zellkompartimente innerhalb der Zelle markieren. Die Antikörper werden in PBS-T (0,1 % Twenn20) verdünnt.

- Die fixierten Zellen werden einfach mit PBS gewaschen.
- Die Zellen werden mit 25 μ l des Primär-Antikörpers versetzt und für 60 min bei 4 $^{\circ}$ C inkubiert.
- Die Wells werden dreifach mit PBS waschen.
- Die Zellen nun mit 25 μl des Sekundär-Antikörpers versetzen und für 60 min bei 4 °C inkubieren.

7.4.4.2.2 Antikörperfärbung von chlamydialen Einschlüssen

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

- Der Pathfinder wird 1:6 mit PBS verdünnt und je 25 μl pro Well auf die bewachsenen Deckgläschen getropft.
- Die Zellen werden nun bei 30 °C für 30 min inkubiert.
- Die Zellen zweifach mit PBS waschen und in 1 ml PBS bei 4 °C lagern.

7.4.4.2.3 Färbung eukaryotischer Zellkerne

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) ist ein fluoreszenter Farbstoff, der an AT-reiche Regionen in der DNA bindet. Durch Anregung bei 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 RT im Dunkeln für 10 min.
- Die Zellen dreifach mit HBSS waschen und in 1 ml PBS bei 4 ° lagern.
- Die Glasplättchen können nun mit2 µl Vectashield auf einem Objektträger versiegelt werden.

7.5 Ergebnisse und Diskussion

7.5.1 rLIPP formt oligomere Strukturen

Eine Membran-penetrierende Funktion von LIPP konnte bereits gezeigt werden, diese ist jedoch unabhängig von den beschriebenen APHs. Eine Inkubation von rLIPP mit Carboxyfluorescein-gefüllten GUVs zeigte ein Ausströmen des Farbstoffes sowie ein Einströmen von rLIPP über die Zeit. Die Deletion der C-terminal gelegenen, potenziellen Transmembrandomäne (ΔTM, AS 391-424) hob diesen Effekt auf (Galle et al., 2019). Auch die APH3 von LIPP scheint einen Effekt auf die Porenbildung in GUV-Membranen zu haben, denn die Deletion der Domäne führte ebenfalls zu einer Reduktion der Zahl undichter (leaky) GUVs (Manuskript I). In dieser Arbeit konnte zudem ein Effekt der TM auf die 14-3-3 ζ Rekrutierung gezeigt werden. Wird die TM deletiert (ΔTM), findet keine Rekrutierung von 14-3-3ζ an GUV-Membranen und die PM von HEp-2 Zellen statt. Der gleiche Effekt ist zu beobachten, wenn die erste APH deletiert wird (△APH1) (Manuskript I und II). Wahrscheinlich ist die Kombination aus TM und APHs für die Formation und Stabilisation der Pore essenziell. Porenbildende Proteine wie Sticholysin I, II (Stl, Stll) von Stichodactyla helianthus oder das Equinatoxin II von Actinia equina oligomerisieren bei Membrankontakt um eine Pore zu bilden (Menestrina, Cabiaux und Tejuca, 1999; Athanasiadis et al., 2001; Mancheño et al., 2001, 2003; Hinds et al., 2002; Alvarez et al., 2003; Castrillo et al., 2010b; Carretero et al., 2018). Auch für LIPP konnten erste Hinweise auf eine Oligomerisierung erbracht werden. Experimente mit nativ gefaltetem rLIPP zeigten, dass es in vitro Komplexe von 10-15 LIPP-Einzelmolekülen formt. Diese Oligomerformation blieb hingegen aus, wenn die TM von LIPP deletiert wurde (Galle, 2018). Eine biologische Funktion konnte bisher nicht gezeigt werden.

Auf Grund der neu erworbenen Kenntnisse bezüglich potenzieller Porenformation über die APHs wurde LIPP näher auf sein Oligomerisierungsverhalten hin untersucht. Dazu wurde nativ gefaltetes rProtein genutzt. Neben dem bereits analysierten Volllängen-LIPP und der ∆TM Variante wurden verschiedene APH-Deletionsvarianten untersucht.





(A) Größenauftrennung und Analyse der Oligomerisierung verschiedener, nativer rProteine in der nativen Gelelektrophorese. Die rProteine wurden bei 40.000 g für 30 Min bei 4 °C zentrifugiert. Je 2 μg natives rProtein wurden über eine Blaue Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Gel: 3 % - 12 %, Life Technology) der Größe nach zuerst für 60 Min. bei 150 V (12-16 mA) und anschließend für 90 Min bei 250 V (8-10 mA) aufgetrennt. Prominente Banden sind mit Sternen (*) markiert, Proteinmarker: PageRuler (in kDa).

(B) Größenauftrennung von nativem rLIPP über Größenausschlusschromatographie. Das rProtein wurde bei 100.000 g für 30 Min bei 4 °C zentrifugiert. Eine Konzentration von 1 mg/ml wurde für die Größenausschlusschromatographie genutzt. Die hellblaue Linie zeigt das Chromatogramm. Distinkte Größen von Kontrollproteinen sind über schwarze Pfeile markiert (in kDa).

(C) Elektronenmikroskopische Analyse von rLIPP und rLIPP∆TM. Native, HIS markierte rProteine wurden aus *E. coli* Lysat via Ni-NTA Agarose gereinigt und in einer Größenausschlusschromatographie aufgereinigt. Die gereinigten Proteine wurden auf einen Eletronenmikroskopiegrid aufgetragen, kontrastgefärbt und in einem Elektronenmikroskop analysiert (n=3) (durchgeführt von M.Sc. Evelyn Schubert, Max-Plank-Institut Dortmund). Größenstandard: 50 nm. Ringförmige Strukturen (rLIPP) konnten nur einmalig beobachtet werden und waren nicht reproduzierbar.

(D) Bindung an und Verformung von PS-GUV Membranen durch rLIPP. 2 µg FITC-markiertes rLIPP wurden über einen Zeitraum von 90 min mit 20 mol% PS-GUV (mit Dylight ™ 594 NHS-markiertem rGST_r14-3-3ζ gefüllt) inkubiert. Größenstandard: 10 µm.

(E) 3D Darstellung von normal geformten und verformten GUVs zusammengesetzt aus Einzelaufnahmen. PS-GUVs wurden bis zu 3h mit FITC-markiertem rLIPP (grün) inkubiert. Links ist ein spärisch geformter PS-GUV, in der Mitte ist ein leicht verformter GUV dargestellt. Beide GUVs sind mit Dylight ™ 594 NHS-markiertem rGST_14-3-3ζ (rot) gefüllt. Rechts ist ein sphärischer sowie ein stark deformierter GUV nach 3 h Inkubation mit rLIPP dargestellt. Der ungefüllte GUV wurde über rot-markiertes Phosphoethanolamin sichtbar gemacht. Größenstandard: 10 µm.

Während Volllängen-LIPP in der nativen Gelelektrophorese die größte Bande bei etwa 720 kDa zeigte (entspricht 13 LIPP-Einzelmolekülen), lag die größte Bande für LIPP_ Δ TM bei etwa 146 kDa (Abbildung 11A). Verglichen mit dem Molekulargewicht von LIPP (55 kDa) handelt es sich dabei zwar weiterhin um Oligomere von vermutlich drei Molekülen, der Unterschied zum Volllängenprotein ist jedoch eindeutig. Erwähnenswert ist zudem, dass das Kontrollprotein rGST (27 kDa), was als Dimer beschrieben ist und daher auf etwa 54 kDa laufen sollte neben der Hauptbande auf etwa 66 kDa auch eine Bande auf etwa 242 kDa zeigte. Banden ähnlicher Laufhöhe wie bei r Δ TM konnten auch nach Deletion der zweiten APH (r Δ APH2), sowie aller drei APHs (r Δ APH1-3) im nativen Gel beobachtet werden. Eine Deletion der ersten oder dritten APH von LIPP (r Δ APH1/ r Δ APH3) resultierte sogar in einer noch größeren Komplexbildung als bei rLIPP zu beobachten war. Oligomere konnten hier bis zu einer Größe von etwa 1048 kDa detektiert werden (Abbildung 11A).

Wurde rLIPP über eine Größenausschlusschromatographie analysiert, so zeigte es auch hier einen Hauptpeak bei etwa 670 kDa (Abbildung 11B). Dies entspricht etwa 12 LIPP-Einzelmolekülen. Die Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass neben der TM auch die APH2 essenziell für eine Oligomerisierung von LIPP sein könnte. Zuvor konnte für die LIPP_ATM Variante ein monomeres Laufverhalten gezeigt werden (Galle, 2018). Dies war hier nicht der Fall. Die Beobachtung, dass auch das Kontrollprotein GST höher als erwartet im Gel lief könnte die Abweichung zu den zuvor erbrachten Daten erklären.

Um die Komplexbildung näher zu untersuchen, wurden rLIPP und r∆TM elektronenmikroskopisch analysiert. Die Analyse wurde in Kooperation mit dem Max-Plank-Institut in Dortmund angefertigt. Die Bedienung der Geräte sowie die Probenvorbereitung der Elektromikroskop (EM)-Probenträger wurde von M.Sc. Evelyn Schubert durchgeführt. Die Reinigung und Produktion der rProteine erfolgte in der AG Hegemann, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.



Abbildung 12: Integration einer Pore über das Fass- oder Ringporen-Modell.

Beide Modelle setzen eine Oligomerisierung der Proteine voraus, um die Pore zu bilden.

(A) Nach dem Fass-Modell wird das Oligomer senkrecht in die Doppellipidschicht integriert. Das Oligomer interagiert nicht direkt mit den Phospholipiden der Membran. Die Translokation einzelner Phospholipide (z.B. Phosphatidylserin, hier in grün dargestellt) durch das aquatische Lumen der Pore ist ein energetisch ungünstiger Übergangszustand und daher nicht favorisiert.

(B) Nach dem Ringporen-Modell wird das Oligomer vornehmlich über amphipathische α-Helices (APHs) in äußere Doppellipidschicht integriert. Die, durch die Interaktion entstandene, lokale Membrankrümmung induziert eine Biegung der äußeren Lipidschicht um die Pore. Die einzelnen porenbildenden Monomere sind somit halbseitig von Phospholipiden der äußeren Membran umgeben. Eine Translokation von einzelnen Phospholipiden (hier in grün dargestellt) ist energetisch effizient realisierbar. Verändert nach (Nieto-Torres *et al.*, 2015).

In der dreifach durchgeführten elektronenmikroskopischen Analyse konnte rLIPP lediglich einmalig in Form von ring-artigen Strukturen mit einem Durchmesser von 15 nm auf den EM-Probenträgern aufgelöst werden (Abbildung 11C, links oben). In späteren Durchläufen identifizierte Strukturen zeigten ebenso ~15-35 nm im Durchmesser, wiesen aber keine ring-artige Anordnung auf. Die Analyse von rLIPP_ Δ TM zeigte ebenfalls Strukturen bis zu einem Durchmesser von 30 nm. Ring-artige Strukturen wurden hier jedoch nicht beobachtet. Die Membran-integrationsabhängige Porenbildung durch Oligomerisierung ist unter Zellmembran-penetrierenden Proteinen anhand zweier Modelle beschrieben, dem Fass- und dem Ringporen-Modell (Abbildung 12) (Yang et al., 2001). Nach dem Fass-Modell wird das Oligomer senkrecht in eine Membran inseriert, ohne direkt mit den Phospholipiden der Membran zu interagieren (Abbildung 12A). Diese Art der Porenbildung innerhalb der amphiphilen Peptide ist bisher nur für das Peptidantibiotikum Alamethicin beschrieben. Die Translokation einzelner Phospholipide kann hier nur durch das aquatische Lumen der Pore geschehen, was einen energetisch ungünstigen Übergangszustand darstellt. Energetisch günstiger ist eine Phospholipid-Translokation über das Ringporen-Modell (Abbildung 12B). Dieses ist durch die Integration vornehmlich amphipathischer α-Helices (APHs) in Membranen beschrieben. Dazu wird der hydrophobe Teil der APH in die äußere Lipidschicht inseriert. Die entstandene, lokale, positive Membrankrümmung induziert dann eine Biegung der äußeren Lipidschicht um APH. Die innere und äußere Lipdischicht treten daraufhin in Kontakt und formieren eine neue Doppelipidschicht um die entstandene Pore. Dies ist etwa für das Toxin Melittin beschrieben (Yang et al., 2001; Qian et al., 2008). Die Pore besteht nicht aus dicht aneinander gelagerten Proteinen, sondern ist durch Phospholipide unterbrochen. Diese Ringporen sind daher nicht sehr stabil und konnten bisher nicht in 3D Strukturen aufgelöst werden (Leontiadou, Mark und Marrink, 2006). Da LIPP die PS Externalisierung und 14-3-32 Interaktion über APHs induziert, ist eine APH-abhängige Integration über das Ringporen-Modell wahrscheinlich, sofern LIPP ebenfalls eine Krümmung der Membran induziert. Dies würde zudem erklären, wieso eine mögliche Porenformation im EM nicht reproduzierbar nachgewiesen werden konnte.

7.5.2 rLIPP induziert Membrankrümmung an synthetischen Membranen

Interessanterweise konnte im Zuge der Bindestudien von LIPP an PS-GUVs die Induktion einer Membrankrümmung beobachtet werden. Über einen Zeitraum von 90 min ist rLIPP in der Lage die Membran von GUVs zu verformen (Abbildung 11D). Beginnend ab Minute 30 traten bei den beobachteten GUVs lokale Verformungen in Form von Eindellungen der Membran hin zum Lumen der GUVs auf. Diese Eindellungen wurden über die Zeit immer massiver, wie im Zoom des 90 min Zeitpunktes zu erkennen ist (Abbildung 11D). Hier waren ganze Membranteile weit bis ins Lumen verformt, sodass die sphärische Form des GUV verloren ging. Werden die GUVs über einen Zeitraum von bis zu 3 h beobachtet, so treten noch stärkere Verformungen der Membran, bis zur Eindellung ganzer Membransegmente auf (Abbildung 11E). Durch die 3D-Darstellung sind die Verformungen hier besonders gut zu erkennen. Wie im linken Teil der Abbildung 11E zu erkennen ist, bindet das FITC markierte rLIPP gleichmäßig an die sphärisch geformte Membran des PS-GUVs während an den verformten GUVs rLIPP eine stärkere Bindung an besonders verformte Areale zeigte. In der Mitte sowie im rechten Teil der Abbildung sind außerdem verformte GUVs dargestellt.

Die für rLIPP beobachteten Verformungen der GUV-Membranen konnten bei unbehandelten sowie LactC2 behandelten GUVs nicht detektiert werden. In der Literatur sind Protein-induzierte Membranverformungen an nicht vorgekrümmten Membranen im Gegensatz zur Verformung von Liposomen nur für wenige Proteine beschrieben.

Ein interessantes Beispiel ist das Influenza A (IAV) Matrix Protein M1. In infizierten Zellen ist das IAV M1 Protein an der Zusammensetzung der Viruspartikel und der Externalisierung des fertigen Virus aus der Zelle (budding) beteiligt. Ob M1 alleinig für das budding verantwortlich ist, konnte bisher nicht endgültig geklärt werden (Gómez-Puertas et al., 2000; Latham und Galarza, 2001; Chen et al., 2007; Lai et al., 2010; Chlanda et al., 2015). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass M1 die Lipiddoppelschicht von GUVs ohne Interaktion mit anderen Proteinen deformieren kann. Erstaunlicherweise bindet es dazu über sechs potenzielle APHs innerhalb des N-terminus an negativ geladene Phospholipide, wie PS, innerhalb Cholesterol-haltiger Membranen und oligomerisiert zwingend, um die Membran zu deformieren. Versuche mit monomerem M1 führten zu keiner Verformung von negativ geladenen Membranen. Die Inkubation von GUVs mit M1 resultierte zudem in leaky GUVs. Durch die entstandene Pore konnte Protein ins Lumen der GUVs diffundieren (Tsfasman et al., 2015; Dahmani, Ludwig und Chiantia, 2019). M1 zeigt also viele Ähnlichkeiten zu LIPP, welches ebenso über vorhergesagte APHs an PS innerhalb Cholesterol-haltiger Membranen bindet und die GUVs penetriert. Interessanterweise zeigen sehr ähnlich durchgeführte Versuche von M1 an PS-GUVs optisch sehr ähnliche Deformationen wie für LIPP beobachtet (Abbildung 11D+E) (siehe Dahmani, Ludwig und Chiantia, 2019). Die Versuche zeigen, dass eine erhöhte mol% von PS (> 20 mol%) in den GUVs die Verformung begünstigt. Eine Erhöhung des PS-Anteils von 20 auf 50 mol% vervierfachte nahezu die Anzahl deformierter GUVs. Die Daten zeigen, dass die Membranverformung mit einem signifikanten Anstieg in der Protein-Multimerisierung und reduzierter Dynamik der Proteine einhergeht. Obwohl die Gesamtmenge an gebundenem Protein auf sphärischen und verformten GUVs identisch ist, konnte gezeigt werden, dass verformte Bereiche signifikant stärker fluoreszieren und somit mehr Protein spezifisch an diesen Stellen lokalisiert (Dahmani, Ludwig und Chiantia, 2019). Ein ähnlicher Effekt, der jedoch bisher nicht quantifiziert wurde, konnte auch bei rLIPP gebundenen GUVs beobachtet werden (siehe Abbildung 11D, zoom 90 min). Die erhöhte Bindeeigenschaft an gekrümmten Membranbereichen ist durch eine Feedbackschleife zu erklären. LIPP und M1 binden beide an Membranbereiche mit erhöhter Lipidordnung (Lipid Rafts). Diese Membranbereiche weisen eine besonders starke Rigidität auf (Simons und Ikonen, 1997; Simons und Toomre, 2000; Owen *et al.*, 2012). Die Integration der gebundenen APHs induziert dort wahrscheinlich eine lokale Veränderung der Membranrigidität und -krümmung. Dies führt zu erhöhter Bindung und Integration weiterer Proteine, was wiederrum zur Erhöhung der Krümmung beiträgt (Pinot *et al.*, 2018).

Eine Auflösung der GUV Membran durch Zugabe von verschiedenen Detergenzien resultierte in keiner Veränderung des GUV umhüllenden Proteingerüsts, was zeigt, dass M1 eine stabile, dreidimensionale, lipidunabhängige Struktur ausbildet. Neben GUVs zeigt M1 auch bei Zugabe zu Liposomen starke Verformungen. Ob LIPP auch Liposomen verformt wurde bisher nicht untersucht.

7.5.3 Die LIPP-Bindedomäne blockiert Adhäsin-typisch die chlamydiale Infektion

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass LIPP mit der humanen Plasmamembran interagiert und diese wahrscheinlich durch die APH-abhängige Formation einer Pore überwindet um die Interaktion mit 14-3-3ζ und den Infektions-erhöhenden Effekt zu realisieren. Die initiale Bindung von LIPP an die humane Zelle wird jedoch nicht durch die APHs, sondern durch die C-terminal lokalisierte Bindedomäne (BD, Abbildung 13A, AS 307-356) vermittelt. Diese ist essenziell für die Bindung an Zellen, jedoch nicht in die Phospholipid-Bindung involviert (Fechtner, Galle und Hegemann, 2016; Galle *et al.*, 2019; Hanisch *et al.*, 2019 unpublished). Während eine Vorinkubation mit rLIPP zu einem konzentrationsabhängigen Infektions-erhöhenden Effekt von bis zu 600% führte, resultierte eine Vorinkubation mit rLIPP_BD erstaunlicherweise zu einer konzentrationsabhängigen Blockierung der anschließenden *Cpn* Infektion von bis zu 80% (Abbildung 13B+C). Eine Vorinkubation von Humanzellen mit der Infektions-erhöhenden Domäne (IED) allein hatte auf Grund der fehlenden Bindung an die Humanzelle keinen Effekt auf die nachfolgende von *Cpn* Infektion (Abbildung 13D+E). Dies zeigt, dass, bezogen auf eine nachfolgende Infektion, die LIPP_BD allein als typisches Adhäsin, wie etwa OmcB oder Pmp21, wirkt. Der starke IED/APH1 vermittelte Infektions-erhöhende Effekt gewinnt durch diese Beobachtung eine noch stärkere Bedeutung.



Abbildung 13: Die LIPP-Bindedomäne vermittelt einen Adhäsin-typischen Infektionsblock.

(A) Schema der in B-E genutzten LIPP Fragmente. IED: Infektions-erhöhende Domäne; BD: Bindedomäne; TM: potenzielle Transmembrandomäne. Identifiziert in (Fechtner, Galle und Hegemann, 2016; Galle *et al.*, 2019).

(B-D) Infektiosität von *Cpn* EBs nach Vorinkubation der HEp-2 Zellen mit rProtein. HEp-2 Zellen wurden mit 12,5 – 200 µg/ml rLIPP **(B)**, rLIPP_BD **(C)**, or rLIPP_IED **(D)** für 1 h bei 37 °C vorinkubiert. 100 µg/ml rGST oder PBS wurden als Kontrolle genutzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreifach gewaschen und anschließend mit *Cpn* (MOI = 5) für 48 h infiziert. Nach PFA-Fixierung der Zellen wurde die Infektiosität durch Auszählen der Inklusionen bestimmt (n=3). Die Infektiosität nach Vorinkubation mit PBS wurde als 100% definiert. Statistik: *** (p<0.001), ** (p<0.01) und * (p<0.05). n.s.= nicht signifikant. Die Analyse der Daten wurde über die Software GraphPad Prism durchgeführt (ungepaarter t-Test, Welch-korrigiert).

(E) Zusammenfassung der Infektiosität bei Vorinkubation mit je 100 µg/ml verschiedener rProteine aus B-D. Diese Darstellungsweise dient der besseren Übersichtlichkeit. rIED: LIPP Infektions-erhöhende Domäne; rBD: LIPP Bindedomäne

7.5.4 Die rLIPP-Bindung ist abhängig von Heparansulfat-ähnlichen

Glykosaminoglykanen

Viele bakterielle Adhäsine nutzen zur Bindung an die Wirtszelle Teile der extrazellulären Matrix (ECM), wie etwa Zuckerstrukturen oder membrangebundene, proteinöse Interaktionspartner. Da in vorangegangenen Arbeiten, sowie im Hefe-Zwei-Hybrid-Assay dieser Arbeit, kein Plasmamembran-gebundener, proteinöser Interaktionspartner für LIPP identifiziert werden konnte, wurden drei verschiedene Hamsterzelllinien (CHO-Zellen) genutzt, um den Effekt von Zucker-Strukturen der Zelloberfläche auf die rLIPP-Bindung zu untersuchen. Neben den wildtypischen CHO-Zellen wurde die rLIPP-Bindung an Proteoglykan-defiziente psgA-745 Zellen (psgA) und Heparansulfat-defiziente psgD-677 Zellen (psgD) getestet. Als Kontrollprotein wurde neben rGST das *Cpn* Adhäsin OmcB genutzt. Dieses vermittelt über die Bindung an Heparan-ähnliche Glykosaminoglykane (HS-GAGs) die initiale Adhäsion des chlamydialen EBs (Moelleken und

Hegemann, 2008; Fechtner *et al.*, 2013). Während rOmcB nach 60 min nur eine schwache Bindung an psgA-Zellen zeigte, blieb eine Bindung an psgD-Zellen vollständig aus (Abbildung 14A). Interessanterweise zeigte auch rLIPP eine verminderte Bindefähigkeit an beide Zelllinien, verglichen mit WT-CHOs (Abbildung 14A+B). Es verhält sich demnach ähnlich wie das bereits charakterisierte OmcB.



Abbildung 14: rLIPP zeigt reduzierte Bindung an Proteoglykan-/Heparansulfat-defiziente CHO Zellen.

(A) Bindeverhalten verschiedener rProteine an drei unterschiedliche CHO-Zelllinien. 100µg/ml rLIPP, rOmcB_BD oder rGST wurden mit konfluent gewachsenen, wildtypischen (WT) CHO-Zellen, Proteoglykan-defizienten psgA-745 CHO-Zellen (psgA) oder Heparansulfat-defizienten psgD-677 CHO-Zellen (psgD) für 15 - 60 min bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen abgelöst, lysiert und das gebundene rProtein auf einem Western-Blot analysiert. Dazu wurde anti-HIS (rLIPP-HIS) und anti-GST (rGST-OmcB) Antikörper genutzt.

(B) Quantifizierung der Bindekapazität von rLIPP an die drei unterschiedlichen CHO-Zelllinien. Die Analyse der Daten aus (A) wurde über die Software GraphPad Prism durchgeführt (n=3).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch die LIPP-Bindung über HS-GAGs vermittelt werden könnte. Um die Abhängigkeit der rLIPP-Bindung über Zuckerstrukturen detaillierter und an humanen Zellen zu analysieren, wurden im Folgenden entweder rProtein oder ein konfluenter HEp-2 Zellrasen mit Heparin/Chondroitinsulfat vorinkubiert. Während Heparansulfat gebunden an Membranproteine oder als Teil der ECM auf der Zelloberfläche vorliegt, ist das strukturell sehr ähnliche und in Mastzellen produzierte Heparin als lösliche Form zu erwerben. Beide Formen bestehen aus Glucosamin-Hexuronsäure-Disaccharid-Einheiten (Stringer und Gallagher, 1997; Sasisekharan und Venkataraman, 2000; Mitsi *et al.*, 2008) Nach erfolgter Vorinkubation wurde ein Adhäsionsassay durchgeführt. Sollte rLIPP mit einem der beiden Proteoglykane interagieren, so führt dies zu einer Reduktion in der HEp-2 Bindung, da durch die Proteoglykan-Interaktion die, für HEp-2 Interaktion relevante, Bindestelle blockiert wird.

Eine Vorinkubation der Zellen mit Heparin oder Chondroitinsulfat hatte keinen Effekt auf die Bindefähigkeit der getesteten rProteine. Ebenso zeigte die Vorinkubation des *Yersinia spp.* Adhäsins rInvasin mit Heparin oder Chondroitinsulfat keinen Effekt auf die Bindeeigenschaften. Die Vorinkubation von rOmcB oder rLIPP mit Heparin hingegen resultierte in einem Verlust der Bindefähigkeit beider Proteine. Eine Vorinkubation des rProteins mit Chondroitinsulfat zeigte wiederum keinen Effekt, verglichen mit unvorbehandeltem Protein im Adhäsionsassay (Abbildung 15A). LIPP bindet demnach wie *Cpn* OmcB an Heparin. Diese Bindung blockiert daraufhin die Adhäsion an die Humanzelle. Es kann daher vermutet werden, dass auch LIPP an HS-GAGs des humanen ECMs bindet.

Zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass eine Vorinkubation von Humanzellen mit der LIPP_BD einen starken, Infektions-blockierenden Effekt vermittelt, während das Volllängen-LIPP die Infektionskapazität erhöht (Abbildung 13). Im Folgenden wurde nun der Einfluss von Heparin und Chondroitinsulfat auf die Infektionskapazität nach Vorinkubation mit rProtein untersucht.



Abbildung 15: Die rLIPP-Bindung an humane Zellen sowie der Infektions-erhöhende Effekt sind abhängig von Heparansulfatähnlichen Glykosaminoglykanen.

(A) Einfluss von Heparin (H)/Chondroitinsulfat (CS) auf das Bindeverhalten verschiedener rProteine an HEp-2 Zellen. 100 μg/ml rLIPP, rOmcB oder rInvasin wurden entweder mit 500 μg/ml H oder CS für 1 h bei 4 °C vorinkubiert. Alternativ wurden HEp-2 Zellen mit identischen Mengen H oder CS für 1 h bei 37 °C vorinkubiert. Nach erfolgter Vorinkubation wurden die jeweiligen H/CS vorbehandelten rProteine für 60 min bei 37 °C mit unvorbehandelten HEp-2 Zellen inkubiert. Alternativ wurde unvorbehandeltes rProtein mit H/CS-vorinkubierten Zellen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen abgelöst, lysiert und das gebundene rProtein auf einem Western-Blot analysiert. Dazu wurde anti-HIS oder anti-GST Antikörper genutzt.

(B) Einfluss von Heparin (H)/Chondroitinsulfat (CS) auf die Infektiosität von *Cpn* EBs 48 h p.i.. 50 µg/ml rLIPP/rOmcB_BD wurden für 1 h bei 4°C mit 500 µg/ml H/CS vorinkubiert und anschließend für 1 h bei 37°C mit HEp-2 Zellen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen + gebundenes rProtein mit *Cpn* EBs (MOI = 5) für 48 h infiziert. Alternativ wurden vor der Infektion *Cpn* EBs mit identischen Mengen H/CS für 1 h bei 4°C inkubiert und auf unvorbehandelte HEp-2 Zellen gegeben. Die Zellen wurden in diesem Fall nicht mit rProtein vorbehandelt. Weiterhin wurden nicht H/CS vorbehandelte HEp-2 Zellen mit verschiedenen rProteinen vorinkubiert und anschließend mit *Cpn* EBs (MOI = 5) für 48 h wurden die Zellen PFA fixiert und die Anzahl der Inklusionen mikroskopisch bestimmt (n=3). Die Infektiosität nach Vorinkubation mit PBS wurde als 100% definiert. Statistik: *** (p≤0.001), ** (p≤0.01) und * (p≤0.05). n.s.= nicht signifikant. Die Analyse der Daten wurde über die Software GraphPad Prism durchgeführt (ungepaarter t-Test).

Während eine Vorinkubation mit rOmcB einen typischen Blockierungseffekt und eine Vorinkubation mit rLIPP den beschriebenen Infektions-erhöhenden Effekt auf eine nachfolgende *Cpn* Infektion induzierte, wirkte eine Vorbehandlung mit Heparin dem rOmcB-Blockierungseffekt und dem rLIPP-Infektionserhöhenden Effekt entgegen (Abbildung 15B, rOmcB_BD + H/rLIPP + H). Eine Vorbehandlung der beiden rProteine mit Chondroitinsulfat vor Inkubation mit den Humanzellen zeigte hingegen keinen Effekt (Abbildung 15B, rOmcB_BD + CS/rLIPP + CS). Auch eine Vorinkubation der *Cpn* EBs mit Heparin wirkte hemmend auf die Infektionskapazität, während eine Vorbehandlung mit Chondroitinsulfat keinen Effekt hatte (Abbildung 15B, *Cpn* + H/*Cpn* + CS)). Diese Ergebnisse zeigen, dass die LIPP Bindung und der daraus resultierende Infektions-erhöhende Effekt über eine initiale Bindung an HS-GAGs realisiert wird. Anzumerken ist zudem, dass die Vorinkubation mit dem als Negativkontrolle gedachten *Yersina spp*. Protein rInvasin überraschenderweise ebenfalls einen Blockierungseffekt vermittelt.

Welcher Abschnitt von LIPP an HS-ähnliche GAGs bindet und weshalb eine Vorinkubation mit rInvasin eine nachfolgende *Cpn* Infektion reduziert, bedarf weiterer Forschung.

lonische Wechselwirkungen sind für die Protein-GAG-Interaktion von großer Bedeutung. Eine Freisetzung von Kationen aus GAG-Ketten ist für die Bindung des Proteins an das Proteoglykan entscheidend (Hileman *et al.*, 1998; Simon Davis und Parish, 2013). Die Bindung an GAGs wird daher durch basische AS vermittelt, wobei anzumerken ist, dass Arginin-Reste trotz gleicher Ladungen fester an GAGs binden als Lysin-Reste. Neben der Ladung ist der Abstand der basischen AS innerhalb des Proteins ein kritischer Faktor für die GAG-Affinität und -Spezifität. Konsenssequenzen wie XBBBBXXBX, XBBXBX und TXXBXXTBXXXTBBB (T= Windung (*turn*), die basisch agierende AS in die Nähe der Interaktionsdomäne bringen) sowie ein kritischer, 3-dimensionaler 20 Ångström-Abstand zwischen basischen AS findet sich in einigen Protein-GAG-Bindedomänen (Hileman *et al.*, 1998; Simon Davis und Parish, 2013).

Cpn OmcB nutzt für die Bindung an HS-GAGs zwei eigene, N-terminale Heparin-Bindemotive (XBBXBX: B= eine der basischen AS: Arginin, Lysin oder Histidin; X= aliphatische/aromatische AS) (Moelleken und Hegemann, 2008). Weitere Analysen der N-terminalen Bindedomäne zeigten, dass die Arginine beider

Motive (AS 57/61) und ein Lysin (AS 67) C-terminal des zweiten Motives eine Schlüsselrolle in der Interaktion spielen. Darüber hinaus scheint eine vorhergesagte Konformationsänderung der Sekundärstruktur für die Heparin-Erkennung entscheidend zu sein. Die Konformationsänderung wird durch das Prolin an Position 66 im variablen Bereich C-terminal zu den konservierten Motiven induziert (Moelleken und Hegemann, 2008; Fechtner *et al.*, 2013).

LIPP besteht zu 13,58% aus basischen AS (69 von 508 AS). Innerhalb der beschriebenen BD, welche für eine Bindung an Humanzellen essenziell ist (Abbildung 13A, AS 307-356), beherbergt LIPP zwei Lysine (K), zwei Arginine (R) und ein Histidin (H), von denen keines in einem bekannten, konservierten Heparin-Bindemotiv organisiert ist. Allerdings sind direkt N-terminal zur definierten BD (AS 303-307, KHLRK: BBXBB) vier basische AS, getrennt durch ein Leucin (L), angeordnet (Abbildung 16).

307

BD

356

KAAKHLRKALENLEKVAPEQVSPEVASRVQSLLARMEQLTHQEPPTVEDLITFVESNVGSDSVE

BBXBB pot. Heparin-Bindemotiv in LIPP

XBBXBX OmcB Heparin-Bindemotiv

Abbildung 16: Darstellung der LIPP Bindedomäne.

Alle basischen AS sind in Rot, Proline in Blau dargestellt. N-terminal der LIPP Bindedomäne (in Gelb markiert) ist ein potenzielles Heparin-Bindemotiv lokalisiert (AS 303-307, KHLRK). Das Bindemotiv von *Cpn* OmcB ist darunter dargestellt. Das ,X' markiert eine beliebige, nicht basische AS. LIPP Bindedomäne nach (Fechtner, Galle und Hegemann, 2016)

Obwohl BBXBB nicht als Heparin-Bindestelle beschrieben ist, deuten Studien an synthetischen Peptiden darauf hin, dass diese Konstellation zu einer Heparin-Bindung führen könnte. Biophysikalische Vorhersagen deuten darauf hin, dass Motive die BBXnBBB-Sequenzen (wobei n= 0 oder 1 ist) enthalten, sehr eng mit Heparansulfat interagieren. Dokumentierte Heparin-Bindestellen enthalten zudem am häufigsten Muster mit einem nicht-basischen Rest zwischen Clustern basischer Aminosäuren (n=1) (Hileman *et al.*, 1998). Ausgehend von diesen Daten kann vermutet werden, dass die gefundene Sequenz (AS 303 - 307) zu einer Heparansulfat-Interaktion führen könnte.

Interessanterweise zeigt die beschriebene LIPP_BD (AS 307-356), heterolog ohne flankierende AS exprimiert, keine Bindung an humane Zellen (unveröffentlichte Daten), weswegen in allen vorangegangenen und publizierten Experimenten eine Variante mit 20 zusätzlichen AS N- und C-terminal der definierten BD genutzt wurde. Eine Variante, in der die definierte BD (AS 307-356) deletiert wurde konnte zudem ebenfalls an humane Zellen binden (reduzierte Bindekapazität verglichen mit rLIPP-VL) (Fechtner, Galle und Hegemann, 2016). Die Bindung von OmcB an HS-GAGs wird neben den Heparin-Bindemotiven auch durch die Sekundärstruktur von OmcB in Abhängigkeit eines Prolins beeinflusst (Moelleken und Hegemann, 2008; Fechtner *et al.*, 2013). Es ist durchaus wahrscheinlich, dass auch die LIPP Bindung an HS-GAGs durch die LIPP-Faltung und eines oder mehrerer der drei in LIPP_BD enthaltenen Proline beeinflusst wird (Abbildung 16).

7.5.5 LIPP, ein Adhäsin mit außergewöhnlichen Fähigkeiten

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass LIPP einzigartige Fähigkeiten besitzt, die vorteilhaft für die chlamydiale Infektion und Aufnahme des EBs in die Humanzelle sind. Die Daten erlauben es ein neues Modell für die LIPP Bindung und Porenbildung sowie für die EB Bindung und Internalisierung zu postulieren (Abbildung 17).





Abbildung 17:Schema der LIPP/EB Bindung und Porenformation/Internalisierung an der humanen Plasmamembran.

(A) Für LIPP wird ein mehrstufiger Adhäsionsprozess postuliert. Phosphatidylserin (PS) ist in grün dargestellt, alle anderen Phospholipide (PL) in blau. APHs = amphipathische Helices, HS-GAGs = Heparansulfat-ähnliche Glykosaminoglykane, BD = LIPP Bindedomäne. Die bisher undefinierte 14-3-3ζ Bindedomäne ist in hellgrau dargestellt. Doppellipidschicht und Schema der Pore aus (Nieto-Torres et al., 2015)

(B) Für *Cpn* EBs wird ein mehrstufiger Adhäsions- und Internalisierungsprozess postuliert. Rot umrandet sind Proteine, die während des jeweiligen Stadiums relevant sind. Proteine, deren Interaktionspartner noch nicht aufgeklärt werden konnten, sind mit einem Fragezeichen markiert. Zur besseren Übersicht sind in Schritt 4 nur das EB und zwei LIPP-Moleküle dargestellt. Der Stern ^{**} weist auf mögliche Signalkaskaden folgend der 14-3-3 ζ + LIPP Interaktion hin. MOMP = *mayor outer membrane protein*, OmcB = Außenmembrankomplexprotein B, T3SS= Typ-III-Sekretionssystem, Pmp21 = polymorphes Membranprotein 21, GAG= Glykosaminoglykan, EGFR= epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor, SNX9= *sortin nexin 9*, N-WASP= Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein

Um in die humane Zelle zu gelangen, bindet das *Cpn* EB zuerst via OmcB und LIPP an HS-ähnliche GAG (HS-GAGs). Die Bindung von LIPP wird über seine C-terminale Bindedomäne vermittelt. Nachfolgend wird die initiale Bindung des EBs über die stabile Adhäsion weiterer Proteine wie den Pmps auf der Oberfläche

der Humanzelle stabilisiert. Pmp21 bindet und aktiviert nun den humanen EGF-Rezeptor. Dies führt zur Dimerisierung und Aktivierung des Rezeptors, woraufhin es zur Induktion intrazellulärer Signalkaskaden kommt (Abbildung 17A.1 und B.1,3) (Moelleken und Hegemann, 2008; Fechtner *et al.*, 2013; Mölleken, Becker und Hegemann, 2013; Fechtner, Galle und Hegemann, 2016; Mölleken und Hegemann, 2017). Vermittelt durch den stabilen Kontakt des EBs mit der Wirtszelle werden zudem Effektorproteine über aktivierte Typ-III-Sekretionsnadeln ins Zytoplasma der Wirtszelle sekretiert (Abbildung 17B.3) (Clifton *et al.*, 2004; Betts-Hampikian und Fields, 2011). Die Interaktion dieser sekretierten Proteine mit Humanproteinen ist an der späteren Internalisierung des EBs in die humane Wirtszelle maßgeblich beteiligt. Das sekretierte Protein CPn0678 beispielsweise rekrutiert und interagiert mit humanem SNX9, das TARP Homolog CPn0572 interagiert direkt mit dem humanen Aktin-Zytoskelett und trägt zu dessen Reorganisation bei (Hänsch, 2016; Zrieq, Braun und Hegemann, 2017; Braun *et al.*, 2019).

Auch LIPP ist an der Internalisierung des EBs in die Wirtszelle direkt beteiligt. Nach der initialen Bindung an HS-GAGs lokalisiert das Protein in räumlicher Nähe zu den Phospholipiden der humanen Plasmamembran (PM) (Abbildung 17A.2). Nach Ausbildung der APHs wird LIPP über die ersten zwei APHs halbseitig in die PM integriert. Dies führt zur lokalen Verkrümmung der Cholesterin-reichen, rigiden Membran. Zeitgleich oder kurz darauf kommt es zur Oligomerisierung von 10-15 LIPP Monomeren. Dies führt in Verbindung mit der dritten APH und der C-terminalen, potenziellen Transmembrandomäne zur Formation eines großen Ringporen-Komplexes. Dieser ermöglicht es LIPP die humane PM in Form einer Pore zu durchspannen. Durch diese Pore rekrutiert und interagiert LIPP mit dem humanen, antiapoptotischen Adapterprotein 14-3-3ζ. Zusätzlich kann nun PS über die gebogene Membran entlang der Pore externalisiert werden. In der äußeren Lipidschicht angelangt, wird es dann wahrscheinlich durch die zweite APH von LIPP auf der Außenseite der Membran fixiert. (Abbildung 17A.3 + B.4). Die so entstandenen PS positiven Domänen auf der Oberfläche der Zelle tragen ebenfalls zur Internalisierung des EBs bei. Durch Flippase unabhängige, endozytotische Prozesse der Zelle können diese PS positiven Areale über die Zeit wieder internalisiert werden (Draeger, Monastyrskaya und Babiychuk, 2011). Cpn nutzt diesen Mechanismus wahrscheinlich für sich, indem es durch die Integration von LIPP in die PM und die darauffolgende APH mediierte PS Externalisation den Membranreparatur-Modus initiiert was wiederum die Effizienz der EB Aufnahme erhöht. Die Externalisierung von PS auf die äußere Membranseite führt weiterhin zu einer Veränderung der Membranidentität und wird ohne Aktivierung apoptotischer Prozesse vollzogen. Dies begünstigt wiederum die Relokalisation von Membran-assoziierten, humanen Proteinen wie den Rac-Proteinen. Gemeinsam mit CPn0572 und rekrutierten SNX9 wird die Polymerisierung des Aktinzytoskeletts unterhalb der PM initiiert. Die Synthese von PI(4,5)P2 und PI(3,4,5)P3 durch die SNX9 rekrutierten Kinasen PI3K und PI5K aktiviert zudem die humane Endozytose-Maschinerie (Abbildung 17B.4) (Hänsch, 2016; Mölleken und Hegemann, 2017). Interessanterweise hat die Rekrutierung von 14-3-3ζ in den ersten 15 min der Infektion einen positiven Effekt auf die chlamydiale Infektion. Es ist zu vermuten, dass apoptotische Faktoren durch die Rekrutierung von 14-3-3ζ inhibiert werden können. In Ctr konnte ein anti-apoptotischer Effekt durch die Interaktion von IncG und 14-3-3β bereits nachgewiesen werden (Scidmore und Hackstadt, 2001; Verbeke et al., 2006). Interessanterweise ist 14-3-3ζ, wie Pmp21, auch an der Aktivierung von Raf-1

und der Phosphorylierung von Erk1/2 beteiligt, was positiv and die Zellproliferation wirkt (Fantl *et al.*, 1994; Thorson *et al.*, 1998; Mölleken, Becker und Hegemann, 2013; Yang *et al.*, 2017). Weiterhin kann 14-3-3 ζ Tiam1 zu β 1-Integrin Komplexen rekrutieren. Dies kann neben SNX9 die Remodellierung des Aktin-Zytoskeletts beeinflussen (O'Toole *et al.*, 2011; Tong *et al.*, 2016).

Gemeinsam führen all diese Faktoren und die dadurch vermittelten Aktivitäten zur erfolgreichen Aufnahme des EBs in die Wirtszelle.

LIPP spielt damit sowohl bei der Adhäsion als auch bei der Internalisierung der chlamydialen EBs eine wichtige Rolle. Es ist das erste beschriebene Protein, welches von außen an die Zelle bindet, eine Pore in der humanen PM bildet, ein Phospholipid externalisiert und mit einem humanen Adapterprotein interagiert, um die Internalisierung eines Pathogens zu ermöglichen.

Literaturverzeichnis

AbdelRahman, Y. M. and Belland, R. J. (2005) 'The chlamydial developmental cycle: Figure 1', *FEMS Microbiology Reviews*, 29(5), pp. 949–959. doi: 10.1016/j.femsre.2005.03.002.

Aitken, A. *et al.* (1995) '14-3-3 alpha and delta are the phosphorylated forms of raf-activating 14-3-3 beta and zeta. In vivo stoichiometric phosphorylation in brain at a Ser-Pro-Glu-Lys MOTIF.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 270(11), pp. 5706–9. doi: 10.1074/jbc.270.11.5706.

Aitken, A. (2006) '14-3-3 proteins: A historic overview', *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press, 16(3), pp. 162–172. doi: 10.1016/J.SEMCANCER.2006.03.005.

Aitken, A. (2011) 'Post-translational modification of 14-3-3 isoforms and regulation of cellular function', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 22(7), pp. 673–680. doi: 10.1016/j.semcdb.2011.08.003.

Alam, R. *et al.* (1994) 'cDN A Cloning and Characterization of Mitochondrial Import Stimulation Factor (MSF) Purified from Rat Liver Cytosol1', *The Journal of Biochemistry*. Narnia, 116(2), pp. 416–425. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124541.

Alegre-Cebollada, J. *et al.* (2007) 'Infrared Spectroscopy Study on the Conformational Changes Leading to Pore Formation of the Toxin Sticholysin II', *Biophysical journal*. The Biophysical Society, 93(9), pp. 3191–3201. doi: 10.1529/BIOPHYSJ.106.102566.

Alvarez, C. *et al.* (2003) 'Binding of sea anemone pore-forming toxins sticholysins I and II to interfaces-modulation of conformation and activity, and lipid-protein interaction.', *Chemistry and physics of lipids*, 122(1–2), pp. 97–105. doi: 10.1016/s0009-3084(02)00181-0.

Anderluh, G. *et al.* (1997) 'N-terminal truncation mutagenesis of equinatoxin II, a pore-forming protein from the sea anemone Actinia equina', *Protein Engineering Design and Selection*, 10(7), pp. 751–755. doi: 10.1093/protein/10.7.751.

Anderluh, G. *et al.* (1999) 'Cysteine-scanning mutagenesis of an eukaryotic pore-forming toxin from sea anemone. Topology in lipid membranes', *European Journal of Biochemistry*, 263(1), pp. 128–136. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00477.x.

Ashraf, G. M. *et al.* (2019) 'The Possibility of an Infectious Etiology of Alzheimer Disease', *Molecular Neurobiology*, 56(6), pp. 4479–4491. doi: 10.1007/s12035-018-1388-y.

Athanasiadis, A. *et al.* (2001) 'Crystal structure of the soluble form of equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone Actinia equina.', *Structure (London, England : 1993)*, 9(4), pp. 341–6. doi: 10.1016/s0969-2126(01)00592-5.

Badour, K. et al. (2007) 'Interaction of the Wiskott-Aldrich syndrome protein with sorting nexin 9 is required

for CD28 endocytosis and cosignaling in T cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(5), pp. 1593–1598. doi: 10.1073/pnas.0610543104.

Barbour, A. G. *et al.* (1982) 'Chlamydia trachomatis has penicillin-binding proteins but not detectable muramic acid.', *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 151(1), pp. 420–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7085567 (Accessed: 24 September 2019).

Bébéar, C. and de Barbeyrac, B. (2009) 'Genital Chlamydia trachomatis infections.', *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15(1), pp. 4–10. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02647.x.

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*. Wiley-Blackwell, 3(4), pp. 544–56. doi: 10.1002/mbo3.186.

Beeckman, D. S. A. and Vanrompay, D. C. G. (2009) 'Zoonotic Chlamydophila psittaci infections from a clinical perspective', *Clinical Microbiology and Infection*, 15(1), pp. 11–17. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02669.x.

Belland, R. J. *et al.* (2003) 'Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of Chlamydia trachomatis.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Acad Sciences, 100(14), pp. 8478–83. doi: 10.1073/pnas.1331135100.

Belland, R. J. *et al.* (2004) 'Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis.', *Cellular microbiology*, 6(2), pp. 117–27. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14706098 (Accessed: 6 August 2019).

Belland, R., Ojcius, D. M. and Byrne, G. I. (2004) 'Focus: Chlamydia', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 2(7), pp. 530–530. doi: 10.1038/nrmicro931.

Benzinger, A. *et al.* (2005) 'Targeted proteomic analysis of 14-3-3 sigma, a p53 effector commonly silenced in cancer.', *Molecular & cellular proteomics : MCP*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 4(6), pp. 785–95. doi: 10.1074/mcp.M500021-MCP200.

Berg, D., Holzmann, C. and Riess, O. (2003) '14-3-3 proteins in the nervous system', *Nature Reviews Neuroscience*, 4(9), pp. 752–762. doi: 10.1038/nrn1197.

Bergamaschi, A., Christensen, B. L. and Katzenellenbogen, B. S. (2011a) 'Reversal of endocrine resistance in breast cancer: interrelationships among 14-3-3ζ, FOXM1, and a gene signature associated with mitosis', *Breast Cancer Research*, 13(3), p. R70. doi: 10.1186/bcr2913.

Bergamaschi, A., Christensen, B. L. and Katzenellenbogen, B. S. (2011b) 'Reversal of endocrine resistance in breast cancer: interrelationships among 14-3-3ζ, FOXM1, and a gene signature associated with mitosis', *Breast Cancer Research*, 13(3), p. R70. doi: 10.1186/bcr2913.

Bernfield, M. et al. (1999) 'Functions of Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans', Annual Review of

Biochemistry, 68(1), pp. 729-777. doi: 10.1146/annurev.biochem.68.1.729.

Betts-Hampikian, H. J. and Fields, K. A. (2010) 'The Chlamydial Type III Secretion Mechanism: Revealing Cracks in a Tough Nut.', *Frontiers in microbiology*. Frontiers Media SA, 1, p. 114. doi: 10.3389/fmicb.2010.00114.

Betts-Hampikian, H. J. and Fields, K. A. (2011) 'Disulfide Bonding within Components of the Chlamydia Type III Secretion Apparatus Correlates with Development', *Journal of Bacteriology*, 193(24), pp. 6950–6959. doi: 10.1128/JB.05163-11.

Bevers, E. M. *et al.* (1999) 'Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. Elsevier, 1439(3), pp. 317– 330. doi: 10.1016/S1388-1981(99)00110-9.

Bialkowska, K. *et al.* (2003) '14-3-3 zeta mediates integrin-induced activation of Cdc42 and Rac. Platelet glycoprotein Ib-IX regulates integrin-induced signaling by sequestering 14-3-3 zeta.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 278(35), pp. 33342–50. doi: 10.1074/jbc.M301217200.

Birkelund, S. *et al.* (2009) 'Analysis of proteins in *Chlamydia trachomatis* L2 outer membrane complex, COMC', *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. Narnia, 55(2), pp. 187–195. doi: 10.1111/j.1574-695X.2009.00522.x.

Bischofberger, M., Gonzalez, M. R. and van der Goot, F. G. (2009) 'Membrane injury by pore-forming proteins', *Current Opinion in Cell Biology*, 21(4), pp. 589–595. doi: 10.1016/j.ceb.2009.04.003.

Blasi, F. (1996) 'Clinical features of Chlamydia pneumoniae acute respiratory infection.', *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 1 Suppl 1, pp. S14–S18. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11866789 (Accessed: 6 August 2019).

Blasi, F., Tarsia, P. and Aliberti, S. (2009) 'Chlamydophila pneumoniae', *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier, 15(1), pp. 29–35. doi: 10.1111/J.1469-0691.2008.02130.X.

Bonazzi, M. *et al.* (2011) 'Clathrin phosphorylation is required for actin recruitment at sites of bacterial adhesion and internalization', *The Journal of Cell Biology*, 195(3), pp. 525–536. doi: 10.1083/jcb.201105152.

Bonazzi, M. and Cossart, P. (2011) 'Impenetrable barriers or entry portals? The role of cell–cell adhesion during infection', *The Journal of Cell Biology*, 195(3), pp. 349–358. doi: 10.1083/jcb.201106011.

Borges, V. *et al.* (2012) 'Directional evolution of Chlamydia trachomatis towards niche-specific adaptation.', *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 194(22), pp. 6143–53. doi: 10.1128/JB.01291-12.

Bouillet P, S. A. (2002) 'BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. - PubMed - NCBI', *jCell Sci*, 115 (Pt 8), pp. 1567–74. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11950875 (Accessed: 22 August 2019).

Braselmann, S. and McCormick, F. (1995) 'Bcr and Raf form a complex in vivo via 14-3-3 proteins.', *The EMBO journal*, 14(19), pp. 4839–48. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7588613 (Accessed: 26 September 2019).

Braun, C. *et al.* (2019) 'CPn0572, the C. pneumoniae ortholog of TarP, reorganizes the actin cytoskeleton via a newly identified F-actin binding domain and recruitment of vinculin.', *PloS one*. Public Library of Science, 14(1), p. e0210403. doi: 10.1371/journal.pone.0210403.

Brett, S. J. *et al.* (1993) 'The invasin protein of Yersinia spp. provides co-stimulatory activity to human T cells through interaction with β integrins', *European Journal of Immunology*, 23(7), pp. 1608–1614. doi: 10.1002/eji.1830230732.

van den Brink, E., van der Laan, E., Killian, J.A., de Kruijff, B. (2004) 'Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile', *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*. Elsevier, 1666, pp. 275–288. Available at:

https://dspace.library.uu.nl/handle/1874/14611 (Accessed: 30 September 2019).

Brunet, A. *et al.* (1999) 'Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor', *Cell*. Cell Press, 96(6), pp. 857–868. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80595-4.

Bunney, T. D., van Walraven, H. S. and de Boer, A. H. (2001) '14-3-3 protein is a regulator of the mitochondrial and chloroplast ATP synthase', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(7), pp. 4249–4254. doi: 10.1073/pnas.061437498.

Campbell, L. A. and Rosenfeld, M. E. (2014) 'Persistent C. pneumoniae infection in atherosclerotic lesions: rethinking the clinical trials.', *Frontiers in cellular and infection microbiology*. Frontiers Media SA, 4, p. 34. doi: 10.3389/fcimb.2014.00034.

Carabeo, R. A. and Hackstadt, T. (2001) 'Isolation and characterization of a mutant Chinese hamster ovary cell line that is resistant to Chlamydia trachomatis infection at a novel step in the attachment process.', *Infection and immunity*, 69(9), pp. 5899–904. doi: 10.1128/iai.69.9.5899-5904.2001.

Carretero, G. P. B. *et al.* (2018) 'Dissecting the mechanism of action of actinoporins. Role of the Nterminal amphipathic α -helix in membrane binding and pore activity of sticholysins I and II', *PLOS ONE*. Edited by P. van der Wel. Public Library of Science, 13(8), p. e0202981. doi: 10.1371/journal.pone.0202981.

Castrillo, I. *et al.* (2010) 'Specific interactions of sticholysin I with model membranes: An NMR study', *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78(8), p. NA-NA. doi: 10.1002/prot.22712.

Celis, J. E. et al. (1990) 'Comprehensive two-dimensional gel protein databases offer a global approach to

the analysis of human cells: The transformed amnion cells (AMA) master database and its link to genome DNA sequence data', *Electrophoresis*, 11(12), pp. 989–1071. doi: 10.1002/elps.1150111202.

Chatterjee, D. *et al.* (2004) 'Reduction of 9-nitrocamptothecin-triggered apoptosis in DU-145 human prostate cancer cells by ectopic expression of 14-3-3zeta.', *International journal of oncology*, 25(2), pp. 503–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15254750 (Accessed: 30 September 2019).

Chaudhri, M., Scarabel, M. and Aitken, A. (2003) 'Mammalian and yeast 14-3-3 isoforms form distinct patterns of dimers in vivo.', *Biochemical and biophysical research communications*, 300(3), pp. 679–85. doi: 10.1016/s0006-291x(02)02902-9.

Cheah, P.-S. *et al.* (2012) 'Neurodevelopmental and neuropsychiatric behaviour defects arise from 14-3-3ζ deficiency', *Molecular Psychiatry*, 17(4), pp. 451–466. doi: 10.1038/mp.2011.158.

Chen, B. J. *et al.* (2007) 'Influenza Virus Hemagglutinin and Neuraminidase, but Not the Matrix Protein, Are Required for Assembly and Budding of Plasmid-Derived Virus-Like Particles', *Journal of Virology*, 81(13), pp. 7111–7123. doi: 10.1128/JVI.00361-07.

Chen, C. *et al.* (2006) 'The Hypothetical Protein CT813 Is Localized in the Chlamydia trachomatis Inclusion Membrane and Is Immunogenic in Women Urogenitally Infected with C. trachomatis', *Infection and Immunity*, 74(8), pp. 4826–4840. doi: 10.1128/IAI.00081-06.

Chi, E. Y., Kuo, C. C. and Grayston, J. T. (1987) 'Unique ultrastructure in the elementary body of Chlamydia sp. strain TWAR.', *Journal of Bacteriology*, 169(8), pp. 3757–3763. doi: 10.1128/jb.169.8.3757-3763.1987.

Chlanda, P. *et al.* (2015) 'Structural Analysis of the Roles of Influenza A Virus Membrane-Associated Proteins in Assembly and Morphology', *Journal of Virology*. Edited by A. García-Sastre, 89(17), pp. 8957– 8966. doi: 10.1128/JVI.00592-15.

Choroszy-Król, I. *et al.* (2014) 'Infections caused by Chlamydophila pneumoniae.', *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University*, 23(1), pp. 123–126.

Chung, J.-J. *et al.* (2009) 'PI3K/Akt signalling-mediated protein surface expression sensed by 14-3-3 interacting motif', *FEBS Journal*, 276(19), pp. 5547–5558. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07241.x.

Clark, G. J. *et al.* (1997) '14-3-3 ζ Negatively Regulates Raf-1 Activity by Interactions with the Raf-1 Cysteine-rich Domain', *Journal of Biological Chemistry*, 272(34), pp. 20990–20993. doi: 10.1074/jbc.272.34.20990.

Clay, A. T., Lu, P. and Sharom, F. J. (2015) 'Interaction of the P-Glycoprotein Multidrug Transporter with Sterols', *Biochemistry*, 54(43), pp. 6586–6597. doi: 10.1021/acs.biochem.5b00904.

Claywell, J. E., Matschke, L. M. and Fisher, D. J. (2016) 'The Impact of Protein Phosphorylation on Chlamydial Physiology.', *Frontiers in cellular and infection microbiology*. Frontiers Media SA, 6, p. 197.
doi: 10.3389/fcimb.2016.00197.

Clifton, D. R. *et al.* (2004) 'From The Cover: A chlamydial type III translocated protein is tyrosinephosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(27), pp. 10166–10171. doi: 10.1073/pnas.0402829101.

Confer, A. W. and Ayalew, S. (2013) 'The OmpA family of proteins: Roles in bacterial pathogenesis and immunity', *Veterinary Microbiology*, 163(3–4), pp. 207–222. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.08.019.

Cooper, G. M. (2000) *The cell : a molecular approach*. ASM Press. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9839/ (Accessed: 1 October 2019).

Cornell, B. and Toyo-oka, K. (2017) '14-3-3 Proteins in Brain Development: Neurogenesis, Neuronal Migration and Neuromorphogenesis', *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Frontiers, 10, p. 318. doi: 10.3389/fnmol.2017.00318.

Corsaro, D., Valassina, M. and Venditti, D. (2003) 'Increasing Diversity within Chlamydiae', *Critical Reviews in Microbiology*. Taylor & Francis, 29(1), pp. 37–78. doi: 10.1080/713610404.

Cosentino, K., Ros, U. and García-Sáez, A. J. (2016) 'Assembling the puzzle: Oligomerization of α-pore forming proteins in membranes', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. Elsevier, 1858(3), pp. 457–466. doi: 10.1016/J.BBAMEM.2015.09.013.

Cossart, P. and Helenius, A. (2014) 'Endocytosis of Viruses and Bacteria', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(8), pp. a016972–a016972. doi: 10.1101/cshperspect.a016972.

Cossart, P. and Roy, C. R. (2010) 'Manipulation of host membrane machinery by bacterial pathogens.', *Current opinion in cell biology*. NIH Public Access, 22(4), pp. 547–54. doi: 10.1016/j.ceb.2010.05.006.

Crawford, R. W., Reeve, K. E. and Gunn, J. S. (2010) 'Flagellated but Not Hyperfimbriated Salmonella enterica Serovar Typhimurium Attaches to and Forms Biofilms on Cholesterol-Coated Surfaces', *Journal of Bacteriology*, 192(12), pp. 2981–2990. doi: 10.1128/JB.01620-09.

Dahlén, G. H. *et al.* (1995) 'Lp(a) lipoprotein, IgG, IgA and IgM antibodies to Chlamydia pneumoniae and HLA class II genotype in early coronary artery disease', *Atherosclerosis*, 114(2), pp. 165–174. doi: 10.1016/0021-9150(94)05480-7.

Dahmani, I., Ludwig, K. and Chiantia, S. (2019) 'Influenza A matrix protein M1 induces lipid membrane deformation via protein multimerization', *Bioscience Reports*, 39(8), p. BSR20191024. doi: 10.1042/BSR20191024.

Dalal, S. N. *et al.* (1999) 'Cytoplasmic localization of human cdc25C during interphase requires an intact 14-3-3 binding site.', *Molecular and cellular biology*, 19(6), pp. 4465–79. doi: 10.1128/mcb.19.6.4465.

Darling, D. L., Yingling, J. and Wynshaw-Boris, A. (2005) 'Role of 14–3–3 Proteins in Eukaryotic Signaling and Development', in *Current topics in developmental biology*, pp. 281–315. doi: 10.1016/S0070-

2153(05)68010-6.

Dautry-Varsat, A., Balañá, M. E. and Wyplosz, B. (2004) 'Chlamydia--host cell interactions: recent advances on bacterial entry and intracellular development.', *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 5(8), pp. 561–70. doi: 10.1111/j.1398-9219.2004.00207.x.

Dcrjsr (2011) *Hand-drawn_helix*. Available at: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/94/Hand-drawn_helix_ribbons_at_various_angles.jpg (Accessed: 29 September 2019).

Dean, D. and Powers, V. C. (2001) 'Persistent Chlamydia trachomatis Infections Resist Apoptotic Stimuli', *Infection and Immunity*, 69(4), pp. 2442–2447. doi: 10.1128/IAI.69.4.2442-2447.2001.

Detels, R. *et al.* (2011) 'The incidence and correlates of symptomatic and asymptomatic Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae infections in selected populations in five countries.', *Sexually transmitted diseases*, 38(6), pp. 503–9.

Domman, D. and Horn, M. (2015) 'Following the Footsteps of Chlamydial Gene Regulation', *Molecular Biology and Evolution*. Narnia, 32(12), p. msv193. doi: 10.1093/molbev/msv193.

Dong, H. *et al.* (2012) 'Glycines: role in α-helical membrane protein structures and a potential indicator of native conformation.', *Biochemistry*. NIH Public Access, 51(24), pp. 4779–89. doi: 10.1021/bi300090x.

Draeger, A., Monastyrskaya, K. and Babiychuk, E. B. (2011) 'Plasma membrane repair and cellular damage control: The annexin survival kit', *Biochemical Pharmacology*, 81(6), pp. 703–712. doi: 10.1016/j.bcp.2010.12.027.

Dreux, N. *et al.* (2013) 'Point Mutations in FimH Adhesin of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli Enhance Intestinal Inflammatory Response', *PLoS Pathogens*. Edited by M. A. Mulvey, 9(1), p. e1003141. doi: 10.1371/journal.ppat.1003141.

Du, X., Fox, J. E. and Pei, S. (1996) 'Identification of a binding sequence for the 14-3-3 protein within the cytoplasmic domain of the adhesion receptor, platelet glycoprotein lb alpha.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 271(13), pp. 7362–7. doi: 10.1074/jbc.271.13.7362.

Everett, K. D. E., Bush, R. M. and Andersen, A. A. (1999) 'Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms', *International Journal of Systematic Bacteriology*. Microbiology Society, 49(2), pp. 415–440. doi: 10.1099/00207713-49-2-415.

Fadel, S. and Eley, A. (2007) 'Chlamydia trachomatis OmcB protein is a surface-exposed glycosaminoglycan-dependent adhesin', *Journal of Medical Microbiology*. Microbiology Society, 56(1), pp. 15–22. doi: 10.1099/jmm.0.46801-0.

Fan, T. *et al.* (1998) 'Inhibition of Apoptosis in Chlamydia-infected Cells: Blockade of Mitochondrial Cytochrome c Release and Caspase Activation', *The Journal of Experimental Medicine*, 187(4), pp. 487–496. doi: 10.1084/jem.187.4.487.

Fan, T. *et al.* (2007) 'Up-regulation of 14-3-3 in Lung Cancer and Its Implication as Prognostic and Therapeutic Target', *Cancer Research*, 67(16), pp. 7901–7906. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0090.

Fanger, G. R. *et al.* (1998) '14-3-3 proteins interact with specific MEK kinases.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 273(6), pp. 3476–83. doi: 10.1074/jbc.273.6.3476.

Fantl, W. J. *et al.* (1994) 'Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins', *Nature*. Nature Publishing Group, 371(6498), pp. 612–614. doi: 10.1038/371612a0.

Fechtner, T. *et al.* (2013) 'Characterization of the interaction between the chlamydial adhesin OmcB and the human host cell.', *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 195(23), pp. 5323–33. doi: 10.1128/JB.00780-13.

Fechtner, T. (2013) *Charakterisierung der neuen, potentiellen Adhäsine Yaa1, Yaa2 und Yaa3 von Chlamydia pneumoniae*. Heinrich-Heine-University Düsseldorf. Available at: https://docserv.uniduesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=25996 (Accessed: 25 September 2019).

Fechtner, T., Galle, J. N. and Hegemann, J. H. (2016) 'The novel chlamydial adhesin CPn0473 mediates the lipid raft-dependent uptake of Chlamydia pneumoniae.', *Cellular microbiology*, 18(8), pp. 1094–105. doi: 10.1111/cmi.12569.

Fields, K. A. and Hackstadt, T. (2002) 'The Chlamydial Inclusion: Escape from the Endocytic Pathway', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 18(1), pp. 221–245. doi: 10.1146/annurev.cellbio.18.012502.105845.

Fischer, A. *et al.* (2009) 'Regulation of RAF Activity by 14-3-3 Proteins', *Journal of Biological Chemistry*, 284(5), pp. 3183–3194. doi: 10.1074/jbc.M804795200.

Fischer, S. F. *et al.* (2001) 'Characterization of Antiapoptotic Activities of Chlamydia pneumoniae in Human Cells', *Infection and Immunity*, 69(11), pp. 7121–7129. doi: 10.1128/IAI.69.11.7121-7129.2001.

Fischer, S. F. *et al.* (2004) 'Protection against CD95-induced apoptosis by chlamydial infection at a mitochondrial step.', *Infection and immunity*, 72(2), pp. 1107–15. doi: 10.1128/iai.72.2.1107-1115.2004.

Foster, T. J. *et al.* (2014) 'Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus', *Nature Reviews Microbiology*, 12(1), pp. 49–62. doi: 10.1038/nrmicro3161.

Freed, E., McCormick, F. and Ruggieri, R. (1994) 'Proteins of the 14-3-3 family associate with Raf and contribute to its activation.', *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 59, pp. 187–93. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7587069 (Accessed: 8 August 2019).

Fu, H., Coburn, J. and Collier, R. J. (1993) 'The eukaryotic host factor that activates exoenzyme S of Pseudomonas aeruginosa is a member of the 14-3-3 protein family.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 90(6), pp. 2320–4. doi: 10.1073/pnas.90.6.2320.

Fu, H., Subramanian, R. R. and Masters, S. C. (2000) '14-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA , 40(1), pp. 617–647. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.40.1.617.

Furukawa, Y. *et al.* (1993) 'Demonstration of the Phosphorylation-Dependent Interaction of Tryptophan Hydroxylase with the 14-3-3 Protein', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press, 194(1), pp. 144–149. doi: 10.1006/BBRC.1993.1796.

Galle, J. N. (2018) *Die Rolle des LIPP Proteins in einer Chlamydia pneumoniae Infektion*. Heinrich-Heine-University Düsseldorf. Available at: https://docserv.uniduesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=44654.

Galle, J. N. *et al.* (2019) 'A Chlamydia pneumoniae adhesin induces phosphatidylserine exposure on host cells', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 10(1), p. 4644. doi: 10.1038/s41467-019-12419-8.

Ganguly, S. *et al.* (2005) 'Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N-acetyltransferase mediated by phosphoserine-205', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(4), pp. 1222–1227. doi: 10.1073/pnas.0406871102.

Garcia-Guzman, M. *et al.* (1999) 'Cell adhesion regulates the interaction between the docking protein p130(Cas) and the 14-3-3 proteins.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 274(9), pp. 5762–8. doi: 10.1074/jbc.274.9.5762.

García-Sáez, A. J. *et al.* (2011) 'Oligomerization and pore formation by equinatoxin II inhibit endocytosis and lead to plasma membrane reorganization.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 286(43), pp. 37768–77. doi: 10.1074/jbc.M111.281592.

Garcia, P. S. *et al.* (2012) 'Sticholysin II: A pore-forming toxin as a probe to recognize sphingomyelin in artificial and cellular membranes', *Toxicon*, 60(5), pp. 724–733. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.05.018.

Gardino, A. K., Smerdon, S. J. and Yaffe, M. B. (2006) 'Structural determinants of 14-3-3 binding specificities and regulation of subcellular localization of 14-3-3-ligand complexes: A comparison of the X-ray crystal structures of all human 14-3-3 isoforms', *Seminars in Cancer Biology*, 16(3), pp. 173–182. doi: 10.1016/j.semcancer.2006.03.007.

Gautier, R. *et al.* (2008) 'HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific -helical properties', *Bioinformatics*, 24(18), pp. 2101–2102. doi: 10.1093/bioinformatics/btn392.

Gérard, H. C. *et al.* (2006) 'Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae in the Alzheimer's brain.', *FEMS immunology and medical microbiology*, 48(3), pp. 355–66. doi: 10.1111/j.1574-695X.2006.00154.x.

Gerlach, R. and Hensel, M. (2007) 'Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens', *International Journal of Medical Microbiology*, 297(6), pp. 401–415. doi: 10.1016/j.ijmm.2007.03.017.

Giménez-Andrés, M., Čopič, A. and Antonny, B. (2018) 'The Many Faces of Amphipathic Helices.', *Biomolecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 8(3). doi: 10.3390/biom8030045.

Gómez-Puertas, P. *et al.* (2000) 'Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding.', *Journal of virology*, 74(24), pp. 11538–47. doi: 10.1128/jvi.74.24.11538-11547.2000.

Grayston, J. T. *et al.* (1989) 'Chlamydia pneumoniae sp. nov. for Chlamydia sp. Strain TWAR', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(1), pp. 88–90. doi: 10.1099/00207713-39-1-88.

Grayston, J. T. *et al.* (1993) 'Evidence that Chlamydia pneumoniae causes pneumonia and bronchitis.', *The Journal of infectious diseases*, 168(5), pp. 1231–5.

Grecco, H. E., Schmick, M. and Bastiaens, P. I. H. (2011) 'Signaling from the living plasma membrane.', *Cell*. Elsevier, 144(6), pp. 897–909. doi: 10.1016/j.cell.2011.01.029.

Grieshaber, S. S., Grieshaber, N. A. and Hackstadt, T. (2003) 'Chlamydia trachomatis uses host cell dynein to traffic to the microtubule-organizing center in a p50 dynamitin-independent process', *Journal of Cell Science*, 116(18), pp. 3793–3802. doi: 10.1242/jcs.00695.

Grimwood, J., Olinger, L. and Stephens, R. S. (2001) 'Expression of Chlamydia pneumoniae polymorphic membrane protein family genes.', *Infection and immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 69(4), pp. 2383–9. doi: 10.1128/IAI.69.4.2383-2389.2001.

Groen, A. *et al.* (2011) 'Complementary Functions of the Flippase ATP8B1 and the Floppase ABCB4 in Maintaining Canalicular Membrane Integrity', *Gastroenterology*, 141(5), pp. 1927-1937.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2011.07.042.

Grozinger, C. M. and Schreiber, S. L. (2000) 'Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3- 3-dependent cellular localization', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(14), pp. 7835–7840. doi: 10.1073/pnas.140199597.

Gu, Y. *et al.* (2018) '14-3-3ζ binds the proteasome, limits proteolytic function and enhances sensitivity to proteasome inhibitors', *Leukemia*, 32(3), pp. 744–751. doi: 10.1038/leu.2017.288.

Gutierrez-Aguirre, I. *et al.* (2004) 'Membrane insertion of the N-terminal α-helix of equinatoxin II, a sea anemone cytolytic toxin', *Biochemical Journal*, 384(2), pp. 421–428. doi: 10.1042/BJ20040601.

Hahn, D. L. *et al.* (2002) 'Chlamydia pneumoniae as a respiratory pathogen.', *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 7, pp. e66-76.

Hammerschlag, M. R. (1999) 'Infectious Diseases in Clinical Practice', *Infectious Diseases in Clinical Practice 8(5)*, pp. 232–240.

Hamon, Y. *et al.* (2000) 'ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine.', *Nature Cell Biology*, 2(7), pp. 399–406. doi: 10.1038/35017029.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000) 'The Hallmarks of Cancer', *Cell*. Cell Press, 100(1), pp. 57–70. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.

Hanisch, P. *et al.* (2019) 'Chlamydia pneumoniae adhesin LIPP recruits and interacts with host cell 14-3-3ζ in early infection', *in submission*.

Hänsch, S. (2016) *Analyse der neuen potentiellen Effektorproteine CPn0712, CPn0677 und CPn0678 von Chlamydia pneumoniae*. Heinrich-Heine-University Düsseldorf. Available at: https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=38920 (Accessed: 25 September 2019).

Harris, S. R. *et al.* (2012) 'Whole-genome analysis of diverse Chlamydia trachomatis strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing', *Nature Genetics*, 44(4), pp. 413–419. doi: 10.1038/ng.2214.

Hase, K. *et al.* (2009) 'Uptake through glycoprotein 2 of FimH+ bacteria by M cells initiates mucosal immune response', *Nature*, 462(7270), pp. 226–230. doi: 10.1038/nature08529.

Hatch, T. P. (1996) 'Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in chlamydiae?', *Journal of Bacteriology*, 178(1), pp. 1–5. doi: 10.1128/jb.178.1.1-5.1996.

Heise, T. and Dersch, P. (2006) 'Identification of a domain in Yersinia virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(9), pp. 3375–3380. doi: 10.1073/pnas.0507749103.

van Helvoort, A. *et al.* (1996) 'MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine.', *Cell*, 87(3), pp. 507–17. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81370-7.

Henderson, I. R. and Lam, A. C. (2001) 'Polymorphic proteins of Chlamydia spp.--autotransporters beyond the Proteobacteria.', *Trends in microbiology*, 9(12), pp. 573–8.

Heuck, A. P., Tweten, R. K. and Johnson, A. E. (2001) 'β-Barrel Pore-Forming Toxins: Intriguing Dimorphic Proteins [†]', *Biochemistry*, 40(31), pp. 9065–9073. doi: 10.1021/bi0155394.

Hileman, R. E. *et al.* (1998) 'Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins', *BioEssays.* John Wiley & Sons, Ltd, 20(2), pp. 156–167. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199802)20:2<156::AID-BIES8>3.0.CO;2-R.

Hinds, M. G. *et al.* (2002) 'Solution structure of the eukaryotic pore-forming cytolysin equinatoxin II: implications for pore formation', *Journal of Molecular Biology*, 315(5), pp. 1219–1229. doi:

10.1006/jmbi.2001.5321.

Hong, Q. *et al.* (2002) 'Two-step Membrane Binding by Equinatoxin II, a Pore-forming Toxin from the Sea Anemone, Involves an Exposed Aromatic Cluster and a Flexible Helix', *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), pp. 41916–41924. doi: 10.1074/jbc.M204625200.

Horn, M. (2008) '*Chlamydiae* as Symbionts in Eukaryotes', *Annual Review of Microbiology*. Annual Reviews , 62(1), pp. 113–131. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162818.

Hybiske, K. and Stephens, R. S. (2007) 'Mechanisms of Chlamydia trachomatis entry into nonphagocytic cells.', *Infection and immunity*, 75(8), pp. 3925–34. doi: 10.1128/IAI.00106-07.

Ikeda, M. *et al.* (2008) 'Identification of YWHAE, a gene encoding 14-3-3epsilon, as a possible susceptibility gene for schizophrenia', *Human Molecular Genetics*, 17(20), pp. 3212–3222. doi: 10.1093/hmg/ddn217.

Jean, S. and Kiger, A. A. (2012) 'Coordination between RAB GTPase and phosphoinositide regulation and functions', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(7), pp. 463–470. doi: 10.1038/nrm3379.

Jiao, C.-Y. *et al.* (2009) 'Translocation and Endocytosis for Cell-penetrating Peptide Internalization', *Journal of Biological Chemistry*, 284(49), pp. 33957–33965. doi: 10.1074/jbc.M109.056309.

Jin, J. *et al.* (2004) 'Proteomic, Functional, and Domain-Based Analysis of In Vivo 14-3-3 Binding Proteins Involved in Cytoskeletal Regulation and Cellular Organization', *Current Biology*. Cell Press, 14(16), pp. 1436–1450. doi: 10.1016/J.CUB.2004.07.051.

Johnson, D. L. *et al.* (2009) 'A novel inhibitor of Chlamydophila pneumoniae protein kinase D (PknD) inhibits phosphorylation of CdsD and suppresses bacterial replication.', *BMC microbiology*. BioMed Central, 9, p. 218. doi: 10.1186/1471-2180-9-218.

Johnson, D. L. and Mahony, J. B. (2007) 'Chlamydophila pneumoniae PknD exhibits dual amino acid specificity and phosphorylates Cpn0712, a putative type III secretion YscD homolog.', *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology Journals, 189(21), pp. 7549–55. doi: 10.1128/JB.00893-07.

Jutras, I., Abrami, L. and Dautry-Varsat, A. (2003) 'Entry of the lymphogranuloma venereum strain of Chlamydia trachomatis into host cells involves cholesterol-rich membrane domains.', *Infection and immunity*, 71(1), pp. 260–6.

Kamp, D. and Haest, C. W. (1998) 'Evidence for a role of the multidrug resistance protein (MRP) in the outward translocation of NBD-phospholipids in the erythrocyte membrane', *Biochimica et Biophysica Acta* (*BBA*) - *Biomembranes*. Elsevier, 1372(1), pp. 91–101. doi: 10.1016/S0005-2736(98)00049-2.

Kligys, K. *et al.* (2009) '14-3-3zeta/tau heterodimers regulate Slingshot activity in migrating keratinocytes.', *Biochemical and biophysical research communications*. NIH Public Access, 383(4), pp. 450–4. doi:

10.1016/j.bbrc.2009.04.031.

Klöckner, A. *et al.* (2014) 'AmiA is a penicillin target enzyme with dual activity in the intracellular pathogen Chlamydia pneumoniae', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 5(1), p. 4201. doi: 10.1038/ncomms5201.

Kokes, M. *et al.* (2015) 'Integrating chemical mutagenesis and whole-genome sequencing as a platform for forward and reverse genetic analysis of Chlamydia.', *Cell host & microbe*. NIH Public Access, 17(5), pp. 716–25. doi: 10.1016/j.chom.2015.03.014.

Krachler, A. M., Ham, H. and Orth, K. (2011) 'Outer membrane adhesion factor multivalent adhesion molecule 7 initiates host cell binding during infection by Gram-negative pathogens', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(28), pp. 11614–11619. doi: 10.1073/pnas.1102360108.

Kristan, K. *et al.* (2007) 'The equinatoxin N-terminus is transferred across planar lipid membranes and helps to stabilize the transmembrane pore', *FEBS Journal*, 274(2), pp. 539–550. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05608.x.

Kuo, C.C, Jackson, L.A, Campbell, L.A, Grayston, J. . (1995) 'Chlamydia pneumoniae (TWAR).', *Clinical microbiology reviews*, 8(4), pp. 451–61.

Lai, J. C. C. *et al.* (2010) 'Formation of virus-like particles from human cell lines exclusively expressing influenza neuraminidase', *Journal of General Virology*, 91(9), pp. 2322–2330. doi: 10.1099/vir.0.019935-0.

Latham, T. and Galarza, J. M. (2001) 'Formation of Wild-Type and Chimeric Influenza Virus-Like Particles following Simultaneous Expression of Only Four Structural Proteins', *Journal of Virology*, 75(13), pp. 6154–6165. doi: 10.1128/JVI.75.13.6154-6165.2001.

Layfield, R. *et al.* (1996) 'Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease brains contain 14-3-3 proteins', *Neuroscience Letters.* Elsevier, 209(1), pp. 57–60. doi: 10.1016/0304-3940(96)12598-2.

Leffers, H. *et al.* (1993) 'Molecular Cloning and Expression of the Transformation Sensitive Epithelial Marker Stratifin: A Member of a Protein Family that has been Involved in the Protein Kinase C Signalling Pathway', *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 231(4), pp. 982–998. doi: 10.1006/JMBI.1993.1346.

Lenoir, G. *et al.* (2009) 'Cdc50p plays a vital role in the ATPase reaction cycle of the putative aminophospholipid transporter Drs2p.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 284(27), pp. 17956–67. doi: 10.1074/jbc.M109.013722.

Leontiadou, H., Mark, A. E. and Marrink, S. J. (2006) 'Antimicrobial Peptides in Action', *Journal of the American Chemical Society*, 128(37), pp. 12156–12161. doi: 10.1021/ja062927q.

Lewis, M. E. *et al.* (2014) 'Morphologic and molecular evaluation of Chlamydia trachomatis growth in human endocervix reveals distinct growth patterns.', *Frontiers in cellular and infection microbiology*.

Frontiers Media SA, 4, p. 71. doi: 10.3389/fcimb.2014.00071.

Li, J. *et al.* (2015) 'A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems', *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Elsevier, 10(2), pp. 81–98. doi: 10.1016/J.AJPS.2014.09.004.

Liang, X. *et al.* (2008) 'An obligatory heterodimer of 14-3-3beta and 14-3-3epsilon is required for aldosterone regulation of the epithelial sodium channel.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 283(41), pp. 27418–25. doi: 10.1074/jbc.M803687200.

Liechti, G. W. *et al.* (2014) 'A new metabolic cell-wall labelling method reveals peptidoglycan in Chlamydia trachomatis', *Nature*. Nature Publishing Group, 506(7489), pp. 507–510. doi: 10.1038/nature12892.

Lillington, J., Geibel, S. and Waksman, G. (2015) 'Reprint of "Biogenesis and adhesion of type 1 and P pili", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850(3), pp. 554–564. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.07.009.

Lin, M. *et al.* (2009) 'Copy number gain and oncogenic activity of YWHAZ/14-3-3ζ in head and neck squamous cell carcinoma', *International Journal of Cancer*, 125(3), pp. 603–611. doi: 10.1002/ijc.24346.

Linhardt, R. J. and Toida, T. (2004) 'Role of Glycosaminoglycans in Cellular Communication', *Accounts of Chemical Research*, 37(7), pp. 431–438. doi: 10.1021/ar030138x.

Liu, D. *et al.* (1995) 'Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein', *Nature*. Nature Publishing Group, 376(6536), pp. 191–194. doi: 10.1038/376191a0.

Liu, X. *et al.* (2010) 'Identification of Chlamydia trachomatis Outer Membrane Complex Proteins by Differential Proteomics', *Journal of Bacteriology*, 192(11), pp. 2852–2860. doi: 10.1128/JB.01628-09.

Longbottom, D. and Coulter, L. J. (2003) 'Animal chlamydioses and zoonotic implications.', *Journal of comparative pathology*, 128(4), pp. 217–44.

Lopez-Girona, A. *et al.* (1999) 'Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein', *Nature*. Nature Publishing Group, 397(6715), pp. 172–175. doi: 10.1038/16488.

Lu, J. *et al.* (2009) '14-3-3ζ Cooperates with ErbB2 to Promote Ductal Carcinoma In Situ Progression to Invasive Breast Cancer by Inducing Epithelial-Mesenchymal Transition', *Cancer Cell*, 16(3), pp. 195–207. doi: 10.1016/j.ccr.2009.08.010.

Luczak, S. E. T. *et al.* (2016) 'The Chlamydia Pneumoniae Adhesin Pmp21 forms oligomers with adhesive properties', *Journal of Biological Chemistry*, 291(43), pp. 22806–22818. doi: 10.1074/jbc.M116.728915.

Malovrh, P. *et al.* (2003) 'A Novel Mechanism of Pore Formation', *Journal of Biological Chemistry*, 278(25), pp. 22678–22685. doi: 10.1074/jbc.M300622200.

Mancheño, J. M. *et al.* (2001) 'Partially folded states of the cytolytic protein sticholysin II.', *Biochimica et biophysica acta*, 1545(1–2), pp. 122–31. doi: 10.1016/s0167-4838(00)00269-7.

Mancheño, J. M. *et al.* (2003) 'Crystal and Electron Microscopy Structures of Sticholysin II Actinoporin Reveal Insights into the Mechanism of Membrane Pore Formation', *Structure*, 11(11), pp. 1319–1328. doi: 10.1016/j.str.2003.09.019.

Mariana Ruiz Villareal (2007) *Phospholipids aqueous solution structures*. Available at: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phospholipids_aqueous_solution_structures.svg (Accessed: 30 September 2019).

Masters, S.C., ‡ *et al.* (1999) 'Interaction of 14-3-3 with a Nonphosphorylated Protein Ligand, Exoenzyme S of Pseudomonas aeruginosa†'. American Chemical Society. doi: 10.1021/BI982492M.

Matsumura, Y. *et al.* (2007) 'ABCA3-mediated choline-phospholipids uptake into intracellular vesicles in A549 cells', *FEBS Letters*. No longer published by Elsevier, 581(17), pp. 3139–3144. doi: 10.1016/J.FEBSLET.2007.05.078.

McCoy, A. J. and Maurelli, A. T. (2006) 'Building the invisible wall: updating the chlamydial peptidoglycan anomaly', *Trends in Microbiology*, 14(2), pp. 70–77. doi: 10.1016/j.tim.2005.12.004.

McGowan, J. E. *et al.* (2017) 'Bioinformatic analysis reveals new determinants of antigenic 14-3-3 proteins and a novel antifungal strategy.', *PloS one*. Public Library of Science, 12(12), p. e0189503. doi: 10.1371/journal.pone.0189503.

McMahon, H. T. and Boucrot, E. (2015) 'Membrane curvature at a glance', *Journal of Cell Science*. Company of Biologists, 128(6), p. 1065. doi: 10.1242/JCS.114454.

Meek, S. E. M., Lane, W. S. and Piwnica-Worms, H. (2004) 'Comprehensive proteomic analysis of interphase and mitotic 14-3-3-binding proteins.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 279(31), pp. 32046–54. doi: 10.1074/jbc.M403044200.

van Meer, G., Voelker, D. R. and Feigenson, G. W. (2008) 'Membrane lipids: where they are and how they behave', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), pp. 112–124. doi: 10.1038/nrm2330.

Menestrina, G., Cabiaux, V. and Tejuca, M. (1999) 'Secondary Structure of Sea Anemone Cytolysins in Soluble and Membrane Bound Form by Infrared Spectroscopy', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 254(1), pp. 174–180. doi: 10.1006/bbrc.1998.9898.

Mengaud, J. *et al.* (1996) 'E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of L. monocytogenes into epithelial cells.', *Cell*, 84(6), pp. 923–32. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81070-3.

Messaritou, G., Grammenoudi, S. and Skoulakis, E. M. C. (2010) 'Dimerization is essential for 14-3-3zeta stability and function in vivo.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 285(3), pp. 1692–700. doi: 10.1074/jbc.M109.045989.

Michaud, N. R. *et al.* (1995) '14-3-3 is not essential for Raf-1 function: identification of Raf-1 proteins that are biologically activated in a 14-3-3- and Ras-independent manner.', *Molecular and Cellular Biology*.

American Society for Microbiology (ASM), 15(6), p. 3390. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC230573/ (Accessed: 25 September 2019).

Mitsi, M. *et al.* (2008) 'A catalytic role of heparin within the extracellular matrix.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 283(50), pp. 34796–807. doi: 10.1074/jbc.M806692200.

Moelleken, K. and Hegemann, J. H. (2008) 'The Chlamydia outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding.', *Molecular microbiology*. Wiley-Blackwell, 67(2), pp. 403–19. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.06050.x.

Molday, R. S., Zhong, M. and Quazi, F. (2009) 'The role of the photoreceptor ABC transporter ABCA4 in lipid transport and Stargardt macular degeneration.', *Biochimica et biophysica acta*. NIH Public Access, 1791(7), pp. 573–83. doi: 10.1016/j.bbalip.2009.02.004.

Mölleken, K., Becker, E. and Hegemann, J. H. (2013) 'The Chlamydia pneumoniae Invasin Protein Pmp21 Recruits the EGF Receptor for Host Cell Entry', *PLoS Pathogens*. Edited by G. T. Van Nhieu, 9(4), p. e1003325. doi: 10.1371/journal.ppat.1003325.

Mölleken, K. and Hegemann, J. H. (2017) 'Acquisition of Rab11 and Rab11-Fip2—A novel strategy for Chlamydia pneumoniae early survival', *PLOS Pathogens*. Edited by B. K. Coombes, 13(8), p. e1006556. doi: 10.1371/journal.ppat.1006556.

Mölleken, K., Schmidt, E. and Hegemann, J. H. (2010) 'Members of the Pmp protein family of Chlamydia pneumoniae mediate adhesion to human cells via short repetitive peptide motifs.', *Molecular microbiology*. Wiley-Blackwell, 78(4), pp. 1004–17. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07386.x.

Montigiani, S. *et al.* (2002) 'Genomic Approach for Analysis of Surface Proteins in Chlamydia pneumoniae', *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 70(1), p. 368. doi: 10.1128/IAI.70.1.368-379.2002.

Morré, S. A. *et al.* (2000) 'Urogenital Chlamydia trachomatis serovars in men and women with a symptomatic or asymptomatic infection: an association with clinical manifestations?', *Journal of clinical microbiology*, 38(6), pp. 2292–6.

Mostowy, S., Danckaert, A., *et al.* (2009) 'Septin 11 Restricts InIB-mediated Invasion by *Listeria*', *Journal of Biological Chemistry*, 284(17), pp. 11613–11621. doi: 10.1074/jbc.M900231200.

Mostowy, S., Nam Tham, T., *et al.* (2009) 'Septins Regulate Bacterial Entry into Host Cells', *PLoS ONE*. Edited by R. H. Valdivia, 4(1), p. e4196. doi: 10.1371/journal.pone.0004196.

Müller, K.-D. *et al.* (2000) 'Neochlamydia hartmannellae gen. nov., sp. nov. (Parachlamydiaceae), an endoparasite of the amoeba Hartmannella vermiformis', *Microbiology*, 146(5), pp. 1231–1239. doi: 10.1099/00221287-146-5-1231.

Murata-Kamiya, N. *et al.* (2010) 'Helicobacter pylori Exploits Host Membrane Phosphatidylserine for Delivery, Localization, and Pathophysiological Action of the CagA Oncoprotein', *Cell Host & Microbe*, 7(5), pp. 399–411. doi: 10.1016/j.chom.2010.04.005.

Murra, G. (2010) *Identifizierung und Charakterisierung von Adhäsionsproteinen des humanpathogenen Erregers Chlamydia pneumoniae*. Heinrich-Heine-University Düsseldorf. Available at: https://docserv.uniduesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=13936 (Accessed: 25 September 2019).

Muslin, A. J. *et al.* (1996) 'Interaction of 14-3-3 with Signaling Proteins Is Mediated by the Recognition of Phosphoserine', *Cell.* Cell Press, 84(6), pp. 889–897. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81067-3.

Muslin, A. J. and Xing, H. (2000) '14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference.', *Cellular signalling*, 12(11–12), pp. 703–9. doi: 10.1016/s0898-6568(00)00131-5.

Neal, C. L. *et al.* (2009) '14-3-3 Overexpression Defines High Risk for Breast Cancer Recurrence and Promotes Cancer Cell Survival', *Cancer Research*, 69(8), pp. 3425–3432. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2765.

Neal, C. L. *et al.* (2012) 'Overexpression of 14-3-3ζ in cancer cells activates PI3K via binding the p85 regulatory subunit', *Oncogene*, 31(7), pp. 897–906. doi: 10.1038/onc.2011.284.

Neal, C. L. and Yu, D. (2010) '14-3-3 ζ as a prognostic marker and therapeutic target for cancer', *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 14(12), pp. 1343–1354. doi: 10.1517/14728222.2010.531011.

Neumann, J., Rose-Sperling, D. and Hellmich, U. A. (2017) 'Diverse relations between ABC transporters and lipids: An overview', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. Elsevier, 1859(4), pp. 605–618. doi: 10.1016/J.BBAMEM.2016.09.023.

Nieto-Torres, J. *et al.* (2015) 'Relevance of Viroporin Ion Channel Activity on Viral Replication and Pathogenesis', *Viruses.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 7(7), pp. 3552–3573. doi: 10.3390/v7072786.

Nomura, M. *et al.* (2015) '14-3-3 interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 290(11), p. 6753. doi: 10.1074/jbc.A114.207880.

Nunes, A. and Gomes, J. P. (2014) 'Evolution, phylogeny, and molecular epidemiology of Chlamydia', *Infection, Genetics and Evolution*, 23, pp. 49–64. doi: 10.1016/j.meegid.2014.01.029.

O'Toole, T. E. *et al.* (2011) 'Tiam1 is recruited to β1-integrin complexes by 14-3-3ζ where it mediates integrin-induced Rac1 activation and motility', *Journal of Cellular Physiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 226(11), pp. 2965–2978. doi: 10.1002/jcp.22644.

Obsil, T. *et al.* (2001) 'Crystal structure of the 14-3-3zeta:serotonin N-acetyltransferase complex. a role for scaffolding in enzyme regulation.', *Cell*, 105(2), pp. 257–67. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00316-6.

Obsil, T. and Obsilova, V. (2011) 'Structural basis of 14-3-3 protein functions', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 22(7), pp. 663–672. doi: 10.1016/j.semcdb.2011.09.001.

Ojcius, D. M., Darville, T. and Bavoil, P. M. (2005) 'Can Chlamydia Be Stopped?', *Scientific American*. Scientific American, Inc., 292(5), pp. 72–79. doi: 10.1038/scientificamerican0505-72.

Ojicius, D. M., Darville, T., Bavoil, P. M. (2006) *Chlamydien-Infektionen: Die heimliche Seuche - Spektrum der Wissenschaft.*

Van Ooij, C. *et al.* (1998) 'Fusion of Chlamydia trachomatis-containing inclusions is inhibited at low temperatures and requires bacterial protein synthesis.', *Infection and immunity*, 66(11), pp. 5364–71. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9784545 (Accessed: 24 September 2019).

Ostrerova, N. *et al.* (1999) 'alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(14), pp. 5782–91. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10407019 (Accessed: 8 August 2019).

Owen, D. M. *et al.* (2012) 'The lipid raft hypothesis revisited - New insights on raft composition and function from super-resolution fluorescence microscopy', *BioEssays*, 34(9), pp. 739–747. doi: 10.1002/bies.201200044.

Pankov, R. *et al.* (2006) 'The plasma membrane lipid composition affects fusion between cells and model membranes', *Chemico-Biological Interactions*. Elsevier, 164(3), pp. 167–173. doi: 10.1016/J.CBI.2006.09.010.

Pautot, S., Frisken, B. J. and Weitz, D. A. (2003) 'Engineering asymmetric vesicles.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 100(19), pp. 10718–21. doi: 10.1073/pnas.1931005100.

Pawson, T. and Scott, J. D. (1997) 'Signaling Through Scaffold, Anchoring, and Adaptor Proteins', *Science*, 278(5346), pp. 2075–2080. doi: 10.1126/science.278.5346.2075.

Pedrera, L. *et al.* (2014) 'Sticholysin I–membrane interaction: An interplay between the presence of sphingomyelin and membrane fluidity', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. Elsevier, 1838(7), pp. 1752–1759. doi: 10.1016/J.BBAMEM.2014.03.011.

Pennington, K. *et al.* (2018) 'The dynamic and stress-adaptive signaling hub of 14-3-3: emerging mechanisms of regulation and context-dependent protein–protein interactions', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 37(42), pp. 5587–5604. doi: 10.1038/s41388-018-0348-3.

Peters, J. *et al.* (2007) 'Type III secretion à la Chlamydia', *Trends in Microbiology*, 15(6), pp. 241–251. doi: 10.1016/j.tim.2007.04.005.

Pinot, M. *et al.* (2018) 'Feedback between membrane tension, lipid shape and curvature in the formation of packing defects', *bioRxiv*. Cold Spring Harbor Laboratory, p. 389627. doi: 10.1101/389627.

Pizarro-Cerdá, J. and Cossart, P. (2006) 'Bacterial Adhesion and Entry into Host Cells', *Cell*. Cell Press, 124(4), pp. 715–727. doi: 10.1016/J.CELL.2006.02.012.

Pizarro-Cerdá, J. and Cossart, P. (2009) '*Listeria monocytogenes* Membrane Trafficking and Lifestyle: The Exception or the Rule?', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25(1), pp. 649–670. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113331.

Pizarro-Cerda, J., Kuhbacher, A. and Cossart, P. (2012) 'Entry of Listeria monocytogenes in Mammalian Epithelial Cells: An Updated View', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), pp. a010009– a010009. doi: 10.1101/cshperspect.a010009.

Popov, V. L. *et al.* (1991) 'Ultrastructure of *Chlamydia pneumoniae* in cell culture', *FEMS Microbiology Letters*. Narnia, 84(2), pp. 129–134. doi: 10.1111/j.1574-6968.1991.tb04584.x.

Pospischil, A. *et al.* (2002) 'Abortion in woman caused by caprine Chlamydophila abortus (Chlamydia psittaci serovar 1).', *Swiss medical weekly*, 132(5–6), pp. 64–6. doi: 2002/05/smw-09911.

Pozuelo Rubio, M. *et al.* (2004) '14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking.', *The Biochemical journal*. Portland Press Ltd, 379(Pt 2), pp. 395–408. doi: 10.1042/BJ20031797.

Qian, S. *et al.* (2008) 'Structure of the alamethicin pore reconstructed by x-ray diffraction analysis.', *Biophysical journal.* The Biophysical Society, 94(9), pp. 3512–22. doi: 10.1529/biophysj.107.126474.

Quazi, F., Lenevich, S. and Molday, R. S. (2012) 'ABCA4 is an N-retinylidene-phosphatidylethanolamine and phosphatidylethanolamine importer', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 3(1), p. 925. doi: 10.1038/ncomms1927.

Raggers, R. J. *et al.* (1999) 'The human multidrug resistance protein MRP1 translocates sphingolipid analogs across the plasma membrane.', *Journal of cell science*, 112 (Pt 3), pp. 415–22. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9885294 (Accessed: 2 October 2019).

Rajalingam, K. *et al.* (2001) 'Epithelial Cells Infected with Chlamydophila pneumoniae (Chlamydia pneumoniae) Are Resistant to Apoptosis', *Infection and Immunity*, 69(12), pp. 7880–7888. doi: 10.1128/IAI.69.12.7880-7888.2001.

Rehman, S. K. *et al.* (2014) '14-3-3 Orchestrates Mammary Tumor Onset and Progression via miR-221-Mediated Cell Proliferation', *Cancer Research*, 74(1), pp. 363–373. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2016.

Ribet, D. and Cossart, P. (2015) 'How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues', *Microbes and Infection*. Elsevier Masson, 17(3), pp. 173–183. doi: 10.1016/J.MICINF.2015.01.004.

Rice University (2019) *The Cell Membrane - Concepts of Biology*. Available at: https://openstax.org/books/concepts-biology/pages/3-4-the-cell-membrane (Accessed: 30 September

2019).

Robert K. Andrews, * *et al.* (1998) 'Binding of Purified 14-3-3 ζ Signaling Protein to Discrete Amino Acid Sequences within the Cytoplasmic Domain of the Platelet Membrane Glycoprotein Ib-IX-V Complex†'. American Chemical Society . doi: 10.1021/BI970893G.

Roelants, F. M. *et al.* (2010) 'A protein kinase network regulates the function of aminophospholipid flippases.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 107(1), pp. 34–9. doi: 10.1073/pnas.0912497106.

Rohde, G. *et al.* (2010) 'Chlamydial zoonoses.', *Deutsches Arzteblatt international*. Deutscher Arzte-Verlag GmbH, 107(10), pp. 174–80. doi: 10.3238/arztebl.2010.0174.

Rojko, N. *et al.* (2013) 'Membrane damage by an α-helical pore-forming protein, Equinatoxin II, proceeds through a succession of ordered steps.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 288(33), pp. 23704–15. doi: 10.1074/jbc.M113.481572.

Römer, W. *et al.* (2007) 'Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells', *Nature*, 450(7170), pp. 670–675. doi: 10.1038/nature05996.

Rurangirwa, F. R. *et al.* (1999) 'Analysis of the 16S rRNA gene of microorganism WSU 86-1044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order Chlamydiales: proposal of Waddliaceae fam. nov., Waddlia chondrophila gen. nov., sp. nov.', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(2), pp. 577–581. doi: 10.1099/00207713-49-2-577.

Saarikangas, J., Zhao, H. and Lappalainen, P. (2010) 'Regulation of the Actin Cytoskeleton-Plasma Membrane Interplay by Phosphoinositides', *Physiological Reviews*, 90(1), pp. 259–289. doi: 10.1152/physrev.00036.2009.

Sachsenweger, M. (2003) Augenheilkunde. 2. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Saito, K. *et al.* (2004) 'Cdc50p, a protein required for polarized growth, associates with the Drs2p P-type ATPase implicated in phospholipid translocation in Saccharomyces cerevisiae.', *Molecular biology of the cell.* American Society for Cell Biology, 15(7), pp. 3418–32. doi: 10.1091/mbc.e03-11-0829.

Sasisekharan, R. and Venkataraman, G. (2000) 'Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function.', *Current opinion in chemical biology*, 4(6), pp. 626–31. doi: 10.1016/s1367-5931(00)00145-9.

Schachter, J. (1999) *Chlamydia*. Edited by R. S. Stephens. American Society of Microbiology. doi: 10.1128/9781555818203.

Schlumberger, M. C. and Hardt, W.-D. (2006) 'Salmonella type III secretion effectors: pulling the host cell's strings', *Current Opinion in Microbiology*, 9(1), pp. 46–54. doi: 10.1016/j.mib.2005.12.006.

Schön, P. *et al.* (2008) 'Equinatoxin II Permeabilizing Activity Depends on the Presence of Sphingomyelin and Lipid Phase Coexistence', *Biophysical Journal*, 95(2), pp. 691–698. doi:

10.1529/biophysj.108.129981.

Schramm, N., Bagnell, C. R. and Wyrick, P. B. (1996) 'Vesicles containing Chlamydia trachomatis serovar L2 remain above pH 6 within HEC-1B cells.', *Infection and immunity*, 64(4), pp. 1208–14. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8606080 (Accessed: 6 August 2019).

Scidmore, M. A. and Hackstadt, T. (2001) 'Mammalian 14-3-3beta associates with the Chlamydia trachomatis inclusion membrane via its interaction with IncG', *Molecular Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 39(6), pp. 1638–1650. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02355.x.

Sebastian, T. T. *et al.* (2012) 'Phospholipid flippases: building asymmetric membranes and transport vesicles.', *Biochimica et biophysica acta*. NIH Public Access, 1821(8), pp. 1068–77. doi: 10.1016/j.bbalip.2011.12.007.

Segawa, K., Kurata, S. and Nagata, S. (2018) 'The CDC50A extracellular domain is required for forming a functional complex with and chaperoning phospholipid flippases to the plasma membrane', *Journal of Biological Chemistry*, 293(6), pp. 2172–2182. doi: 10.1074/jbc.RA117.000289.

Segrest, J. P. *et al.* (1990) 'Amphipathic helix motif: Classes and properties', *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 8(2), pp. 103–117. doi: 10.1002/prot.340080202.

Seimiya, H. *et al.* (2000) 'Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase.', *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 19(11), pp. 2652–61. doi: 10.1093/emboj/19.11.2652.

Sharadadevi, A., Sivakamasundari, C. and Nagaraj, R. (2005) 'Amphipathic α-helices in proteins: Results from analysis of protein structures', *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 59(4), pp. 791–801. doi: 10.1002/prot.20459.

Shen, Y. *et al.* (2000) 'InIB-dependent internalization of Listeria is mediated by the Met receptor tyrosine kinase.', *Cell*, 103(3), pp. 501–10. doi: 10.1016/s0092-8674(00)00141-0.

Shima, K. *et al.* (2018) 'The Genetic Transformation of Chlamydia pneumoniae', *mSphere*. American Society for Microbiology (ASM), 3(5). doi: 10.1128/MSPHERE.00412-18.

Simon Davis, D. A. and Parish, C. R. (2013) 'Heparan sulfate: a ubiquitous glycosaminoglycan with multiple roles in immunity.', *Frontiers in immunology*. Frontiers Media SA, 4, p. 470. doi: 10.3389/fimmu.2013.00470.

Simons, K. and Ikonen, E. (1997) 'Functional rafts in cell membranes', *Nature*. Nature Publishing Group, 387(6633), pp. 569–572. doi: 10.1038/42408.

Simons, K. and Toomre, D. (2000) 'Lipid rafts and signal transduction', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 1(1), pp. 31–39. doi: 10.1038/35036052.

Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972) 'The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes', *Science*, 175(4023), pp. 720–731. doi: 10.1126/science.175.4023.720.

Singh, P. K. *et al.* (2017) 'Dynein light chain 1 induces assembly of large Bim complexes on mitochondria that stabilize Mcl-1 and regulate apoptosis', *Genes & Development*, 31(17), pp. 1754–1769. doi: 10.1101/gad.302497.117.

Sluchanko, N. N. and Gusev, N. B. (2012) 'Oligomeric structure of 14-3-3 protein: What do we know about monomers?', *FEBS Letters*. No longer published by Elsevier, 586(24), pp. 4249–4256. doi: 10.1016/J.FEBSLET.2012.10.048.

Sriram, S. *et al.* (1999) 'Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis.', *Annals of neurology*, 46(1), pp. 6–14. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10401775 (Accessed: 6 August 2019).

Stephens, R. (1999) 'Chlamydia: intracellular biology, pathogenesis, and immunity'. Available at: https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Chlamydia:+Intracellular+Biology,+Pathogenesis,+and+I mmunity&author=J.+Schachter&publication_year=1999& (Accessed: 6 August 2019).

Stephens, R. S. *et al.* (2000) 'Eukaryotic cell uptake of heparin-coated microspheres: a model of host cell invasion by Chlamydia trachomatis.', *Infection and immunity*, 68(3), pp. 1080–5.

Stephens, R. S. *et al.* (2001) 'Heparin-binding outer membrane protein of chlamydiae', *Molecular Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 40(3), pp. 691–699. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02418.x.

Stewardson, A. J. and Grayson, M. L. (2010) 'Psittacosis', *Infectious Disease Clinics of North America*. Elsevier, 24(1), pp. 7–25. doi: 10.1016/J.IDC.2009.10.003.

Stones, D. H. and Krachler, A.-M. (2015) 'Fatal attraction: how bacterial adhesins affect host signaling and what we can learn from them.', *International journal of molecular sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 16(2), pp. 2626–40. doi: 10.3390/ijms16022626.

Stringer, S. E. and Gallagher, J. T. (1997) 'Heparan sulphate.', *The international journal of biochemistry & cell biology*, 29(5), pp. 709–14. doi: 10.1016/s1357-2725(96)00170-7.

Subtil, A. *et al.* (2004) 'Analysis of Chlamydia caviae entry sites and involvement of Cdc42 and Rac activity.', *Journal of cell science*, 117(Pt 17), pp. 3923–33. doi: 10.1242/jcs.01247.

Suzuki, J. *et al.* (2010) 'Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F', *Nature*, 468(7325), pp. 834–838. doi: 10.1038/nature09583.

Suzuki, J., Imanishi, E. and Nagata, S. (2014) 'Exposure of phosphatidylserine by Xk-related protein family members during apoptosis.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 289(44), pp. 30257–67. doi: 10.1074/jbc.M114.583419.

Suzuki, J., Imanishi, E. and Nagata, S. (2016) 'Xkr8 phospholipid scrambling complex in apoptotic phosphatidylserine exposure.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

America. National Academy of Sciences, 113(34), pp. 9509–14. doi: 10.1073/pnas.1610403113.

Takahashi, Y. (2003) 'The 14-3-3 Proteins: Gene, Gene Expression, and Function', *Neurochemical Research*. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 28(8), pp. 1265–1273. doi: 10.1023/A:1024296932670.

Tang, S. J. *et al.* (1998) 'Association of the TLX-2 homeodomain and 14-3-3eta signaling proteins.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 273(39), pp. 25356–63. doi: 10.1074/jbc.273.39.25356.

Tang, X. *et al.* (1996) 'A Subfamily of P-Type ATPases with Aminophospholipid Transporting Activity', *Science*, 272(5267), pp. 1495–1497. doi: 10.1126/science.272.5267.1495.

Tarling, E. J., Vallim, T. Q. de A. and Edwards, P. A. (2013) 'Role of ABC transporters in lipid transport and human disease', *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 24(7), pp. 342–350. doi: 10.1016/j.tem.2013.01.006.

Telles, E. *et al.* (2009) 'A novel pocket in 14-3-3ε is required to mediate specific complex formation with cdc25C and to inhibit cell cycle progression upon activation of checkpoint pathways', *Experimental Cell Research*, 315(8), pp. 1448–1457. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.01.018.

Thorson, J. A. *et al.* (1998) '14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1 phosphorylation and kinase activity.', *Molecular and cellular biology*, 18(9), pp. 5229–38. doi: 10.1128/mcb.18.9.5229.

Tong, J. *et al.* (2016) 'Phosphorylation and Activation of RhoA by ERK in Response to Epidermal Growth Factor Stimulation.', *PloS one*. Public Library of Science, 11(1), p. e0147103. doi: 10.1371/journal.pone.0147103.

Toyo-oka, K. *et al.* (2014) '14-3-3 and Regulate Neurogenesis and Differentiation of Neuronal Progenitor Cells in the Developing Brain', *Journal of Neuroscience*, 34(36), pp. 12168–12181. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2513-13.2014.

Tsfasman, T. *et al.* (2015) 'Amphipathic alpha-helices and putative cholesterol binding domains of the influenza virus matrix M1 protein are crucial for virion structure organisation', *Virus Research*, 210, pp. 114–118. doi: 10.1016/j.virusres.2015.07.017.

Tzivion, G. *et al.* (2006) '14-3-3 proteins as potential oncogenes', *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press, 16(3), pp. 203–213. doi: 10.1016/J.SEMCANCER.2006.03.004.

Uchimido, R., Schmidt, E. P. and Shapiro, N. I. (2019) 'The glycocalyx: a novel diagnostic and therapeutic target in sepsis', *Critical Care*, 23(1), p. 16. doi: 10.1186/s13054-018-2292-6.

Valdivia, R. H. (2008) 'Chlamydia effector proteins and new insights into chlamydial cellular microbiology', *Current Opinion in Microbiology*, 11(1), pp. 53–59. doi: 10.1016/j.mib.2008.01.003.

Veiga, E. and Cossart, P. (2005) 'Listeria hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade

mammalian cells', Nature Cell Biology, 7(9), pp. 894-900. doi: 10.1038/ncb1292.

Verbeke, P. *et al.* (2006) 'Recruitment of BAD by the Chlamydia trachomatis Vacuole Correlates with Host-Cell Survival', *PLoS Pathogens*, 2(5), p. e45. doi: 10.1371/journal.ppat.0020045.

Vlisidou, I. *et al.* (2006) 'Role of intimin-tir interactions and the tir-cytoskeleton coupling protein in the colonization of calves and lambs by Escherichia coli O157:H7.', *Infection and immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 74(1), pp. 758–64. doi: 10.1128/IAI.74.1.758-764.2006.

Wang, J. *et al.* (2006) 'Sterol Transfer by ABCG5 and ABCG8', *Journal of Biological Chemistry*, 281(38), pp. 27894–27904. doi: 10.1074/jbc.M605603200.

Wang, Y. *et al.* (2011) 'Development of a Transformation System for Chlamydia trachomatis: Restoration of Glycogen Biosynthesis by Acquisition of a Plasmid Shuttle Vector', *PLoS Pathogens*. Edited by R. H. Valdivia, 7(9), p. e1002258. doi: 10.1371/journal.ppat.1002258.

Wang, Y. *et al.* (2013) 'Genetic Transformation of a Clinical (Genital Tract), Plasmid-Free Isolate of Chlamydia trachomatis: Engineering the Plasmid as a Cloning Vector', *PLoS ONE*. Edited by A. Aiyar, 8(3), p. e59195. doi: 10.1371/journal.pone.0059195.

Weinberger, A. *et al.* (2013) 'Gel-Assisted Formation of Giant Unilamellar Vesicles', *Biophysical Journal*, 105(1), pp. 154–164. doi: 10.1016/j.bpj.2013.05.024.

Wolf, K., Fischer, E. and Hackstadt, T. (2000) 'Ultrastructural analysis of developmental events in Chlamydia pneumoniae-infected cells.', *Infection and immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 68(4), pp. 2379–85. doi: 10.1128/iai.68.4.2379-2385.2000.

Woodcock, J. M. *et al.* (2003) 'The dimeric versus monomeric status of 14-3-3ζ is controlled by phosphorylation of Ser58 at the dimer interface', *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), pp. 36323–36327. doi: 10.1074/jbc.M304689200.

Wuppermann, F. N. *et al.* (2008) 'Chlamydia pneumoniae GroEL1 protein is cell surface associated and required for infection of HEp-2 cells.', *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 190(10), pp. 3757–67. doi: 10.1128/JB.01638-07.

Xiao, B. *et al.* (1995) 'Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways', *Nature*. Nature Publishing Group, 376(6536), pp. 188–191. doi: 10.1038/376188a0.

Xing, H. *et al.* (2000) '14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades.', *The EMBO journal.* European Molecular Biology Organization, 19(3), pp. 349–58. doi: 10.1093/emboj/19.3.349.

Xu, J. *et al.* (2015) '14-3-3ζ Turns TGF-β's Function from Tumor Suppressor to Metastasis Promoter in Breast Cancer by Contextual Changes of Smad Partners from p53 to Gli2', *Cancer Cell*, 27(2), pp. 177–192. doi: 10.1016/j.ccell.2014.11.025.

Yabas, M. *et al.* (2011) 'ATP11C is critical for the internalization of phosphatidylserine and differentiation of B lymphocytes.', *Nature immunology*. NIH Public Access, 12(5), pp. 441–9. doi: 10.1038/ni.2011.

Yaffe, M. B. *et al.* (1997) 'The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity.', *Cell*, 91(7), pp. 961–71. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80487-0.

Yaffe, M. B. (2002) 'How do 14-3-3 proteins work? - Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis', *FEBS Letters*. John Wiley & Sons, Ltd, 513(1), pp. 53–57. doi: 10.1016/S0014-5793(01)03288-4.

Yamamoto, H. *et al.* (2008) 'Identification of a novel substrate for TNFα-induced kinase NUAK2', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 365(3), pp. 541–547. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.11.013.

Yang, J. *et al.* (1999) 'Maintenance of G2 arrest in the Xenopus oocyte: a role for 14-3-3-mediated inhibition of Cdc25 nuclear import', *The EMBO Journal*, 18(8), pp. 2174–2183. doi: 10.1093/emboj/18.8.2174.

Yang, J. *et al.* (2017) '14-3-3η loss leads to neonatal lethality by microRNA-126 downregulation-mediated developmental defects in lung vasculature', *Cell and Bioscience*. BioMed Central, 7(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s13578-017-0186-y.

Yang, L. *et al.* (2001) 'Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores', *Biophysical Journal*. Cell Press, 81(3), pp. 1475–1485. doi: 10.1016/S0006-3495(01)75802-X.

Yang, X. *et al.* (2006) 'Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(46), pp. 17237–17242. doi: 10.1073/pnas.0605779103.

Yang, X. *et al.* (2011) '14-3-3Zeta Positive Expression is Associated With a Poor Prognosis in Patients With Glioblastoma', *Neurosurgery*, 68(4), pp. 932–9385. doi: 10.1227/NEU.0b013e3182098c30.

Yarar, D. *et al.* (2008) 'SNX9 Activities are Regulated by Multiple Phosphoinositides Through both PX and BAR Domains', *Traffic*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 9(1), pp. 133–146. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00675.x.

Zha, J. *et al.* (1996) 'Serine Phosphorylation of Death Agonist BAD in Response to Survival Factor Results in Binding to 14-3-3 Not BCL-XL', *Cell.* Cell Press, 87(4), pp. 619–628. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81382-3.

Zrieq, R., Braun, C. and Hegemann, J. H. (2017) 'The Chlamydia pneumoniae Tarp Ortholog CPn0572 Stabilizes Host F-Actin by Displacement of Cofilin', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, p. 511. doi: 10.3389/fcimb.2017.00511.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phospholipide und die humane Plasmamembran.	10	
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Formation einer amphipathischen Helix	bei	
Membrankontakt	15	
Abbildung 3: Pathogen Adhäsion/Internalisierung durch Zipper- und Trigger-Mechanismus.	_16	
Abbildung 4: Taxonomie der Ordnung Chlamydiales.	_18	
Abbildung 5: Der chlamydiale Infektions-/Entwicklungszyklus. Abbildung 6: Adhäsion und Internalisierung des Cpn EBs. Abbildung 7: Schematische Darstellung des Cpn Proteins LIPP (CPn0473). Abbildung 8 Gegenüberstellung der humanen 14-3-3 Isoformen. Abbildung 9: 14-3-3ζ Monomer und Homodimer.	_21 _23	
		_26
	28 30	
		Abbildung 10: Schematische Übersicht bekannter 14-3-3 Funktionen.
	Abbildung 11: LIPP formt oligomere Strukturen und ist in der Lage artifizielle Membranen	zu
verformen.	124	
Abbildung 12: Integration einer Pore über das Fass- oder Ringporen-Modell.	126	
Abbildung 13: Die LIPP-Bindedomäne vermittelt einen Adhäsin-typischen Infektionsblock.	129	
Abbildung 14: rLIPP zeigt reduzierte Bindung an Proteoglykan-/Heparansulfat-defiziente C	HO	
Zellen	130	
Abbildung 15: Die rLIPP-Bindung an humane Zellen sowie der Infektions-erhöhende Effekt s	sind	
abhängig von Heparansulfat-ähnlichen Glykosaminoglykanen	132	
Abbildung 16: Darstellung der LIPP Bindedomäne.	134	
Abbildung 17:Schema der LIPP/EB Bindung und Porenformation/Internalisierung an	der	
humanen Plasmamembran	136	

Danksagung

Allem voran gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Johannes Hegemann. Nachdem ich bereits meine Masterarbeit im Institut für Funktionelle Genomforschung absolvieren durfte, bin ich nur zu gerne für meine Doktorarbeit dortgeblieben. Ich habe die Möglichkeit bekommen mich im Rahmen des SFB1208 mit Membransystemen im chlamydialen Kontext zu beschäftigen. Hinzu kam, dass das Proteinvon-Interesse den Namen LIPP trägt und es somit doch auch irgendwo ein Zeichen für mich war. LIPP und Philipp, besser geht es wohl nicht. Zu dem Thema konnte ich dann natürlich nicht "Nein" sagen. Während meiner Arbeit hatte ich die Gelegenheit mir immer wieder Tipps und konstruktive Kritik zu holen. Durch die Gespräche habe ich nie den Fokus für die wichtigen Kontrollen verloren. Auf Konferenzen konnte ich zudem meinen Horizont erweitern und immer wieder meine Arbeit in Präsentationen der Wissenschaftswelt vorstellen.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meinem Zweitgutachter Herrn Prof. Dr. Lutz Schmitt bedanken. Schon als Gutachter für meine Masterarbeit unterstützte er mich sehr gut. Ganz nach dem Motto "*never change a running system*" war diese Kombination auch für die Doktorarbeit die richtige Entscheidung. Für die vielen guten experimentellen Vorschläge während unserer Treffen möchte ich mich ganz besonders bedanken. Zusammen habt ihr mich *gepusht* die extra Meile zu gehen und dafür bin ich euch dankbar. Ein ganz besonderer Dank gilt natürlich auch meinen Eltern und meiner Schwester, die mich nicht nur während meiner Doktorarbeit, sondern auch während meines gesamten Studiums unterstützt haben. Danke, dass ihr immer nachgefragt habt ob alles funktioniert und es mir gut geht, auch wenn ihr nie verstanden habt, was ich da so genau mache oder warum manche Experimente zwei Wochen dauern. Das aufrichtige Nicken, gut zureden und das super Essen war und ist mit viel Wert.

Vielen Dank an meine Freunde. Ihr habt mir Halt gegeben und dafür gesorgt, dass ich auch in schweren Zeiten nicht im sprichwörtlichen Gulag der sozialen Vereinsamung versinke. Ein blöder Witz hier und da, eine feine Saunanacht oder ein paar *trashige* B-Movies haben mir die Zeit sehr versüßt. Ich konnte euch immer mein Leid klagen und ihr habt mich aufgebaut oder mir zurecht gesagt, ich solle mich nicht so anstellen.

Danke an alle Mitarbeiter der AG Hegemann und AG Fleig. Ihr seid der wahre Grund warum die Doktorarbeit eine einmalige und verdammt positive Erfahrung war. Hier habe ich nicht nur Kollegen, sondern Freunde gefunden. Ihr habt jeden Tag zu etwas Besonderem gemacht und ich kann euch sagen, ich habe euch alle bereits in meiner Schreibphase vermisst.

Ganz besonders möchte ich hier das LIPP-LAB: Jan, Daisy, Lea und Nik hervorheben. Nachdem Jan mir die Eigenheiten unseres treuen Begleiters LIPP nähergebracht hat und bis zum letzten Tag immer für Fragen, Anregungen und Korrekturen da war, war es an mir, meine beiden Masterstudenten Nik und Lea an die Thematik heran zu führen. Ihr habt beide großartige Arbeit geleistet. Nik, der alte Haudegen ist uns ja sogar erhalten geblieben und zieht jetzt mit seiner Forschung an uns allen vorbei (alter Glücksritter), Lea macht auch ihre Doktorarbeit. Mit Nik teilte ich neben der Bench und dem Büroplatz auch das eine

Danksagung

oder andere Mal das Zimmer (nur das Zimmer! aus Kostengründen) auf diversen Konferenzen. Mit Daisy verbindet mich neben so vielem mehr das gemeinsame Projekt. Wir haben unsere Arbeit zeitgleich bestritten und uns immer unterstützt, sei es im täglichen Alltag oder SFB Veranstaltungen. So soll es sein. Explizit möchte ich mich zudem bei Coco bedanken. Wir haben uns damals im Mastermodul kennengelernt und in dir habe ich eine enge Freundin gefunden. Die Whiskyabende oder Essen bei vornehmlich asiatischen Restaurants waren mir immer eine besondere Freude.

Auch bei Katja möchte ich mich ausdrücklich für ihre Hilfe und Unterstützung in den letzten Jahren bedanken. Ich dachte immer es gibt niemanden, der alles weiß, aber wenn es um Angelegenheiten rund ums Labor geht hat mich Katja eines Besseren belehrt. Danke dafür.

Unglücklicherweise kann ich hier nicht jeden einzeln aufzählen, auch wenn ich gerne würde, aber ich wisst, was ihr mir bedeutet.

Gesonderter Dank geht an Sebastian Hänsch (aka Seppel), nun am CAi (HHU, Düsseldorf) tätig. Das ImageJ Skript zur Analyse der GUVs war mir eine große Hilfe und die beiden ImageJ Kurse haben meinen Horizont erweitert. Die Segeltrips waren natürlich auch ein Knaller.

Weiterhin möchte ich dem ganzen SFB1208 danken. Neben der Finanzierung meines Projekts haben mich auch die konstruktiven Gespräche in meiner Arbeit positiv beeinflusst. Hervorzuheben ist hier Stephan Schott, der dazu beigetragen hat, dass ich die APHs in LIPP charakterisieren konnte. Die gesamte Atmosphäre innerhalb des SFBs war immer positiv und jeder war nur zu gerne bereit den anderen mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. So konnte ich beispielweise, nachdem Thorsten Eierhoff uns leider verlassen hat, die Betreuung der GUVs in unserem Institut übernehmen und so viele Kollaborationen eingehen.

Last but not least I would like to thank my girlfriend Alicia. This part is in English cause your German is still not perfect but honestly far better than my French. So English is quite fair, I guess. Thank you for your support. Since we met you had a huge impact on my life and even though we both did our PhDs at the same time, you in Paris and I in Düsseldorf, we managed well to organize our work and private life. You showed me I can do more than I would have ever imagined.

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.

Philipp Timo Hanisch (Düsseldorf, November 2019)