

**Charakterisierung der Proteine CPn0677 und CPn0678 in der
frühen *Chlamydia pneumoniae* Infektion**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Dominik Spona
aus Düsseldorf

Düsseldorf, März 2021

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

Berichtersteller

1. Prof. Dr. Johannes H. Hegemann

2. Prof. Dr. Thomas Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2021

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung.....	VI
Summary	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Chlamydien	1
1.1.1 Die Pathogenität der Gattung <i>Chlamydia</i>	2
1.1.2 Der chlamydiale Infektionszyklus	3
1.1.3 Das Humanpathogen <i>Chlamydia pneumoniae</i>	5
1.2 Die Endozytose	6
1.2.1 Clathrin-vermittelte Endozytose	8
1.2.2 Die Plasmamembran während der Endozytose.....	11
1.2.3 Das Aktin-Zytoskelett während der Endozytose	13
1.2.4 N-WASP, SNX9 und Syndapin – Essenzielle Mediatoren der Endozytose .	14
1.2.5 Die Endozytose dient als Eintrittsmechanismus für intrazelluläre Pathogene .	20
1.2.6 Die ersten Schritte in der <i>Chlamydia pneumoniae</i> Infektion	23
1.3 CPn0677 und CPn0678	26
2 Zielsetzung.....	29
3 Teil I: Manuskript I.....	30
3.1 Zusammenfassung.....	32
4 Teil II: Manuskript II.....	65
4.1 Zusammenfassung.....	66
5 Teil III: Weitere Ergebnisse.....	88
5.1 Einleitung und Zusammenfassung bisheriger Ergebnisse.....	88
5.2 Zielsetzung.....	89
5.3 Material	90

5.3.1	Gebrauchsmaterialien	90
5.3.2	Geräte und Maschinen	91
5.3.3	Chemikalien und Reagenzien	92
5.3.4	Lösungen und Puffer	95
5.3.5	Enzyme	98
5.3.6	Agarosen	99
5.3.7	Färbemittel	99
5.3.8	Antikörper	99
5.3.9	Kits	100
5.3.10	Größenstandards	100
5.3.11	Plasmide und Oligonukleotide	101
5.3.12	Zellen und Zelllinien	102
5.3.13	Medien	103
5.4	Methoden	105
5.4.1	Molekularbiologische Methoden	105
5.4.2	Biochemische Methoden	112
5.4.3	Zellbiologische Methoden	122
5.4.4	Mikroskopie	123
5.4.5	Bioinformatische Programme	125
5.5	Ergebnisse	126
5.5.1	Identifikation weiterer potenzieller humaner Interaktionspartner	126
5.5.2	Stabile Trimerbildung durch CPn0678 und CPn0677 Monomere	135
5.5.3	Lokalisation von CPn0677 zur Plasmamembran durch einen EGF-Stimulus	137
5.6	Diskussion	139
5.6.1	Die bakteriellen Interaktionsplattformen CPn0677 und CPn0678	139
5.6.2	Oligomerisierung von CPn0678 – ein bifunktionaler Mechanismus	143
5.6.3	Beeinflussung der intrazellulären Lokalisation von CPn0677 durch einen EGF-Stimulus	145
6	Teil IV: Abschließende Diskussion	148
6.1	Weiterer Ausblick für die Proteine CPn0677 und CPn0678	148
6.2	CPn0677 und CPn0678 als Schlüsselproteine der frühen chlamydialen Infektion	150

Literaturverzeichnis	153
Abbildungsverzeichnis	169
Tabellenverzeichnis	170
Danksagung.....	171
Eidesstattliche Erklärung	172

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A	Ampere
ADBE	Aktivitätsabhängige Massenendozytose (activity-dependent bulk endocytosis)
AP	Alkalische Phosphatase
APH	Amphipathische Helix
Arp 2/3	Aktin-verwandte Proteine 2/3 (actin related proteins 2/3)
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BAR	Bin-Amphiphysin-Rvs
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
<i>C. pn.</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
<i>C. ps.</i>	<i>Chlamydia psittaci</i>
<i>C. tr.</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
ca.	Circa
CAE	Clathrin-abhängige Endozytose
CCV	Clathrin- umschlossener Vesikel (clathrin coated vesicle)
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
cOMC	chlamydialer Außenmembrankomplex (chlamydia outer membrane complex)
CUE	Clathrin-unabhängige Endozytose
d. h.	das heißt
dd	deionisiert
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5`-Triphosphat
DOPC	Phosphatidylcholin
DOPS	Phosphatidylserin
DTT	Dithiothreitol
EB	Elementarkörperchen (elementary body)
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
et al.	Siehe, Siehe, und andere, Siehe
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan
hpi	Stunden nach der Infektion (hours post infection)
HS	Heparansulfat
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
L	Liter
LC-Domain	Geringe Komplexitäts Domäne (low complexity domain)
LiAc	Lithiumacetat
LipP	Lipid Internalization Promoting Protein
M	Molar

Abkürzungsverzeichnis

Mb	Mega-Basenpaare
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOMP	Außenmembranprotein
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OmcA	Außenmembran Komplex Protein A
OmcB	Außenmembran Komplex Protein B
PBS	Physiologischer Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PI(4,5)P2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
PI5K	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase
PIPs	Phosphatidylinositolphosphat
PM	Plasmamembran
Pmps	Polymorphe Membranproteine
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	Prolin reiche Region
PX	Phox-Homologie
RB	Retikularkörperchen (reticulate body)
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH3	Src homology 3
SNX9	Sorting-Nexin 9
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
TarP	Transloziertes Aktin-rekrutierendes Phosphoprotein
TEMED	Tetramethylethylendiamin
U	Einheiten (Units)
ü/N	über Nacht
UPM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)

Zusammenfassung

Das Humanpathogen *Chlamydia pneumoniae* (*C. pn.*) ist ein weit verbreitetes, gramnegatives, obligat intrazelluläres Bakterium. Der Erreger infiziert die oberen und unteren Atemwege. Bedingt durch die obligat intrazelluläre Lebensweise müssen Chlamydien in Wirtszellen eindringen, um sich zu vermehren. Die infektiösen Bakterien adhären an die Wirtszelle und sekretieren bakterielle Effektorproteine über ein Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) in das Zytosol der Wirtszelle, wo diese Wirtszellprozesse beeinflussen, um eine effektive Aufnahme durch die Wirtszelle zu gewährleisten. Zwei dieser sekretierten Effektoren sind CPn0677 und CPn0678, die zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion in die Wirtszelle gelangen und in die Endozytose-Maschinerie der Wirtszelle eingreifen. In dieser Arbeit wurde die Funktion der beiden Effektorproteine im Kontext der frühen Infektion charakterisiert.

Die Gene *cpn0677* und *cpn0678* kodieren für die Proteine CPn0677 und CPn0678. Sie stellen im genomischen Kontext und im direkten Vergleich mit den Genomen anderer Chlamydien-Spezies einen Sonderfall dar, da an dieser Genom-Position die anderen Spezies nur ein einziges Gen besitzen. Das Protein CPn0678 ist direkt an der Internalisierung des Pathogens beteiligt, indem es an die zytosolische Seite der Plasmamembran (PM) der Zielzelle bindet, diese verformt und SNX9, ein zentrales multifunktionales Endozytoseprotein, rekrutiert. Essenziell für die PM Bindung ist eine N-terminale amphipathische Helix (APH) von CPn0678, welche die Bindung an negativ geladene Phospholipide vermittelt und so Membrantubulation induziert. Über seine konservierte C-terminale Polyprolinsequenz interagiert CPn0678 mit der Src Homologie 3 (SH3)-Domäne von SNX9, wodurch es an der bakteriellen Eintrittsstelle lokalisiert. Die SNX9 Rekrutierung ist infektionsrelevant, da Humanzellen mit reduzierten SNX9 Proteinmengen eine signifikant verringerte Internalisierungsrate der chlamydialen Elementarkörperchen aufweisen.

Parallel zur Sekretion von CPn0678 wird der Effektor CPn0677 in die Wirtszelle sekretiert und bindet über eine N-terminale APH an die PM. Durch die Rekrutierung von Syndapin 2 und N-WASP ist CPn0677 ebenfalls an der Internalisierung des Pathogens beteiligt. *In vitro* Pulldown-Experimente zeigten, dass CPn0677 über eine C-terminale Polyprolinsequenz mit Syndapin 2, einem membranmodulierenden und Endozytose-relevanten F-BAR-Protein, interagiert. Zusätzlich konnte durch *in vitro* und *in vivo* Experimente eine Syndapin 2-unabhängige Interaktion von N-WASP mit CPn0677 gezeigt werden. In mikroskopischen Studien an *C. pn.* infizierten Humanzellen konnte mittels spezifischer Antikörper eine Kolokalisation der beiden Proteine an der chlamydialen Eintrittsstelle verifiziert werden. Zeitgleich wurde eine Kolokalisation mit Aktin beobachtet. Zusammenfassend wurde die Funktion der Effektoren CPn0677 und CPn0678 in der frühen Infektion untersucht. Es

konnte gezeigt werden, dass beide Proteine mit wichtigen Komponenten der späten humanen Endozytose-Maschinerie interagieren und damit Wirtszellprozesse manipulieren, um eine effektive Aufnahme chlamydialer Zellen zu gewährleisten. Dies untermauert die signifikante Rolle der beiden Effektoren in der frühen *C. pn.* Infektion.

Summary

The human pathogen *Chlamydia pneumoniae* (*C. pn.*) is a widespread, Gram-negative, obligate intracellular bacterium. The pathogen infects the upper and lower respiratory tract. Due to the obligatory intracellular lifecycle, chlamydia must infect host cells to self-replicate. The infectious bacteria adhere to the host cell and secrete bacterial effector proteins via a type III secretion system (T3SS) into the host cell's cytosol, to influence various host cell mechanisms for effective internalization of the pathogen. Two of these secreted effectors are CPn0677 and CPn0678, which enter the host cell at an early stage of infection and intervene in the host cell's endocytic machinery. In this work the function of the two effector proteins in the context of early infection was characterized.

In-depth comparisons with other chlamydial species revealed that CPn0677 and CPn0678 are *C. pneumoniae*-specific, displaying no or only low homology to other chlamydial proteomes. The function of CPn0678 is directly involved in the internalization of the pathogen by deforming the plasma membrane (PM) of the target cell and recruitment of SNX9, a key multifunctional endocytic protein. An N-terminal amphipathic helix (APH) of CPn0678 mediates binding to phospholipids in both the PM and synthetic membranes and is sufficient to induce extensive membrane tubulations. Additionally, CPn0678 interacts via its conserved C-terminal polyproline sequence with the Src homology 3 (SH3) domain of SNX9, thereby localizing it at the bacterial entry point. This interaction is relevant for infection since human cells with a reduced SNX9 protein quantity show a significantly reduced chlamydial elementary body internalization rate.

Simultaneously to the secretion of CPn0678 the effector CPn0677 is secreted into the host cell and binds to the PM via an N-terminal APH. By recruiting and manipulating the functions of Syndapin 2 and N-WASP, CPn0677 also is involved in the internalization of the pathogen. *In vitro* pulldown experiments showed that CPn0677 interacts with Syndapin 2, a membrane-modulating and endocytosis-relevant F-BAR protein, via a C-terminal polyproline sequence. In addition, a Syndapin 2-independent interaction of N-WASP with CPn0677 could be shown by *in vitro* and *in vivo* experiments. In microscopic studies with *C. pn.* infected human epithelial cells, a colocalization of those proteins at the chlamydial entry point could be shown utilizing specific antibodies. In addition to these remarks, actin colocalization was observed. In summary, the function of the effectors CPn0677 and CPn0678 in the early infection was examined. It was shown that both proteins interact with important components of the late human endocytosis machinery and thus manipulate host cell processes to ensure effective uptake of chlamydial cells. This underpins the significant role of the two effectors in the early *C. pn.* Infection.

1 Einleitung

1.1 Chlamydien

Das Phylum *Chlamydiae* umfasst eine Vielzahl von gramnegativen, obligat intrazellulären Bakterienspezies, deren Mitglieder bemerkenswerte gemeinsame Eigenschaften in ihrer Lebensweise aufweisen. Innerhalb des Phylums existiert nur eine einzige Ordnung, die *Chlamydiales*, welche insgesamt vier Familien umfasst. Ursprünglich gab es innerhalb der Ordnung nur die Familie der „echten“ Chlamydien, die *Chlamydiaceae* mit der Gattung *Chlamydia*. Durch Analysen der 16S rRNA wurden jedoch noch die Chlamydienverwandten Familien (*Parachlamydiaceae*, *Waddliaceae* und *Simkaniaceae*) zu der Ordnung hinzugefügt (1–3).

Nach heutigem Kenntnisstand können sich sämtliche Chlamydien nur innerhalb von eukaryotischen Wirtszellen oder -organismen replizieren. Die Lebensweise der Chlamydien ähnelt daher der von Viren und reicht in ihrer Vielfalt von einer pathogenen Art in Menschen und Tieren bis zu einer endosymbiontischen Lebensweise in Amöben (4–6). Im allgemeinen Sprachgebrauch wird der Begriff Chlamydien zumeist als Synonym für zwei der für Menschen relevantesten Vertreter genutzt. Hierbei handelt es sich um die humanpathogenen Spezies *Chlamydia trachomatis* (*C. tr.*) und *Chlamydia pneumoniae* (*C. pn.*). Obwohl verschiedene Wirte infiziert werden können, teilen alle Chlamydien-Arten einen einzigartigen biphasischen Lebenszyklus. Dieser besteht aus zwei unterschiedlichen morphologischen Formen, den infektiösen, aber metabolisch inaktiven Elementarkörperchen (EB) und den intrazellulären, metabolisch aktiven Retikularkörperchen (RB) (7).

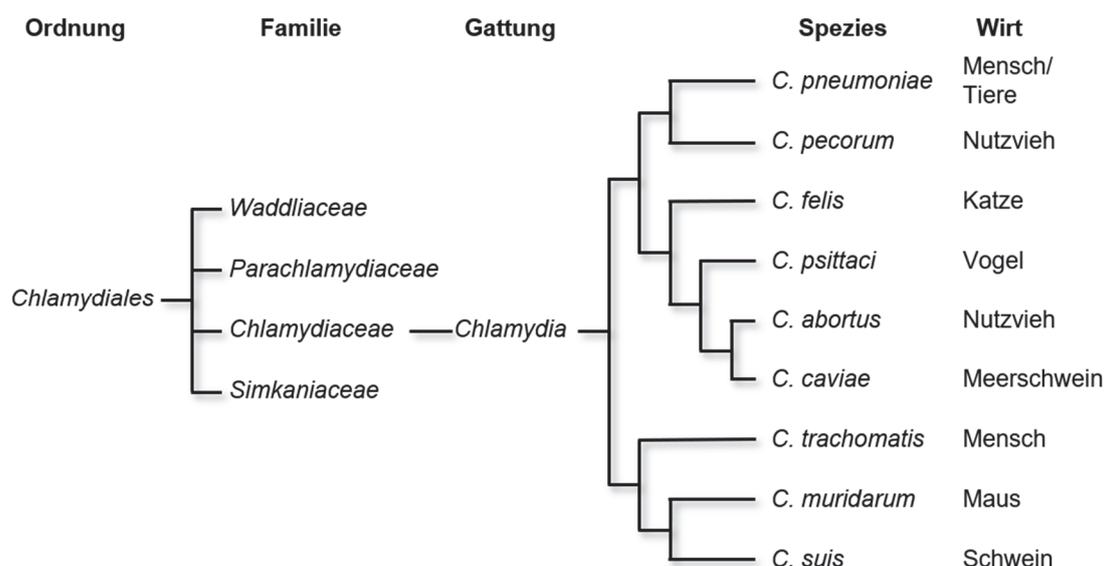


Abbildung 1: Taxonomische Klassifizierung der Ordnung *Chlamydiales*

Anordnung der Mitglieder der Ordnung *Chlamydiales* mit Schwerpunkt auf der Gattung *Chlamydia*. Darstellung angelehnt an Everett et al. (2) und ergänzt durch (8, 9). Die Abstände der Linien repräsentieren nicht den phylogenetischen Abstand der Spezies. Nutzvieh: Schwein, Rind, Ziege und Schaf.

1.1.1 Die Pathogenität der Gattung *Chlamydia*

Mitglieder der Familie *Chlamydiaceae* haben sich erfolgreich an die jeweiligen intrazellulären Nischen angepasst und sind trotz ihrer großen genomischen Ähnlichkeit sehr wirt- und gewebespezifisch.

Mit der Infektion von ca. 600 Millionen Personen weltweit pro Jahr sind *C. tr.* und *C. pn.* die für Menschen relevantesten Vertreter dieser Familie (10). Laut Schätzungen der WHO (Stand 2015) infizieren sich jährlich etwa 130 Millionen Menschen mit *C. tr.* (11). Die verursachten Krankheiten sind dabei spezifisch für die 19 verschiedenen Serovare, die sich durch eine hohe Gewebespezifität und einen oft asymptomatischen Krankheitsverlauf auszeichnen (12). So sind die Serovare A bis C verantwortlich für okulare Trachome, die bei Nicht-Behandlung zu Erblindung der betroffenen Personen führen können. Geschätzt sind mindestens 1,3 Millionen Menschen im Jahr 2002 an einem Trachom erblindet. Im Jahr 2010 wurde angenommen, dass 40 Millionen Menschen an einer aktiven Krankheit leiden. Die Krankheit tritt hauptsächlich in armen ländlichen Gemeinden und in Entwicklungsländern auf (13). Die Serovare D bis K sind gewebespezifisch an den Urogenitaltrakt angepasst und stellen die am häufigsten sexuell übertragene Bakterienart weltweit dar (14). Chlamydieninfektionen des Urogenitaltrakts verlaufen bei Frauen in höherem Maße asymptomatisch als bei Männern und werden daher oft nicht diagnostiziert und folglich nicht behandelt. Infolgedessen kommt es häufig zu Reinfektionen. Diese haben Einfluss auf die Anatomie des oberen Genitaltrakts. Infektionen und Reinfektionen in diesem Bereich führen zu Narbenbildung des Eileitergewebes, was wiederum zu Unfruchtbarkeit und Eileiterschwangerschaft führen kann (15). Weitere Folgen einer Infektion des oberen Genitaltrakts bei Frauen sind Zervizitis, Endometritis, Salpingitis und Urethritis (16). Bei Männern können Infektionen zu Nebenhodenentzündungen, Harnröhrenobstruktionen und einer verminderten Fruchtbarkeit führen (17). Die Serovare L1 bis L3 (LGV) sind ebenfalls sexuell übertragbar und infizieren zunächst den Urogenitaltrakt, führen allerdings im weiteren Verlauf zu systemischen Infektionen des lymphatischen Systems (18).

Infektionen durch *C. pn.* verursachen akute sowie chronische, respiratorische Erkrankungen. Der Erreger wird über Tröpfcheninfektionen übertragen und infiziert die Epithelzellen der Atemwege. Dabei sind sowohl die oberen als auch die unteren Atemwege betroffen. Die Infektionen dieser Bereiche können zur Ausbildung von Pharyngitis, Sinusitis, Bronchitiden oder Pneumonien führen (19, 20). Das Humanpathogen *C. pn.* und dessen Biologie werden im Kapitel 1.1.3 und 1.2.6 im Detail vorgestellt.

Neben den humanen Krankheitserregern existieren fünf Chlamydienspezies, die ein breites Wirtsspektrum aufweisen und vornehmlich Tiere infizieren. *Chlamydia psittaci* (*C. ps.*) ist in erster Linie ein Krankheitserreger von Vögeln und verursacht Atemwegserkrankungen, die erhebliche Auswirkungen auf die Geflügelzucht haben. Darüber hinaus besitzt *C. ps.* ein zoonotisches Potenzial, da Übertragungen von infizierten Vögeln auf den Menschen möglich sind (21, 22). *Chlamydia pecorum* infiziert Nutztiere wie Rinder, Schafe, Ziegen und Schweine und kann zu Polyarthritiden, Konjunktivitis, Lungenentzündung und Enzephalomyelitis führen (23–25). *Chlamydia abortus* ist aufgrund seiner Fähigkeit, die Plazenta von Schafen und Ziegen zu infizieren, von erheblicher wirtschaftlicher Bedeutung. Die durch *C. abortus* hervorgerufene Infektionskrankheit kann zu spontanem Abort und Fehlgeburten führen (26). Zusätzlich sind zoonotische Übertragungen von *C. abortus* auf den Menschen möglich, die zu Todgeburten und Schwangerschaftsabbrüchen führen können (27). *Chlamydia felis* kann Katzen infizieren und ist eine häufige Ursache für Bindehautentzündungen bei diesen. Zudem wurde auch für diesen Erreger ein zoonotisches Potenzial beschrieben. Eine Übertragung auf den Menschen führt ebenso zu Bindehautentzündungen (28, 29).

1.1.2 Der chlamydiale Infektionszyklus

Alle Chlamydien-Arten teilen einen einzigartigen biphasischen Entwicklungszyklus und benötigen als obligat intrazelluläre Bakterien eine eukaryotische Wirtszelle, um sich zu replizieren. Als Adaptation an diese Lebensweise existieren zwei morphologische und funktionelle unterschiedliche Formen, die ca. 300 nm großen infektiösen, aber metabolisch inaktiven, EBs und die ca. 1 µm großen intrazellulären, metabolisch aktiven RBs (5, 7). Eine weitere Adaptation im Zuge der Entwicklungsgeschichte der Chlamydien ist die massive Reduktion des Genoms auf Größen von 1 Mb mit 850 – 1000 Genen, was eine enorme Anpassung an die spezifischen Wirte und den intrazellulären Lebensstil widerspiegelt (30). Es wird davon ausgegangen, dass ungefähr $\frac{2}{3}$ der Gene artenübergreifend konserviert und für die intrazelluläre Lebensweise essenziell sind (31). Zudem geht die Genomreduktion mit dem Verlust von Stoffwechsel-relevanten Enzymen einher (32). Chlamydien sind gramnegative Bakterien und besitzen eine innere und eine äußere Membran. Zur Stabilisierung der Zellen gegenüber osmotischer Lysis besitzen gramnegative Bakterien typischerweise Peptidoglykane, welche jedoch bei Chlamydien in nur sehr geringen Mengen vorhanden sind (33–35). Damit die Stabilität der EBs gewährleistet ist, besitzen Chlamydien in der äußeren Membran eine Reihe von hochverzweigten, Cystein-reichen Proteinen, die über Disulfidbrücken vernetzt sind. Dieser Komplex wird als chlamydialer Außenmembrankomplex (cOMC) bezeichnet und besteht zu ca. 60 % aus dem Außenmembranprotein (MOMP) (36). Weitere Bestandteile des cOMC sind die

Außenmembrankomplex-Proteine A und B (OmcA, OmcB). Trotz der Wirtsspezifität der Chlamydien und den damit einhergehenden Unterschieden in der Gewebe-Spezifität laufen die Entwicklungszyklen, mit Ausnahme von Variationen in der Zyklusdauer, im Wesentlichen identisch ab. Im Folgenden wird der Infektionszyklus am Beispiel von *C. pn.* erläutert (Abb. 2).

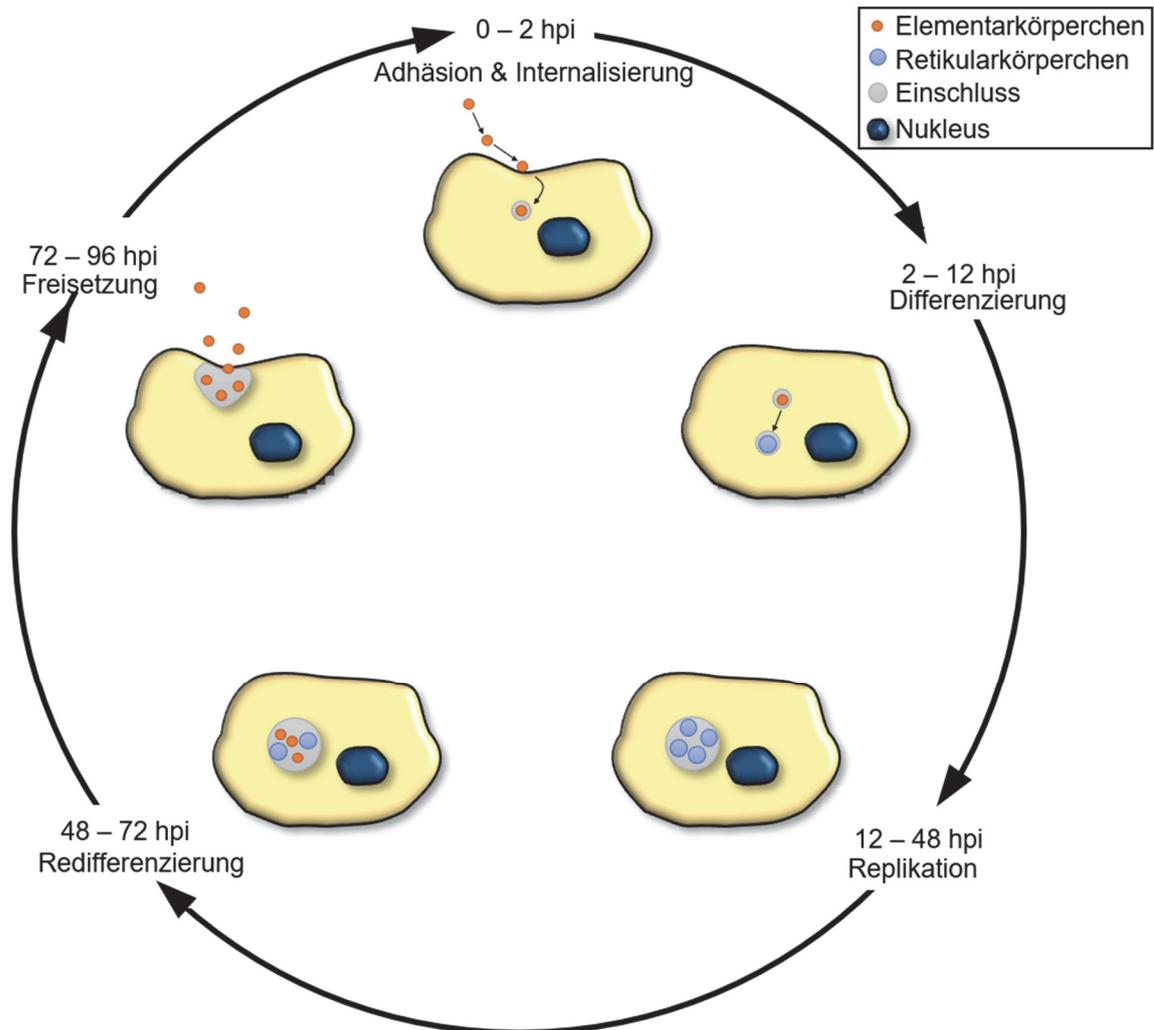


Abbildung 2: Darstellung des chlamydialen Entwicklungszyklus

Dargestellt ist ein repräsentativer biphasischer Entwicklungszyklus von Chlamydien. Die Dauer des chlamydialen Infektionszyklus ist abhängig von der jeweiligen Spezies. Der dargestellte Infektionszyklus orientiert sich an *C. pn.* Die Darstellung ist angelehnt an Wolf et al. 2000 (37). hpi = Stunden nach der Infektion.

Der Infektionszyklus beginnt mit der Adhäsion der EBs an die Wirtszelle. Anschließend werden die EBs durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen. Innerhalb des humanen Zytoplasmas befindet sich das EB nun in einem Membran-gebundenen Kompartiment, dem Einschluss. Die detaillierte Erläuterung der initialen Infektions-Prozesse erfolgt im Kapitel 1.2.6. Während des gesamten Entwicklungszyklus verbleiben die Bakterien in dem Einschluss. Nach ca. zwei Stunden beginnt die Differenzierung zu den metabolisch aktiven RBs, die nun in der Lage sind, das Genom zu replizieren und Gene zu exprimieren. Im Zuge der Differenzierung kommt es zu

Umstrukturierungen des cOMC, wobei die vernetzten Proteine des Komplexes reduziert werden und der Komplex sich lockert (38). Zeitgleich werden über das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) Effektorproteine zur Manipulation von Wirtszellmechanismen sekretiert und zusätzlich Nährstoffe akquiriert (39). Hierfür werden sekretorische Vesikel, gefüllt mit ATP und anderen wichtigen Bestandteilen für die Replikation, abgefangen und zur Inklusion transportiert (40).

Im Zeitraum von zwölf bis 48 Stunden replizieren sich die RBs durch binäre Spaltung. Nach 48 – 72 Stunden beginnt die asynchrone Re-Differenzierung von RBs zu EBs. Dies geht mit der Umgestaltung der äußeren Membran und der Genexpression von Effektoren, welche für die nächste Runde der Infektion durch EBs benötigt werden, einher (41, 42). Nach 72 – 96 Stunden endet der Zellzyklus von *C. pn.* und die EBs verlassen die Wirtszelle. Die Freisetzung der EBs erfolgt durch Protease-induzierte Zelllyse, Exozytose oder Extrusion. Im Falle der Exozytose oder Extrusion bleibt die Wirtszelle intakt (41, 43). Die freigesetzten infektiösen EBs ermöglichen Neuinfektionen von benachbarten Zellen. Die initialen Schritte der Infektion, die Adhäsion und die Internalisierung, sind bis dato Gegenstand der Chlamydienforschung.

1.1.3 Das Humanpathogen *Chlamydia pneumoniae*

Innerhalb der Familie *Chlamydiaceae* gelten *C. pn.* und *C. tr.* als humanpathogene Spezies. *C. pn.* wird im Allgemeinen via Tröpfcheninfektionen übertragen und infiziert die oberen und unteren Atemwege (44). Nach aktuellen Kenntnissen verlaufen 70 % der akuten Infektionen der Atemwege von Menschen mit *C. pn.* asymptomatisch oder nur leicht symptomatisch, d. h. ca. 30 % der Infektionen verursachen schwere Atemwegserkrankungen, einschließlich ambulant erworbener Lungenentzündung (Pneumoniae), Bronchitis und einer Vielzahl von anderen Erkrankungen der oberen Atemwege (45). Infektionen mit *C. pn.* werden außerdem mit chronisch entzündlichen Erkrankungen in Beziehung gesetzt. Diese Relation ist jedoch bis dato ein kontroverses Thema, da der kausale Einfluss einer *C. pn.* Infektion auf bestimmte chronische Krankheiten nie zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte (46). Eine wachsende Zahl von Indizien zeigt jedoch, dass *C. pn.* nicht nur an Atemwegsinfektionen beteiligt ist, sondern auch zur Pathogenese einer Reihe von entzündlichen Erkrankungen wie Atherosklerose, Arthritis, Asthma, Lungenkrebs und chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen beiträgt. Darüber hinaus sind Zusammenhänge zwischen *C. pn.* Infektionen und neurologischen Störungen wie Alzheimer, Multiple Sklerose und Schizophrenie bekannt (47–50). Ein weiterer relevanter Aspekt, der die Bedeutung chlamydialer Infektionen hervorhebt, liegt in der hohen Durchseuchungsrate der weltweiten Bevölkerung mit *C. pn.* Die Antikörper-Prävalenz im Alter von 20 Jahren liegt bei ca. 50 % und steigt im Alter von 70 Jahren auf 80 % (19, 51).

Dies verdeutlicht, dass fast jeder Mensch mindestens einmal im Leben mit *C. pn.* infiziert wird. Interessanterweise sind nicht nur Infektionen von Menschen bekannt, sondern auch Zoonosen vom Menschen auf Tiere wurden dokumentiert. Infektionen konnten zudem in warm- und kaltblütigen Tieren wie Pferden, Koalas und anderen Säugetieren, Beuteltieren, Amphibien und Reptilien nachgewiesen werden (52, 53). Ein generelles Problem für die Erforschung von *C. pn.* liegt in den begrenzten Möglichkeiten der genetischen Manipulation von *C. pn.* Während bei *C. tr.* seit 2013 zunächst erfolgreich genetische Manipulationen durchgeführt werden (54), gab es bei *C. pn.* in den letzten Jahren keine erfolgreichen Ansätze. Lediglich die stabile Transformation von *C. pn.* mit Vektoren wurde im Jahr 2018 erstmalig erfolgreich durchgeführt (55). Bevor die Prozesse der frühen *C. pn.* Infektionen dargestellt werden, erfolgt eine Einführung in die Endozytose.

1.2 Die Endozytose

Unter dem Begriff Endozytose werden zelluläre Vorgänge zusammengefasst, die für die Aufnahme von extrazellulären Partikeln oder Flüssigkeiten in die Zelle verantwortlich sind. Generell wird die Aufnahme dieser Stoffe durch Einstülpungen von lokalen Bereichen der PM bewerkstelligt, sodass das aufgenommene Material in einem Membran umhüllten Kompartiment vorliegt. Die Endozytose reguliert dabei eine Vielzahl von relevanten Prozessen wie die Nährstoffaufnahme, Zellhomöostase und Signaltransduktion (56).

Unter der weit gefassten Definition können vier Kernmechanismen zusammengefasst werden: Phagozytose, Pinozytose, Clathrin-abhängige Rezeptor-vermittelte Endozytose und die Clathrin-unabhängige Endozytose. Abgesehen von diesen vier Kernmechanismen gibt es noch weitere Endozytose-Mechanismen, die in dieser Arbeit nicht berücksichtigt werden. Welcher Endozytose-Mechanismus genutzt wird, hängt von den biophysikalischen und chemischen Eigenschaften der aufgenommenen Partikel ab. Bedingt durch die Größe des Partikels und der damit verbundenen notwendigen Verformung der PM ist eine grobe Klassifizierung des Endozytose-Prozesses möglich. Die Aufnahme von Partikeln mit einer Größe von mehr als 500 nm erfolgt typischerweise mittels Endozytose-Mechanismen, wie der Phagozytose oder Makropinozytose (auch bekannt als fluide Endozytose) (57). Partikel und Stoffe, die unterhalb dieser Größe liegen, werden durch Endozytose-Prozesse, wie der Rezeptor-vermittelten Clathrin-abhängigen Endozytose (CAE) und Clathrin-unabhängigen Endozytose (CUE), aufgenommen (57). Die verschiedenen Endozytose-Mechanismen sind in Abbildung 3 schematisch dargestellt und werden im Folgenden mit den jeweiligen Hauptfunktionen kurz zusammengefasst.

Die Phagozytose (Abb. 3, Punkt 1) ist definiert als schrittweiser Prozess, bei dem große Partikel ($> 0,5 \mu\text{m}$) durch Ausstülpungen der PM in einem Membran umhüllten Vesikel (Phagosom) eingeschlossen und in die Zelle aufgenommen werden. Während in einzelligen

Organismen die Phagozytose ein grundsätzlicher Prozess für die Akquisition von Nährstoffen ist, nutzen mehrzellige Organismen die Phagozytose hauptsächlich zur Aufnahme und Beseitigung von Mikroorganismen (58). Innerhalb von mehrzelligen Organismen übernehmen spezialisierte Immunzellen, wie Phagozyten und Leukozyten, die Aufgabe der Eliminierung von Krankheitserregern aus dem System (59). Eine weitere Aufgabe der Phagozytose in mehrzelligen Organismen liegt in der Entfernung von apoptotischen Zellen zur Aufrechterhaltung der Zellhomöostase. Für diese Aufgabe sind neben spezialisierten Zellen, wie die Makrophagen, auch Epithelzellen zur Phagozytose fähig und werden als fakultative oder nicht-professionelle Phagozyten angesehen (60).

Die Makropinozytose (Abb. 3, Punkt 2) ist ein Prozess, der zur nicht-selektiven Internalisierung von Flüssigkeiten und darin gelösten Stoffen, toten Zellen und Zelltrümmer führt. Bei diesem Prozess wird die extrazelluläre Flüssigkeit von Membranausstülpungen umschlossen und in ein Membran-umhülltes Kompartiment (Makropinosom) aufgenommen. Allgemein wird dieser Endozytose-Prozess genutzt, um Nährstoffe für die Zelle zu akquirieren (61). Unter besonderen Umständen kommt es zur Aufnahme von Partikeln, einschließlich Bakterien und Viren, die diesen Endozytose-Prozess nutzen, um Wirtszellen zu infizieren (62). Die Makropinozytose ist wichtig für eine Reihe von physiologischen Prozessen und wird beispielsweise von spezialisierten Immunzellen, wie Antigen-präsentierende dendritische Zellen, verwendet, um die extrazelluläre Flüssigkeit auf das Vorhandensein von Antigenen zu untersuchen (63). Je nach Größe der gebildeten Vesikel kommt es zur Unterscheidung in Makro- und Mikropinozytose. Die Mikropinozytose wird assoziiert mit der Bildung kleiner Vesikel, sogenannter Mikropinosomen mit ca. 100 nm \emptyset und die Makropinozytose mit der Bildung großer Vesikel (0,5 – 5 μm \emptyset).

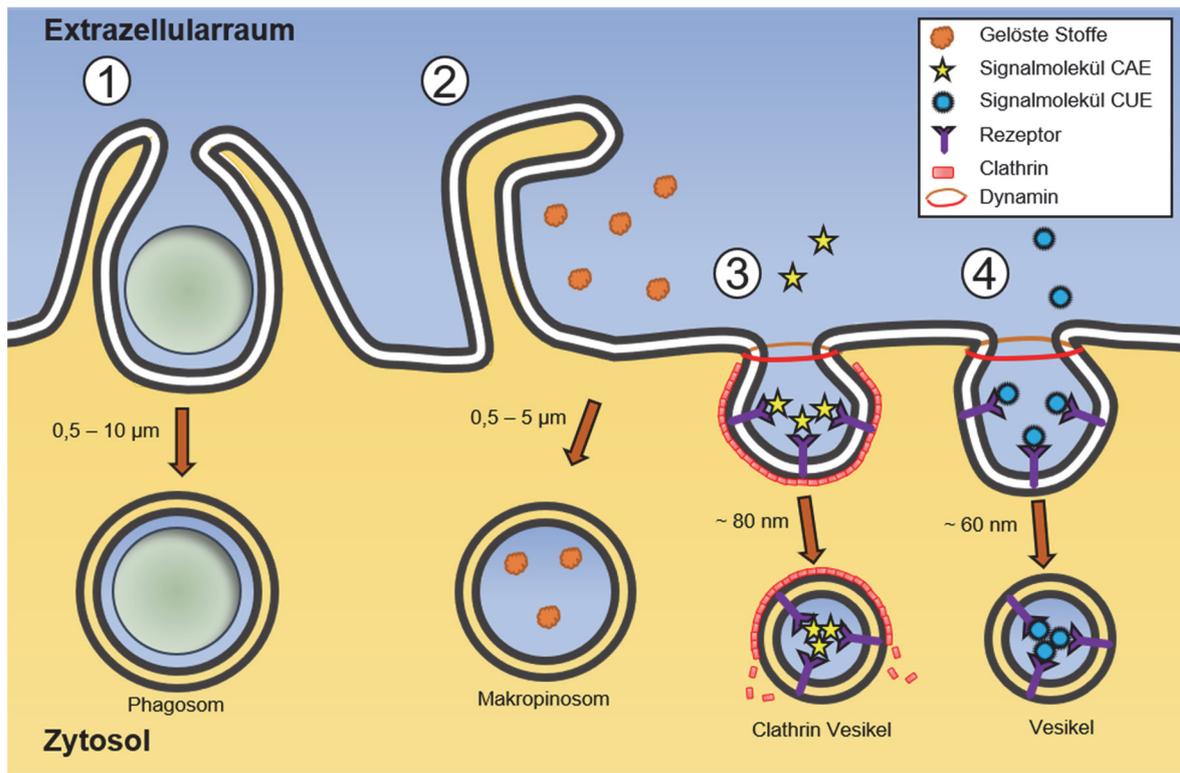


Abbildung 3: Die verschiedenen Endozytose-Mechanismen von humanen Zellen

Schematische Darstellung der Endozytose-Wege der Humanzelle. **1** Phagozytose, **2** Makropinozytose, **3** Rezeptor-vermittelte, Clathrin-abhängige Endozytose (CAE), **4** Clathrin-unabhängige Endozytose (CUE). Darstellung angelehnt an Foroozandeh et al. 2018 (64).

Kleine Partikel und Stoffe werden durch Rezeptor-vermittelte Endozytose-Mechanismen aufgenommen (65). Prinzipiell beruhen diese Endozytose-Mechanismen auf der Bindung von Liganden an ihren spezifischen Rezeptor. Durch die Bindung wird eine Signaltransduktion in der Zelle induziert, welche die Aufnahme des Rezeptor-Liganden-Komplexes initiiert. Allgemein ist bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose eine Unterscheidung zwischen der CAE (Abb. 3, Punkt 3) und CUE (Abb. 3, Punkt 4) möglich (66). Eine wichtige Rolle in diesen Endozytose-Prozessen besitzen Hüllproteine wie Clathrin und Caveolin (57). Im folgenden Kapitel wird die Rezeptor-vermittelte CAE im Detail betrachtet.

1.2.1 Clathrin-vermittelte Endozytose

Die Rezeptor-vermittelte CAE erzeugt kleine (60–120 nm Ø) Membranvesikel, die verschiedene Frachtmoleküle von der PM eukaryotischer Zellen in das Zytoplasma transportieren (67). Die Vesikel-Ladung besteht dabei hauptsächlich aus Transmembranproteinen und ihren extrazellulären Liganden. Dieser Endozytose-Prozess ist an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt, einschließlich der Nährstoffaufnahme, in Signalprozessen, der Entwicklungsregulation durch Morphogene und der Zelladhäsion (57). In dieser Arbeit wird deshalb die CAE mit den relevanten Vorgängen dargestellt. Konzeptionell ist die CAE ein einfacher Prozess, der aus fünf

aufeinanderfolgenden und teilweise überlappenden Schritten besteht (Abb. 4). Beginnend mit der Aktivierung der CAE durch die Liganden-Bindung an Rezeptoren, wie beispielsweise Transferrin an den Transferrin-Rezeptor oder vom epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) an den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR), kommt es zur Initiation/Nukleation (68, 69). Darauf folgt die Frachtselektion und Assemblierung der Clathrinhülle. Schließlich kommt es zur Abspaltung des Vesikels und der Demontage der Clathrinhülle. Bisher sind ca. 50 Proteine bekannt, die an der CAE beteiligt sind (67). Obwohl Rezeptoren und ihre Liganden durch einige Mechanismen (z. B. über CUE) in die Zelle gebracht werden können, bleibt die CAE der ausführlichste untersuchte Endozytose-Mechanismus. Die CAE vieler Rezeptortypen beginnt mit der Bindung des Liganden am Transmembranrezeptor. Die Interaktion zwischen Liganden und Rezeptor bewirkt eine Rekrutierung und Anhäufung von endozytotisch relevanten Proteinen zum aktivierten Rezeptor, was wiederum den initialen Prozess der Formierung eines Clathrin-umschlossenen Vesikels (CCV) darstellt. Darauf folgt die Assemblierung eines Initiationskomplexes, bestehend aus FCHO Proteinen (FCHO1/2), EPS15 und Intersektinen (70, 71). Der Komplex wird an der Innenseite der PM assembliert und führt zu einer lokalen Krümmung der PM.

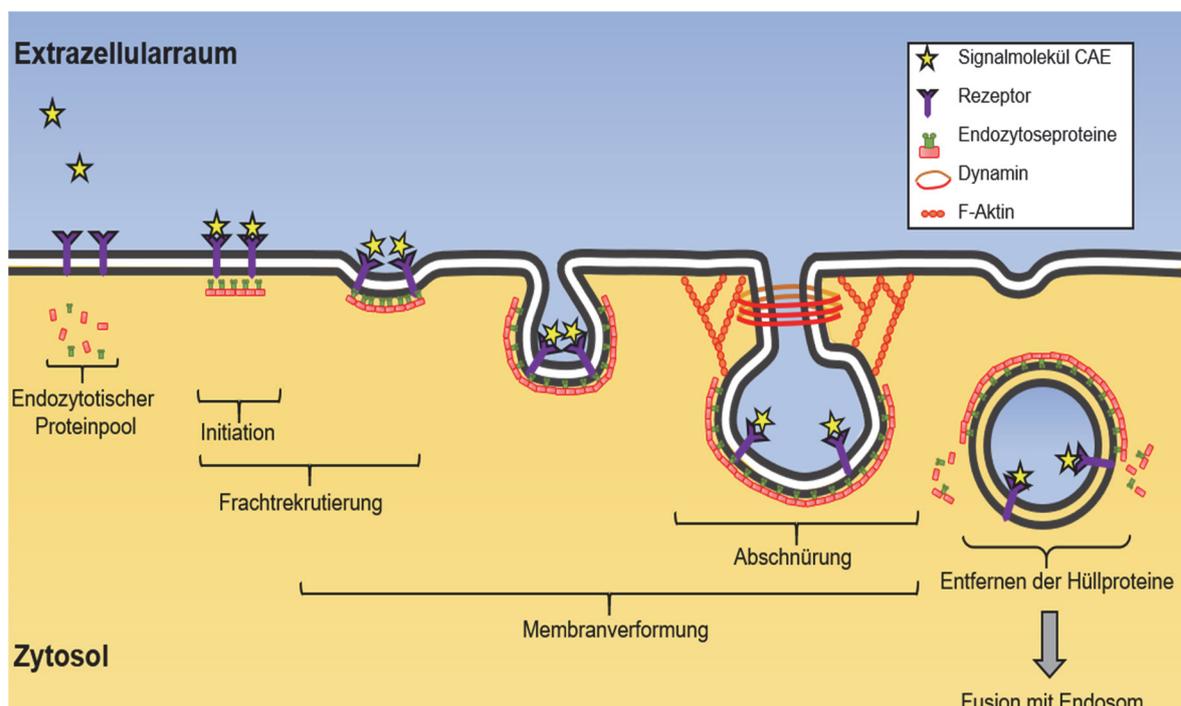


Abbildung 4: Schematischer Ablauf der Clathrin-abhängigen Endozytose

Durch Bindung eines Liganden an den Rezeptor wird die CAE initiiert und es kommt zur Signaltransduktion. Schematisch dargestellt sind die verschiedenen Prozess-Schritte und involvierten Klassen von Proteinen, die während der CAE ablaufen, um die Aufnahme des aktivierten Rezeptors zu bewerkstelligen. Darstellung angelehnt an Kaksonen et al. 2018 (67).

Dieser lokale Krümmungsbereich definiert die Stelle, an der es zur Bildung des CCV kommt und ist durch die Anreicherung mit dem Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat

(PI(4,5)P₂) gekennzeichnet (72). Im nächsten Schritt rekrutiert der Nukleationskomplex das essenzielle Adapterprotein AP2, welches zusammen mit anderen ladungsspezifischen Adapterproteinen für die Frachtselektion verantwortlich ist. AP2 bindet sowohl an PI(4,5)P₂ als auch an den zytoplasmatischen Teil von Transmembranrezeptoren und gilt als Interaktionszentrum. Die Selektivität der Fracht beruht auf einer Vielzahl von spezifischen Adapterproteinen, die wiederum in der Lage sind, an AP2 zu binden (73, 74). Im Anschluss an die Frachtselektion kommt es zur Rekrutierung von Clathrin-Triskelion durch AP2 und weiteren akzessorischen Adapterproteinen wie EPS15. Die Polymerisation von Clathrin an der zytoplasmatischen PM-seite führt zur Stabilisierung der Membrankrümmung und zur Formierung der Clathrinhülle um das entstehende Vesikel bis sich schließlich eine Knospe gebildet hat (75, 76). Die Abschnürung zum CCV von der PM ist abhängig von dem mechanochemischen GTPase-Protein Dynamin, welches von BAR (Bin–Amphiphysin–Rvs)-Domänen enthaltenden Proteinen rekrutiert wird und spezifisch an die Membrankrümmung am Hals des Vesikels bindet (77, 78).

BAR-Domänen-Proteine sind Teil einer großen Proteinfamilie, die an der Grenzfläche zwischen der Zellmembran und dem Zytoplasma eine herausragende Rolle spielen. Die Proteine können durch die BAR-Domäne dimerisieren und bilden dadurch eine funktionelle Einheit, die Membranen bindet und zu Membranverformungen führen kann. Unterschiede in ihren intrinsischen Krümmungen und Lipidbindungseigenschaften erklären eine große Vielfalt an membranmodulierenden Eigenschaften (79). Beispiele für BAR-Domänen-Proteine, die Dynamin rekrutieren, sind Amphiphysin, Endophilin, Sorting-Nexin 9 (SNX9) und Syndapin, die alle als Gemeinsamkeit eine Src-Homologie 3 (SH3)-Domäne aufweisen und an Prolin-reiche Domänen von Dynamin binden können. Die Akkumulation der Proteine um den Hals des Vesikels begünstigen die Funktion der GTP Hydrolyse von Dynamin und dem darauf folgenden Mechanismus der Abspaltung des Vesikels (80, 81). Je nach Größe des Vesikels kommt es in diesem Prozess zur Aktinpolymerisierung durch den Arp 2/3 (Aktin-verwandte Proteine 2/3)-Komplex, wodurch eine in das Zellinnere gerichtete Kraft etabliert wird, die zur Abschnürung des Vesikels beiträgt (82). Arp 2/3 wird z.B. durch das Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (N-WASP) aktiviert, das selbst von den SH3-Domänen von BAR-Domänen enthaltenden Proteinen rekrutiert wird (83, 84). Nach der Abschnürung des CCV wird die Clathrinhülle durch HSC70 und Auxilin vom Vesikel entfernt und das Vesikel wird zum frühen Endosomen transportiert und fusioniert mit diesem (85, 86).

Für die Endozytose ist die Modulation von zwei grundlegenden Strukturen, der PM und des Zytoskeletts, notwendig. Die PM muss durch spezielle Proteine verformt werden, damit es zur Vesikelbildung kommt. Das Zytoskelett wirkt stabilisierend auf die entstehende Knospung der Membran und ist an der Kraftausübung, um die Knospung in das Zellinnere

zu ziehen, beteiligt. Die Einflüsse der beiden Strukturen auf die Endozytose werden in den folgenden zwei Kapiteln dargelegt.

1.2.2 Die Plasmamembran während der Endozytose

Die PM gilt als Zellgrenze und trennt die inneren Bestandteile der Zelle von den äußeren. Sie besteht aus einer Phospholipid-Doppelschicht und gilt dabei als semipermeable Barriere zwischen zwei wässrigen Komponenten. Diese „Barriere“ ist jedoch eine sehr dynamische Struktur, die sich biegen, spalten und verschmelzen kann. Diese Prozesse sind bei der Bildung von endozytischen Vesikeln essenziell und gehen einher mit einer umfassenden proteinvermittelten Umgestaltung der PM, die durch Protein-Protein- und Protein-Phospholipid-Wechselwirkungen räumlich und zeitlich organisiert ist.

Im Fall der CAE zeigt die Membran grundsätzlich zwei morphologische distinkte Formen. Beginnend mit der Ausstülpung der Membran in das Zellinnere kommt es zu einer kugelförmigen Kuppel, die mit Fortschreiten der Endozytose in eine kugelförmige Knospe übergeht, welche wiederum über einen „Hals“ mit der PM verknüpft ist (Abb. 5). Diese Verformungen der PM werden dabei in der Regel durch mehrere Faktoren induziert und können grob in drei Kategorien unterteilt werden: Verformungen der Membran durch Änderungen der Lipidzusammensetzung und -asymmetrie. Verformung der PM durch Bindung oder Insertion von Proteindomänen sowie Verformungen durch Kräfteinwirkungen wie sie z.B. vom Zytoskelett generiert werden (87). Zumeist wirken dabei mehrere Faktoren synergetisch, um Membrankrümmungen zu erzeugen (88).

Phospholipide besitzen eine intrinsische Form, die abhängig von der Größe ihrer Kopfgruppen und ihrer Acylreste ist. Diese Eigenschaften bestimmen die Packungsdichte und daher auch die Form der Lipidschicht. Sofern viele Lipide mit ähnlicher Form lokal akkumulieren, nimmt eine Lipideinzelschicht die spontane Krümmung der lokalen Lipide an. Dies kann aufgrund der Doppelschichtkopplung die gesamte Membran verändern (89, 90). Kommt es zum Austausch von Lipiden durch Lipide mit „größeren“ Kopfgruppen auf einer Seite der Lipiddoppelschicht, wird die Komposition verändert. Die veränderten Kopfgruppen nehmen sterisch mehr Platz ein.

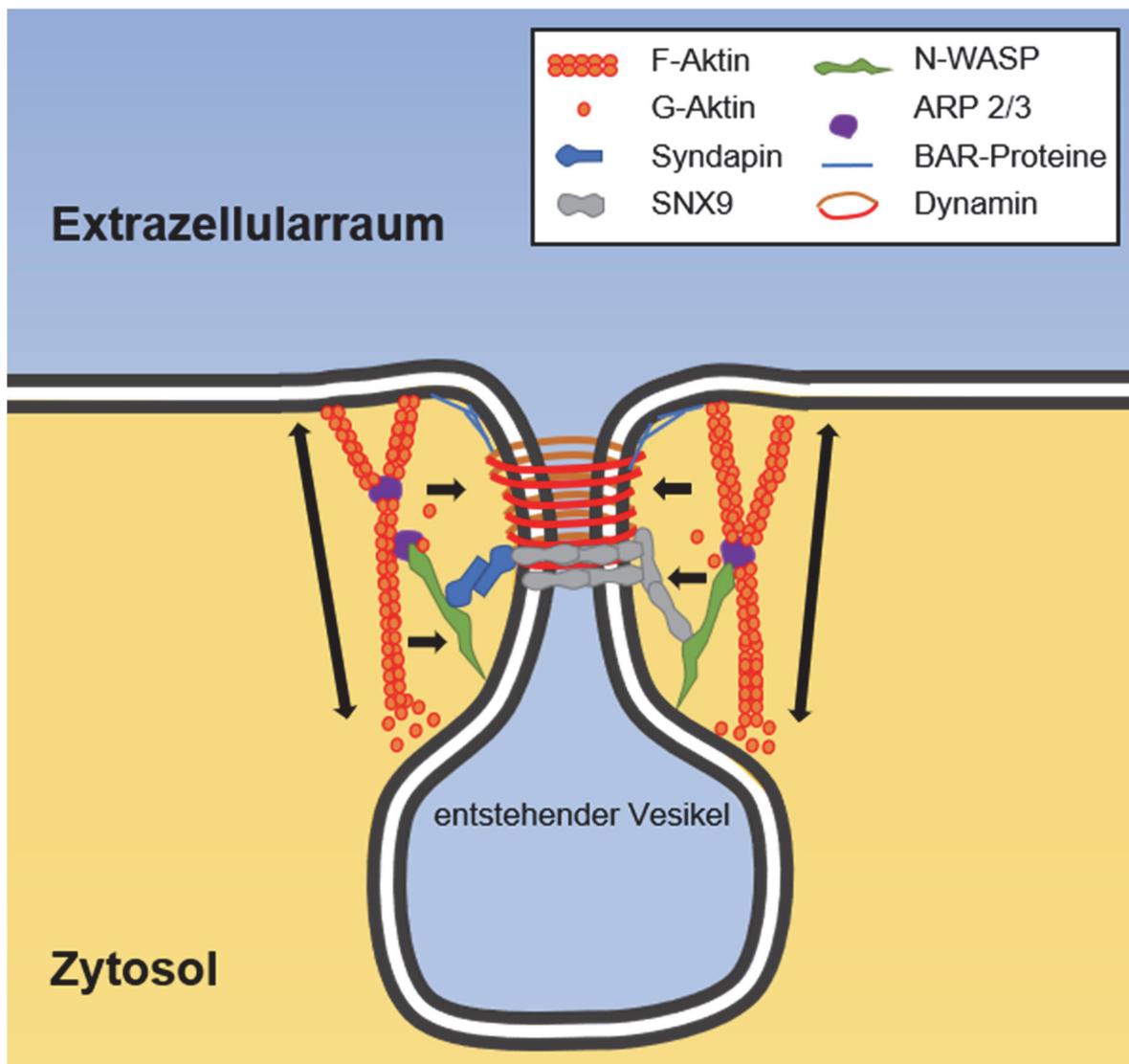


Abbildung 5: Einfluss der Membran und des Aktin-Zytoskeletts während der späten Endozytose

Schematische Darstellung der involvierten Komponenten und der auftretenden Kraftwirkungen während der CAE. Die schwarzen Pfeile stellen Kraftausübungen, die durch das Zytoskelett etabliert werden, dar. Zum späten Zeitpunkt der Vesikelbildung wird der Vesikelhals verengt und anschließend durch die kombinierten Kraftausübungen der Kontraktion von Dynamin und des Aktin-Zytoskeletts abgeschnürt. Angelehnt an Kessels & Qualmann 2004 (92).

Dies löst eine Krümmung in Richtung der Lipidschicht aus, in der keine Veränderung der Lipidzusammensetzung erfolgt ist (91). Akkumulieren beispielsweise Phosphatidylinositol-Phosphate (PIPs) an der Innenseite der PM, führt dies zu einer Membrankrümmung in Richtung des Zytosols. Im Falle der CAE stellt die Akkumulation von PI(4,5)P₂ das initiale Signal für Membranverformungen dar (93). Auf eine ähnliche Art und Weise induzieren Proteine wie Transmembranrezeptoren oder auch nur einzelne Proteindomänen-Membrankrümmungen (94, 95). Ein Mechanismus, der während der CAE vorkommt, ist die hydrophobe Insertion. Dieser Mechanismus basiert auf dem Einfügen von Proteindomänen wie amphipathischen Helices (APH) oder kleinen hydrophoben Schleifen auf der inneren Seite der PM. Dies führt dazu, dass der Insertionsbereich in Bezug auf den Rest der Lipidschicht gespreizt wird, was eine starke Tendenz der Membran erzeugt, sich lokal in

Richtung der Insertion auszudehnen (96–98). Die am häufigsten vorkommenden Proteindomänen, die in Membrankrümmungen involviert sind, sind Bin-Amphiphysin-Rvs (BAR)-Domänen enthaltende Proteine. Diese Kategorie von Proteinen ist in der Lage, bereits existierende Membrankrümmungen zu detektieren und durch Dimerisierung ein Gerüst zu erzeugen, das die Membrankrümmung verstärkt (99). BAR-Domänen-Proteine sind über den gesamten Zyklus der CAE involviert. So ist beispielsweise Syndapin ein wichtiges Bindeglied zwischen der Membrankrümmung und der Rekrutierung des Aktin-Zytoskeletts und wird als späterer Faktor für die CAE rekrutiert (Kapitel 1.2.4.2). Syndapin hat im C-Terminus eine F-BAR Domäne, die spezifische Membrankrümmungsgrade erkennt und erzeugt (100). Ein weiteres Beispiel aus der Gruppe der BAR-Domänen-Proteine ist SNX9, welches mit Dynamin interagiert und für die Rekrutierung von Dynamin zum Vesikelhals verantwortlich ist und somit ein Faktor der späten CAE darstellt (Kapitel 1.2.4.1). Durch die F-BAR-Domäne besitzt SNX9 auch die Fähigkeit, Membranen zu modulieren und ist ebenfalls an der Bildung des „Halses“ von CCV beteiligt (101). Schließlich ist das Aktin-Zytoskelett ebenfalls in Membrankrümmungsprozessen involviert. In bestimmten Fällen der CAE wird Aktin beispielsweise bereits zum Zeitpunkt der ersten Membrankrümmung rekrutiert und umgibt im weiteren Verlauf die Invagination der sich ausstülpenden Membran und schließlich das komplette Vesikel. Der Kontext des Aktin-Zytoskeletts wird im folgenden Kapitel im Detail dargelegt.

1.2.3 Das Aktin-Zytoskelett während der Endozytose

Das Zytoskelett ist ein komplexes, dynamisches Netzwerk von miteinander interagierenden Proteinfilamenten, die im Zytoplasma aller Zellen, einschließlich Bakterien und Archaeen, vorhanden sind (102). In Eukaryoten besteht es aus drei Hauptkomponenten: Aktinfilamenten, Intermediärfilamenten und Mikrotubuli, wobei im Rahmen der Endozytose Mikrotubuli und Aktinfilamente und deren Interaktionen wichtige Faktoren darstellen. Sowohl Mikrotubuli als auch Aktinfilamente zeigen ähnliche Dynamiken. Beide Filamente haben einen Nukleationskern, an dem es zur Polymerisation der monomeren Bestandteile (α/β -Tubulin bzw. globuläres Aktin) in eine Richtung kommt. An der entgegengesetzten Stelle depolymerisiert das Filament hingegen, sodass ohne externe Beeinflussung ein dynamisches Gleichgewicht vorliegt. Wachstum oder Verkürzung der Filamente wird durch Beeinflussung der verschiedenen Prozesse an den jeweiligen Seiten erreicht, sodass die Nettopolymerisation oder Nettodepolymerisation überwiegt (103).

Das Mikrotubuli-Zytoskelett ist am Vesikeltransport innerhalb der Zelle involviert und wird im Rahmen dieses Kapitels nicht weiter thematisiert. Das Aktin-Zytoskelett ist hingegen häufig direkt an Endozytose-Mechanismen, wie der Filopodien-Bildung oder Phagozytose beteiligt (104). Im Falle der CAE wurde bei Hefen erstmalig die Notwendigkeit der

Modulation vom F-Aktin-Zytoskelett beschrieben (105). In Säugetiersystemen ist das Aktin-Zytoskelett an verschiedenen Endozytose-Mechanismen beteiligt, einschließlich Phagozytose, Makropinozytose und Caveolin-vermittelter Endozytose. Die Notwendigkeit der Beteiligung des Aktin-Zytoskeletts bei der Säugetier CAE ist jedoch noch nicht komplett geklärt (106). Sie scheint aber notwendig zu werden, wenn bestimmte Bedingungen, wie die Aufnahme größerer Partikel oder die Endozytose von Pathogenen wie *Listeria*, gelten (107, 108). Sowohl in Hefe- als auch in Säugetierzellen dient der Arp 2/3 (Arp 2/3)-Komplex, bestehend aus sieben Untereinheiten, als Nukleationsfaktor eines verzweigten Aktin-Netzwerks an Stellen der Endozytose (109, 110). Zwei Untereinheiten des Arp 2/3-Komplexes, ähneln stark der Struktur von monomerem Aktin und dienen als Keimbildungsstellen für neue Aktinfilamente. Der Komplex bindet an die Seiten bestehender „Mutter“-Filamente und initiiert das Wachstum eines neuen „Tochter“-Filaments in einem charakteristischen Winkel von 70 Grad zum „Mutter“-Filament. Durch diese Keimbildung neuer Filamente entstehen verzweigte Aktin-Netzwerke (111). Die Schlüsselkomponenten, die die Bildung der Aktinfilamente an den endozytischen Stellen regulieren, sind die Proteine der WASP-Familie, die den Arp 2/3-Komplex rekrutieren und aktivieren. Dazu gehört das Protein N-WASP, das selbst von den SH3-Domänen von BAR-Domänen enthaltenden Proteinen rekrutiert wird (Kapitel 1.2.4.3) (112, 113). So kann sowohl Syndapin als auch SNX9 aktiv zytosolisches N-WASP zum Vesikelhals relokalisieren und aktivieren. Das aktivierte N-WASP assoziiert mit seinem G-Aktin-bindenden C-Terminus an den Arp 2/3-Komplex und führt zu einer Konformationsänderung, wodurch ein neuer Nukleationskern gebildet wird. Es kommt zur Verzweigung der Aktinfilamente in diesem Bereich (114). Die Nukleation von Aktin übt eine Kraftübertragung auf die PM aus, wodurch die Abschnürung des CCV unterstützt wird. Insbesondere nutzen intrazelluläre Pathogene häufig das Aktin-Zytoskelett, um eine effektive Endozytose in Wirtszellen zu gewährleisten (115, 116). In den nächsten Kapiteln wird die Funktion einiger für die Endozytose essenzieller Proteine vorgestellt.

1.2.4 N-WASP, SNX9 und Syndapin – Essenzielle Mediatoren der Endozytose

1.2.4.1 *SNX9: Mediator zwischen dem Aktin-Zytoskelett und der PM*

SNX9 ist beteiligt an verschiedenen Endozytose-Mechanismen und ist ein Mitglied der SNX-Proteinfamilie, die aus insgesamt 33 Proteinen besteht. Die Funktion der Proteinfamilie wurde im Kontext der endosomalen Vesikeltransporte, wie z.B. der Vesikelsortierung, identifiziert (117). Sämtliche Mitglieder der SNX-Proteinfamilie teilen eine gemeinsame Phox-Homologie (PX)-Domäne, die als Membraninteraktionsdomäne gilt und eine Membranassoziation über PIPs ermöglicht (118). Mit Ausnahme dieser Domäne sind

die Proteine sehr unterschiedlich und haben unterschiedliche Rollen in Zellen. In Bezug auf die Proteinfunktion ist eine weitere Einordnung in eine kleinere relevantere Untergruppe möglich. 12 von 33 SNX-Proteinen besitzen zusätzlich zur PX-Domäne noch eine BAR-Domäne. Einige der PX-BAR-haltigen SNX haben auch eine SH3-Domäne. Wohingegen aufgrund einer ähnlichen Domänen-Organisation SNX9, zusammen mit SNX18 und SNX33, in eine Unterfamilie eingegliedert wird (101). Alle Proteine dieser Unterfamilie haben einen Bereich mit geringer Komplexität (LC-Domain = *low complexity domain*), eine PX-Domäne und im C-Terminus eine BAR-Domäne, die als zweite Membraninteraktionsdomäne gilt. Durch die BAR-Domäne sind die Proteine in der Lage, Homo- und Heterodimere auszubilden, die nach der erfolgreichen Oligomerisierung durch Bindung spezifische Membrankrümmungsgrade erkennen, erzeugen und stabilisieren können (119–121). Die PX- und BAR-Domänen bilden eine funktionelle Einheit, die auch PX-BAR genannt wird (119, 122). Weiterhin existiert die Yoke-Domäne, welche aus zwei separaten Regionen (Y_N und Y_C) besteht und die PX-Domäne flankiert. Sie dient als Verbindungselement, das die membranbindenden PX- und BAR-Domänen zu einer einzigen „Superdomäne“ verbindet, deren strukturelle Integrität für die membranmodulierende Aktivität des Proteins essenziell ist (101). Darüber hinaus weist SNX9 eine N-terminale SH3-Domäne auf, die für eine Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich ist (Abb. 6). So wird beispielsweise die Bindung von N-WASP und Dynamin über diese Domäne vermittelt (101, 123). Außerdem dient diese Domäne auch als Interaktionsplattform für bakterielle Proteine, wie EspF (*E. coli* secreted protein F) und ist somit ein nachgewiesenes Manipulationsziel von Pathogenen (124).

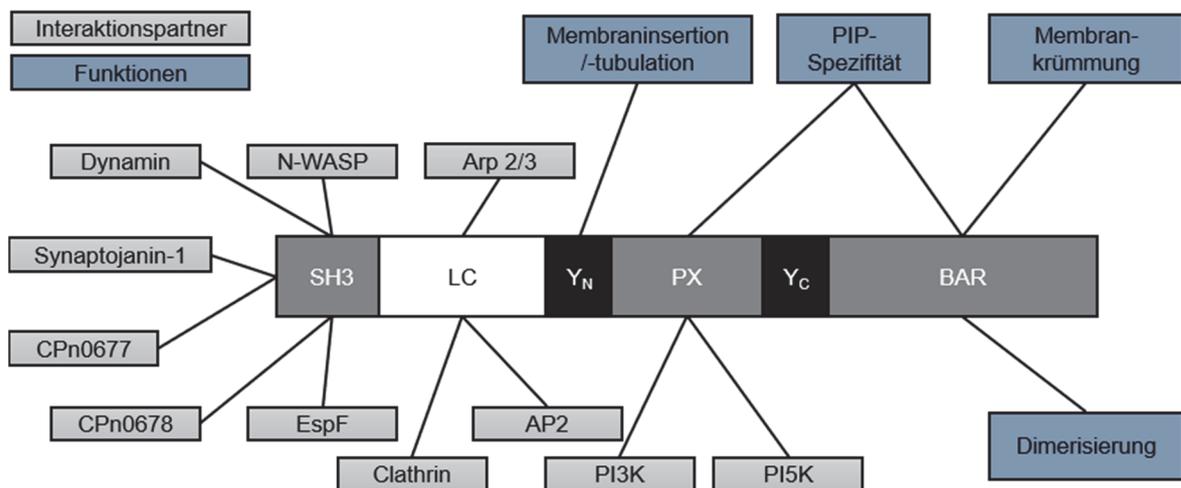


Abbildung 6: Funktionen- und Domänenübersicht von SNX9

Schematische Darstellung der bekannten SNX9-Domänen mit ihren zugehörigen Funktionen (blaue Kästen) und einigen proteinösen Interaktionspartnern (graue Kästen). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nicht alle bekannten Interaktionspartner in der Grafik angegeben. PX, Phox-homology domain; BAR, Bin-Amphiphysin-Rvs167-domain; $Y_{N/C}$, C-terminal oder N-terminale Yoke-Domäne; SH3, Src-homology 3 domain. Angelehnt an Bendris und Schmid 2016 (125).

Aufgrund der zahlreichen Interaktionsmöglichkeiten mit Proteinen und auch Lipiden bzw. Membranen ist SNX9 ein multifunktionales Protein, das in zahlreichen Prozessen involviert ist (Abb. 6). Im Kontext dieser Arbeit wird jedoch nur die Rolle von SNX9 während der CAE beschrieben. Die Funktion von SNX9 kann dabei im Wesentlichen auf die Membranbindefähigkeit, Aktivierung und Rekrutierung von Dynamin und N-WASP zurückgeführt werden. Die überwiegenden publizierten Daten deuten auf eine Hauptfunktion von SNX9 während der späten Phase der CAE, zum Zeitpunkt der Vesikelausbildung und Abschnürung, hin (125). Das primär im Zytosol und an der PM assoziierte SNX9 kann durch die Bindung an Clathrin oder dem Adapterprotein AP2 spezifisch zu Stellen der CAE rekrutiert werden (126, 127). Unterstützend auf diesen Rekrutierungsprozess wirkt auch die hohe Bindungsaffinität der PX-Domäne zu den während der CAE PM-definierenden PIPs, wie PI(3,5)P₂, PI(3,4)P₂ und PI(3,4,5)P₃ (72, 128). Zusätzlich kann SNX9 über die PX-Domäne die PI5K (Phosphatidylinositol 4-Phosphat 5-Kinase) aktivieren, die PI(4)P zu PI(4,5)P₂ umwandelt und die PI(4,5)P₂-Konzentration lokal in diesem Bereich erhöht. Dies hat einen positiven Rückkopplungseffekt, welcher wiederum die Rekrutierung von weiterem SNX9 begünstigt (129). Außerdem interagiert die PX-Domäne mit der PI3K (Phosphoinositid 3-Kinase), die PI(4,5)P₂ zu PI(3,4,5)P₃ umsetzt, welches ein endozytotisches Signal darstellt und somit die Endozytose vorantreiben kann (130). Durch die PIP-Bindung wird einerseits die Lokalisation von SNX9 zur endozytischen Stelle bestimmt und andererseits die Aktivierung von SNX9 initiiert (130). Dadurch kommt es zur SNX9-Oligomerisierung, die zu einer starken Erhöhung des Aktivitätslevel von N-WASP und der GTP-Hydrolyse durch Dynamin führt (131). Die erhöhte N-WASP Aktivität bedingt infolgedessen eine erhöhte Arp 2/3-abhängigen F-Aktinpolymerisierung. Zusammen mit der Kontraktion von Dynamin kommt es zur Kraftübertragung auf die endozytische PM, womit das Vesikel abgeschnürt wird (101). Dies zeigt, dass sowohl die Membranmodulation als auch die kontrollierte Dynamik von Proteinaktivitäten und deren Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett in allen Bereichen der Endozytose benötigt wird, wobei SNX9 ein wichtiges Adapterprotein darstellt.

1.2.4.2 Syndapin - ein membranmodulierendes Endozytose relevantes F-Bar Protein

Syndapin ist ein F-BAR und SH3-Domänen enthaltendes Protein, welches in der Endozytose und dem Vesikeltransport involviert ist. In Säugetieren existieren drei Gene, die für drei Hauptisoformen kodieren. Alle Proteine wirken in unterschiedlichen Endozytose-Mechanismen und gelten als Adaptoren des Aktin-Zytoskeletts in verschiedenen zellulären Prozessen, wie der neuronalen Morphogenese und Zellmigration. Innerhalb dieser Isoformen gibt es hoch konservierte Domänen und eine starke AS-Sequenzidentität (92).

Die verschiedenen Isoformen kommen in unterschiedlichen Geweben vor und sind an einer Vielzahl von zellulären Prozessen involviert. Syndapin 1 ist die neuronenspezifische Isoform (132), Syndapin 2 wird in allen Geweben ubiquitär exprimiert (133) und Syndapin 3 wird hauptsächlich in der Skelett- und Herzmuskulatur exprimiert (134). Die membranmodulierende Aktivität von Syndapin wird über die F-BAR-Domäne und seinen Interaktionspartnern, z. B. Dynamin und N-WASP, etabliert. Alle drei Isoformen sind Mitglieder der F-BAR-Domäne-Unterfamilie, deren Proteinsequenzen hoch konserviert sind. Sie alle enthalten eine C-terminale SH3-Domäne für die Vermittlung von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Zu den primären Interaktionspartnern gehören Dynamin, Synaptojanin, Synapsin und N-WASP (100, 133, 135). Die drei Syndapin-Isoformen sind gewebespezifisch an der Endozytose und den Vesikeltransport-Prozessen in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen beteiligt. Syndapin 1 hat eine Rolle in der activity-dependent bulk endocytosis (ADBE) in Neuronen; Syndapin 2 in der CAE, Caveolae-Bildung, im Golgi-Vesikel-Transport und dem Endosomen-Recycling; Syndapin 3 hingegen beim Transport und Recycling von Glucosetransportern. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Rolle von Syndapin 2 (folgend Syndapin) während der Endozytose hervorgehoben. Die zahlreichen Proteininteraktionspartner führten zunächst zu der Annahme, dass Syndapin sowohl bei der Endozytose als auch bei der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts eine zentrale Rolle spielt (135). Diese Hypothese wurde durch detailliertere Untersuchungen der Wechselwirkungen von Syndapin mit Dynamin und N-WASP gestützt. In Koimmunopräzipitationsstudien wurde eine Interaktion der endogenen Proteine nachgewiesen. Zudem führte die Überexpression der Syndapin-SH3-Domäne in permeabilisierten Zellen zu einer Hemmung der Rezeptor-vermittelten Endozytose (100). Diese Hemmung tritt beim Übergang von invaginierten Clathrin-beschichteten Gruben zu geschlossenen endozytischen Membrankompartimenten auf (136). Neben Dynamin konnte eine Interaktion von Syndapin mit dem Arp 2/3-Komplexaktivator N-WASP bewiesen werden (133). Im Normalzustand liegt N-WASP durch intramolekulare Wechselwirkung der VCA-Region mit der BR-CRIB-Domäne in einem autoinhibierten Zustand vor, da sich die Domänen durch ihre Faltung überlagern (Kapitel 1.2.4.3). Dieser Faltungszustand verhindert, dass die VCA-Region an den Arp 2/3-Komplex binden kann (111, 137). Die Autoinhibition wird erst durch kompetitive Bindung von anderen Molekülen, wie beispielsweise Cdc42, an die CRIB-Domäne aufgehoben. Die VCA Domäne wird frei gesetzt und kann mit dem Arp 2/3-Komplex assoziieren und diesen aktivieren (138–140). Da Syndapin N-WASP zur Membran rekrutiert und in Abhängigkeit von der SH3-Domäne und dem Arp 2/3-Komplex die lokale Aktinpolymerisation auslöst, scheint Syndapin zu den N-WASP-Aktivatoren zu gehören.

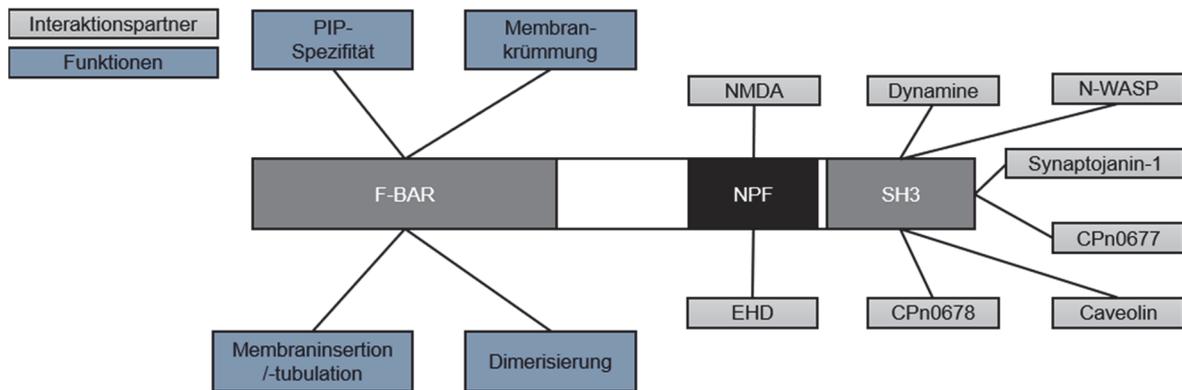


Abbildung 7: Funktionen- und Domänenübersicht von Syndapin

Schematische Darstellung der bekannten Syndapin-Domänen mit ihren zugehörigen Funktionen (blaue Kästen) und einigen proteinösen Interaktionspartnern (graue Kästen). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nicht alle bekannten Interaktionspartner in der Grafik angegeben. F- BAR, Fes-CIP4 homology Bin-Amphiphysin-Rvs167-domain; SH3, Src-homology 3 domain; NPF, asparagine-proline-phenylalanine motif. Angelehnt an Quan und Robinson 2013 (141).

Eine Verbindung zwischen den zytoskelettalen und endozytotischen Funktionen von Syndapinen wurde durch die Beobachtung nahegelegt, dass eine Überexpression von N-WASP die Rezeptor-vermittelte Endozytose stört. Dies hängt ausschließlich von der Syndapin-bindenden, zentralen Prolin-reichen Domäne von N-WASP ab. Der Phänotyp kann durch Syndapin-Ko-Überexpression gerettet werden. Zusammenfassend agiert Syndapin auf eine ähnliche Art und Weise wie SNX9 zum Zeitpunkt der Vesikelabschnürung des CCV und stellt ein weiteres Bindeglied zwischen dem Aktin-Zytoskelett und der Membran dar.

1.2.4.3 Die WASP-Familie ist für die Aktivierung des Arp 2/3-Komplexes verantwortlich

In Säugetieren kodieren 5 Gene für die Mitglieder der WASP-Proteinfamilie, dazu gehören WASP, N-WASP, WAVE1/SCAR1, WAVE2 und WAVE3 (137, 142). Die Mitglieder der WASP-Familie wurden als Hauptregulatoren des Arp 2/3-Komplexes identifiziert (143). Diese Proteine aktivieren den Arp 2/3-Komplex, welcher durch Aktinpolymerisierung neue Filamente an bereits existierenden Aktin-Filamenten erzeugt. WASP-Familienproteine besitzen gemeinsame, konservierte Domänen, wie die C-terminale Verprolin-Homologie-Domäne (V), die Cofilin-Homologie-Domäne (C) und die saure Domäne (A). Zusammen bilden diese drei Domänen die VCA-Region (137). Die VCA-Region bindet Aktinmonomere und den Arp 2/3-Komplex, was zu einer rasanten Steigerung der Aktinpolymerisation durch Aktivierung des Arp 2/3-Komplexes führt. Die N-Termini der WAVE- und WASP-Proteine divergieren am stärksten voneinander, sind aber in allen Spezies konserviert. Der N-Terminus enthält die Domänen, die eine Verbindung mit regulatorischen Proteinen herstellen. WASP und N-WASP enthalten eine WASP-Homologie 1 (WH1) -Domäne, die auch als Ena / VASP-Homologie 1 (EVH1) -Domäne bekannt ist, und eine CRIB-Domäne,

die die Rho-GTPase Cdc42 bindet. Die WH1-Domäne interagiert mit der WIP-Proteinfamilie (WASP-interacting protein) und es wird angenommen, dass diese Interaktion die Aktivität von WASP oder N-WASP unterdrückt (144). Im Gegensatz dazu enthalten die WAVE-Proteine eine SCAR-Homologie-Domäne (SHD) und besitzen keine GTPase-Bindungsdomäne. Sowohl WASPs als auch WAVEs enthalten eine basische Region (BR), die an PI(4,5)P2 und andere anionische Phospholipide bindet und so die Proteine so zur PM rekrutieren können (145). Unter normalen Bedingungen werden WASP und N-WASP durch intramolekulare Wechselwirkung zwischen der C-terminalen VCA-Domäne und der N-terminalen BR-CRIB Domäne gefaltet, dass die Domänen sich gegenseitig maskieren (139, 146). Gefaltetes WASP und N-WASP sind inaktiv und es ist keine Bindung am Arp 2/3-Komplex möglich. Die Autoinhibition wird erst durch die kompetitive Bindung anderer Moleküle an die CRIB-Domäne oder an die umgebende Region freigesetzt. So kann beispielsweise CDC42 an die CRIB-Domäne binden, wodurch die Faltung aufgehoben wird und VCA frei gesetzt wird (137, 147). Durch richtungsweisende Publikationen kristallisierte sich die Rolle von N-WASP bei der Ausbildung bestimmter Aktin-Strukturen an der PM (148), bzw. während der Endozytose, heraus (149). Besonders herausragend ist hierbei die Vermittlerrolle von N-WASP als Verarbeiter von Signalen durch Bindung von SH3-Domänen-Proteinen, die zur Aktivierung von N-WASP und dadurch zur Aktivierung von Arp 2/3-Komplexes führen.

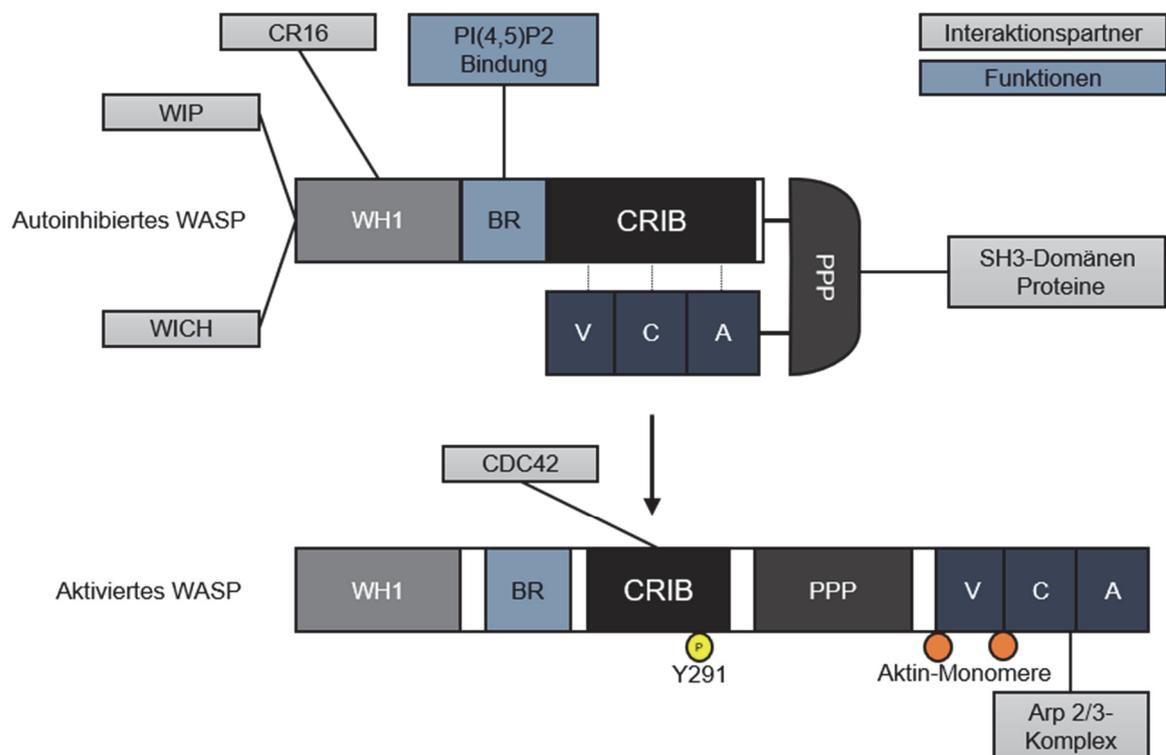


Abbildung 8: Funktionen- und Domänenübersicht von WASP

Schematische Darstellung der bekannten WASP-Domänen mit ihren zugehörigen Funktionen (blaue Kästen) und einigen proteinösen Interaktionspartnern (graue Kästen). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nicht alle bekannten Interaktionspartner in der Grafik angegeben. WH1, WASP-Homologie 1; BR, basische Region; CRIB,

Cdc42- and Rac-interaktive Bindungsdomäne; PPP, Polyprolin Domäne; V, Verprolin-Homologie-Domäne; C, Cofilin-Homologie-Domäne; A, saure Domäne. Angelehnt an Thrasher und Burns 2010 (150).

Es wurde beobachtet, dass das Aktivitätslevel der N-WASP-Aktivierung von den SH3-Domänen verschiedener Proteine abhängt (151). Ebenfalls führt eine Phosphorylierung durch Tyrosinkinasen an der Aminosäure Y291 in der CRIB-Domäne zur Erhöhung der basalen Aktivität von WASP gegenüber dem Arp 2/3-Komplex und ermöglicht die WASP-Aktivierung durch neue Stimuli, wie durch SH2-Domänen von Kinasen der Src-Familie (152). Wichtig ist, dass die WASP-Phosphorylierung und die Bindung von Cdc42 einen synergistischen Effekt auf die Aktivierung des Arp 2/3-Komplexes haben. Daher wird die Aktivierung des Arp 2/3-Komplexes durch WASP und N-WASP lokal durch die additiven Effekte verschiedener Arten von Signalmolekülen optimiert und akkumuliert. Insgesamt ist zu erkennen, dass N-WASP durch verschiedenste Proteine aktiviert werden kann. Es ist somit an der Signalweiterleitung von verschiedenen zellulären Komponenten beteiligt, mit dem Effekt, dass es zu einer Arp 2/3-induzierten F-Aktin-Verzweigung kommt.

1.2.5 Die Endozytose dient als Eintrittsmechanismus für intrazelluläre Pathogene

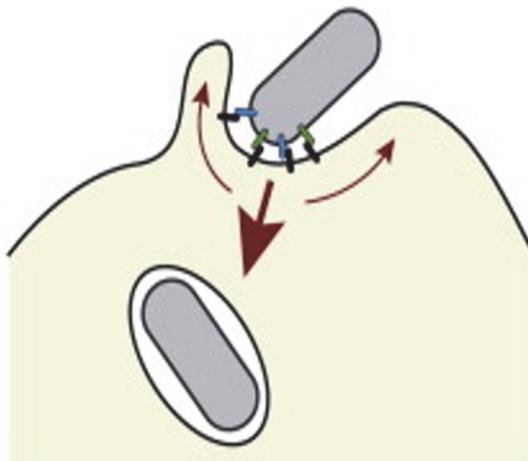
Pathogene dringen in Wirtszellen ein, um vor schädlichen extrazellulären Komponenten und Zellen, wie beispielsweise Antikörper und Immunzellen, geschützt zu sein. Als obligate intrazelluläre Parasiten haben Viren keine Wahl und sind darauf angewiesen, Wirtszellen zu infizieren, um sich zu vermehren. Bakterien und eukaryotische Parasiten haben oft andere Möglichkeiten, da die meisten selbstreplizierend sind. Einige haben sich jedoch dahingehend entwickelt, Vorteile aus der geschützten Umgebung im Zytosol oder in zytoplasmatischen Vakuolen tierischer Zellen zu ziehen, die für Wachstum und Vermehrung eine günstige Umgebung darstellen. Dabei nutzen Pathogene die Wirtszell-Endozytose-Maschinerie aus, um eine effektive Aufnahme zu gewährleisten (153–156).

Bei Viren ist die CAE der meist genutzte Mechanismus, um in Zellen einzudringen (153, 154, 157, 158). So nutzen beispielsweise das vesikuläre Stomatitis-Virus und die Adenoviren die CAE aus, um in ihre Wirtszellen zu gelangen (159, 160). Neben der CAE ist auch die CUE ein möglicher Mechanismus für bestimmte Viren, um Wirtszellen zu infizieren. So dringt das SV40 (Simian Virus 40) nach Bindung an das Lipid Raft-spezifische Gangliosid GM1 über CUE in die Humanzelle ein (161, 162). Für Vaccinia-Viren wurde auch ein Makropinozytose-Mechanismus für die Aufnahme in die Wirtszelle beschrieben (163).

Invasive Bakterien gelangen über einen Mechanismus, welcher der Phagozytose ähnelt, in Zellen (155, 156). Die Internalisierungsstrategie kann dabei in zwei Kategorien unterteilt werden: den Zipper- und den Trigger-Mechanismus (Abb. 9). Beim Zipper-Mechanismus kommen spezielle bakterielle Oberflächenproteine zum Einsatz. Diese Adhäsine interagieren direkt mit einem Wirtszellrezeptor, wodurch eine Reihe von Signalereignissen

induziert wird. Durch diese Signalkaskaden kommt es zur Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und einer massiven Aktinpolymerisierung an der Bindestelle des Pathogens. Einhergehend kommt es zu Veränderungen der Lipidkomposition und Umstrukturierungen der PM und letztendlich zur Aufnahme des Bakteriums (164, 165). *Listeria monocytogenes* gilt als Modellorganismus für den Zipper-Mechanismus. Es initiiert diesen Mechanismus über zwei essenzielle Proteine auf der Zelloberfläche (166). Das erste, Internalin A (InIA), interagiert mit E-Cadherin, einem Zell-Zell-Adhäsionsmolekül, das nur in einigen Epithelzellen exprimiert wird (167). Für die Internalisierung in andere Zelltypen verwendet *Listeria* ein zweites Invasin, das InIB-Protein, welches die Rezeptortyrosinkinase Met aktiviert. Met ist auf allen Epithelzellen vorhanden (168, 169). Diese Aktivierung führt zur Akkumulation von α - und β -Catenin, Myosin VIIa, Vezatin und der Aktivierung der PI3-Kinase, gefolgt von einer Aktinpolymerisierung unterhalb des Bakteriums. Über die Aktivierung von wirtseigenen Septinen und Clathrin wird so die Internalisierung des Bakteriums über die CAE abgeschlossen (170–172).

A Zipper-Mechanismus
z.B. *Listeria monocytogenes*



B Trigger-Mechanismus
z.B. *Salmonella Typhimurium*

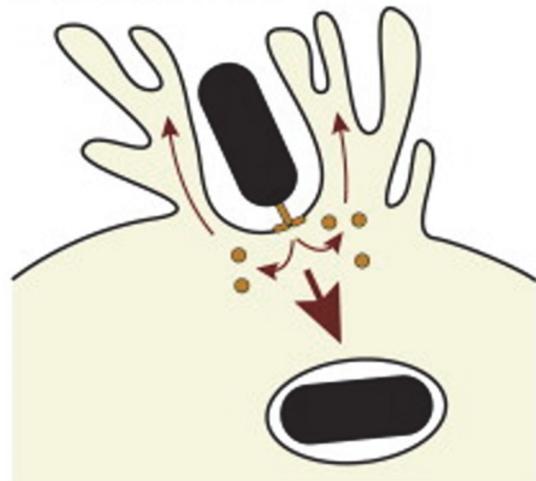


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Zipper- und Trigger-Mechanismus

Zipper- und Trigger-Mechanismus im Vergleich als Adhäsions- und Internalisierungsstrategie von Pathogenen. Schematische Darstellung der Internalisierung von *Listeria monocytogenes* über einen "Zipper"-Mechanismus (**A**) oder von *Salmonella Typhimurium* über einen "Trigger"-Mechanismus (**B**). Beim "Zipper"-Mechanismus induziert die Interaktion von bakteriellen Oberflächenproteinen mit Wirtsproteinen in der PM eine Reorganisation des Zytoskeletts und der Membran, was zur Internalisierung des Bakteriums führt. Beim "Trigger"-Mechanismus löst die Injektion von Effektoren durch das Bakterium in das Zytoplasma der Wirtszelle eine lokale Veränderung des Zytoskeletts und die Bildung von Membranausstülpungen aus, wodurch das Bakterium internalisiert werden kann. Modifiziert nach Ribet und Cossart 2015 (173).

Im Fall des Trigger-Mechanismus ist die wesentliche Kernkomponente die Bildung von Aktin-reichen Membranausstülpungen, welche durch lokale Signalinduktionen ausgelöst werden. Verantwortlich für diese Veränderungen sind sekretierte T3SS-Effektoren, die von Bakterien in Wirtszellen transloziert werden. Ein prominentes Beispiel für diesen

Mechanismus stellt *Salmonella* Typhimurium dar. Nach dem initialen Kontakt mit der Wirtszelle inseriert Salmonella über das T3SS die beiden Proteine IpaB und IpaC in die PM der Wirtszelle, um dort einen Translokationskomplex zu bilden, der die Injektion von T3SS-Effektoren ermöglicht. Die Effektoren aktivieren die Wirtszell-Rho-GTPasen Cdc42 und Rac, welche eine lokal begrenzte Membranveränderung durch Polymerisation von kortikalem Aktin induzieren. Durch diese Prozesse wird die PM in Richtung des Extrazellularraums ausgestülpt und umschließt letztlich das Bakterium, was zur Aufnahme des Bakteriums führt (174, 175).

Bei den Chlamydien ist der endgültige molekulare Mechanismus des Wirtszelleintritts noch nicht geklärt. Im Laufe der Jahre wurden viele widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht. Es ist möglich, dass Chlamydien sowohl den Zipper- als auch Trigger-Mechanismus parallel nutzen, um eine Invagination herbeizuführen. Andererseits ist nicht endgültig geklärt, inwiefern die CAE zur Internalisierung von Chlamydien beiträgt. Mikroskopische Analysen haben das Konzept der Rezeptor-vermittelten CAE sowohl unterstützt als auch widerlegt (176–178). Drei Forschungsgruppen haben eine Assoziation von *C. tr.* mit Clathrin und die Aufnahme in CCV beobachtet (176–178). Andere Forscher zeigten, dass der Eintritt von *C. tr.* unverändert blieb, wenn die CAE gehemmt wurde (179, 180). Rezente hochauflösende kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen haben eine unerwartete Vielfalt von Strukturen bei der frühen Internalisierung von *C. tr.* in die Wirtszelle gezeigt. Es konnten unter anderem Phagozytose-Einschlüsse, die sich eng um einzelne EBs schließen und komplexe Mikropinosomen-artige Strukturen entdeckt werden (181). Zusätzlich konnten in Fluoreszenzmikroskopischen-Aufnahmen und in der Rasterelektronenmikroskopie durch *C. tr.* induzierte Mikrovilli an EB-Eintrittsstellen beobachtet werden (182). Es ist jedoch nicht möglich, allein durch mikroskopische Aufnahmen zu beurteilen, ob diese Wirts-Pathogen-Strukturen sequenzielle Anordnungen eines einzelnen Signalwegs darstellen oder mehrere unabhängige Eintrittsmechanismen widerspiegeln.

Die Internalisierung von *C. tr.* wird häufig dem Trigger-Mechanismus zugeordnet, wie er beispielsweise bei *Salmonella* Typhimurium vorkommt. Ebenso wie Salmonellen sekretiert *C. tr.* T3SS-Effektoren in die Wirtszelle, die die GTPase Rac1 der Rho-Familie aktivieren (183). An diesem Prozess ist TarP beteiligt. TarP ist ein frühes Multidomänen-Effektorprotein, das räumlich und zeitlich mit der Rekrutierung von Aktin an EB-Invasionsstellen verbunden ist und dessen Funktion im Wesentlichen mit zwei Mechanismen verbunden wird (184). Der erste Mechanismus zeichnet sich durch eine konservierte Aktin-Keimbildungsdomäne aus, welche direkt mit G- und F-Aktin assoziiert (185, 186). Die Bindung von TarP an Aktin führt zu zwei biochemisch distinkten Funktionen: der Aktin-Keimbildung und der Aktin-Bündelung, die wahrscheinlich zu Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts in der Wirtszelle während der EB Internalisierung beitragen. Die zweite

Funktion ermöglicht TarP die Aktin-Remodellierung durch einen Rac1-abhängigen Mechanismus an den *C. tr.* Bindungsstellen (183, 184).

Neben der Sekretion von T3SS-Effektoren sind auch Wirtszellrezeptoren an der Internalisierung verschiedener Chlamydienspezies beteiligt. Beispielsweise nutzt *C. pn.* das speziesspezifische Außenmembranprotein Pmp21 als Invasin, welches an EGFR bindet (187). Diese Interaktion führt dazu, dass der EGFR dimerisiert und aktiviert wird, wodurch eine intrazelluläre Signalkaskade induziert wird. Zusätzlich kommt es durch die EGFR-Aktivierung zur Rekrutierung der Adapterproteine Grb2 und der Ubiquitinligase c-Cbl (188). Die Expression des funktionellen EGFR auf menschlichen Zellen ist somit für die *C. pn.* Infektion ein essenzieller Bestandteil, da die Depletion von EGFR signifikant die Infektion von *C. pn.* hemmt (187). Dieser Eintritts-Mechanismus ähnelt eher dem Zipper-Mechanismus von *Listeria monocytogenes*, bei dem ein einziger bakterieller Ligand ausreicht, um den bakteriellen Eintritt zu fördern (189). Zusätzlich zu diesem Zipper-Mechanismus nutzt *C. pn.* den Trigger-Mechanismus, um in Wirtszellen einzudringen. Parallel zu den Pmp21-EGFR-Wechselwirkungen sezerniert *C. pn.* das TarP-Ortholog CPn0572 über das T3SS. CPn0572 bindet und polymerisiert Aktin, um die Aufnahme von *C. pn.* in Aktin-reiche Strukturen zu erzwingen (190). Eine weitere Publikation weist auf eine CUE von *C. pn.* in nicht-phagozytierenden Epithelzellen hin (191). In dieser Publikation wird beschrieben, dass die Internalisierung von *C. pn.* EBs abhängig von intakten Lipid Rafts, speziellen Lipidmikrodomänen innerhalb der PM, ist. Wird die Organisation der Lipid Rafts gestört, wurden verringerte Internalisierungsraten von *C. pn.* beschrieben (191). Interessanterweise wird eine Beteiligung der CAE für *C. pn.* in dieser Studie ausgeschlossen, da die durch RNA-Interferenz vermittelte Depletion von Clathrin keinen negativen Effekt auf die Internalisierung von *C. pn.* hatte (191).

Zusammengefasst zeigen diese Ausführungen, dass Chlamydien möglicherweise sowohl den Zipper- als auch Trigger-Mechanismus parallel nutzen, um eine Internalisierung der EBs herbeizuführen.

1.2.6 Die ersten Schritte in der *Chlamydia pneumoniae* Infektion

Die Adhäsion an die Wirtszelle ist der erste essenzielle Prozess für eine erfolgreiche Infektion von Wirtszellen. Die initialen Schritte werden dabei durch Proteine vermittelt, die als Adhäsine bezeichnet werden (192). Die Bindung der Adhäsine basiert auf Wechselwirkungen mit proteinösen oder nicht-proteinösen Interaktionspartnern und Strukturen, die auf der Wirtszelloberfläche lokalisiert sind. Im Falle der Humanpathogene *C. pn.* und *C. tr.* wird eine zweistufige Adhäsion an Wirtszellen postuliert. Der erste reversible Kontakt zwischen den Chlamydien und der Zelle basiert auf einer schwachen Interaktion zwischen dem chlamydialen äußeren Membranprotein OmcB und

Glykosaminoglykanen (GAG) (193, 194). GAGs sind Zuckerstrukturen auf der Wirtszelloberfläche und kommen in allen eukaryotischen Zellmembranen vor. Sie gehören zu der extrazellulären Matrix und bilden einen Teil der Glykokalyx (195, 196). Zur Gruppe der GAGs gehört z.B. Heparansulfat (HS). OmcB wurde infolge von experimentellen Studien als HS-bindendes Protein identifiziert. Das Ablösen und Entfernen der GAGs von der Wirtszelloberfläche reduziert signifikant die Infektiosität von Chlamydien (193, 194). Neben OmcB existieren weitere Proteine, die Adhäsion-relevant und auf der Oberfläche von EB präsent sind. So konnten beispielsweise die Bindungs-Eigenschaften von GroEL1 an Humanzellen in Versuchen mit rekombinanten Proteinen unter Anwendung eines Hefe-Oberflächen-Expressionssystems nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde gezeigt, dass GroEL1 auf der Oberfläche von *C. pn.* EBs präsent ist. Jedoch ist der endgültige Mechanismus, bzw. ein möglicher humaner Interaktionspartner, bisher noch unbekannt (197).

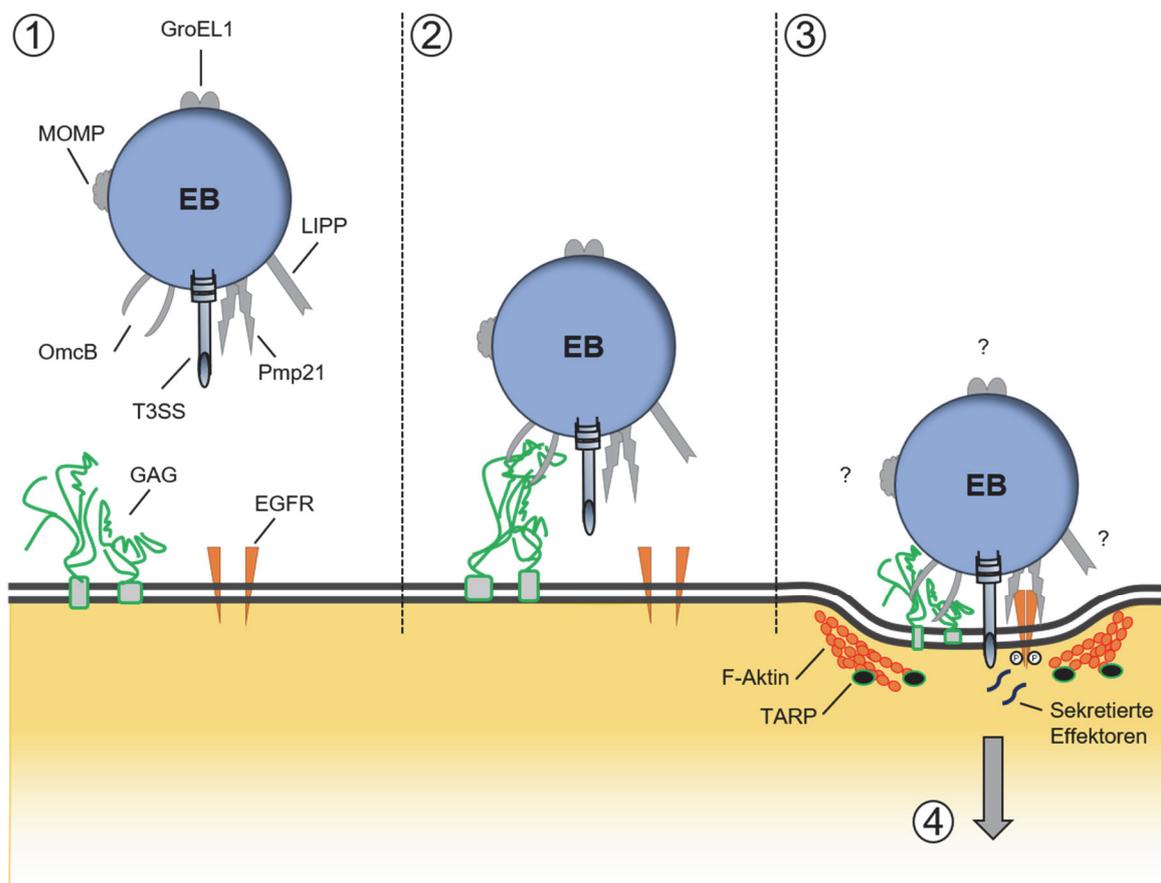


Abbildung 10: Schematische Darstellung der frühen Infektionsprozesse von *C. pn.*

Dargestellt sind die für die Adhäsion relevanten Proteine von *C. pn.* und die bekannten humanen Interaktionspartner. Die Abbildung umfasst die postulierte, zweistufige Adhäsion und Teilprozesse der Internalisierung. 1: Freies EB ohne Bindung zur Wirtszelle. 2: Initiale reversible Bindung an die Wirtszelle. 3: Stabile Adhäsion an die Wirtszelle und Sekretion von Effektorproteinen. 4: Aufnahme des EBs in die Wirtszelle. Bei den mit Fragezeichen gekennzeichneten Proteinen ist der Interaktionspartner unbekannt.

Ein weiteres Protein, das den spezifischen Kriterien eines Adhäsins entspricht, ist ArtJ. Das Protein wurde auf der Oberfläche von EBs detektiert und in Versuchen mit rekombinanten

Proteinen weist es adhäsive Eigenschaften an Humanzellen auf. Aber auch bei diesem Protein ist der humane Interaktionspartner nicht identifiziert (198–200). Ein Adhäsion mit besonderen Eigenschaften stellt das *C. pn.* spezifische Lipid Internalization Promoting Protein (LipP) dar. LipP lokalisiert in räumlicher Nähe zur Wirtszellplasmamembran, wodurch es vermutlich zu einer Integration des Proteins in die PM kommt. Es wird postuliert, dass es zu einer anschließenden Oligomerisierung kommt und eine Pore innerhalb der Membran erzeugt wird. Dadurch kommt es zur Externalisierung des auf der inneren Seite der PM befindlichen Phospholipids Phosphatidylserin (PS) (201–203).

Die Familie der polymorphen Membranproteine (Pmps) stellt mit 21 Proteinen, die größte Proteinfamilie innerhalb von *C. pn.* dar. Für insgesamt 16 von den 21 Proteinen der Familie konnte in *C. pn.* eine Expression bewiesen werden, für sechs dieser Pmps wurde eine Oberflächenlokalisierung auf *C. pn.* EBs nachgewiesen (204). Die Pmp-Proteine sind Teil der Typ-5-Autotransporter Familie und besitzen eine N-terminale Signalsequenz, eine C-terminale β -Fasstonnenstruktur und eine Passagierdomäne. Über die N-terminale Signalsequenz wird das ungefaltete Protein in einer Sec-abhängigen Translokation in das Periplasma des Chlamydiums transportiert. Vom Periplasma aus bildet die β -Fasstonnenstruktur eine Pore in der äußeren chlamydialen Membran, sodass die Passagierdomäne durch die Pore auf die äußere Seite transportiert wird und dort in der Membran verankert wird (205, 206). Die Mitglieder der Pmp Familie adhären über zwei spezifischen Motive (GGA (I, L, V), oder FxxN) an humane Zellen und bilden hetero- und homomere Strukturen aus (187, 207, 208). Bisher konnte ausschließlich für Pmp21 der EGFR als humaner Interaktionspartner identifiziert werden (187). Die Bindung von Pmp21 an EGFR aktiviert diesen und führt zur Dimerisierung des Rezeptors, der anschließend phosphoryliert wird. Dies induziert die Rekrutierung des Adapterproteins Grb2, welches die Bindung von c-Cbl ermöglicht, wodurch ein Proteinkomplex gebildet wird, der die EGFR-Internalisierung über CAE oder CUE ermöglicht (209, 210). Die durch Pmp21-bedingte EGFR Aktivierung induziert den ERK- und Akt-Signalweg. Dadurch wird die Phosphoinositid-3-Kinase aktiviert und Phosphatidylinositol PI(4,5)P2 zu PI(3,4,5)P3 phosphoryliert (211). Parallel zum Adhäsionsprozess kommt es im Folgenden zu einer Interaktion des chlamydialen T3SS mit der humanen PM. Sobald die Nadel des T3SS die Wirtszellmembran erreicht, assemblieren Proteine des Nadelspitzenkomplexes die Translokationskomplex-Verankerung. Der Translokationskomplex wird durch integrale Membranproteine gebildet, die eine Pore in der Wirtszellmembran erzeugen. Dies ermöglicht die Sekretion von Effektorproteinen in die Wirtszelle (212). Effektorproteine besitzen eine N-terminale Signalsequenz, welche die Proteine als Substrat für den T3SS kennzeichnet (213). Die Funktion der sekretierten Effektorproteine liegt in der Manipulation von Wirtszellmechanismen, um eine effektive Aufnahme der EBs zu gewährleisten. Ein

bereits bekannter Effektor ist das TarP-Homolog CPn0572. Nach Sekretion in die Wirtszelle interagiert es mit Aktin und bewirkt eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts an der EB Eintrittsstelle (190). Neben CPn0572 sind CPn0677 und CPn0678 weitere T3SS-sekretierte Effektorproteine, deren biologische Funktion im Detail im folgenden Kapitel erläutert wird.

1.3 CPn0677 und CPn0678

In genomweiten Transkriptanalysen von *C. pn.* wurden 1052 der insgesamt 1073 bakteriellen Gene analysiert. Im Zuge des Screenings wurde ein koregulierter Gencluster entdeckt, welcher aus den drei Genen *cpn0676*, *cpn0677* und *cpn0678* besteht. Dieser Gencluster konnte in initialen Arbeiten als neues *C.pn.* Operon identifiziert werden, welcher spät im Infektionszyklus hochreguliert wird (> 48 hpi) und dessen Proteine vermutlich relevant für die frühe Infektion von *C. pn.* sind (214). Insbesondere die Gene *cpn0677* und *cpn0678* stellen im genomischen Kontext und im direkten Vergleich zu näher verwandten (*C. psittaci*) und weniger nahe verwandten (*C. tr.*) Spezies einen Sonderfall dar, da an dieser Position die beiden anderen Spezies nur ein einziges Gen besitzen (Abb. 11). Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen der *C. pn.* spezifischen Proteine CPn0677 und CPn0678 zu *C. tr.* CT694 existiert nur eine geringe Aminosäure-Identität von CPn0677 und CPn0678 zu CT694 (<5 %). Die Aminosäuren-Identität ist bei der näher verwandten Spezies *C. psittaci* höher und liegt bei CPn0677 zu CPsi0751 bei 21 % und CPn0678 zu Cpsi0751 bei 14 %. In den ersten Untersuchungen der Proteine CPn0677 und CPn0678 wurde mit rekombinanten Proteinen eine adhäsive Eigenschaft an humanen Epithelzellen festgestellt und eine chlamydiale Oberflächenlokalisierung vermutet (214). Ein weiteres Indiz für die Oberflächenlokalisierung lag darin, dass eine Vorbehandlung von *C. pn.* EBs mit spezifischen Antikörpern gegen CPn0677 und CPn0678 zu einer signifikanten Infektionsreduktion führten (214). In mikroskopischen Studien zum späten Zeitpunkt der Infektion (48 hpi) konnten die beiden Proteine als bakterienassoziiert innerhalb der Inklusion detektiert werden, was mit den Transkriptdaten übereinstimmt (214). Interessanterweise zeigten CPn0677 und CPn0678 in ektopischen Expressionsstudien in humanen Epithelzellen eine Assoziation mit der Innenseite der PM (214).

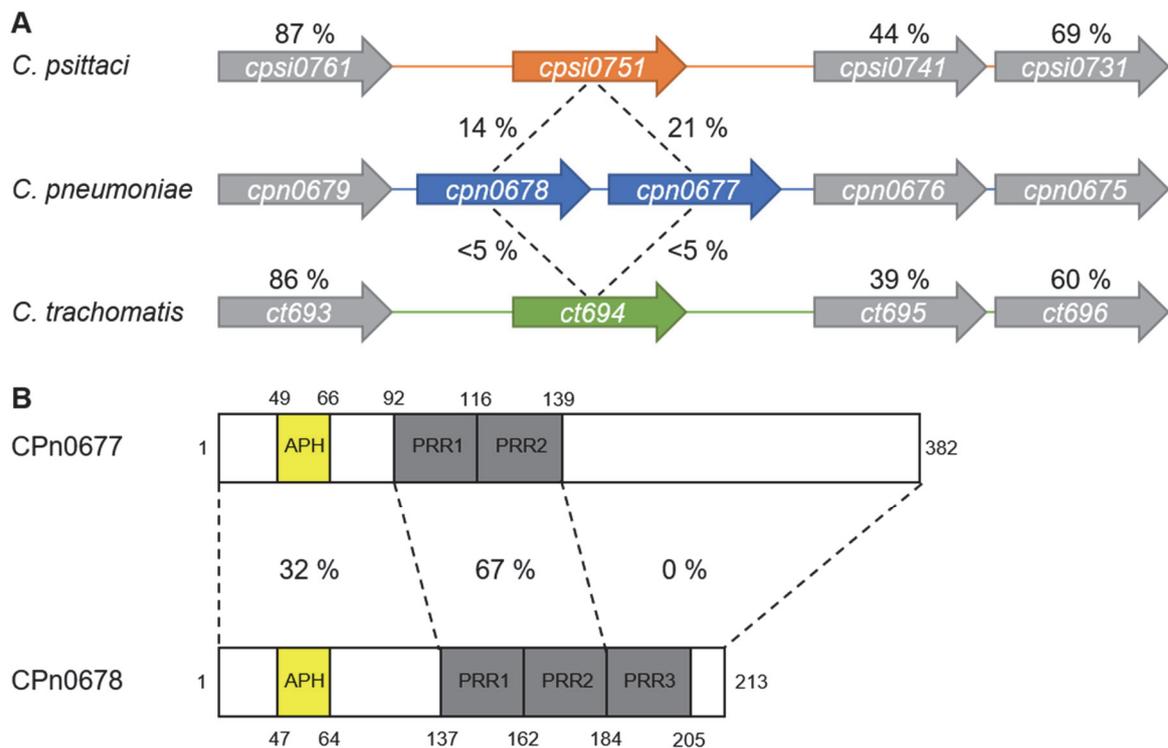


Abbildung 11: Schematische Darstellung des *C. pn.* Genclusters *cpn0676-cpn0678* und der syntenischen Loci von *C. tr.* und *C. psittaci*.

(A) Dargestellt ist die genomische Anordnung des Genclusters *cpn0676-cpn0678* mit den flankierenden Genen und die der Spezies *C. tr.* und *C. psittaci*. Die Prozentzahlen zeigen Aminosäuren-Identität zwischen den Homologen (*C. psittaci* gegen *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* gegen *C. pneumoniae*) an. Die Aminosäuren-Identität wurde mittels NCBI blastp ermittelt. (B) Schematische Darstellung der Proteine CPn0677 und CPn0678 inklusive der bekannten Domänen. Die gestrichelten Linien und die dazugehörigen Prozentzahlen geben die Identität innerhalb dieser Bereiche an. APH = Amphipathische Helix, PRR = Prolin-Reiche Region.

Durch sukzessive Deletionen wurde für CPn0678 eine ca. 20 AS große Region ermittelt, die essenziell für diesen Phänotyp ist (Abb. 11 B, APH-Domäne) (215). Für CPn0677 konnte die PM-Assoziationsdomäne zunächst auf die ersten 140 AS eingeschränkt werden (215). Diese initialen Ergebnisse führten dazu, dass CPn0677 und CPn0678 zunächst als chlamydiale oberflächenlokalisierte Adhäsine beschrieben wurden.

Erst in der darauffolgenden, eingehenden Charakterisierung konnte diese Aussage revidiert werden und es wurde die Theorie aufgestellt, dass es sich bei CPn0677 und CPn0678 um T3SS-sekretierte Effektoren handelt (216). Biochemische Zugänglichkeitsanalysen mittels differentieller Permeabilisierung und Nutzung von spezifischen Antikörpern zeigten in mikroskopischen Studien mit infizierten Zellen zu spätem Zeitpunkt der Infektion (~ 78 hpi), dass es sich um intrachlamydiale Proteine handelt, die mit redifferenzierten EBs assoziieren und nicht auf der Oberfläche von EBs lokalisieren (216). Durch Permeabilisierung der Zellen mit Methanol wurde das intrachlamydiale Protein S1 detektiert und das gleiche galt für CPn0677 und CPn0678. Wurden die Zellen dagegen mit Saponin permeabilisiert, konnte weder CPn0677, CPn0678 noch S1 detektiert werden (216). Unter Anwendung der gleichen Permeabilisierungs-Methode zum frühen Zeitpunkt der Infektion (20 min pi) konnte bereits

mit Saponin ein Signal für CPn0677 und CPn0678 detektiert werden, was ein Indiz für die Sekretion der Proteine darstellt und die T3SS-Sekretions-Theorie bestärkt (216). Zuvor konnten bereits in heterologen Sekretionsassays für CPn0677 und CPn0678 funktionale T3SS-Signalsequenzen identifiziert werden (214). Darüber hinaus wurde eine Interaktion von CPn0678 mit dem humanen intrazellulären Protein SNX9 nachgewiesen, die durch die erste Prolin-reiche Regionen im C-Terminus vermittelt wird (214). Die Bindung von SNX9 an CPn0678 ist auf die Interaktion eines distinkten RxxPxxP-Motivs innerhalb der ersten PRR zurückzuführen, welches mit der SH3-Domäne von SNX9 interagiert (216). Aufgrund der AS-Identität in den PRRs von CPn0677 und CPn0678 (Abb. 11 B) wurde auch eine Interaktion von CPn0677 mit SNX9 postuliert, konnte aber bisher nicht experimentell bestätigt werden (216). Die Interaktion von CPn0678 mit SNX9 scheint infektionsrelevant zu sein, da die Infektionsrate durch *C. pn.* von humanen-SNX9-defizienten Zellen reduziert war (214). Der zuvor beobachtete Effekt der Assoziation mit der humanen PM von rekombinantem CPn0678 ist dabei auf eine N-terminale APH zurückzuführen, die die Bindung an Phospholipide vermittelt. Allerdings ist die Bindungsspezifität der Phospholipide nicht bekannt. Des Weiteren konnte in ektopischen Expressionsstudien in humanen Epithelzellen ein Tubulationsphänotyp der PM, vermittelt durch die CPn0678 APH, identifiziert werden (216). Die Membranassoziation von transfizierten CPn0678 an die Innenseite der PM von Humanzellen konnte durch Deletion der APH neutralisiert werden (216). Im Fall von CPn0677 wurde anhand von Sequenzvergleichen zu CPn0678 ebenfalls eine N-terminale APH postuliert, dessen Funktionalität experimentell noch nicht bestätigt wurde (216).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass CPn0677 und CPn0678 mit hoher wahrscheinlich T3SS-sekretierte Effektorproteine mit komplexen Funktionen sind. Sie haben eine mögliche Relevanz in der frühen Phase der *C. pn.* Infektion. Die genaue Wirkungsweise und die Funktion von CPn0677 und CPn0678 während der Endozytose von chlamydialen EBs ist bisher nicht bekannt. In den vorherigen Arbeiten lag der Fokus im Wesentlichen auf der Charakterisierung von CPn0678 und dessen Eigenschaften. Viele der postulierten Funktionen von CPn0677 sind lediglich aufgrund der AS-Identität in der APH und den PRRs zu CPn0678 als Indiz vorgeschlagen worden, allerdings wurden diese Thesen experimentell bisher nicht bestätigt. Die Charakterisierung von CPn0677 und CPn0678 ist dahingehend nicht vollständig abgeschlossen und ihre Funktionsanalyse als potenzielle T3SS-sekretierte Effektorproteine und deren Auswirkungen auf die Infektion von Chlamydien sind noch nicht gänzlich erschlossen.

2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Funktionsanalyse zweier chlamydialer Effektorproteine (CPn0677 und CPn0678) im Kontext der frühen *Chlamydia pneumoniae* Infektion. CPn0678 bindet an die Plasmamembran. Die dafür postulierte APH-Domäne sollte funktionell auf ihre Phospholipidspezifität und ihrer potenziellen Membranverformungs-Eigenschaft analysiert werden. Eine Interaktion von CPn0678 mit humanem SNX9 konnte schon in vorherigen Studien beschrieben werden. In dieser Arbeit sollte nun analysiert werden, wie diese Interaktion etabliert wird und wie sich diese Protein-Protein-Wechselwirkung auf die Internalisierung von chlamydialen EBs auswirkt. CPn0678 besitzt drei C-terminale, Prolin-reiche Regionen, die als potenzielle Protein-Interaktionsplattform gelten; ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher die Identifikation möglicher weiterer humaner Interaktionspartner.

Die initial durchgeführten Studien fokussierten auf CPn0678, was dazu führte, dass die Eigenschaften von CPn0677 weitestgehend unerforscht blieben. Die postulierten Funktionen für CPn0677 basieren lediglich auf der AS-Identität im N-terminalen Bereich und insbesondere in den Prolin-reichen Regionen zu CPn0678. Deswegen war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die bereits vorher postulierte Interaktion von CPn0677 mit SNX9 zu untersuchen. Ebenfalls sollte die potenzielle Eigenschaft der CPn0677 APH-Domäne bezüglich der Membranbindung, der Phospholipidspezifität und der intrazellulären Lokalisation in transfizierten Säugerzellen und an synthetischen Membranen analysiert werden. Ein weiteres Ziel lag in der Identifikation möglicher weiterer humaner Proteine, die mit CPn0677 interagieren. Sofern weitere Interaktionspartner existieren, sollten insbesondere deren Interaktionsmechanismus mit CPn0677 und deren Relevanz für die Infektion charakterisiert werden.

3 Teil I: Manuskript I

Chlamydia-induced curvature of the host-cell plasma membrane is required for infection

Sebastian Hänsch, Dominik Spona, Gido Murra, Karl Köhrer, Agathe Subtil⁴, Ana Rita Furtado, Stephan F. Lichtenthaler, Bastian Dislich, Katja Mölleken, Johannes H. Hegemann

Geteilte Erstautorschaft

Beteiligungen:

Sebastian Hänsch (S.H.): 30 %, Dominik Spona (D.S.): 30%, Gido Murra (G.M.): 5 %, Karl Köhrer (K.K.): 2 %, Agathe Subtil (A.S.) 2 %, Ana Rita Furtado (A.R.F.) 2 %, Stephan F. Lichtenthaler (S.F.L.): 2 %, Bastian Dislich (B.D.): 2 %, Katja Mölleken (K.M.): 15 %, Johannes H. Hegemann (J.H.H.): 10 %

S.H., D.S., K.M., und J.H.H. planten alle Experimente, die in diesem Manuskript dargestellt sind.

K.M. und J.H.H. schrieben das Manuskript und übernahmen Korrekturarbeiten.

D.S., K.M. stellten die Figuren und Figuren-Legenden zusammen.

S.H., D.S., G.M., A.S., A.R.F., und K.M. werteten Daten aus.

K.K., S.F.L., und B.D. haben neue Reagenzien und Analysewerkzeuge beigesteuert.

S.H., D.S., G.M., A.S., A.R.F., und K.M. führten die Experimente aus.

Einzelleistungen zu den Figuren der Veröffentlichung:

S.H. erbrachte die Daten zu folgenden Figuren: Fig. 1 E, F; Fig. 4. D; Fig. 5 J; Supl. Fig. 1 C; Supl. Fig. 2 B, C; Supl. Fig. 3 B, C, D und führte im Rahmen seiner Doktorarbeit die initiale Charakterisierung von CPn0678 als sekretiertes Effektorprotein durch.

D.S. erbrachte die Daten zu folgenden Figuren: Fig. 2 D, E; Fig. 3 A, B, C, D; Fig. 4 A, B, C, F; Fig. 5 A, B, C, D, E, F, G, H, I; Supl. Fig. 3 A; Supl. Fig. 4 D, E; Supl. Fig. 5, Supl. Fig. 6; Supl. Film S1 bis S15 und führte im Rahmen seiner Doktorarbeit die Charakterisierung von CPn0678 in der frühen Infektion fort.

G.M. erbrachte die Daten zu folgenden Figuren: Fig. 1 A; Supl. Fig. 1 B, Supl. Tab. 1 und entdeckte im Rahmen der Doktorarbeit das Protein CPn0678

A.S. erbrachte die Daten zur folgenden Figure: Fig. 1 D

A.R.F. erbrachte die Daten zur folgenden Figure: Fig. 1 D

K.M. erbrachte die Daten zu folgenden Figuren: Fig. 1 B, C, Fig 2 A, B, C; Fig. 4 E; Supl. Fig. 1 A; Supl. Fig. 3 A, B, C; und Supl. Tab. 1

Veröffentlicht in: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Januar 2020, DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1911528117>

Impact factor: 9,4 (2019)

Hiermit bestätige ich, dass diese Angaben korrekt sind.

Düsseldorf, den 22.03.2021

Dominik Spona

3.1 Zusammenfassung

Während der Invasion von Wirtszellen wird von *Chlamydia pneumoniae* das Effektorprotein CPn0678 sezerniert, das die Internalisierung des Pathogens erleichtert, indem es die Plasmamembran der Zielzelle umgestaltet und SNX9, ein zentrales multifunktionales endozytisches Gerüstprotein, rekrutiert. In diesem Manuskript wird gezeigt, dass die amphipatische N-terminale Helix von CPn0678 die Bindung an Phospholipide sowohl in der Plasmamembran als auch in synthetischen Membranen vermittelt und darüber hinaus in der Lage ist eine ausgedehnte Membrantubulation zu induzieren. CPn0678 interagiert über seine konservierte C-terminale Polyprolinsequenz mit der SH3-Domäne von SNX9. Somit wird SNX9 an bakteriellen Eintrittsstellen rekrutiert, an denen *C. pneumoniae* über EGFR-vermittelte Endozytose internalisiert wird. In Zellen die reduzierte Proteinmengen von humanen SNX9 aufweisen, ist die Internalisierung signifikant verringert, während die ektopische Überexpression von CPn0678-GFP im Allgemeinen zu einer dominant-negativen Wirkung auf den Endozytose-Prozess führt, was zur reduzierten Aufnahme von Chlamydien-Elementarkörpern und zu einem verringerten Umsatz von EGFR führt. Somit ist CPn0678 ein früher sekretierter Effektor, der an der Regulierung der Endozytose von *C. pneumoniae* in EGFR- und SNX9-abhängiger Weise beteiligt ist.

Chlamydia-induced curvature of the host-cell plasma membrane is required for infection

Sebastian Hänsch^{2,8}, Dominik Spona^{1,8}, Gido Murra¹, Karl Köhrer³, Agathe Subtil^{4,5}, Ana Rita Furtado^{4,5}, Stephan F. Lichtenthaler⁶, Bastian Dislich^{6,7}, Katja Mölleken^{1,9}, Johannes H. Hegemann^{1,9,*}

¹Institute for Functional Microbial Genomics, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

²Center of Advanced Imaging (CAI), Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

³Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum (BMFZ), Genomics & Transcriptomics Laboratory (GTL), Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

⁴Unité de Biologie Cellulaire de l'Infection Microbienne, Institut Pasteur, Paris, France.

⁵Centre National de la Recherche Scientifique UMR3691, Paris, France.

⁶German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE)

⁷Institut für Pathologie, Universität Bern, Bern, Switzerland

⁸equally contributed to this work

⁹These authors are joint senior authors of this work

* Correspondence should be directed to johannes.hegemann@hhu.de

Abstract

During invasion of host cells, *Chlamydia pneumoniae* secretes the effector protein CPn0678, which facilitates internalization of the pathogen by remodeling the target cell's plasma membrane and recruiting SNX9, a central multifunctional endocytic scaffold protein. We show here that the strongly amphipathic N-terminal helix of CPn0678 mediates binding to phospholipids in both the plasma membrane and synthetic membranes, and is sufficient to induce extensive membrane tubulations. CPn0678 interacts via its conserved C-terminal polyproline sequence with the SH3 domain of SNX9. Thus, SNX9 is found at bacterial entry sites, where *C. pneumoniae* is internalized via EGFR-mediated endocytosis. Moreover, depletion of human SNX9 significantly reduces internalization, whereas ectopic overexpression of CPn0678-GFP results in a dominant-negative effect on endocytotic processes in general, leading to the uptake of fewer chlamydial elementary bodies and diminished turnover of EGFR. Thus, CPn0678 is an early effector involved in regulating the endocytosis of *C. pneumoniae* in an EGFR- and SNX9-dependent manner.

Significance

We describe a novel mechanism by which the obligate intracellular pathogen *Chlamydia pneumoniae* induces curvature of the host-cell plasma membrane and recruits a central component of the endocytotic machinery. We demonstrate that a Type III-secreted (T3S) *C. pneumoniae* effector protein named CPn0678 binds via its N-terminal amphipathic helix to negatively charged phospholipids in the inner leaflet of the host plasma membrane (PM) at the site of entry, and induces membrane curvature. Its proline-rich region then recruits SNX9, a key regulator of endocytosis, and the complex facilitates uptake of *C. pneumoniae* into host cells.

Introduction

All members of the *Chlamydiaceae* are obligate intracellular pathogens of humans and animals, and cause a variety of diseases depending on the tissues they target (1). The two species that affect humans are *C. trachomatis* and *C. pneumoniae*, which are the causative agents of severe urogenital conditions including pelvic inflammation and ectopic pregnancies, and respiratory disorders such as pneumonia and bronchitis, respectively (2), (3). *C. pneumoniae* infections are also associated with several chronic diseases including asthma, Alzheimer's disease, multiple sclerosis and even lung cancer (4), (5), (6), (7).

The most critical step in the life cycle of an obligate intracellular bacterium is internalization into the host cell. The most common entry strategies are (i) the "zipper" and (ii) the "trigger" mechanisms. In the former, a bacterial adhesin/invasin interacts with a surface receptor, thereby activating its downstream signaling machinery and effectively hijacking receptor endocytosis for bacterial internalization. In the latter, an initial and rather weak interaction between pathogen and host is rapidly followed by translocation of bacterial proteins, called effectors, into the host cytoplasm. These effectors modulate the host cytoskeleton and induce extensive ruffling of the plasma membrane (PM) to facilitate pathogen entry (8). Both mechanisms involve the use of bacterial proteins to manipulate essential components of the endocytic machinery, such as the phosphoinositide-converting enzymes that regulate the lipid composition (and hence the curvature) of the PM (9), (10), adaptors and regulators like SNX9 that control endocytosis and vesicle trafficking (11), (12) and finally actin polymerization, which facilitates bacterial uptake (13, 14). Interestingly, SNX9 harbors a membrane-curvature-sensing BAR domain and binds preferentially to membranes of high curvature (15). Using an *in vitro* system it has been proposed that binding to PI(4,5)P₂, the early endosome marker PI(3)P, and domains of high membrane curvature recruits SNX9 in order to trigger the actin machinery and complete endocytosis (16).

Internalization is preceded by stable adhesion to the host cell, which induces intracellular signaling and recruitment of endocytosis-related proteins. Recently, host receptors like the

ephrin receptor (EPHA2) or EGFR have been shown to promote adhesion of *C. trachomatis*, but the chlamydial interaction partner remains undefined, as does the mechanism of entry (17), (18). For *C. pneumoniae* we have shown that the pathogen uses one of its highly diverse polymorphic membrane proteins, Pmp21, to bind and activate the EGFR (19). EGFR activation triggers the PI3 kinase, which in turn recruits specific endocytic adaptor proteins to facilitate the EGFR-mediated endocytosis of *C. pneumoniae* (20). In addition to this zipper mechanism, *C. pneumoniae* employs the trigger approach to enter host cells. Simultaneously with the Pmp21-EGFR interaction, *C. pneumoniae* secretes its Tarp ortholog CPn0572 via a Type III secretion (T3S) system. CPn0572 then binds and polymerizes actin to enforce bacterial uptake into actin-rich structures (21).

To determine whether *C. pneumoniae* employs other mechanisms to achieve efficient internalization, we searched for new early effector proteins involved in these processes. Here we show that the effector CPn0678 is also a T3S substrate, and localizes to the PM at bacterial entry sites. CPn0678 can bind phospholipids in both natural and synthetic membranes, and upon expression in human cells it generates membrane tubulations, and interacts with the host protein SNX9 (sorting nexin 9), a multifunctional protein involved in clathrin-mediated endocytosis (CME), membrane remodeling and actin dynamics (12). Our data suggest that, during host-cell entry, secreted CPn0678 binds to and curves the PM, which recruits SNX9 to the late stages of endocytosis. These findings show that CPn0678-induced membrane curvature and plays a central role in the uptake of *C. pneumoniae*.

Results

CPn0678 – prototype of a T3-secreted chlamydial effector protein

A common feature of both chlamydial adhesins and early effectors is that they are expressed late in the preceding infection, and displayed on the elementary body (EB) or stored within it for early secretion. Therefore, we performed a genome-wide transcriptional analysis to screen for such genes and found 88 genes to be significantly upregulated (Table S1). This set included genes for previously described adhesins, components and potential substrates of the T3S system, and hypothetical genes. Among the latter class, we identified a highly upregulated cluster of three genes comprising *cpn0676*, *cpn0677* and *cpn0678*. RT-PCR confirmed that their transcript levels increased significantly from 36 h onward, with *cpn0677* and *cpn0678* RNAs becoming more abundant than *cpn0676* (Fig. 1A).

Comparison of the *C. pneumoniae* *cpn0676-cpn0678* locus with other chlamydial genomes showed that the genes are part of a syntenic locus. CPn0676 is conserved among all Chlamydia species with approx. 39-44% identity, while comparison of CPn0677 and CPn0678 revealed a more complex pattern. All other species have only one gene at this locus, while *C. pneumoniae* carries two genes, *cpn0677* and *cpn0678* (Fig. 1B). CPn0678

itself harbors three conserved proline-rich repeats (PRR), two of which are conserved within the N-terminal segment of CPn0677 and are 67% identical to each other (Fig. 1C). In-depth comparisons with other chlamydial species revealed that these two proteins are *C. pneumoniae*-specific, displaying no or only low homology to other chlamydial proteomes. Thus, we generated a phylogenetic tree showing the relationships across the chlamydial kingdom by comparing full-length CPn0678 with the syntenic proteins of various species (Fig. S1A). The most distantly related proteins, with less than 5% identity to CPn0678, are found in *C. trachomatis*, *C. muridarum* and *C. suis* (Fig. 1B, See also Fig. S1A). One of these is *C. trachomatis* TmeA (CT_694), a known T3 effector protein, which interacts with the host protein AHNAK and is involved in early steps in the *C. trachomatis* infection (22), (23). Although the three species are closely related, *C. trachomatis* TmeA shares only 50-55% identity with its homologs in *C. suis* and *C. muridarum*, possibly suggesting differences in their functions. The syntenic proteins from *C. abortus*, *C. felis*, *C. psittaci* and *C. caviae* share higher levels of identity with CPn0678 (Fig. S1A), ranging between 34 and 40%. This is because the PRR1 and PRR2 of CPn0678 are conserved among the homologous proteins in these four species (Fig. S1A). Among them is SINC (G5Q_0070), an effector expressed by *C. psittaci*, which associates with the nuclear membrane during late stages of infection (24). These findings clearly demonstrate that this genomic locus encodes effector proteins with diverse functions in different chlamydial species.

To confirm that CPn0677 and CPn0678 are T3-secreted effector proteins, we used a heterologous *Shigella flexneri* T3S assay (25). The first 25 N-terminal amino acids of each protein were fused to the calmodulin-dependent adenylate cyclase (Cya) reporter protein. These constructs were then separately expressed in a *S. flexneri ipaB* (constitutive T3S) or *mxiD* (deficient in T3S) null strain (26), (27). Fractionation experiments confirmed that both proteins contained a T3S-competent signal sequence, as the reporter constructs were detectable in the supernatants, as was the positive control IpaD, whereas the intracellular protein CRP was retained in the pellet (Fig. 1D). In addition, confocal microscopy of inclusions labeled with specific antibodies at 48 hpi revealed that both CPn0677 (Fig. 1E, S1C) and CPn0678 (Fig. 1F, S1C) were associated with the condensed DAPI staining characteristic of EBs and not with the nuclear envelope as shown for SINC (24). In agreement with our transcriptional studies, the two proteins were detected from 48 to 84 hours post-infection (hpi) in lysates of infected cells (Fig. S1B). Deconvolution of STED images of EBs released from bursting inclusions at 86 hpi showed a ring-like structure for both proteins (Fig. 1E, F). The protein signals in these rings do not look continuous, but seem to be enriched in certain areas, which perhaps indicates the clustered presence of the T3S system preloaded with the effector proteins. Taken together, these findings indicate that both proteins are T3S effectors, which are secreted in the early phase of infection.

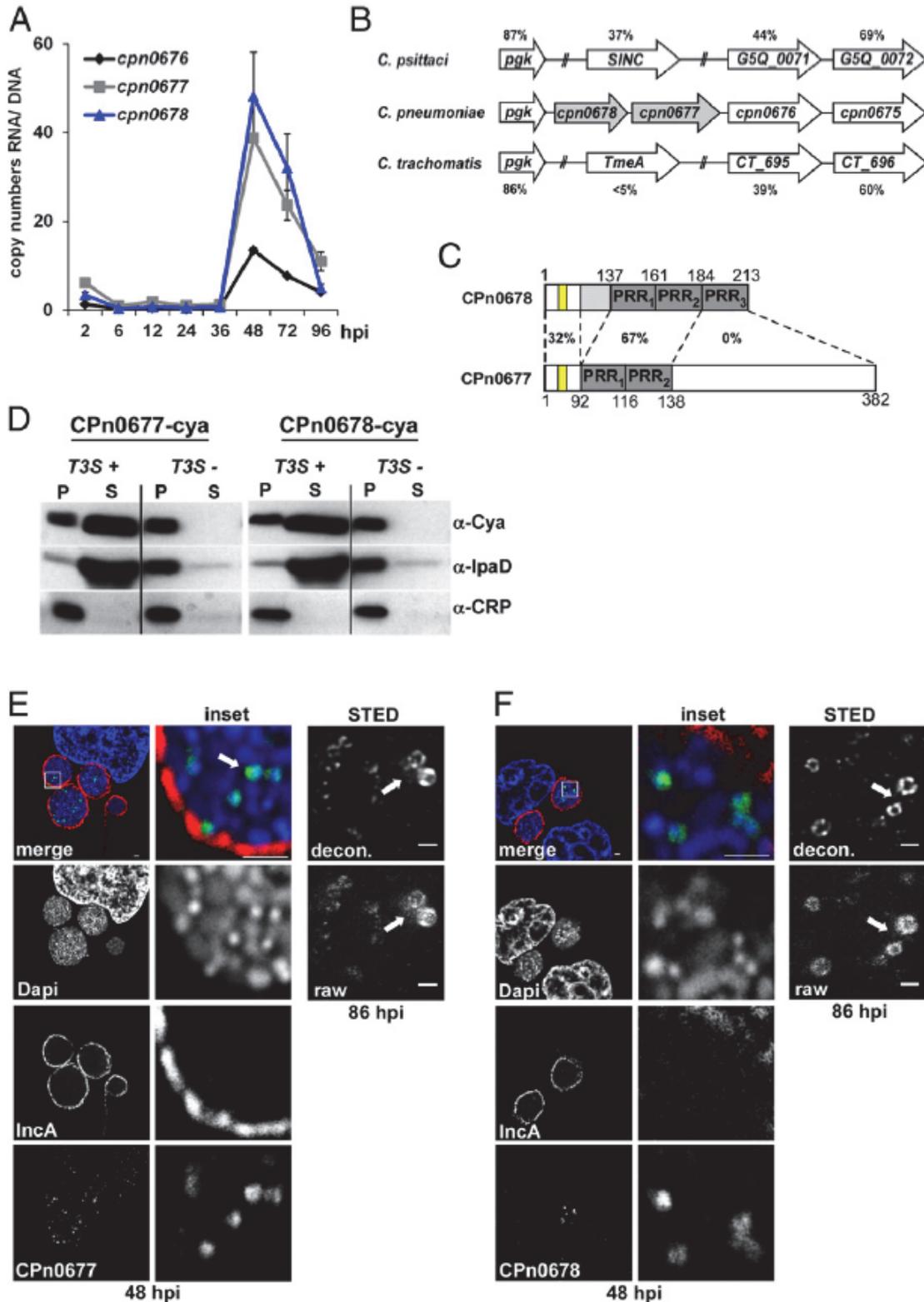


Figure 1: CPn0678 is a *C. pneumoniae*-specific T3S effector.

(A) HEp-2 cells were infected with *C. pneumoniae* (MOI 100 for the period 2 – 12 h pi, MOI 5 for 24 – 96 h pi) and harvested at the indicated time points for nucleic acid isolation. Levels of *cpn0677* and *cpn0678* mRNA were determined by qRT-PCR using a segment of the *ompA* gene as the genomic reference. Data are represented as means ± SEM. (B) Schematic representation of the *C. pneumoniae* gene cluster *cpn0676*-*cpn0678* and the syntenic loci of *C. trachomatis* and *C. psittaci*. Percentage amino-acid sequence identity between homologs (*C. psittaci* vs. *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* vs. *C. pneumoniae*) is indicated. (C) Domain structure and sequence comparison of CPn0677 and CPn0678. The position of the amphipathic helical region (APH) is highlighted in yellow. (D) Chimeric proteins consisting of the first 25 amino acids of CPn0677 or CPn0678 fused to the reporter Cya were expressed in *ipaB* (T3S +) and *mxjD* (T3S -) mutant strains of *S.*

flexneri. Supernatant (S) and pellet (P) preparations were fractionated by SDS/PAGE and probed with antibodies against Cya, IpaD or CRP. **(E, F left panel)** Confocal images of HEp-2 cells infected for 48 h with *C. pneumoniae* were fixed with PFA, permeabilized with methanol and stained with specific antibodies against CPn0677 **(E)** or CPn0678 **(F)** and anti-rabbit Alexa488. The inclusion membrane was stained with anti-IncA and anti-mouse Alexa594. DNA of host and bacteria was labeled with DAPI. The area in the white box is shown at higher magnification in the inset (top two rows, middle panel). White arrows indicate stained EBs. Bar 5 μm . **(E, F right panel)** EBs released from HEp-2 cells infected for 84 h were fixed with PFA, permeabilized with methanol and stained with anti-CPn0677 **(E)** or CPn0678 **(F)** and anti-rabbit Alexa488. STED images of EBs were generated with a Leica TCS SP8 STED 3x microscopy system. Deconvolution was performed using Huygens Professional with standard parameters. Bar 0.5 μm .

CPn0678 is a lipid-binding, membrane-tubulating effector protein

Based on our sequence comparisons and initial localization studies, we concluded that CPn0678 could be the prototype for the *C. pneumoniae* effector proteins CPn0678 and CPn0677 encoded by the syntenic locus, and in the following we describe our efforts to uncover the function of CPn0678. As both TmeA and SINC interact with host membranes (28), (24), we searched for potential membrane-interacting domains and found an N-terminal region (aa 47-64) with a strongly amphipathic character. Secondary-structure predictions revealed that this region also carries an α -helix, so we refer to this sequence as the amphipathic helix (APH). Projected into a helical wheel, the amphipathic amino acids of the APH all face to one side of the helix (Fig. 2A). The APH is conserved, albeit weakly, in CPn0677 (aa 48-65) (Fig. 1C). To understand the function of the APH we first studied the localization of CPn678-GFP ectopically expressed in living HEp-2 cells treated with the plasma membrane dye CellMask (Fig. 2A). Imaging revealed that CPn678-GFP localizes to the PM and induces a strong tubulation phenotype, with CPn678-lined tubules emanating from the cell membrane into the cytosol (Fig. 2A). Next, we introduced amino-acid exchanges into the APH in the full-length protein to elucidate whether the predicted α -helix or the amphipathic amino acids are functionally involved in the observed membrane tubulation (Fig. 2B, C). In MutA the amino-acid exchanges result in an APH with a 10-fold reduction in hydrophobicity while the predicted α -helix is retained (Fig. 2B), in the converse mutant MutB the α -helix is destroyed while the hydrophobicity is increased (Fig. 2C). Ectopic expression and live imaging in the presence of CellMask revealed that both mutants have lost their tubulation phenotypes and no PM localization could be detected (Fig. 2B, C). To verify that the N-terminal APH is responsible for the tubulation phenotype, we generated different deletion variants and analyzed them under the same conditions in live imaging and for general protein expression (Figs. 2D, E, S2A). All variants harboring the APH (CPn0678, N-term and Δ PRR1) show both localization to the PM and a membrane-tubulating phenotype (Fig. 2D). Quantification of phenotypes revealed that cells expressing CPn0678 or Δ PRR1 show an approx. 50 % distribution of both phenotypes, while cells expressing the N-term variant show membrane tubules in 10 % of cells; otherwise we found the protein at

were C-terminally fused with GFP and used in live-cell imaging following treatment with CellMask. White arrowheads show membrane tubulations emanating from the plasma membrane. Bar 10 μm . **(E)** Quantification of subcellular localization of CPn0678, N-term and ΔPRR1 fused with GFP. Data are represented as means \pm SD. (n=3).

the PM (Fig. 2E). In contrast, localization to the PM and tubule formation were both lost when we deleted the APH (ΔAPH) or expressed a C-terminal fragment (C-term), indicating that the APH is indeed essential for membrane binding (Fig. 2D). In proteins containing a bin-amphiphysin-rvs BAR domain, membrane curvature is mediated by insertion of the amphipathic helices, which exert a bending force on the lipid bilayer (29), (30). These membrane tubules colocalize with the cortical actin cytoskeleton and can be enhanced or stabilized by its chemical depolymerization (31), (32). Similarly, we observed that the membrane tubules induced by CPn0678-GFP expression colocalized with cortical actin (Fig. S2B). When these cells were treated with cytochalasin D, an actin-depolymerizing drug, 50% more cells exhibited tubules than in the control (Fig. S2C). In addition, we detected colocalization of CPn0678-GFP tubules with microtubules (Fig. S2B), and inhibition of microtubule polymerization by nocodazole treatment completely suppressed tubule formation (Fig. S2C). These findings indicate that cortical actin and the microtubule cytoskeleton play an important role in CPn0678-mediated membrane tubulation.

Using giant unilaminar vesicles (GUVs), a model system for biological membranes, we analyzed the membrane and lipid interactions of CPn0678 in more detail (Fig. 3). These GUVs are based on 69.75 mol% dipalmitoylphosphatidylcholine (DOPC) and 25 mol% cholesterol stained with Texas Red (0.25 mol%). During vesicle assembly, additional selected PIPs are incorporated, while in phosphatidylserine (PS)-containing GUVs the lipid composition is changed to 49.75 mol% DOPC/25 mol% cholesterol/0.25 mol% Texas Red and 20 mol% PS. Quantification of confocal images revealed that FITC-labeled recombinant CPn0678 binds to all of the tested lipids, and shows the highest affinities for phosphatidylserine (PS), the most abundant negatively charged phospholipid in the PM (33) and PIP4, a phospholipid found in Golgi membranes which is the precursor of PIP4,5 in the PM (34) (Fig. 3A, B). Deletion of the PRR1 did not significantly affect binding, whereas deletion of the APH completely abolished lipid interaction (Fig. 3A, B), indicating that the APH mediates the interaction of CPn0678 with lipids, especially those found in the inner leaflet of the PM (35). During these analyses, we observed that GUVs incubated with binding-competent CPn0678 variants developed membrane tubules on their surfaces, especially those containing the negatively charged PS (Fig. 3A, white arrowheads). Thus, we generated GUVs composed of PIP4,5 and PS to more closely approximate the phospholipid mixture on the PM, and imaged them in the absence or presence of different FITC-labeled CPn0678 variants. All variants harboring the APH domain (CPn0678, N-term

and Δ PRR1) elicited membrane tubulation on the GUVs, while Δ APH did not bind to the

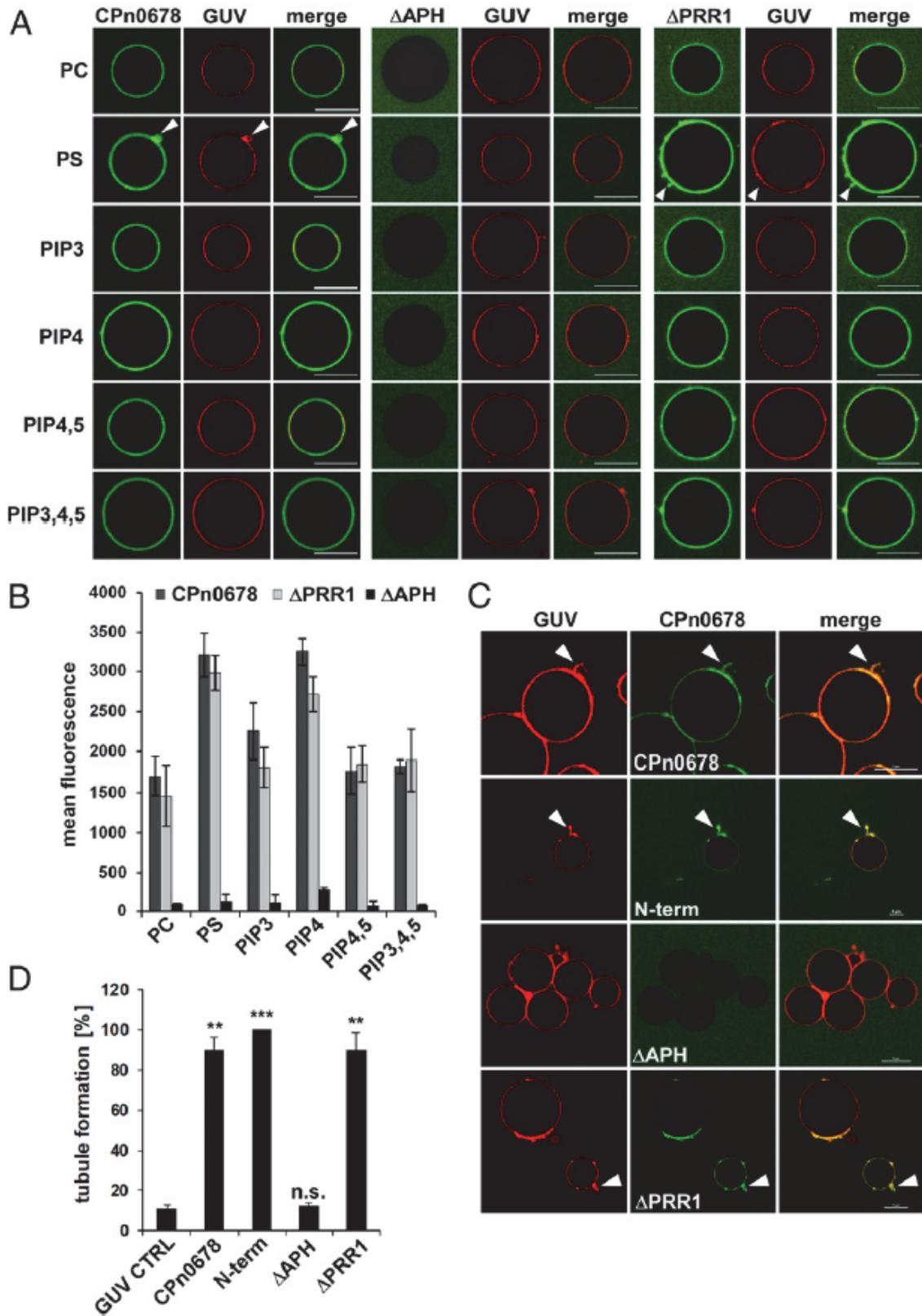


Figure 3: CPn0678 binds to and tubulates artificial membranes.

(A, B) Lipid binding assay using FITC-labeled recombinant CPn0678 variants and Texas Red-stained GUVs containing the indicated lipids. (A) Confocal images of GUVs incubated with CPn0678 variants. White arrowheads indicate membrane deformations. Bar 10 μ m. (B) Quantification of microscopic analyses of protein binding expressed as the mean fluorescence of sets of 50 individual GUVs. Data are presented as means \pm SD. (n=3). (C, D) Lipid binding assay using FITC-labeled recombinant CPn0678 variants and Texas Red-stained

GUVs containing PS and PIP_{4,5}. **(C)** Confocal images of GUVs bound by FITC-labeled recombinant CPn0678 variants. White arrowheads indicate membrane deformations leading to disruption of GUVs, as shown in the Supplementary Information (Movies S1-5). Bar 10 μ m. **(D)** Quantification of analyses of membrane deformation in samples containing 50 individual GUVs each. Data are presented as means \pm SD. (n=2). N.s. – not significantly different from CPn0678; ***P-value of 0.001

GUVs as shown previously (Fig. 3C, D, Movies S1-S5). Quantification of GUVs incubated with CPn0678, N-term and Δ PRR1 revealed that 90-100 % of them showed membrane tubulations, while only 12 % of GUVs incubated with Δ APH showed tubulation which is close to the value for control GUVs (11%) (Fig. 3D). Furthermore, we observed that GUVs incubated with N-term showed a marked tendency to burst during incubation; bursting also occurred in GUVs treated with CPn0678, but with a lower frequency (Movies S1-S5), indicating that the tubulation elicited by the APH-carrying variants is strong enough to disturb the integrity of the GUVs.

CPn678-induced membrane tubulation enables the protein to interact with the endocytic scaffold protein SNX9

Based on our previous findings, we hypothesized that CPn0678 is an early effector secreted via T3S. Therefore, we next analyzed the localization of endogenous CPn0678 at 15 min pi, at which time adhesion and internalization of *C. pneumoniae* can be observed by colocalization of EBs with the host EGF receptor (20). As expected, we found that CPn0678 colocalized with EGFR at EB contact sites on the PM and in endocytic invaginations containing internalized EBs (Fig. 4A). We quantified and validated our imaging data and 40% of EGFR-positive EBs showed colocalization with CPn0678 (Figs. 4B, S3A,B), indicating that the protein is secreted during EGFR-dependent adhesion and internalization. We then studied the function of CPn0678 during the entry process. As mentioned above, CPn0678 contains three PRR domains. Such domains are known to mediate protein-protein interactions, most commonly with proteins carrying Src homology 3 (SH3) domains (36), (37). SH3 domains are small modules of 50-60 amino acids with a characteristic 3D structure, which recognize the minimal motif PxxP. Extending the motif with additional prolines and charged amino acids increases the specificity of the PRR for defined target proteins (38). Interestingly, SH3 domains can be found in many proteins involved in endocytosis (39). Since *C. pneumoniae* utilizes EGFR-mediated endocytosis (19), we asked whether transfected CPn0678-GFP colocalized with various SH3-containing proteins. We chose proteins directly related to EGFR-mediated endocytosis, such as the endocytic adaptor proteins Grb2 (40), c-Cbl (41) and Cin85 (42). We also selected SNX9, a key regulator of dynamin assembly required for efficient clathrin-mediated endocytosis and known to be involved in actin dynamics during endocytosis (12), (43) (Fig. S4A, B). Coexpression studies revealed no colocalization of CPn0678 with Cin85, c-Cbl or Grb2, but

SNX9 colocalized with CPn0678 both at the PM and in the CPn0678-induced tubules described above (Fig. S4A). In cells co-expressing both proteins, we observed that SNX9 relocated to CPn0678-positive tubules. Since the latter are phenotypically distinct from the tubules generated upon overexpression of SNX9 (Fig. S4C) (44), this observation is indicative of a direct interaction. Moreover, when we immunoprecipitated CPn0678-GFP from these co-expressing cells, we only detected mCherry-SNX9 and none of the other SH3 proteins in the eluted fraction, in agreement with our imaging data (Fig. S4B). We verified the SNX9-CPn0678 interaction in pulldown experiments using recombinant proteins. Here, CPn0678-His was found to interact directly with GST-SNX9 (Figs. 4C, S5) in pulldowns using either His or GST resin. SNX9 contains an SH3 domain that recognizes PRRs with a positive charge at the N-terminus (consensus (R/K)xxPxxP), as do the PRRs found in dynamin and N-WASP (43). Since this consensus sequence also occurs in the first PRR motif (RPAPPQP) of CPn0678, we deleted either the SH3 domain of SNX9 (Δ SH3) or the first PRR motif in CPn0678 (Δ PRR) and found that both variants had lost the ability to interact with their respective full-length partner (Figs. 4C, S5), indicating that SNX9 and CPn0678 indeed interact via their SH3 and PRR motifs respectively. The SH3 domain alone is sufficient for interaction, as it is capable of pulling down CPn0678 on its own.

Finally, to test for a *direct* interaction between the two proteins, we performed fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *In vivo*, the average lifetime of CPn0678-GFP was measured with and without co-expression of mCherry-SNX9. Reduction of the lifetime is caused by Förster resonance energy transfer (FRET) from a donor molecule (here CPn0678-GFP) to an acceptor molecule (here mCherry-SNX9) in close proximity (< 10 nm) and thus indicates interaction *in vivo*. The donor control showed an average lifetime of 2.86 ns (Fig. 4D). In contrast, the average lifetime of CPn0678-GFP was significantly reduced (by 256 ps) to 2.60 ns, when co-expressed with mCherry-SNX9 (Fig. 4D). Similar levels of lifetime reduction have been observed in other protein interaction studies and for fused proteins (45), (46), (47). Taken together, these data suggest that the APH directs CPn0678 to the PM, where it can directly interact with SNX9 via PRR and SH3 domains. To elucidate the hierarchy of these interactions during recruitment of SNX9 to the secreted chlamydial effector, we performed further *in vivo* and *in vitro* assays in which we measured the interaction of different CPn0678 variants – either capable of binding and tubulating the membrane (CPn0678, N-term and Δ PRR1) or not – with SNX9 and two deletion variants (Δ BAR, Δ BAR Δ SH3) (Fig. 4E, F, Movies S6-15). The BAR domain of SNX9 contains classical amphipathic helices to induce membrane tubulation, although SNX9 is better at sensing curvature than inducing it (44), (48). While lipid binding is maintained via the PX domain, deletion of the BAR domain disrupts membrane tubulation, and deletion of the SH3

domain inhibits all protein-protein interactions (12). Upon co-expression of CPn0678 with SNX9, colocalization of both proteins on membrane tubules was dependent on the

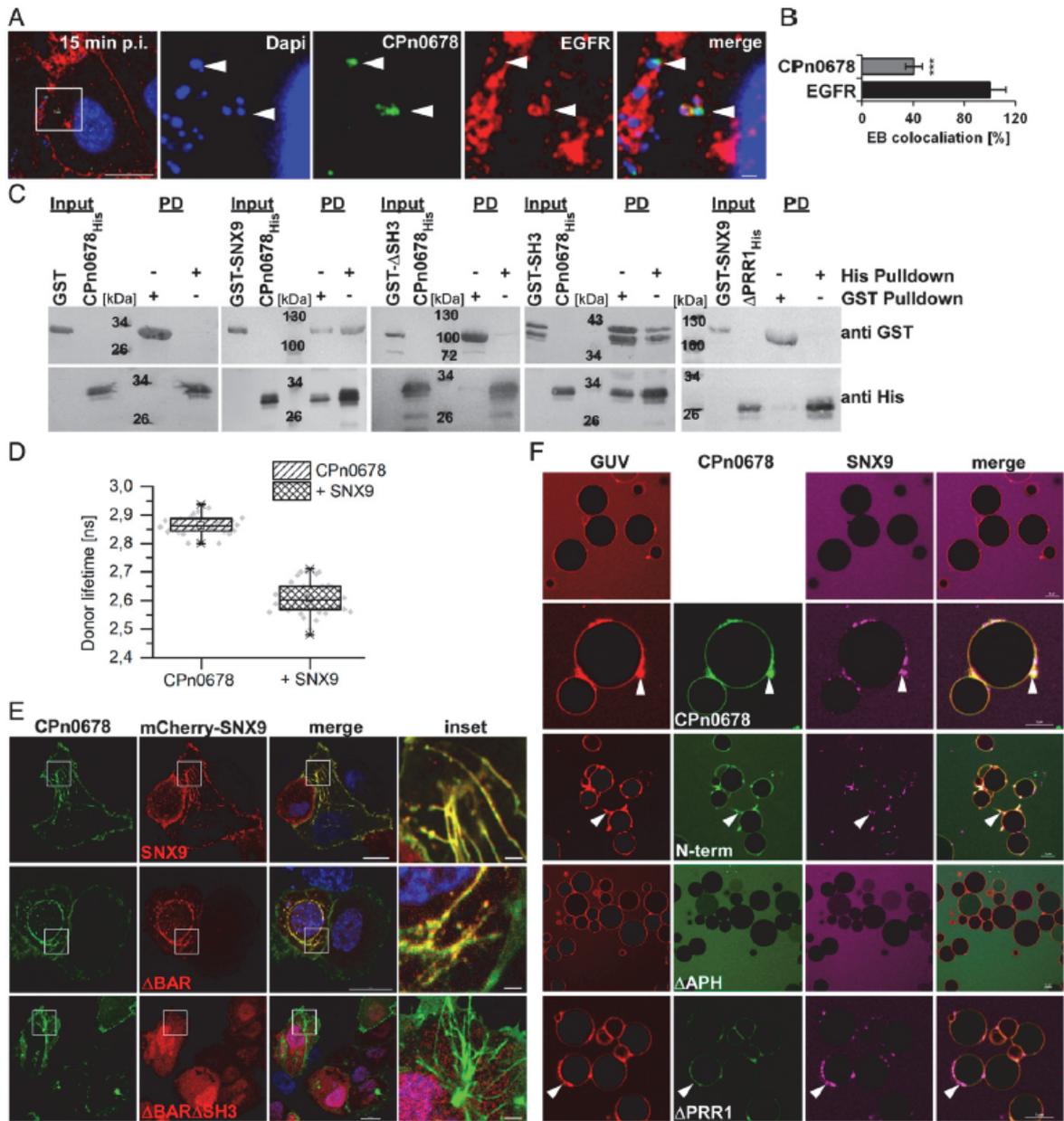


Figure 4: CPn0678 interacts with host SNX9.

(A) Colocalization of CPn0678 (stained with anti-CPn0678 and anti-rabbit Alexa488) and EGFR (stained with anti-EGFR and anti-mouse Alexa594) at bacterial entry sites at 15 min pi. The area in the white box is shown at higher magnification in the inset (right panels). (B) EBs associating with EGFR were quantified for additional colocalization of CPn0678 signals shown in (A). Confocal images of 300 individual EBs were analyzed. Data are presented as means \pm SD ($n = 3$). *** P value ≤ 0.001 . Colocalization was validated by estimating Pearson's Correlation Coefficients (Fig. S3A, B). (C) Pull-down experiments using purified recombinant GST or GST-SNX9 variants (Δ SH3, SH3) and CPn0678_{10His} or CPn0678 Δ PRR1_{10His}. Input and elution samples obtained from His-pull-downs and GST-pull-downs were fractionated by SDS/PAGE and probed with anti-GST and anti-His antibodies. (D) Quantification of FLIM measurements of average fluorescence lifetimes, used to monitor Förster resonance energy transfer (FRET) from CPn0678-GFP to mCherry-SNX9. The lifetime of donor fluorescence measured in 30-40 cells with or without co-expression of the acceptor are depicted as a box plot generated by OriginPro. Data are presented as means \pm SD ($n=3$). (E) Confocal images of cells co-expressing CPn0678-GFP and mCherry-SNX9 variants (SNX9, Δ BAR, Δ BAR Δ SH3). Insets show regions in white squares. Bar 10 μ m, insets 1 μ m. (F) Confocal images of Texas Red-stained GUVs containing PS and PIP4,5 pre-incubated for 10 min with DyLight650-labeled SNX9 and followed by addition of FITC-labeled

CPn0678 variants. Movies of each sample are included in the Supplementary Information (Movies S6-15). Bar 5 μm . presence of the SNX9 SH3 domain, but independent of the BAR domain (Fig. 4E, S4E). Furthermore, CPn0678 variants lacking the PRR1 motif (i.e., N-term or ΔPRR1) showed no colocalization with SNX9, whereas variants lacking the membrane localization domain, C-terminus or APH, interacted with SNX9, although interaction was restricted to the cytosol (Fig. S4D, E). This indicates that CPn0678 induces the recruitment of SNX9 to membrane structures formed by the chlamydial effector. During chlamydial endocytosis this occurs at the PM, where secreted CPn0678 locally deforms the membrane and recruits SNX9. To test our hypothesis that CPn0678-induced membrane curvature indeed recruits SNX9, we again used GUVs composed of PS and PIP4,5 (Fig. 4F, Movies S6-15). In accordance with published data, DyLight650-labeled SNX9 did not bind to these GUVs (Fig. 4F, Movie S6), for although it is capable of binding to PIP4,5 lipids (49), (50), it does so only if the membranes are already curved (16). Strikingly, when we added FITC-labeled CPn0678 to GUVs preincubated with SNX9 we observed immediate binding of CPn0678 and generation of membrane tubules, to which SNX9 was subsequently recruited (Fig. 4F, Movie S7). This recruitment is dependent on the membrane-tubulating capacity of the N-terminal APH of CPn0678, as SNX9 is recruited to the GUV surface in the presence of membrane-modulating N-term or ΔPRR1 variants but not ΔAPH (Fig. 4F, Movies S8-10). Moreover, SNX9 recruitment to GUVs is not dependent on its own membrane-curving domain, as we observed the same pattern of recruitment of SNX9 ΔBAR to CPn0678, N-term and ΔPRR1 but not ΔAPH variants (Fig. S6, Movies S11-15). Taken together, these results show that CPn0678 induces membrane curvature which is then sensed by SNX9.

Internalization of *C. pneumoniae* depends on the interaction between CPn0678 and SNX9.

To demonstrate the interdependence of endogenous SNX9 and CPn0678 during *C. pneumoniae* internalization, we first analyzed whether SNX9 localizes to invading EBs. Indeed, by 15 min pi, we were able to detect a patch-like association of SNX9 with EBs surrounded by EGFR (Fig. 5A). Quantification and validation of the imaging data revealed that 47% of EBs that colocalize with EGFR are also positive for SNX9 (Figs. 5B, S3C). Next, we performed a co-immunoprecipitation assay on cells lysed 15 min after infection, and were able to co-precipitate CPn0678 using a specific antibody against SNX9; conversely, SNX9 was recovered with an antibody directed against CPn0678 (Fig. 5C). These findings are further supported by direct colocalization of both proteins with attaching and invading *C. pneumoniae* EBs (Fig. 5D). We analyzed 400 EBs for CPn0678 expression, quantified and validated how many of them colocalize with SNX9. Some 40% were found to show an

overlap between SNX9 and CPn678 (Figs. 5E, S3D). This indicates that, upon attachment of the EB to the host cell, CPn678 is secreted and recruits SNX9 to the site of

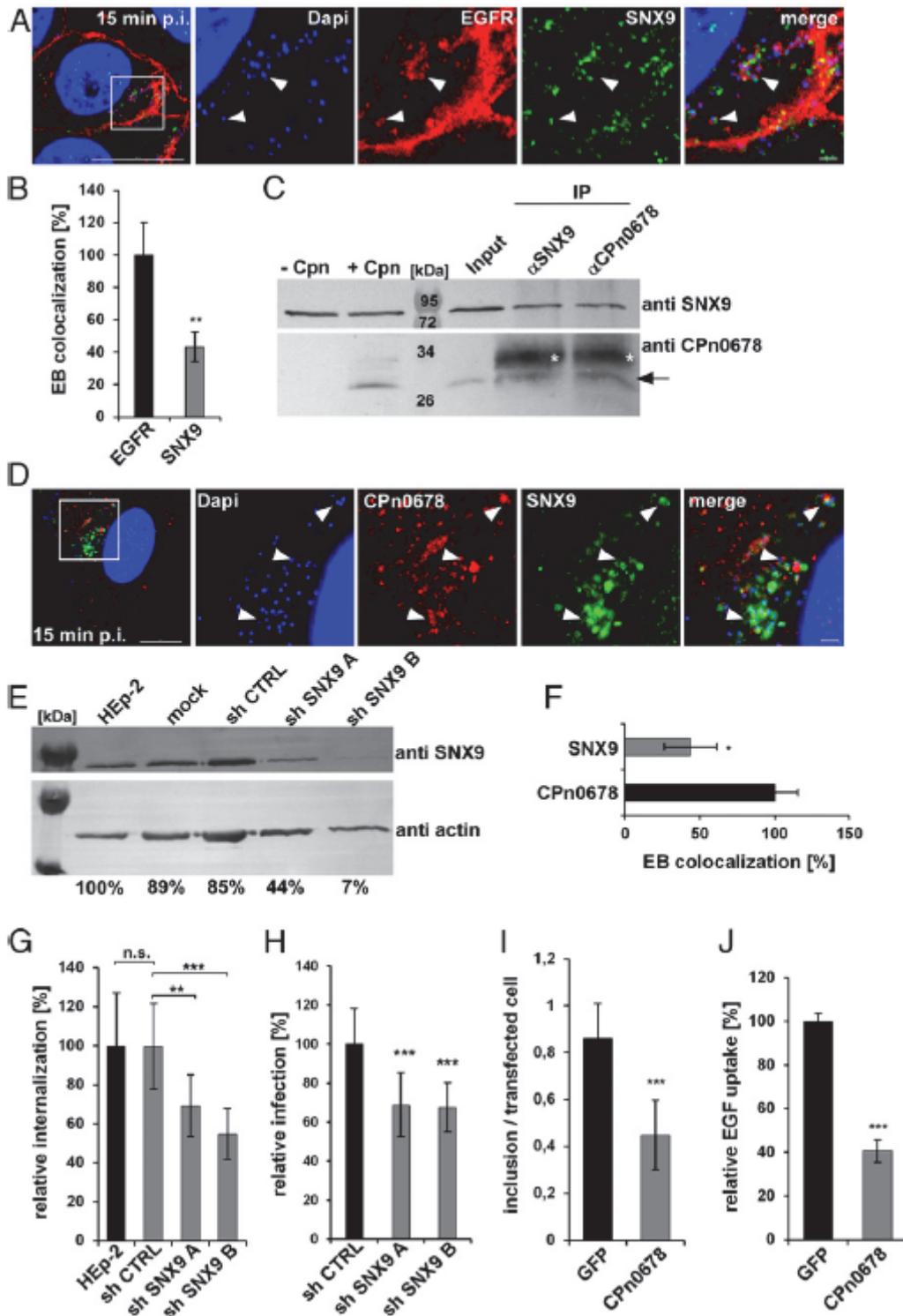


Figure 5: Interaction of SNX9 with CPn0678 is essential for infection by *C. pneumoniae*

(A) Colocalization of SNX9 (stained with anti-SNX9 and anti-mouse Alexa488) and EGFR (stained with anti-EGFR and anti-rabbit Alexa594) at bacterial entry sites at 15 min p.i. *C. pneumoniae* EBs were stained with DAPI. Insets show regions in white squares. White arrowheads indicate instances of colocalization. Bar 10 μ m, insets 1 μ m. (B) EBs colocalizing with EGFR were quantified for additional colocalization of SNX9 signals shown in (A). Confocal images of 200 individual EBs were analyzed. Data are presented as means \pm SD (n = 3). ** P value \leq 0.01. Colocalization was validated by estimating Pearson's Correlation Coefficients (Fig. S3C). (C) Co-immunoprecipitation of HEp-2 cells infected or not infected with *C. pneumoniae* EBs (MOI 100). Cell lysates were incubated with μ MACS protein G microbeads coupled to antibodies directed against SNX9 or CPn0678.

Elution samples were fractionated by SDS/PAGE and detected with the appropriate antibodies. White asterisks mark the light chain of the antibody, the black arrow the specifically labeled CPn0678 band. **(D)** Colocalization of SNX9 (stained with anti-SNX9 and anti-mouse Alexa488) and CPn0678 (stained with anti-CPn0678 and anti-rabbit Alexa594) at bacterial entry sites at 15 min pi. *C. pneumoniae* EBs were stained with DAPI. Insets show regions outlined by white squares. White arrowheads show colocalization. Bar 10 μ m, insets 1 μ m. **(E)** EBs colocalizing with CPn0678 were quantified for additional colocalization of SNX9 signals shown in **(D)**. Confocal images of 400 individual EBs were analyzed. Data are presented as means \pm SD (n = 3). **P* value \leq 0.1. Colocalization was validated by estimating Pearson's Correlation Coefficients (Fig. S3D). **(F-H)** *C. pneumoniae* internalization and infection of HEp-2 cells depleted of SNX9 by stably integrated shRNA plasmids. A non-targeting shRNA served as control. **(F)** Immunoblot of cell lysates fractionated by SDS/PAGE and probed with antibodies against SNX9. Actin served as the loading control. Signal intensity was quantified with ImageJ and expressed as a percentage of the actin signal. **(G)** Quantification of internalization of EBs into cells used in **(F)** at 2 hpi based on the examination of 40 visual fields. Data are represented as means \pm SD (n = 4). *P* value: ** \leq 0.01, *** \leq 0.001. **(H)** Quantification of infection of cells used in **(F)** at 48 hpi based on the examination of 40 visual fields. Data are represented as means \pm SD (n = 4). *P* value: *** \leq 0.001. **(I, J)** Infection and EGF uptake assay of HEp-2 cells transfected for 15 h with either GFP or CPn0678-GFP. **(I)** Transiently transfected cells were subjected to a *C. pneumoniae* infection (MOI 2), fixed at 24 hpi and the numbers of inclusions in 10 visual fields were counted and plotted relative to the GFP control. Data are presented as means \pm SD (n=3). *P* value: *** \leq 0.001. **(J)** Transfected cells were incubated with 100 ng/ml EGF-Alexa594 for 15 min, EGF uptake was measured in 10 visual fields and plotted relative to the GFP control. Data are presented as mean \pm SD (n=3) *P* value: *** \leq 0.001.

internalization, where both proteins together facilitate the EGFR-mediated endocytosis of *C. pneumoniae*. We subsequently used a cell line that stably expresses two different shRNAs directed against SNX9 and performed internalization and infection studies with these cells (Fig. 5F-H). Cells expressing shRNA B retained only 9% SNX9 protein and showed a 50% reduction in internalization rate compared to control cells, while cells expressing the less effective shRNA A retained 67% of the protein, and the internalization rate fell by 30% (Fig. 5F, G). In infection studies both cell lines showed a comparable reduction of infection (Fig. 5H), indicating that SNX9 is essential for the *C. pneumoniae* internalization process.

Moreover, we generated cells with a dominant-negative endocytosis phenotype by transiently overexpressing CPn0678-GFP, therefore trapping endogenous SNX9 in a CPn0678-bound state (Fig. 5I, J) at the PM. When we analyzed their capacity for endocytosis by either exposing them to *C. pneumoniae* EBs or labeled EGF, we observed a 50 % reduction in inclusion formation in comparison to cells expressing GFP (Fig. 5I), and a 60 % reduction in uptake of EGF (Fig. 5J), showing that the chlamydial early effector protein CPn0678 recruits SNX9 to bacterial entry sites, where both proteins facilitate the uptake of *C. pneumoniae* into host cells in a concerted manner.

Discussion

Upon T3-mediated secretion, the novel effector protein CPn0678 described in this work localizes to the host plasma membrane (PM) at bacterial entry sites enriched in EGFR. CPn0678 induces membrane curvature, which is sensed by SNX9, a key regulator of endocytosis. SNX9 is then recruited by and binds to CPn0678 via the interaction of its SH3 domain with the class I polyproline sequence in the C-terminal segment of the chlamydial

effector. We therefore refer to the protein hereafter as SemC (for 'Secreted Effector of Membrane Curvature`.

The BAR-PX domain of SNX9 binds preferentially to membranes of high curvature (15). Indeed, recently it was shown that SNX9 localizes to highly curved regions of late clathrin-coated invaginations, which coincide with PI(4,5)P₂ and PI(3)P (50), (51). The SNX9 PX-BAR domain binds to PI(4,5)P₂-containing vesicles primarily via the BAR domain, and with lower affinity to PI(3)P-binding sites via the PX domain. Based on *in vitro* studies, it was subsequently proposed that SNX9 is recruited via its three effectors PI(4,5)P₂, PI(3)P and membrane curvature to the clathrin-coated invagination to locally activate the actin machinery and complete endocytosis (16).

On the basis of our results, we propose that SemC acts to control the size and shape of the endocytic vesicle formed following the activation of the EGFR-mediated endocytosis machinery, which is triggered by binding of the bacterial adhesin Pmp21 to EGFR (19). During chlamydial infection, an adjustment in plasma membrane curvature is essential, because while clathrin-mediated receptor endocytosis generates vesicles with a diameter of ~ 120 nm (52), chlamydial EBs have a diameter of ~400 nm. The significantly larger size of the developing vesicle harboring the EB exhibits significantly less curvature. SNX9 binds to membranes of clathrin-coated vesicles ~10 times better than to vesicles with lower curvature (16). Thus, we suggest that, once secreted, CPn0678 binds to the host cell and induces a level of curvature equivalent to that of the developing clathrin vesicle; the curved membrane recruits SNX9, and a direct interaction of SemC with SNX9 may facilitate and stabilize this process. Recruitment of SNX9 and additional endocytic components targeted by SNX9, such as dynamin for neck constriction and N-WASP, enhance actin dynamics (12), (53), (43). We have shown here that SemC uses its APH domain to induce membrane curvatures in synthetic membranes such as GUVs, which are strong enough to disrupt these vesicles. Ectopic expression of the effector in human cells generates tubules emanating from the PM. Formation of SemC -induced tubules on GUV membranes is essential for recruitment of SNX9 which by itself does not bind to these vesicles, and tubulation is solely dependent on the presence of the APH. Formation of membrane tubules within cells is dependent on the actin and microtubule cytoskeleton. SemC -induced tubulation is intensified upon recruitment of SNX9, as revealed by our finding that, when overexpressed, SNX9 strongly enhances the SemC tubule phenotype. Furthermore, ectopic expression of SemC prior to infection negatively influences the endocytotic capacity of cells, leading to fewer internalized EBs and less endocytosed EGFR. These observations imply that, during internalization, secreted SemC redirects SNX9 function to chlamydial entry sites, which in turn promotes the uptake of EBs.

In addition, SemC may manipulate other SNX9 functions, such as vesicle maturation, activation of dynamin for vesicle scission and the regulation of actin assembly – which is essential for membrane remodeling by interaction with N-WASP or Arp2/3 (12). Interestingly, due to this central role in endocytosis, SNX9 is targeted in different ways by other bacterial pathogens (54), (55).

Depletion of SNX9 by shRNA reduces but does not abrogate *C. pneumoniae* internalization. This can likely be accounted for by continuing interaction of SemC with other members of the SNX9 family, in particular SNX18 and SNX33 (56). Moreover, this might also be indicative of the robustness of the chlamydial host-cell-entry process, which very likely relies on a variety of chlamydial effector protein functions yet to be identified.

In conclusion, we speculate that the chlamydial effector SemC manipulates a core process of endocytosis by binding to and inducing curvature of the PM underneath invading *Chlamydiae*. This membrane deformation recruits the central endocytotic scaffold protein SNX9. The SemC -SNX9 interaction is direct, and together the two proteins promote formation of a vesicle that is large enough to accommodate an EB, and stimulate its endocytosis by locally activating the actin machinery.

Materials and Methods

Antibodies and reagents

The primary antibody against SNX9 (OT11E4) was purchased from Origene, anti-EGFR (PA1-1110) and anti-GFP (MA5-15256) were from Thermo Scientific, anti-penta-His (#34660) from Qiagen, anti-GST (#2622) from Cell Signaling, and anti-DsRed (sc-101526) from Santa Cruz. Anti-IncA was a gift from GM Zhong (57), anti-DnaK was obtained from S. Birkelund (58). Antibodies against Cpn0677 and Cpn0678 were generated in our lab, as was anti-CPn0147. Mouse anti-cya, rabbit anti-CRP, and rabbit anti-lpaD antibodies were generously donated by Drs. N. Guiso, A. Ullmann and C. Parsot (Institut Pasteur, Paris), respectively. Secondary anti-rabbit and anti-mouse antibodies coupled to Alexa 488 or Alexa594 were purchased from Thermo Scientific, and those coupled to alkaline phosphatase were sourced from Promega. CellMask (orange) and Rhodamine-Phalloidin were purchased from Thermo Scientific, and SiR-Tubulin from Spirochrome. All lipids used in this study were obtained from Avanti Lipids, and Texas Red dye, NHS-FITC and DyLight650NHS from Thermo Scientific. Nocodazole and cytochalasin D were purchased from Merck.

Growth of chlamydia, bacteria and cell lines

C. pneumoniae GiD was propagated in HEp-2 cells (ATCC: CCL-23). HEp-2 and HEK293-T cells stably expressing shRNA plasmids were cultured in DMEM medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), MEM vitamins and non-essential amino acids (Thermo

Scientific). Chlamydial elementary bodies (EBs) were purified using a 30% gastrographin solution (Bayer) and stored in SPG buffer (220 mM sucrose, 3.8 mM KH_2PO_4 , 10.8 mM Na_2HPO_4 , 4.9 mM L-glutamine). All cloning was carried out by *in vivo* homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. The *Escherichia coli* strains XL-1 Blue (Stratagene) and BL21 (DE3, Invitrogen) were used for plasmid amplification and protein purification, respectively. The *ipaB* and *mxuD* strains, in which the corresponding genes (*ipaB* and *mxuD*) have been inactivated (26), are derived from the virulent wild-type M90T strain of *S. flexneri*, and were grown in Luria-Bertani medium supplemented with (0.1 mg/ml) ampicillin.

***Shigella* heterologous secretion assay**

Analysis of secreted proteins was performed as described previously (25). Briefly, 1 ml of a 30°C overnight culture of *S. flexneri ipaB* or *mxuD* that had been transformed with different Cya chimeras was added to 30 ml of LB broth containing 0.1 mg/ml ampicillin, and incubated at 37°C for 4 h. For experiments using full-length proteins, expression was induced by adding 150 μM IPTG for the 4-h growth period. Bacteria were then harvested by centrifugation and the supernatant was filtered through a Millipore filter (0.2 μm). To precipitate the proteins, a 1/10 volume of trichloroacetic acid was added to the supernatant, and both the precipitate and the bacterial pellet were resuspended in sample buffer for analysis by SDS-PAGE and immunoblot.

Preparation and analysis of giant unilamellar vesicles (GUVs)

GUVs were prepared as described previously (59). Briefly, PIP-containing lipid mixtures contain 69.75 mol% DOPC, 25 mol% cholesterol and 0.25 mol % Texas Red to which 5 mol% PIPs was added. In PS-containing GUVs the mixture was changed to 49.75 mol% DOPC/25 mol% cholesterol/0.25 mol% Texas Red/20 mol% DOPS. GUVs containing PIP_{4,5} and PS were prepared by mixing 44.75 mol% DOPC, 25 mol% cholesterol, 0.25 mol% Texas Red and 20 mol% DOPS with 5mol% PIP_{4,5}. Lipid mixtures were prepared and added to a chamber built of ITO-coated slides (Präzisions Glas & Optik) glued together with Vitrex (Vitrex Medical). The cavity between the slides was filled with 10% sucrose solution and sealed with Vitrex. The slides were connected via clamps to a frequency generator and an alternating voltage of 2.0 V_{p-p} was applied at a frequency of 11 Hz. The GUVs were grown for 2-3 h in the dark at room temperature. For microscopic analyses, μ -slides Angiogenesis (Ibidi) were coated for 5-10 min at RT with 2 mg/ml beta-casein (Merck) and washed with PBS. Then 10 μl of GUV solution mixed with 30 μl of PBS was added to the slides and the GUVs were allowed to settle. Then 2 μg of NHS-FITC-labeled recombinant protein was added and incubated for 15 min at RT. For binding studies with two proteins, GUVs were first incubated with 2 μg of NHS-650-labeled recombinant protein and imaged for 10 min at RT, then 2 μg of NHS-FITC-labeled recombinant protein was

added and images were acquired for additional 10 min. Images were quantified using ImageJ. For each lipid and protein combination, 50 GUVs were analyzed for their maximum fluorescence intensity on the membrane.

Microscopy and image processing

General imaging was performed using an inverse Nikon TiE Live Cell Confocal C2plus equipped with a 100x TIRF objective and a C2 SH C2 Scanner. All images were generated with Nikon NIS Elements software and quantified using ImageJ.

gSTED measurements were performed using a TCS SP8 STED 3X (Leica, Wetzlar, Germany) equipped with an HC PL APO CS2 100x objective (NA 1.4) at a scan speed of 400-600 Hz. A pulsed white-light laser was used at 499 nm for AlexaFluor488 excitation and a continuous-wave fiber laser at 592 nm was used for excitation depletion. The detection range of the GaAsP hybrid detector was set from 504 nm to 580 nm to collect the emitted fluorescent signals. To further increase resolution, time gating was set from 0.5 ns to 12 ns. Finally, deconvolved STED data were calculated using standard algorithms implemented in the Huygens software (Huygens Professional, Scientific Volume Imaging, Hilversum, Netherlands) on the acquired raw data.

Statistical analyses

Statistical analyses of FLIM imaging data were performed using OriginPro. The data represent the mean \pm SD of n experiments. For simple paired analyses between two groups, a Student's t -test was chosen. A P value of less than 0.01 was considered to be statistically significant.

Data Availability Statement:

All data discussed in the paper will be made available to readers.

Acknowledgments

We thank MA McNiven for plasmids, Bernd Tebarth for implementing the Chlamydia microarray, Astrid Engel for preparation of protein samples, Elena Görres and David Shi for generating mutant constructs and the CAI for imaging. We acknowledge grant support from the DFG to JHH (project A5) as part of CRC 1208, and funding of a graduate fellowship by the Jürgen Manchot Foundation.

Author Contributions

Conceptualization K.M. and J.H.H.; Methodology K.M., K.K. and J.H.H.; Investigation S.H., D.S., G.M., A.S., F.A.R., L.S., D.B. and K.M.; Writing – Original Draft K.M. and J.H.H.; Writing – Review & Editing K.M. and J.H.H.; Funding Acquisition J.H.H.; Supervision Resources K.M. and J.H.H.

Declaration of interest

The authors declare no competing interests.

Supporting Information

Supplementary Methods

Plasmid constructs, cloning procedures

For heterologous secretion in *S. flexneri*, N-terminal sequences of *cpn0677* and *cpn0678* were integrated into pUC19cya using *HindIII* and *XbaI* sites. For protein expression, *cpn0677* and *cpn0678* were amplified from *C. pneumoniae* GiD genomic DNA and integrated into pFT25 to generate C-terminal 10His-Tag. Cpn678 Δ APH10His and Cpn678 Δ PRR110His were amplified by PCR from WT constructs and integrated into pFT25. GST-SNX9_pGEX5.1 was generated by cloning the SNX9 coding sequence into the *BamHI* and *NotI* sites of pGEX5X.1. GST-SNX9-SH3_pGEX was kindly provided by NM Alto. The SH3 domain of SNX9 was amplified from a WT construct and fused to GST by integration into pKM36.

CPn0678-GFP WT and deletion variants were generated by cloning of *cpn0678* into pKM55. mCherry expression constructs were generated by recloning of *Grb2*, *c-Cbl* and *Cin85* (gift from MA McNiven) into pKM95 (C-terminal mCherry), and *SNX9* and of deletion variants into pAE66 (N-terminal mCherry). *SNX9* shRNA plasmids used for generation of stable cell lines were obtained by integration of *SNX9* target sequences shRNA_1 (gagagtcagcatcatgtct) or shRNA_2 (taagcacttgactggttat) into *MluI* and *ClaI* sites of pLVTHM, respectively.

Transcript analysis

For transcriptome analyses throughout the chlamydial infection cycle (0-96 h.p.i.), a home-made microarray spotted with 300- to 500-bp PCR products covering all *C. pneumoniae* ORFs was used. Chlamydial mRNA and gDNA was isolated at 2, 6, 12 and 24 h.p.i. using an MOI of 100, and at 24, 36, 48, 72 and 96 h.p.i. using an MOI of 5. mRNA was Cy5-labeled during reverse transcription, mixed with fragmented gDNA labeled with Cy3 and hybridized to the array. Signal detection and quantification were performed using ImaGen and GeneSpring software by comparing mRNA/gDNA signal intensities of three biological replicates per time point. Differentially regulated genes are those that showed at least a 2-fold increase or decrease in signal intensity.

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

HEp-2 cells were infected with *C. pneumoniae* (at MOI 100 and observed at 2-12 hpi, or at MOI 5 for analysis over the period 24-96 hpi) and nucleic acids were isolated at the indicated time points. cDNA was synthesized using pd(N)₆ random hexamers as primers on isolated RNA. To measure the ratio of mRNA per genome, previously isolated gDNA was used as a template in real-time PCRs following the manufacturer's instructions 3 (RealMasterMix SYBR ROX 2.5x, 5PRIME). Δ CT values were determined using defined amounts of the cloned plasmid pSW1. This plasmid contains a fragment of the chlamydial *ompA* gene and

was used as a standard for real-time PCRs in a PCR ABI Prism 7000 (Applied Biosystems). The ratios of specific mRNAs to genomic DNA were calculated from the measured ΔCT values.

Co-immunoprecipitation

For *in vivo* co-immunoprecipitation (Co-IP) of infected cells, HEp-2 cells were cultivated to 100% confluency in 6-well plates and infected with gradient-purified *C. pneumoniae* EBs (MOI 100) by centrifugation for 20 min (25°C at 2900 rpm). After centrifugation, cells were shifted to 37°C and grown under 6% CO₂ for 15 min. Infected cells were washed three times with HBSS and lysed with Phospho-Lysis buffer (1% NP40, 1% Triton X100, 20 mM Tris, 140 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM Na₂VO₄, Merck Protease Inhibitor Cocktail). The lysate was cleared by centrifugation for 10 min at 4°C at 10,000xg. The supernatant was mixed with Protein G MicroBeads (Miltenyi Biotech) that had been preincubated with 2 µg antiSNX9 or anti-CPn0678 overnight at 4°C. Co-IP assays of co-transfected cells were performed using anti-GFP MicroBeads. Eluted proteins were resolved by SDS/PAGE and detected by immunoblot.

FRET-FLIM measurements and single-pixel FLIM analysis

Measurements and analysis were performed after 18 h of expression in HEp-2 cells incubated in a prewarmed environment (37°C). Time-domain FLIM was performed on a confocal laser scanning microscope (Zeiss LSM 780) additionally equipped with a single-photon counting device with picosecond time resolution (PicoQuant Hydra Harp 400). eGFP fluorescence was excited at 485 nm using a linearly polarized diode laser (LDH-D-C-485) operated at a repetition rate of 32 MHz. Excitation power was monitored and adjusted to around 1 µW at the objective (40× water immersion, Zeiss C-PlanApo, NA 1.2). The emitted light was collected and fluorescence was then detected by Tau-SPADs (PicoQuant) within a narrow segment of the eGFP emission spectrum (band-pass filter: HC520/35 AHF). Images were taken with 12.6 µs pixel time and a resolution of 0.17 µm per pixel (zoom 5, 256 × 256). A series of 80 frames was merged into one image and further analyzed. Additionally, fluorescence of mCherry was recorded by merging 10 frames excited with a DPSS-561 nm cw laser to verify acceptor presence. The instrument response function (IRF) of the setup was measured on each experimental day using a KI-quenched erithrosin B solution. The fluorescence lifetime of eGFP was analyzed using the software tool SymPhoTime 64, version 2.3 (PicoQuant, Berlin, Germany). Due to the low excitation power used to prevent photobleaching during image acquisition, and the small pixel size adopted to increase spatial resolution, the number of photons per pixel was still low after merging of frames, ranging from 100 to a maximum of 1700 photons per pixel. An individual ROI was generated for every dataset to ensure that only pixels with a minimum of 200 photons contributed to the modeling of the average lifetime. The photon numbers within the ROI

generate a histogram which is used for a single exponential fit to approximate the average eGFP lifetime with background contribution and correction for shifting of the IRF. The same model was applied to the CPn0678-GFP donor control and the CPn0678-GFP mCherry-SNX9 coexpression.

EGF uptake assay

HEp-2 cells were transiently transfected with CPn0678-GFP or GFP alone for 15 h, washed twice with PBS and placed in serum-free medium for 5 h at 37°C and 6% CO₂. EGF labeled with Alexa594 (100 ng/ml) was added for 15 min at 37°C. Cells were then washed twice with PBS and fixed with PFA for 10 min. EGF uptake was quantified by analyzing the presence of intracellular EGF vesicles in confocal images using ImageJ.

Pulldown assay

Recombinant His- or GST-tagged proteins were expressed in *E. coli* BL21 and purified according to the manufacturer's protocols for *cOmplete* His-Tag purification resin (Roche) and Pierce Glutathione Agarose (Thermo Scientific). Aliquots (200 µg) of purified protein were incubated for 2 h at 4°C with either His-Tag purification resin or Glutathione Agarose, then 200 µg of the test protein was added and incubated for an additional 2 h at 4°C or the incubation sequence was reversed. The mixture was washed four times with PBS containing 50 mM imidazole (Merck) or 50 mM TRIS/HCL pH 8 (Merck). Eluted fractions were collected by adding 100 µl of 500 mM imidazole in PBS or 50 mM TRIS/HCl and 10 mM reduced glutathione in PBS, resolved by SDS/PAGE and detected by immunoblot.

Preabsorption of polyclonal antibodies

Green fluorescent latex beads (diam. 1.036 µm, Polysciences) were coated with 40 µg/ml rCPn0677, rCPn0678 or BSA respectively. Purified antibodies were incubated with coated beads overnight at 4°C under constant agitation. The supernatant was collected after pelleting the beads by centrifugation (10 min at 17,000xg) and used for immunofluorescence staining.

Immunofluorescence staining

Transfected and/or infected cells were fixed at the indicated time points with 3% paraformaldehyde in PBS (PFA) for 10 min, then washed three times with PBS, and permeabilized with either 100% methanol for 10 min or with 2% saponin (Merck) in PBS for 20 min. Depending on the permeabilization protocol, primary antibodies were diluted in PBS or in 0.5% saponin solution and incubated for 30 min at 37°C. Cells were washed three times with PBS with or without 0.5% saponin and incubated with secondary antibodies (anti-rabbit/mouse Alexa488/594) for 30 min at 37°C in PBS with or without 0.5% saponin. DAPI was used to visualize DNA.

Infection experiments

HEp-2 cells either stably expressing, or transiently transfected with, the appropriate constructs were infected with *C. pneumoniae* EBs (MOI 1) by short centrifugation as described before, then shifted to 37°C for 2 h before the infection medium was replaced by fresh medium and the cells were incubated for 48 h. The number of inclusions formed was quantified by confocal imaging, using an antibody directed against the inclusion membrane protein Cpn0147 and anti-rabbit Alexa594, as described previously.

Internalization assay

HEp-2 cells stably expressing the appropriate constructs were cultivated to 70% confluency in 24-well plates on glass coverslips (Ø 1 cm²), then infected with purified *C. pneumoniae* EBs (MOI 5) by centrifugation for 20 min (25°C at 2900 rpm). After centrifugation, cells were shifted to 37°C and grown under 6% CO₂ for 2 h, washed three times with PBS and fixed with 3% paraformaldehyde in PBS (PFA) for 10 min. Internalization rates were determined by immunostaining with anti-Chlamydia and anti-rabbit Alexa488 and DAPI. Cells were imaged by confocal microscopy and internalization ratios were determined by counting external Alexa488-positive and all DAPI-positive bacteria.

Pearson Correlation Coefficient estimation for non-random colocalization

“*Pearson Correlation Coefficient*” (PCC) of EGFR & Cpn0678, EGFR & SNX9 and SNX9 & CPn0678 signal pairs were estimated using the “*Fiji-plugin JaCoP*”. In each image Regions Of Interest (ROIs) of 100x100 pixel were chosen representing regions of strong chlamydial infection (with Cpn), which were compared to regions with cytoplasmic background signal (w/o Cpn). Image metadata were directly read by the plugin and completed manually (e.g. numerical aberture of objective or wavelength). PCC values were estimated using “*JaCoP*”. Simultaneously, the significance of the “*Costes randomization randomization*” was calculated by “*JaCoP*”, which compares PCCs of the original data with the PCCs of data with a randomly shuffled channel using 1000 iterations. To further stress the “*Costes randomization*” we applied an 8 pixel blocksize, representing the average signal size of the EB surrounded by EGFR/ SNX9/ CPn0678 for the scrambling procedure. “*Costes randomization*” significance was performed on each ROI at a blocksize of 8 pixel. In total 23 of 24 ROIs chosen for “with Cpn” and 20 of 24 ROIs for “w/o Cpn” regions passed the “*Costes randomization*” test using a minimum significance level of 95 % at a blocksize of 8 pixel. ROIs below the significance level were excluded from the PCC analysis.

Supplementary Figures

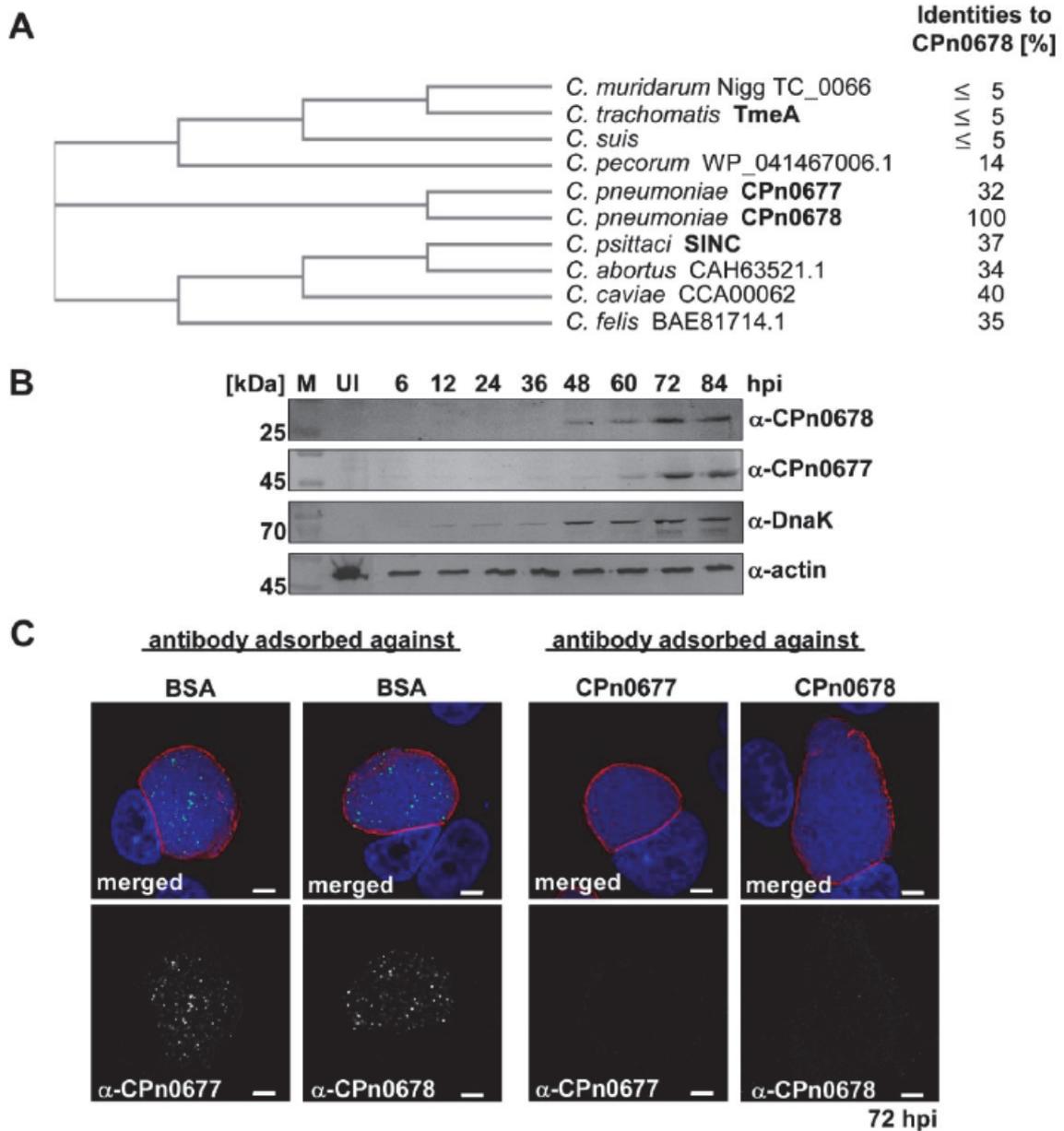


Figure S1: CPn0677 and CPn0678 are expressed late during infection.

(A) Phylogenetic analysis of CPn0678 homologs and syntenic proteins in the indicated species was performed using EMBL-EBI multiple sequence alignment and simple phylogeny tools. (B) Infected cells (MOI 5) were harvested at the indicated time points, and equal amounts of protein were fractionated by SDS/PAGE and probed with specific antibodies against CPn0677, CPn0678, DnaK and actin. (C) Confocal images of HEp-2 cells infected for 72 h, fixed with PFA, permeabilized with methanol and stained with antibodies against CPn0677 or CPn0678 which had been preabsorbed against either BSA (left panel) or recombinant CPn0677 or CPn0678 (right panel). Anti-CPn0677 and anti-CPn0678 antibodies were visualized with anti-rabbit Alexa488, and the inclusion membrane with anti-IncA antibody and anti-mouse Alexa 594. Host and bacterial DNAs were labeled with DAPI. Bar 5 μ m.

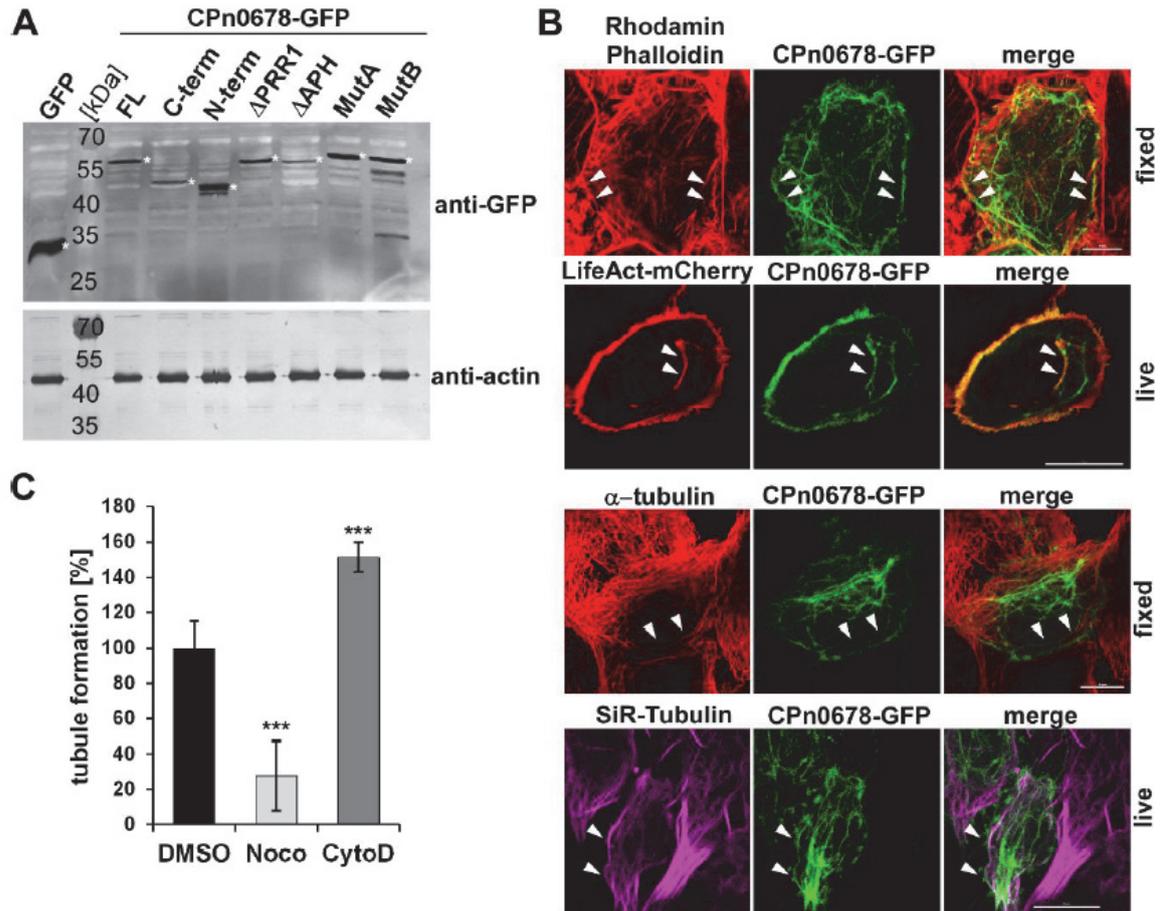


Figure S2: CPn0678-generated membrane tubules associate with actin filaments and microtubules.

(A) HEp-2 cells were transiently transfected with CPn0678-GFP or variants thereof for 24 h, lysed, fractionated by SDS/PAGE and probed with specific antibodies against GFP and actin. Expected bands are marked by white asterisks. (B) Confocal images of HEp-2 cells transfected for 15 h with CPn0678-GFP fixed and stained either with rhodamine phalloidin for actin, or with an anti- α -tubulin antibody and anti-mouse Alexa594, or live images of CPn0678-GFP-expressing cells cotransfected with LifeAct-mCherry or treated with SiR-Tubulin. White arrows mark sites of colocalization. Bar 10 μ m. (C) Quantification of tubule formation in cells transfected for 15 h with CPn0678-GFP, and treated for 30 min at 37°C with DMSO Cytochalasin D (CytoD) or Nocodazole (Noco). On average, 80 cells were analyzed. Data are represented as mean \pm SD (n=3). *P* value: *** \leq 0.001.

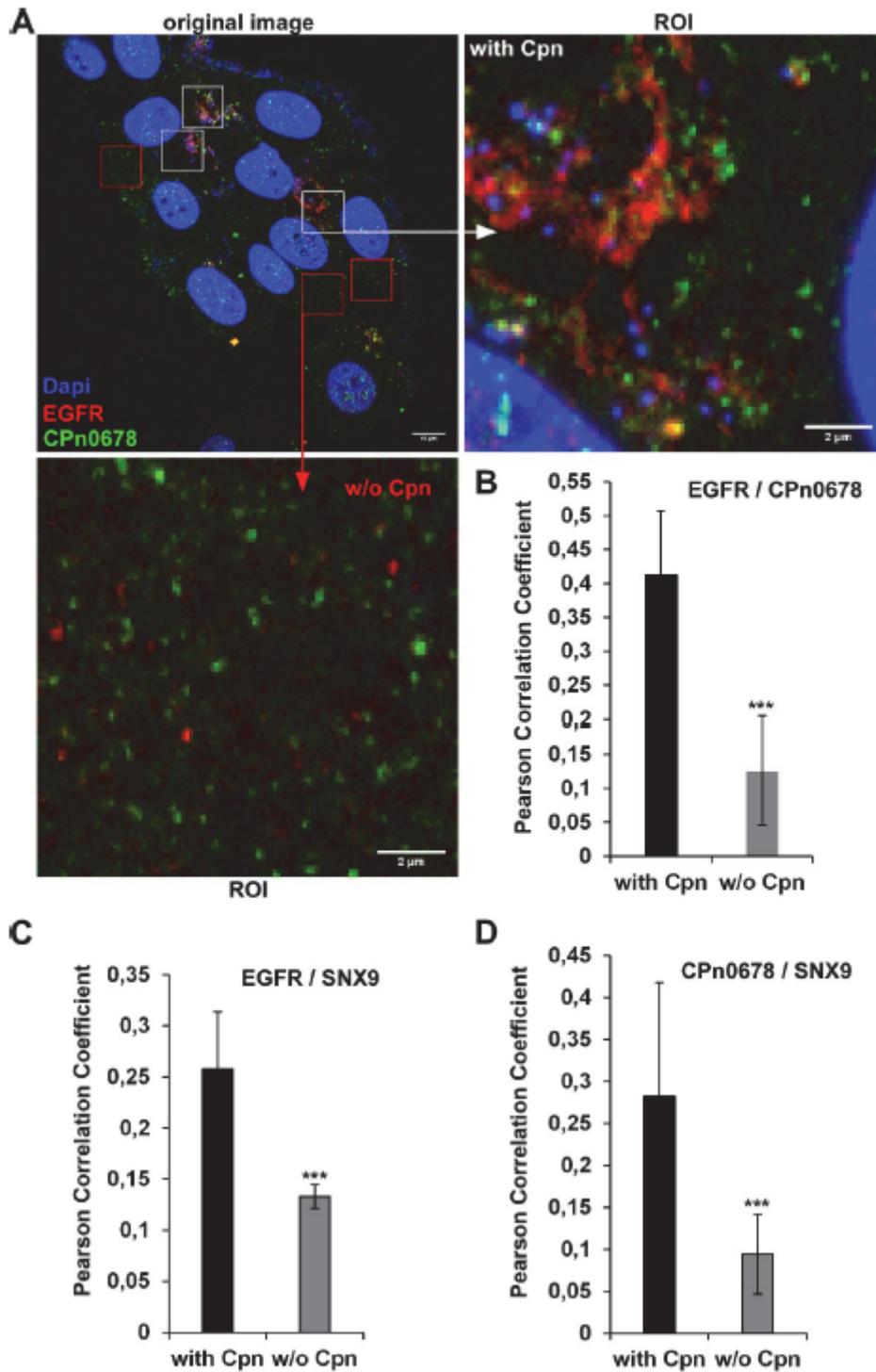


Figure S3: Pearson Correlation Coefficient estimation for non-random colocalization.

(A-D) Confocal images used for colocalization studies shown in Figs. 4A,B; 5A,B and 5D,E were subjected to the Fiji-plugin JaCoP for estimation of non-random colocalization. (A) ROIs of 100x100 pixel were chosen representing regions of strong chlamydial infection (with Cpn), which were compared to regions with cytoplasmic background signal (w/o Cpn). Bar 10 μ m, insets 2 μ m. (B-D) PCC values of corresponding signal pairs of EGFR & Cpn0678 (B), EGFR & SNX9 (C) and CPn0678 & SNX9 (D) were estimated using JaCoP. Data are represented as mean \pm SD (n=3). P value: *** \leq 0.001.

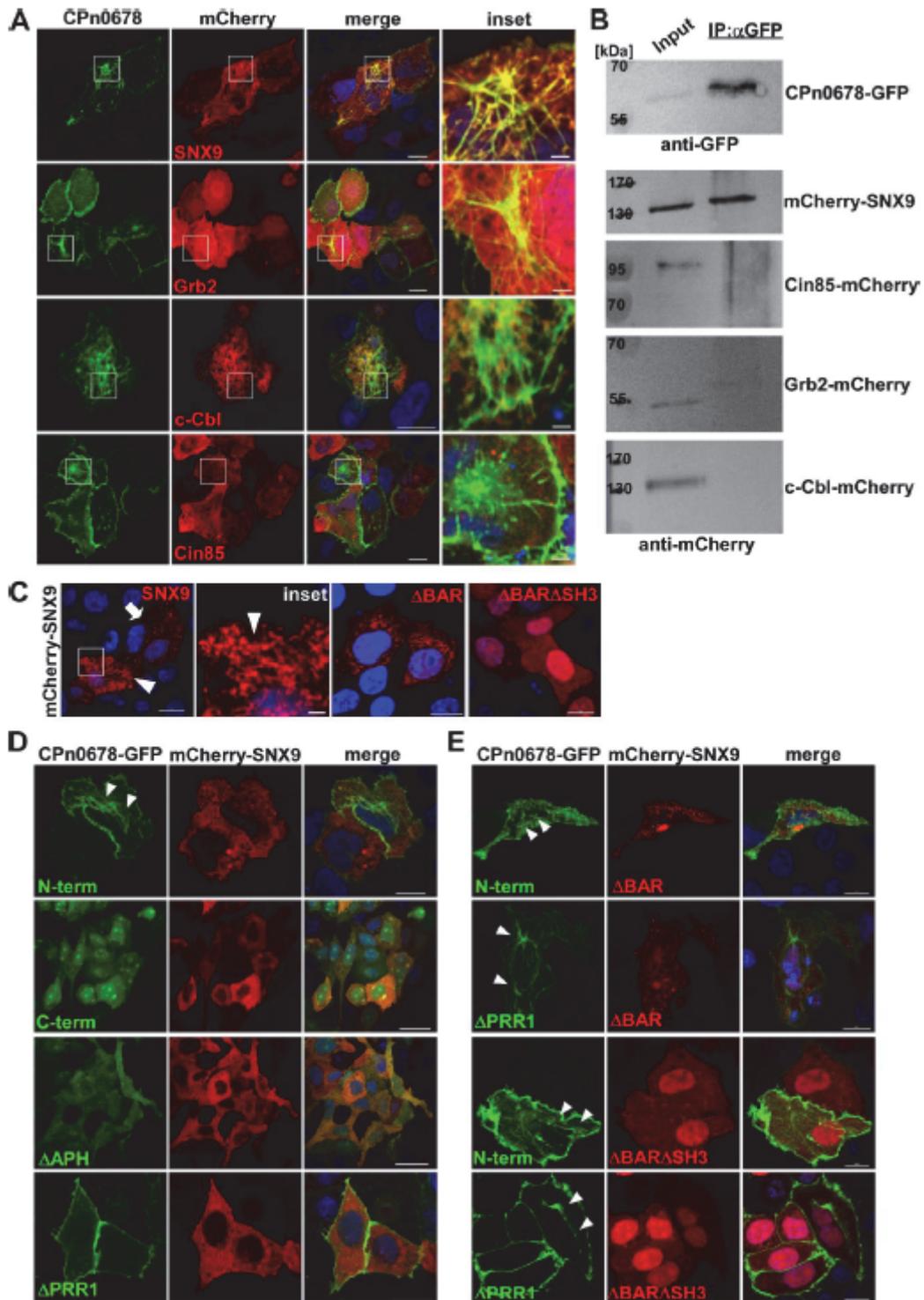


Figure S4: CPn0678 interacts with SNX9 via the first PRR domain.

(A) Confocal images of Hep-2 cells cotransfected with CPn0678-GFP and SNX9, Grb2, c-Cbl or Cin85, each fused to mCherry. Insets represent areas outlined in white boxes. Bar 10 μ m, insets 1 μ m. (B) Coimmunoprecipitation analysis of lysates of the Hep-2 cells shown in (A) using μ MACS anti-GFP microbeads. Eluted samples were fractionated on SDS/PAGE and probed with antibodies against GFP and mCherry. (C) Confocal images of Hep-2 cells expressing mCherry-SNX9 or deletion variants (Δ BAR, Δ BAR Δ SH3). Inset represents the area in the white box. The white arrow marks vesicular SNX9, the white arrowhead points to the tubulation phenotype. Bar 10 μ m, insets 1 μ m. (D, E) Confocal images of Hep-2 cells cotransfected with mCherry-SNX9 (D) or deletion variants (E) in combination with various CPn0678-GFP variants. White arrowheads mark CPn0678-GFP-positive membrane tubules. Bar 10 μ m.

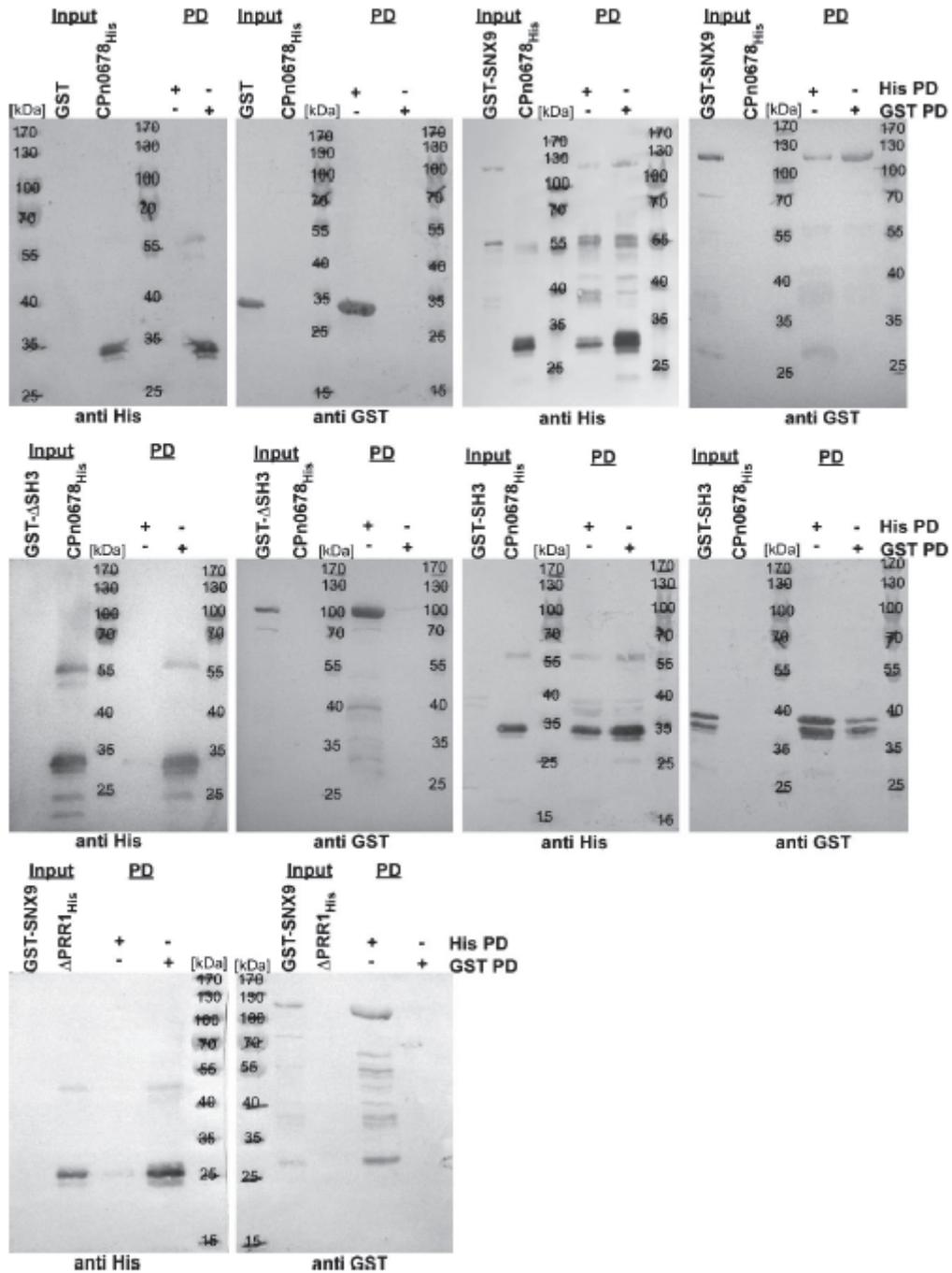


Figure S5: GST-SNX9 interacts with CPn067810His via the first PRR domain in pulldown experiments. Full immunoblots of pulldown experiments using purified recombinant GST or GST-SNX9 variants (Δ SH3, SH3) and CPn0678_{10His} or CPn0678 Δ PRR110His shown in Fig.4C. Input and elution samples obtained from His-pulldowns and GST-pulldowns were fractionated by SDS/PAGE and probed with anti-GST and anti-His antibodies.

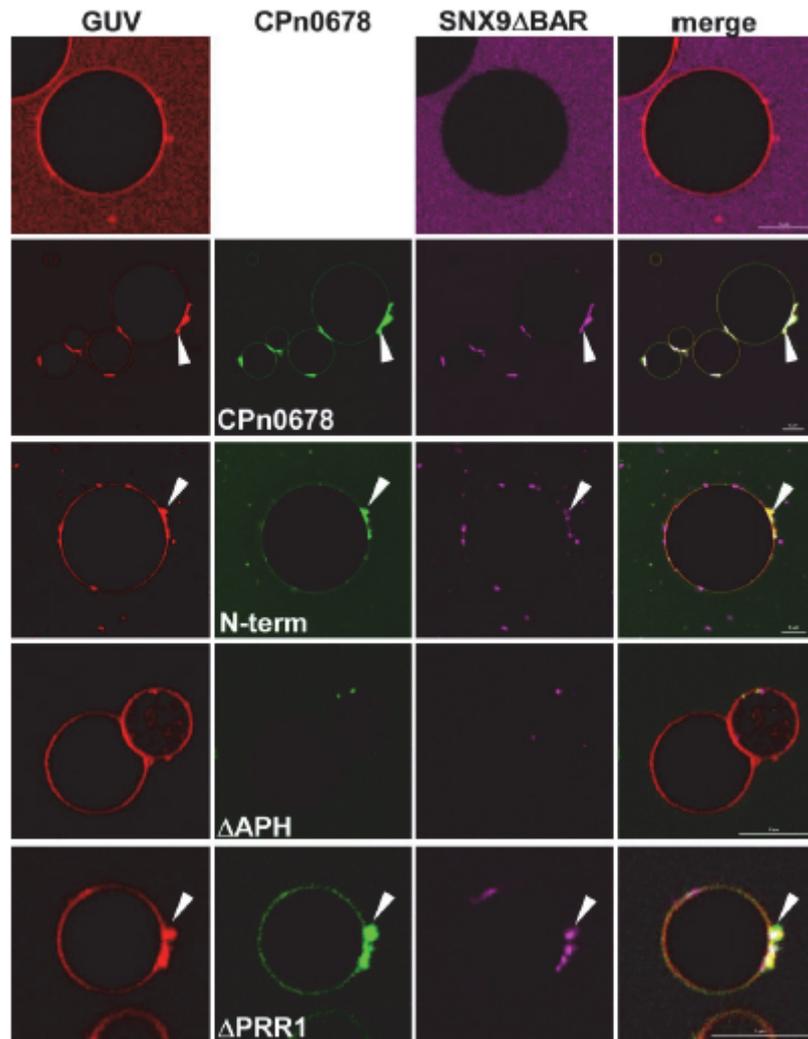


Figure S6: CPn0678 tubulates artificial GUV membranes and recruits SNX9 independently of the BAR domain.

Confocal images of GUVs containing PS and PIP_{4,5} stained with Texas Red, incubated for 10 min with DyLight650-labeled SNX9 \square BAR and then with FITC-labeled recombinant CPn0678 variants. White arrowheads mark recruitment of SNX9 \square BAR to CPn0678-mediated membrane tubulations. Full movies in Supplementary Information (Movies S1-14). Bar 5 μ m.

Supplementary Movies

<https://www.pnas.org/content/117/5/2634/tab-figures-data>

References

1. Elwell C, Mirrashidi K, & Engel J (2016) Chlamydia cell biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 14(6):385-400.
2. Newman L, *et al.* (2015) Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting. *PLoS One* 10(12):e0143304.
3. Roulis E, *et al.* (2015) Comparative genomic analysis of human Chlamydia pneumoniae isolates from respiratory, brain and cardiac tissues. *Genomics* 106(6):373-383.

4. Webley WC & Hahn DL (2017) Infection-mediated asthma: etiology, mechanisms and treatment options, with focus on *Chlamydia pneumoniae* and macrolides. *Respir Res* 18(1):98.
5. Balin BJ, *et al.* (2018) *Chlamydia pneumoniae*: An Etiologic Agent for Late-Onset Dementia. *Front Aging Neurosci* 10:302.
6. Cossu D, Yokoyama K, & Hattori N (2018) Bacteria-Host Interactions in Multiple Sclerosis. *Front Microbiol* 9:2966.
7. Zhan P, *et al.* (2011) *Chlamydia pneumoniae* infection and lung cancer risk: a meta-analysis. *Eur J Cancer* 47(5):742-747.
8. Cossart P & Helenius A (2014) Endocytosis of viruses and bacteria. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6(8).
9. Weber MM & Faris R (2018) Subversion of the Endocytic and Secretory Pathways by Bacterial Effector Proteins. *Front Cell Dev Biol* 6:1.
10. Weigele BA, Orchard RC, Jimenez A, Cox GW, & Alto NM (2017) A systematic exploration of the interactions between bacterial effector proteins and host cell membranes. *Nat Commun* 8(1):532.
11. Alto NM, *et al.* (2007) The type III effector EspF coordinates membrane trafficking by the spatiotemporal activation of two eukaryotic signaling pathways. *J Cell Biol* 178(7):1265-1278.
12. Bendris N & Schmid SL (2017) Endocytosis, Metastasis and Beyond: Multiple Facets of SNX9. *Trends Cell Biol* 27(3):189-200.
13. de Souza Santos M & Orth K (2015) Subversion of the cytoskeleton by intracellular bacteria: lessons from *Listeria*, *Salmonella* and *Vibrio*. *Cell Microbiol* 17(2):164-173.
14. Mooren OL, Galletta BJ, & Cooper JA (2012) Roles for actin assembly in endocytosis. *Annu Rev Biochem* 81:661-686.
15. Pylypenko O, *et al.* (2008) A combinatorial approach to crystallization of PX-BAR unit of the human Sorting Nexin 9. *J Struct Biol* 162(2):356-360.
16. Daste F, *et al.* (2017) Control of actin polymerization via the coincidence of phosphoinositides and high membrane curvature. *J Cell Biol* 216(11):3745-3765.
17. Subbarayal P, *et al.* (2015) EphrinA2 receptor (EphA2) is an invasion and intracellular signaling receptor for *Chlamydia trachomatis*. *PLoS Pathog* 11(4):e1004846.
18. Patel AL, *et al.* (2014) Activation of epidermal growth factor receptor is required for *Chlamydia trachomatis* development. *BMC Microbiol* 14:277.
19. Mülleken K, Becker E, & Hegemann JH (2013) The *Chlamydia pneumoniae* invasion protein Pmp21 recruits the EGF receptor for host cell entry. *PLoS Pathog* 9(4):e1003325.
20. Mülleken K & Hegemann JH (2017) Acquisition of Rab11 and Rab11-Fip2-A novel strategy for *Chlamydia pneumoniae* early survival. *PLoS Pathog* 13(8):e1006556.
21. Zrieq R, Braun C, & Hegemann JH (2017) The *Chlamydia pneumoniae* Tarp Ortholog CPn0572 Stabilizes Host F-Actin by Displacement of Cofilin. *Front Cell Infect Microbiol* 7:511.
22. Hower S, Wolf K, & Fields KA (2009) Evidence that CT694 is a novel *Chlamydia trachomatis* T3S substrate capable of functioning during invasion or early cycle development. *Mol Microbiol* 72(6):1423-1437.
23. McKuen MJ, Mueller KE, Bae YS, & Fields KA (2017) Fluorescence-Reported Allelic Exchange Mutagenesis Reveals a Role for *Chlamydia trachomatis* TmeA in Invasion That Is Independent of Host AHNAK. *Infect Immun* 85(12).
24. Mojica SA, *et al.* (2015) SINC, a type III secreted protein of *Chlamydia psittaci*, targets the inner nuclear membrane of infected cells and uninfected neighbors. *Mol Biol Cell* 26(10):1918-1934.
25. Subtil A, Parsot C, & Dautry-Varsat A (2001) Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery. *Mol Microbiol* 39(3):792-800.

26. Allaoui A, Sansonetti PJ, & Parsot C (1993) MxiD, an outer membrane protein necessary for the secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins. *Mol Microbiol* 7(1):59-68.
27. Menard R, Sansonetti PJ, & Parsot C (1993) Nonpolar mutagenesis of the ipa genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J Bacteriol* 175(18):5899-5906.
28. Bullock HD, Hower S, & Fields KA (2012) Domain analyses reveal that *Chlamydia trachomatis* CT694 protein belongs to the membrane-localized family of type III effector proteins. *J Biol Chem* 287(33):28078-28086.
29. McMahon HT & Boucrot E (2015) Membrane curvature at a glance. *J Cell Sci* 128(6):1065-1070.
30. Zimmerberg J & Kozlov MM (2006) How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(1):9-19.
31. Itoh T, *et al.* (2005) Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Dev Cell* 9(6):791-804.
32. Guerrier S, *et al.* (2009) The F-BAR domain of srGAP2 induces membrane protrusions required for neuronal migration and morphogenesis. *Cell* 138(5):990-1004.
33. Leventis PA & Grinstein S (2010) The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu Rev Biophys* 39:407-427.
34. Hammond GR, Machner MP, & Balla T (2014) A novel probe for phosphatidylinositol 4-phosphate reveals multiple pools beyond the Golgi. *J Cell Biol* 205(1):113-126.
35. Ingolfsson HI, *et al.* (2014) Lipid organization of the plasma membrane. *J Am Chem Soc* 136(41):14554-14559.
36. Ball LJ, Kuhne R, Schneider-Mergener J, & Oschkinat H (2005) Recognition of proline-rich motifs by protein-protein-interaction domains. *Angew Chem Int Ed Engl* 44(19):2852-2869.
37. Kurochkina N & Guha U (2013) SH3 domains: modules of protein-protein interactions. *Biophys Rev* 5(1):29-39.
38. Saksela K & Permi P (2012) SH3 domain ligand binding: What's the consensus and where's the specificity? *FEBS Lett* 586(17):2609-2614.
39. Marsh M & McMahon HT (1999) The structural era of endocytosis. *Science* 285(5425):215-220.
40. Jiang X, Huang F, Marusyk A, & Sorkin A (2003) Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits. *Mol Biol Cell* 14(3):858-870.
41. Visser GD & Lill NL (2005) The Cbl RING finger C-terminal flank controls epidermal growth factor receptor fate downstream of receptor ubiquitination. *Exp Cell Res* 311(2):281-293.
42. Haglund K, Shimokawa N, Szymkiewicz I, & Dikic I (2002) Cbl-directed monoubiquitination of CIN85 is involved in regulation of ligand-induced degradation of EGF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(19):12191-12196.
43. Lundmark R & Carlsson SR (2009) SNX9 - a prelude to vesicle release. *J Cell Sci* 122(Pt 1):5-11.
44. Park J, Zhao H, & Chang S (2014) The unique mechanism of SNX9 BAR domain for inducing membrane tubulation. *Mol Cells* 37(10):753-758.
45. Lleres D, *et al.* (2017) Quantitative FLIM-FRET Microscopy to Monitor Nanoscale Chromatin Compaction In Vivo Reveals Structural Roles of Condensin Complexes. *Cell Rep* 18(7):1791-1803.
46. Long Y, *et al.* (2018) Optimizing FRET-FLIM Labeling Conditions to Detect Nuclear Protein Interactions at Native Expression Levels in Living Arabidopsis Roots. *Front Plant Sci* 9:639.
47. Baumann S, Zander S, Weidtkamp-Peters S, & Feldbrugge M (2016) Live cell imaging of septin dynamics in *Ustilago maydis*. *Methods Cell Biol* 136:143-159.
48. Neumann S & Schmid SL (2013) Dual role of BAR domain-containing proteins in regulating vesicle release catalyzed by the GTPase, dynamin-2. *J Biol Chem* 288(35):25119-25128.

49. Shin N, *et al.* (2008) SNX9 regulates tubular invagination of the plasma membrane through interaction with actin cytoskeleton and dynamin 2. *J Cell Sci* 121(Pt 8):1252-1263.
50. Schoneberg J, *et al.* (2017) Lipid-mediated PX-BAR domain recruitment couples local membrane constriction to endocytic vesicle fission. *Nat Commun* 8:15873.
51. Sochacki KA, Dickey AM, Strub MP, & Taraska JW (2017) Endocytic proteins are partitioned at the edge of the clathrin lattice in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 19(4):352-361.
52. Kaksonen M & Roux A (2018) Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19(5):313-326.
53. Soulet F, Yazar D, Leonard M, & Schmid SL (2005) SNX9 regulates dynamin assembly and is required for efficient clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell* 16(4):2058-2067.
54. Tapia R, Kralicek SE, & Hecht GA (2017) EPEC effector EspF promotes Crumbs3 endocytosis and disrupts epithelial cell polarity. *Cell Microbiol* 19(11).
55. Piscatelli HL, Li M, & Zhou D (2016) Dual 4- and 5-phosphatase activities regulate SopB-dependent phosphoinositide dynamics to promote bacterial entry. *Cell Microbiol* 18(5):705-719.
56. Park J, *et al.* (2010) SNX18 shares a redundant role with SNX9 and modulates endocytic trafficking at the plasma membrane. *J Cell Sci* 123(Pt 10):1742-1750.
57. Luo J, *et al.* (2007) Characterization of hypothetical proteins Cpn0146, 0147, 0284 & 0285 that are predicted to be in the Chlamydia pneumoniae inclusion membrane. *BMC Microbiol* 7:38.
58. Birkelund S, *et al.* (1996) Characterization of two conformational epitopes of the Chlamydia trachomatis serovar L2 DnaK immunogen. *Infect Immun* 64(3):810-817.
59. Mathivet L, Cribier S, & Devaux PF (1996) Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an AC electric field. *Biophys J* 70(3):1112-1121.

4 Teil II: Manuskript II

The *Chlamydia pneumoniae* effector protein CPn0677 recruits the endocytic proteins N-WASP and Syndapin 2 to facilitate host cell entry

Dominik Spona, Gereon Poschmann, Kai Stühler, Katja Moelleken, Johannes H. Hegemann

Erstautor

Beteiligungen:

Dominik Spona (D.S.): 65 %, Gereon Poschmann (G.P.): 4 %, Kai Stühler (K.S.) 1 %, Katja Moelleken (K.M.) 20 %, Johannes H. Hegemann (J.H.H.): 10 %

D.S., K.M. und J.H.H. planten alle Experimente, die in diesem Manuskript dargestellt sind.

D.S. schrieb das Manuskript und K.M. und J.H.H. übernahmen Korrekturarbeiten.

D.S. und K.M. stellten die Figuren und Figuren-Legenden zusammen.

D.S., G.P. und K.M. werteten Daten aus.

G.P. und K.S. haben neue Reagenzien und Analysewerkzeuge beigesteuert.

D.S. und K.M. führten die Experimente aus.

Einzelleistungen zu den Figuren der Veröffentlichung:

D.S. erbrachte die Daten zu folgenden Figuren: Fig. 1 A – F; Fig. 2 A, C, D, E, F, G, H; Fig. 3 A, B, C, D, E, F; Fig. 4 A, B, C; Supl. Fig. 1; Supl. Fig. 2; Supl. Fig. 3; Supl. Fig. 4

G.P. erbrachte die Daten zur folgenden Figur 2 B

K.M. erbrachte die Daten zu folgenden Figuren: Fig. 2 D; Fig. 3 B; Fig. 4 C und D

Hiermit bestätige ich, dass diese Angaben korrekt sind.

Düsseldorf, den 22.03.2021

Dominik Spona

4.1 Zusammenfassung

Alle Arten von Chlamydien durchlaufen einen einzigartigen Entwicklungszyklus, der zwischen extrazellulärer und intrazellulärer Umgebung wechselt und die Notwendigkeit erfordert in Wirtszellen einzudringen. Die Adhäsion und Internalisierung sind somit essenzielle Infektionsschritte. Während der Invasion von Wirtszellen wird das Effektorproteine CPn0677 sezerniert, um die Internalisierung des Pathogens zu erleichtern. In diesem Manuskript wird gezeigt, dass eine N-terminale amphipathische Helix eine Bindung an die humane Plasmamembran vermittelt. Über die N-terminale Polyprolinsequenz interagiert CPn0677 mit Syndapin 2 ein zentrales multifunktionales endozytisches Gerüstprotein. Unabhängig von dieser Interaktion wird durch eine C-terminale alpha-Helix einer Interaktion mit N-WASP etabliert, ein potenter Aktin-Nukleator. Somit wird N-WASP an bakterielle Eintrittsstellen rekrutiert, an denen *C. pneumoniae* über EGFR-vermittelte Endozytose internalisiert wird. Humanzellen mit signifikant reduziertem Syndapin 2 Protein zeigten eine verringerten Infektiosität von *C. pneumoniae*. Außerdem kolokalisiert CPn0677 mit Aktin, was eine Beteiligung des Pathogens am Aktin-Zytoskelett der Wirtszelle zeigt. Somit ist CPn0677 ein sekretiertes Effektorprotein, das an der Endozytose von *C. pneumoniae* beteiligt ist und durch die Interaktion zweier humaner Proteine das Aktin-Zytoskelett für eine effektive Invasion umgestaltet.

The *Chlamydia pneumoniae* effector protein CPn0677 recruits the endocytic proteins N-WASP and Syndapin 2 to facilitate host cell entry

Dominik Spona ^{1,a}, Gereon Poschmann ², Kai Stühler ^{2,3}, Katja Mölleken^{1,a,b}, Johannes H. Hegemann ^{1,b,*}

¹Institute for Functional Microbial Genomics, University of Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany

²Institute for Molecular Medicine, Medical Faculty, Heinrich Heine University Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany

³Molecular Proteomics Laboratory, BMFZ, Heinrich Heine University Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany

* Correspondence should be directed to johannes.hegemann@hhu.de

Abstract

The early steps of a *Chlamydia pneumoniae* infection are accompanied by the secretion of effector proteins. One of those secreted effectors is CPn0677, which facilitates internalization of the pathogen by recruiting host cell proteins and modulating the actin cytoskeleton. In this work, we show that CPn0677 binds to membranes mediated by an N-terminal amphipathic helix with a specificity to Phosphatidylserine. In a two-step mode, the N-terminal polyproline sequence of CPn0677 interacts with Syndapin 2 an adaptor and regulator involved in endocytosis, while a C-terminal alpha helix directly interacts with N-WASP a potent actin nucleator. Interestingly, a reduced Syndapin 2 level leads to a reduced infectivity of *C. pneumoniae*. Moreover, N-WASP is located at the entry site of *C. pneumoniae*. Finally, CPn0677 colocalizes with actin showing an involvement of the pathogen with the actin cytoskeleton of the host cell. Altogether, CPn0677 is a secreted effector protein involved in regulating the endocytosis of *C. pneumoniae* in an actin dependent manner.

Introduction

Members of the *Chlamydiaceae* family are obligate intracellular pathogens that infect animals and humans causing a variety of diseases (1). Within this family *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae* represent the two major human pathogens. A *C. trachomatis* infection can lead to severe urogenital conditions, including ectopic pregnancies and pelvic inflammation, while *C. pneumoniae* causes respiratory disorders such as bronchitis and pneumonia (2, 3). Furthermore, infections with *C. pneumoniae* are linked to several chronic diseases including multiple sclerosis, asthma, Alzheimer's disease, and lung cancer (4–7).

As obligate intracellular pathogens the most critical step in the life cycle of all Chlamydia is the adhesion to and internalization into the host cell. For bacterial entry into the host cell, the “zipper” and the “trigger” mechanism are common strategies. The “zipper” mechanism is described as a bacterial adhesion/invasion event that enables internalization by interacting with a surface receptor followed by activation of the downstream signalling cascade effectively hijacking receptor endocytosis. Via the trigger mechanism, bacterial internalization is achieved by a first rather weak adhesion to the host rapidly followed by translocation of bacterial effector proteins into the host cell cytoplasm by the type three secretion system, having a modulating effect on host cellular processes, eventually facilitating pathogen uptake (8). Both mechanisms involve a plethora of bacterial proteins that are capable of effectively manipulating host cell components of the endocytic pathway. For instance, proteins such as the phosphoinositide-converting enzymes regulating the plasma membrane lipid composition and hence the curvature (9, 10), adaptors and regulators like Syndapin 2 which control endocytosis (11), and actin polymerization initiators like N-WASP by activating the Arp2/3 complex (12) are examples for important host cell proteins involved in endocytic events. Syndapin 2 is a Fes-CIP4 homology, Bin-amphiphysin-Rvs161/167(F-BAR) and Src-homology 3 (SH3) domain-containing protein with membrane remodelling activity and additionally is a potential link between the cortical actin cytoskeleton and endocytosis because it was shown to interact with N-WASP and recruiting the actin machinery (11, 13). Furthermore, N-WASP involvement in pathogenesis of *Shigella* and in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) was shown, highlighting that hijacking those essential endocytic proteins is a universally used entry mechanism by pathogens (14, 15).

Prior to the internalization process, a stable binding to the host cell is necessary. An initial weak binding to the host cell is mediated by OmcB interacting with human heparan sulphate-like proteoglycans (GAGs) (16, 17) followed by a more stable binding to the host cell plasma membrane by members of the polymorphic membrane protein (Pmp) adhesin family. *C. pneumoniae* specifically binds and activates the epidermal growth factor receptor (EGFR) via Pmp21 triggering a signal cascade to facilitate EGFR mediated endocytosis resembling a zipper mechanism (18, 19). Simultaneously the trigger mechanism is used to enter the host cells. Secretion of the *C. pneumoniae* TarP ortholog CPn0572 via the type III secretion (T3S) system leads to binding and polymerization of actin facilitating the bacterial uptake (20). Recently we showed that CPn0678/SemC, a *C. pneumoniae* type 3 secreted effector interacts with the host cell membrane inducing curvature and thus recruits human Sorting nexin 9 to the invasion site, yet another trigger approach to support host cell entry (21).

In this study, we describe CPn0677, a type 3 secreted effector protein employing a trigger mechanism to achieve efficient internalization. We show that CPn0677 binds to negatively charged phospholipids via an N-terminal amphipathic helix (APH). Furthermore, CPn0677 interacts with Syndapin 2, an F-Bar protein involved in endocytosis and membrane remodelling (11, 22). We show that CPn0677 interacts with N-WASP, an actin nucleation promoting factor for the Arp2/3 complex. This interaction is independent of the Syndapin 2 described activation of N-WASP (23). Thus, our data show that CPn0677 secretion during early infection steps of *C. pneumoniae* plays a central role for the uptake of the pathogen.

Results

CPn0677 is a secreted, lipid-binding effector protein. CPn0677 is a *C. pneumoniae*-specific type three secreted effector protein with homology to CPn0678 (21). Based on sequence analysis, comparison to CPn0678 and secondary structure prediction an N-terminally located alpha helix was identified with amphipathic properties ranging from amino acid 49 to 66 now referred as APH (Fig. 1A). Projection of the alpha helix into a helical wheel shows the segregation of hydrophobic and polar residues between two faces of the helix. Analysis of heterologously expressed CPn0677-GFP in epithelial HEp-2-cells revealed a high rate of cytosolic localization (Fig. 1B; 86.7 %) and low rate of a membrane binding phenotype (Fig. 1B; 11.9 %). Surprisingly, 1.4 % of the transfected cells showed a tubular phenotype with lined tubules emanating from the cell plasma membrane into the cytosol. In a truncated version of CPn0677 consisting of amino acids 1 to 138 (Fig. 1A; N1) the phenotype drastically changed to 32.4 % cytosolic localization, 23.5 % membranous localization and 44.1 % tubular phenotype (Fig. 1B; N1). Accordingly, the deletion of the APH (Δ APH) led to a complete loss of the membrane or tubular phenotype resulting in a 100 % cytosolic localization.

To further analyse the lipid binding ability of CPn0677 giant unilamellar vesicles (GUV) were used. The GUVs are based on a standard lipid mix with 69.75 mol% Dipalmitoylphosphatidylcholine (DOPC) and 25 mol% cholesterol stained with Phosphatidylethanolamine conjugated with Texas red (0.25 mol%). To check the lipid specificity during GUV assembly following different phosphatidylinositol's (PIPs) in a concentration of 5 mol% were added: Phosphatidylinositol 3-phosphate (PIP 3), Phosphatidylinositol-4-phosphate (PIP 4), Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP 4,5) or Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP 3,4,5). In case of the phosphatidylserine (PS) containing GUVs the lipid composition was changed to 49.75 mol% DOPC/25 mol% cholesterol/0.25 mol% Texas red and 20 mol% PS. Quantification of the obtained confocal images revealed CPn0677 binding to all tested GUVs with the highest affinity towards PS, a negatively charged lipid most abundant in the PM (24) as well as Phosphatidylinositol-4-

phosphate (PIP 4), a lipid prominent in Golgi membranes, but also representing the precursor of Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP 4,5) (25) (Fig. 1C and D). Deletion of the APH domain (Δ APH) abolished protein binding to all tested GUVs (Fig. 1E and Fig. S1B). Since GUVs are representing an ordered lipid structure in the form of a unilamellar lipid layer consisting of different lipids we were further interested in the binding capability of CPn0677 towards disordered lipid structures with only one lipid.

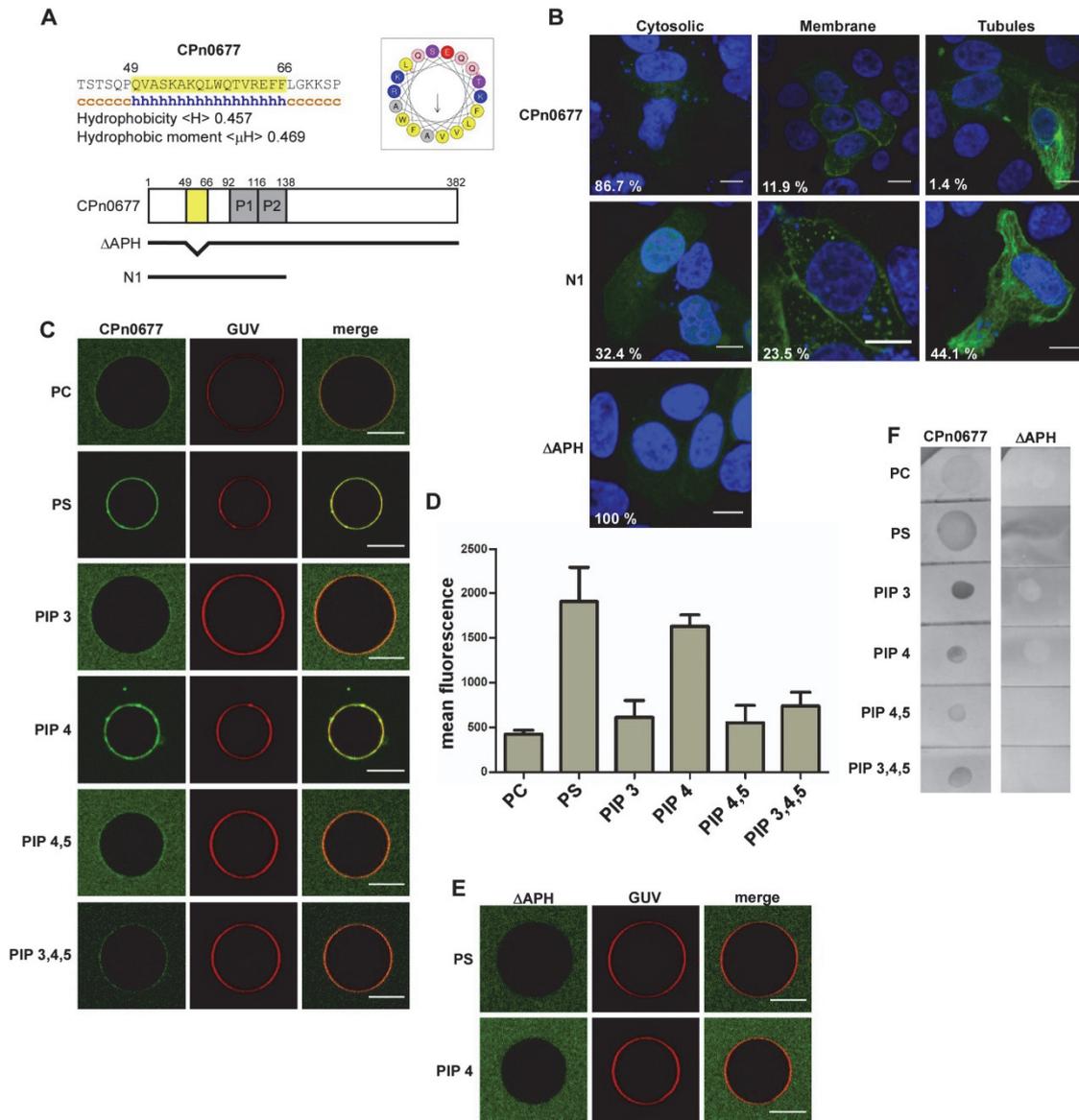


Figure 1: The N-terminal APH of CPn0677 mediates lipid binding.

(A) The region containing amino acid residues 43 to 72 of CPn0677 was analysed for hydrophobicity, hydrophobic moment and amino acid composition using HeliQuest (heliquest.ipmc.cnrs.fr) showing a segment with a strong amphipathic character (amino acids 49 to 66, highlighted in yellow) represented as a helical wheel (APH) with amphipathic amino acids in yellow and polar residues in blue. Secondary-structure prediction with GORIV (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html) revealed the presence of an α -helix (amino acids 49 to 65, represented by blue "h"). Schematic representation of the fragments of CPn0677, which were C terminally fused with GFP and used in transfection experiments. (B) Confocal images of cells expressing CPn0677-GFP variants (CPn0677, N1 and Δ APH). Percentages indicate the occurring phenotype in 300 transfected cells quantified for each variant. (Scale bars 10 μ m.). (C, D and E) Protein binding assay to artificial membranes using FITC-labelled recombinant CPn0677 or Δ APH and texas

red stained GUVs consisting of the indicated lipids. **(C)** Confocal images of GUVs incubated for 10 min with rCPn0677. (Scale bars 10 μm .). **(D)** Quantification of microscopic analyses of recombinant protein binding to GUVs expressed as the mean fluorescence of sets of 50 individual GUVs. Data are presented as means \pm SD ($n = 3$). **(E)** Confocal images of GUVs incubated for 10 min with r Δ APH. (Scale bars, 10 μm .). **(F)** Membrane lipid strip assay with recombinant CPn0677 variants (CPn0677 and Δ APH) Membrane lipid strips were incubated with 1 $\mu\text{g/ml}$ His-tagged proteins and analysed with anti-His antibody. Controls are shown in figure S1.

Therefore, PIP Strips were used to further verify the observed results. As positive controls we used the recombinant Lactadherin C2 domain for PS (26), a 2xFYVE zinc finger domain as positive control for PIP 3 (27) and PLC δ PH domain for high affinity to PIP 4,5 and weaker affinity to PIP 4 and PIP 3,4,5 (28) (Fig. S1A). In contrast to the GUV experiments the highest affinity for CPn0677 was towards PIP 3, nevertheless a binding to all tested lipids was observed. Deletion of the APH leads to the loss of lipid binding function as seen before (Fig. 1E).

The host cell protein Syndapin 2 interacts with CPn0677. Proline-rich regions (PRR) represent a platform for protein-protein interactions. Since CPn0677 harbours two of those regions within its N-terminal region we searched for potential interaction partners directly associated with the PRRs (29) (Fig. 1A). To tackle this question a quantitative mass spectrometry analysis was performed. Using transfected Human epithelial type 2 (HEp-2) cells, interacting proteins were enriched with an affinity pulldown and co-purified using a CPn0677-GFP fusion protein as bait and GFP expressing cells as controls (Fig. 2A). As interacting human proteins we identified (i) Sorting Nexin 9 (SNX9), an endocytic accessory protein involved in clathrin-mediated endocytosis (30), (ii) the ubiquitin-specific protease 9X (USP9X), a deubiquitylating enzyme involved in several cellular processes; (iii) N-WASP (WASL) a nucleation-promoting factor for the ubiquitously expressed Arp 2/3 complex (23), (iv) WAS/WASL-interacting protein family members 1 and 2 (WIPF 1 and 2) which play a role in the recruitment and activation of N-WASP (32), and (v) Syndapin 2 and 3 (PACSIN 2 and 3) functioning in different endocytic and vesicle trafficking pathways (13) (Fig. 2B).

For CPn0678 it is documented that an interaction with human endocytic SNX9 is established between the first PRR of CPn0678 and the Src-homology 3 (SH3) domain of SNX9 (21). Based on these findings we hypothesized a similar interaction mode between CPn0677 and the SH3 domain from Syndapin and therefore we examined the potential interaction partner in more detail (33). We chose to test Syndapin 2 since it is ubiquitously expressed in all cells in contrast to Syndapin 3 that mostly is expressed in muscle tissue (34). To check our hypothesis transfection experiments were performed with CPn0677 and Syndapin 2 in HEp-2 cells. Single transfection of CPn0677-GFP showed the prior observed cytosolic localization. Transfection of mCherry-Syndapin 2 shows a similar cytosolic localization (Fig S2A). In cotransfection studies with cells expressing CPn0677-GFP + mCherry-Syndapin 2 a colocalization between those two proteins was observed (Fig. 2D, marked by white arrowheads) indicating a direct interaction. The N1 version of CPn0677

with both PRR showed the previously observed tubular phenotype with a distinct colocalization of Syndapin 2 in those tubules (Fig. 2D). On the other hand, both C1 and Δ P1 (Fig. 2C) indicated no distinctive colocalization with Syndapin 2 highlighting that the interaction domain most likely is present in the N-terminal part of CPn0677.

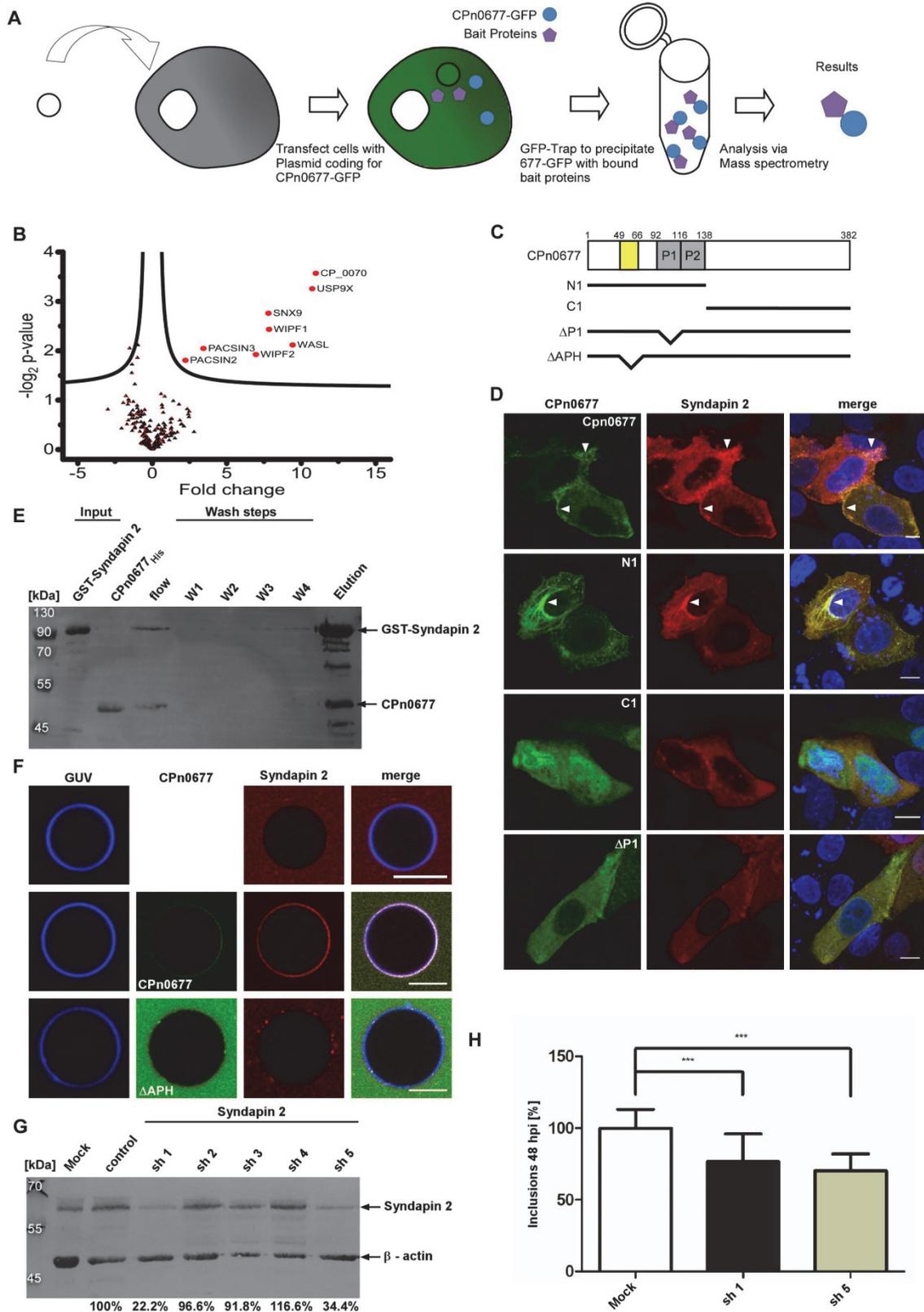


Figure 2: CPn0677 interacts with host Syndapin 2.

(A) Schematic overview of the process of generating the samples for mass spectrometry analysis. (B) Volcanoplot of proteins enriched by CP_0070 (CPn0677) affinity purification. Proteins from CP_0070-GFP purifications (n=3) showing higher intensities in comparison to GFP-only controls (n=3) are represented by big red dots. The fold change represents the difference of mean values of log₂ LFQ intensities (CP_0070-GFP minus GFP), the black line marks the cut-off for significant altered proteins as calculated the significance analysis of microarrays method. (C) Schematic representation of the fragments of CPn0677 which were C terminally fused with GFP and used in transfection and GUV experiments. (D) Confocal images of cells coexpressing CPn0677-GFP variants (CPn0677, N1, C1 and ΔAPH) and mCherry-Syndapin 2. (Scale bars 10 μm.). (E) Pulldown experiment using purified recombinant CPn0677_{10His} and GST-Syndapin 2. Input and Elution samples obtained from GST-pulldowns were fractionated by SDS/PAGE and probed with anti-GST and anti-His antibodies. (F) Confocal images of DOPS GUVs incubated for 10 min with recombinant Alexa 594 dyed Syndapin 2 and additionally added FITC stained rCPn0677 variants (CPn0677 and ΔAPH. (Scale bars 10 μm.). (G) Immunoblot of cell lysates expressing shRNAs against Syndapin 2. Lysates fractionated by SDS/PAGE and probed with antibodies against Syndapin 2 and beta-actin. Actin served as the loading control. Signal intensity was quantified with ImageJ and expressed as a percentage of the actin signal. (n = 3). (H) *C. pneumoniae* infection of HEp-2 cells depleted of Syndapin 2 by stably integrated shRNA plasmids. Quantification of internalization of EBs into cells used in G at 48 hpi based on the examination of 5 visual fields. Data are represented as means ± SD (n = 6, ***P ≤ 0.001).

Though, those results not necessarily indicate a direct interaction between Syndapin 2 and CPn0677. To further analyse the initial interaction, we purified recombinant protein and conducted *in vitro* pulldown experiments, thus verifying the CPn0677-Syndapin 2 interaction (Fig. 2E and Fig. S2B). Syndapin 2 is described as an F-Bar protein with the ability to bind and tubulate membranes (35, 36). To further investigate the involvement of membranes in this interaction we performed additional GUV experiments. As expected, we did not observe binding of recombinant Syndapin 2 to DOPS GUVs over a time scale of 10 min (Fig. 2F). Strikingly, when FITC-labelled CPn0677 was added to GUVs preincubated with Syndapin 2 we observed immediate binding (Fig. 2F). To demonstrate the linkage of the CPn0677 – Syndapin 2 interaction in connection to the *C. pneumoniae* infection we created five HEp-2 Syndapin 2-knockdown cell lines, with a successful knockdown of Syndapin 2 in cell line one and five (Fig. 2G and Fig. S2C). We observed in both cell lines a reduced number of inclusion in direct comparison to the control of about 30 % after 48 hpi, which shows that Syndapin 2 is important for the *C. pneumoniae* infection (Fig. 2H).

The CPn0677-N-WASP interaction is independent of Syndapin 2. The Syndapin family proteins are well-known interactors of N-WASP linking the cortical actin cytoskeleton machinery to endocytosis (22). As previously described our mass spectrometric analysis revealed N-WASP as a potential interaction candidate. We next wanted to test if N-WASP is involved in the *C. pneumoniae* infection and whether the interaction is dependent on the described Syndapin 2 – N-WASP interaction. A bioinformatical analysis showed evidence of an additional α-helix ranging from amino acid 135 to 166 with a conserved N-WASP binding motif (LPPIAQALKDMLA). A nearly identical motif can be found in the human protein Nck1 and in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) effector protein EspFu, both Proteins are described to interact with the BR_CRIB domain of N-WASP (15, 37, 38). Since this motif is present within CPn0677 we hypothesized it as a potential binding domain

to N-WASP. To test our hypothesis, we performed several transfection experiments with different truncated variants of CPn0677 and cotransfected those variants with N-WASP (Fig. 3A). In case of CPn0677 full length a patch like colocalization with N-WASP in the cytosol of HEP-2 cell was observed (Fig. 3B).

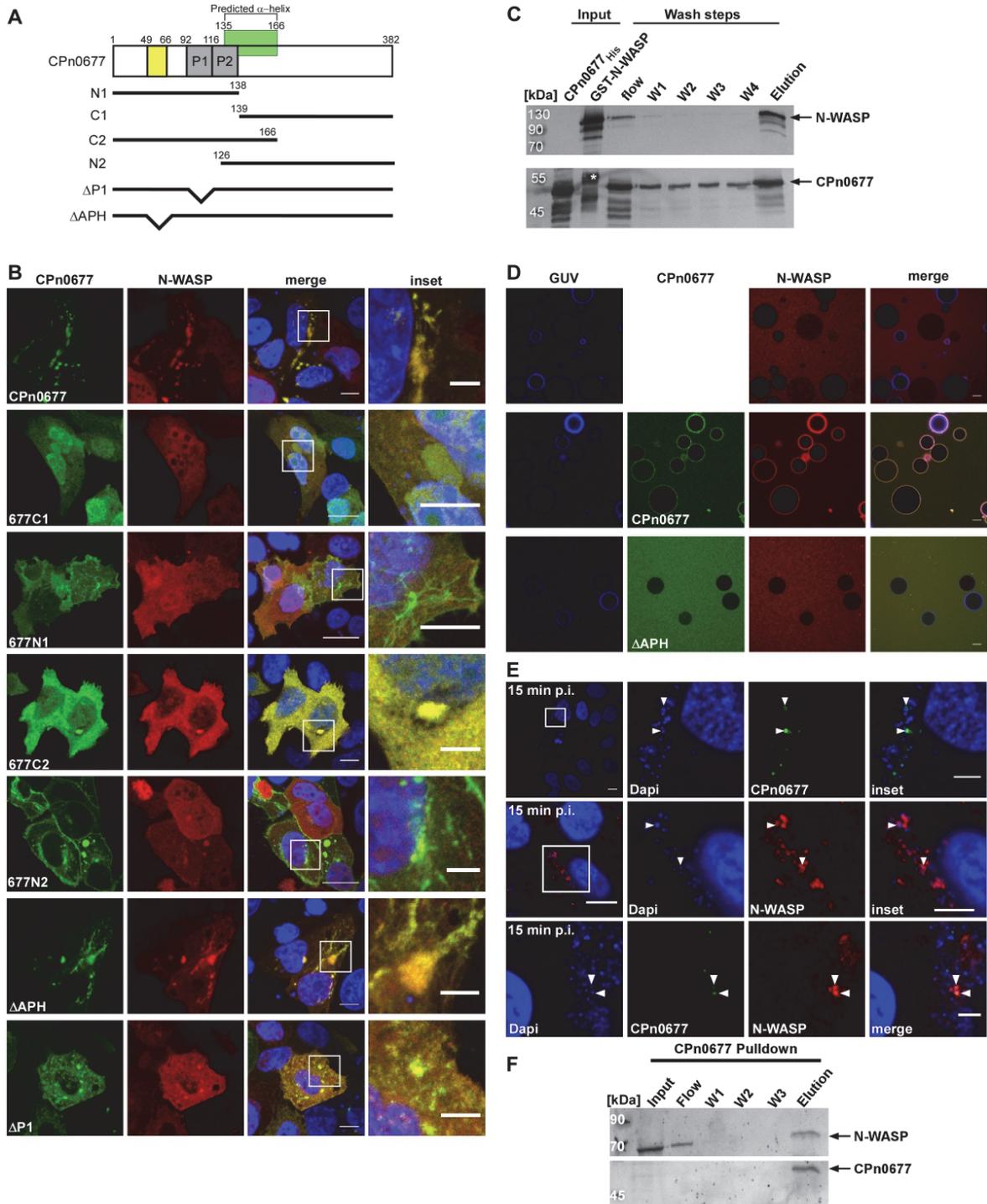


Figure 3: CPn0677 recruits and interacts with N-WASP.

(A) Schematic representation of the fragments of CPn0677 which were C terminally fused with GFP and used in transfection and GUV experiments. Secondary-structure prediction with GORIV (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html) revealed the presence of an α -helix ranging from amino acid 135 to 166 (highlighted in green). (B) Confocal images of cells coexpressing CPn0677-GFP variants (CPn0677, C1, N1, C2, N2, Δ APH and Δ P1) and mCherry-N-WASP. Insets show regions in white squares (Scale bars 10 μ m; 5 μ m in Insets). (C) Pull-down experiment using purified recombinant CPn0677^{10His} and

GST-N-WASP. Input and Elution samples obtained from GST-pulldowns were fractionated by SDS/PAGE and probed with anti-GST and anti-His antibodies. **(D)** Confocal images of DOPS GUVs incubated for 10 min with recombinant Alexa 594 dyed N-WASP and additionally added FITC stained rCPn0677 variants (CPn0677 and Δ APH). (Scale bars 10 μ m.). **(F)** Coimmunoprecipitation of HEp-2 cells infected with *C. pneumoniae* EBs (MOI 100). Cell lysates were incubated with μ MACS protein G microbeads coupled to antibodies directed against CPn0677. Elution samples were fractionated by SDS/PAGE and detected with the appropriate antibodies.

Remarkably neither N1, N2 nor C1 showed any colocalization with N-WASP. Only in the case of the C2 variant a patch like colocalization could be observed. Due to the overall cytosolic expression phenotype the visual colocalization effect is not as convincing as in the full-length variant. Interestingly both Δ APH and Δ P1 show a comparable colocalization as observed in the full-length variant (Fig. 3B). The microscopic analyses showed a colocalization between N-WASP and CPn0677, which is independent of the APH or the PRRs and therefore most likely independent of Syndapin 2. Since colocalization is not a prove for a direct interaction, we performed pulldown experiments using recombinant protein, showing that N-WASP and CPn0677 indeed interact independently of Syndapin 2 (Fig. 3F). To test if the N-WASP recruitment to membranes via CPn0677 is performed likewise the recruitment of Syndapin 2 we utilized GUVs. N-WASP was applied to GUVs over a time scale of 10 and was unable to bind to DOPS-GUVs. As soon as CPn677 was added a recruitment of N-WASP to the CPn0677 positive GUVs was observed. Once again, this process is dependent on the APH lipid binding domain of CPn0677.

To demonstrate the endogenous situation of this interaction we first analysed the localization of CPn0677 during early steps of EB invasion. Indeed, 15 min post infection, we detected a ring like association of CPn0677 surrounding chlamydial EBs and a patch like association of N-WASP (Fig. 3E). This is further underlined by direct colocalization of both proteins with invading *C. pneumoniae* EBs. Next, we verified the endogenous interaction by performing a coimmunoprecipitation assay on HEp-2 cells. We coprecipitated N-WASP using a specific antibody against CPn0677 and vice versa (Fig. 3F and Fig. S3B).

N-WASP and CPn0677 interaction is accompanied by actin accumulation. To further determine the essential domains responsible for N-WASP – CPn0677 interaction various pulldown experiments were conducted using the GFP-Trap system. Here, we used GFP-fused CPn0677 or N-WASP variants as bait to pull the mCherry-N-WASP or CPn0677-mCherry full length proteins. As a result, we precipitated mCherry-N-WASP when used CPn0677 full length and the C2 variant. Indicating that the alpha helical structure with the N-WASP binding motif might be responsible for the interaction. While C1 and N1 did not precipitated N-WASP. Using the GFP tagged N-WASP variants, only the BR_CRIB domain was able to coimmunoprecipitate CPn0677-mCherry (Fig. 4B and Fig. S4A). This result indicates a similar binding fashion as the already published interaction mode for the secreted EHEC effector protein EspFu (15, 37).

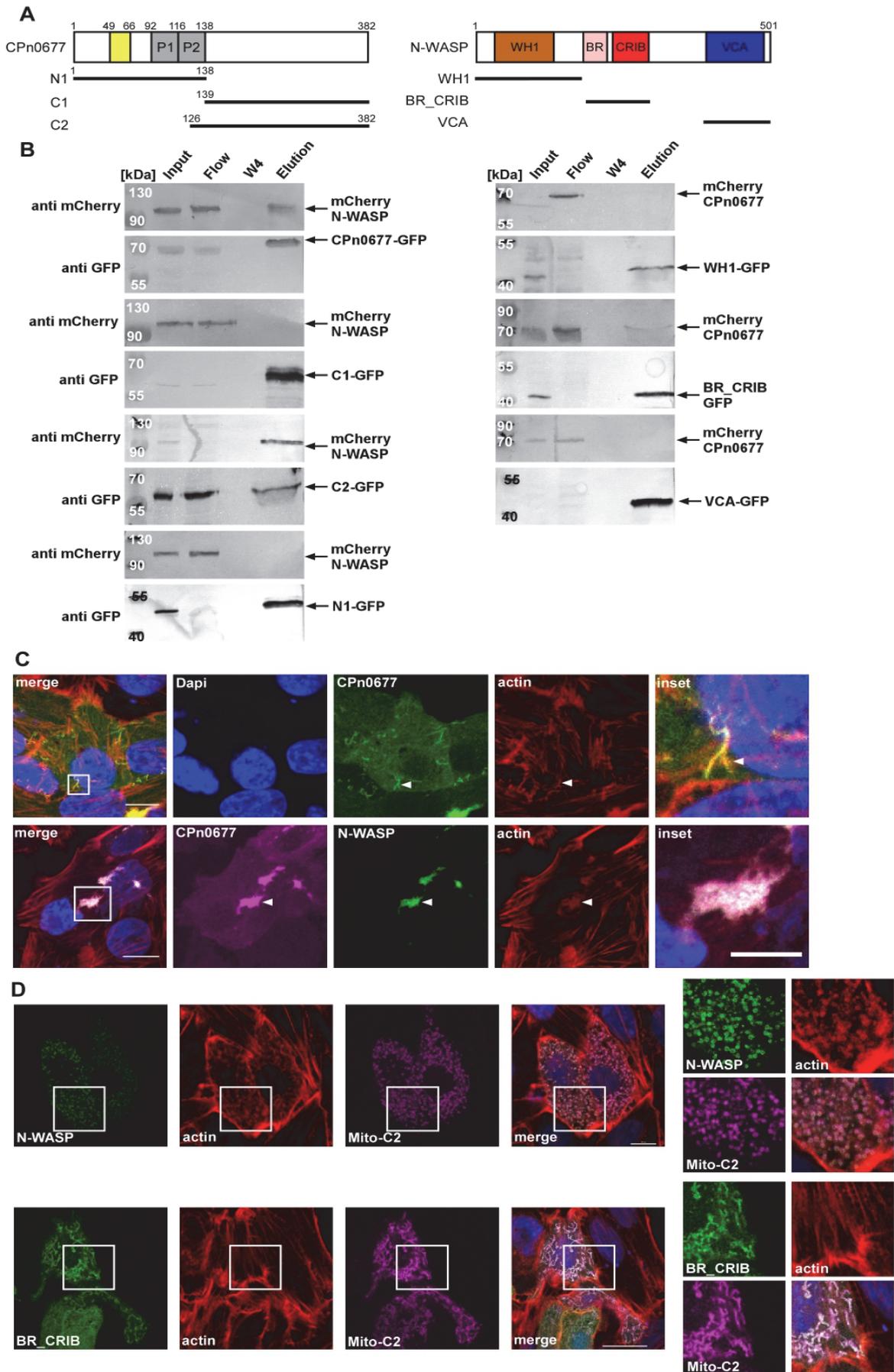


Figure 4: Interaction of N-WASP and CPn0677 is accompanied by recruitment of actin.

(A) Schematic representation of the fragments of CPn0677 and N-WASP which fused with GFP and mCherry used in transfection and GFP-Pulldown experiments. **(B)** Coimmunoprecipitation of HEp-2 cells cotransfected with CPn0677-GFP variants (CPn0677, N1, C1 and C2) and mCherry-N-WASP or N-WASP-GFP variants (WH1, BR_CRIB and VCA) with CPn0677-mCherry. Cell lysates were incubated with GFP-Trap Agarose pulling GFP tagged proteins. Input and Elution samples were fractionated by SDS/PAGE and detected with the appropriate antibodies. **(C)** Confocal images of cells expressing CPn0677 or coexpressing CPn0677 and N-WASP. Cells were stained with Rhodamine phalloidin to visualize the actin cytoskeleton. White arrowheads indicate spots of colocalization. *Insets* show regions in white squares. (Scale bars 10 μ m; 5 μ m in *Insets*). **(D)** Confocal images of cells coexpressing GFP-N-WASP variants (N-WASP and BR_CRIB) and CPn0677 fused to a mitochondria localization signal sequence. Cells were stained with Rhodamine phalloidin to visualize the actin cytoskeleton. *Insets* show regions in white squares. (Scale bars 10 μ m).

N-WASP is also described as an activator of the Arp2/3 complex, a potent actin nucleator complex that branches actin filaments to create a dendritic actin network (12).

Interestingly, we also observed a colocalization of actin in CPn0677 transfected cells in tubular manner. In cotransfected cells with CPn0677 and N-WASP the actin network is disrupted and colocalizes in big patches with both proteins indicating that the host cell actin cytoskeleton is modulated (Fig. 4C). For a better visualization of the actin colocalization we decided to fuse the C2 variant to a mitochondria targeting signal forcing the fusion protein to bind to the mitochondria membrane in a circular manner around the mitochondria (Fig. S4B). In cotransfected cells with C2 and N-WASP and staining of the actin network a colocalization around the mitochondria was observed. When only the BR_CRIB domain was expressed together with C2 no actin redistribution to the mitochondria could be seen. Indeed, showing that the actin localization is dependent on the activation of the Arp2/3 complex mediated by the VCA domain of N-WASP (39). Taken together these results highlight that N-WASP is a direct interactor of CPn0677 and by activating the Arp2/3 complex can modulate the host cell actin cytoskeleton.

Discussion

The *C. pneumoniae* internalization into the host cell is a crucial process during infection. To mediate this process several effector proteins are secreted into host cell cytoplasm (21, 40, 41). In this work we describe the *C. pneumoniae*-specific effector CPn0677 displaying membrane binding capability and interaction with host cell N-WASP and Syndapin 2, two major components of clathrin-mediated receptor endocytosis (42, 43).

During clathrin-mediated uptake of particles, Syndapin 2 is considered facilitating the mid to late process of endocytosis. The N-terminal F-BAR domain senses membrane curvature and binds to phospholipids. Furthermore, interaction with N-WASP is mediated by its C-terminal SH3 domain thus forming a link between the PM and the actin cytoskeleton (13). Binding of N-WASP links this actin nucleating factor, that in turns activates the Arp2/3 complex, to the membrane resulting in massive actin polymerization at this endocytic site. The generated pushing force then enhances the scission process of endocytic vesicles (12, 44).

Based on our results, we propose that CPn0677 acts as a scaffold protein by mediating a stable binding to two host cell proteins Syndapin 2 and N-WASP, which are recruited to the EB entry site. For successful EB uptake a stable binding of those endocytic proteins is necessary. Physiological clathrin-mediated receptor endocytosis in epithelial cells generates vesicles with a diameter of 30 nm to 120 nm (44), while chlamydial EBs have a diameter of ~400 nm, which poses a major challenge for the endocytic machinery. Thus, after secretion, CPn0677 binds to the inner leaflet of the host cell PM anchoring Syndapin 2 to the PM since the larger formed vesicle implies significantly less curvature, which may restrict Syndapin 2 binding to the PM on its own. Even though Syndapin 2 can recruit N-WASP during regular endocytosis events CPn0677 independently recruits N-WASP to the PM. Therefore, localizing N-WASP in proximity to Syndapin 2, which in turn may enable the interaction between Syndapin 2 and N-WASP resulting in the release of N-WASP autoinhibition. Hence activating N-WASP and allowing it to in turn activate Arp2/3 complex results in actin polymerization (45). Recruitment of N-WASP and Syndapin 2 is accompanied by additional endocytic components targeted by both proteins, such as Dynamin for neck constriction and EHD-containing proteins, which are key conductors of endocytic transport (30, 46, 47).

We have shown that CPn0677 uses its APH domain to bind synthetic membranes (GUVs). Ectopic expression of the CPn0677-N1 variant in human cells generates an extreme membrane tubulation phenotype colocalizing with Syndapin 2. This shows that the Syndapin 2-interacting domain is located within the N-Terminus of CPn0677. Ectopic expression of the CPn0677-C2 variant recruits N-WASP and shows a disturbed actin cytoskeleton phenotype creating actin patches within the cell, highlighting that the interaction domain is within the C-terminus of CPn0677. The mode of interaction with both endocytic proteins therefore is independent and CPn0677 can interact solely with N-WASP or Syndapin 2. Furthermore, stable depletion of Syndapin 2 by shRNA reduces *C. pneumoniae* EB uptake significantly indicating the necessity of this protein for EB internalization. These observations imply that, during internalization, secreted CPn0677 redirects Syndapin 2 and N-WASP function to PM regions underneath chlamydial entry sites, which in turn promotes the uptake of EBs.

In conclusion, we speculate that the chlamydial effector CPn0677 manipulates core processes of endocytosis by binding of the PM underneath invading *Chlamydiae*. Followed by the regular recruitment of endocytic proteins to the entry sites, CPn0677 binds and anchors Syndapin 2 and N-WASP to the PM. The CPn0677-N-WASP-Syndapin 2 interaction is direct and independent. Together the three proteins promote formation of a vesicle that is large enough to accommodate an EB and stimulate its endocytosis by locally activating the actin machinery.

Acknowledgments

We thank the Jürgen Manchot Foundation for support by a graduate fellowship.

Declaration of interest

The authors declare no competing interests.

Materials and Methods

Antibodies and reagents. The primary antibodies against N-WASP (PA5-52198), anti-Syndapin 2 (PA5-83983), anti-mCherry (MA5-32977) and anti α -actin (MA5-15739) were purchased from Invitrogen, anti-penta-His (#34660) from Qiagen, anti-GST (#2622) from Cell Signaling and anti-GFP (3H9) from Chromotek. The primary antibody against CPn0677 was generated by Eurogentec. Secondary anti-rabbit, anti-mouse and anti-rat coupled to Alexa488 or Alexa594 were purchased from Thermo Scientific and those coupled to alkaline phosphatases were purchased from Promega. Rhodamine-Phalloidin was obtained from Thermo Scientific, and SiR-Tubulin from Spirochrome. All lipids used in this study were obtained from Avanti lipids, and Texas red dye, NHS-FITC, DyLight650NHS and DAPI from Thermo Scientific. Trypsin, Cell Dissociation Solution Non-enzymatic and Gentamicin was sourced from Sigma-Aldrich. μ MACS Protein G MicroBeads were obtained from Miltenyi, His-Tag Purification Resin and Pierce Glutathione Agarose from Roche. GFP-Trap resin was purchased from Chromotek.

Quantitative mass spectrometric analysis

Proteins were prepared for mass spectrometric analysis by in-gel digestion essentially as described (48). Resulting peptides were separated on a rapid separation liquid chromatography system (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific) using a one h gradient and C18 columns as described (49). Peptides were directly injected into a QExactive plus mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) using a nano-source interface. The mass spectrometer was operated in positive, data-dependent mode. For recording precursor spectra following settings were used: spectrum resolution: 70000, advanced gain control target: 3000000, maximum ion time 50 ms, scan range 200 to 2000 m/z, profile mode. Up to 20 2-5fold charged precursors were selected (4 m/z isolation window), fragmented by higher-energy collisional dissociation and analysed: spectrum resolution: 17500, advanced gain control target: 100000, maximum ion time 50 ms, available scan range 200 to 2000 m/z, profile mode. Already fragmented precursors were excluded from further isolation for the next 10 seconds. Resulting raw files were further analysed using MaxQuant (version 1.6.3.4, MaxPlanck Institute for Biochemistry, Planegg, Germany) for peptide and protein

identification and quantification with standard parameters if not otherwise stated. Peptides and proteins were identified at a false discovery rate of 1%. Quantitative data was further processed with Perseus (Version 1.6.2.2, MaxPlanck Institute for Biochemistry, Planegg, Germany). Here, log₂ transformed LFQ-intensity values were used. Missing values were filled in with values from a downshifted normal distribution (width 0.3, downshift 2.5 standard deviations) and p-values calculated by Student's t-tests which were combined with the significance analysis of microarrays approach for cut-off determination ($S_0 = 0.2$, 10% false discovery rate).

Cultivation of cell lines, bacteria, and propagation of *Chlamydia*. HEp-2 cells (ATCC: CCL-23) and HEK293-T cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, MEM vitamins, non-essential amino acids amphotericin B (2,5 µg/ml) and gentamicin (50 µg/ml) at 37°C in an atmosphere containing 6% CO₂. HEp-2 cells were used for propagation of the *C. pneumoniae* GiD strain. EB purification was done using a 30% gastrografin solution and stored in SPG buffer (220 mM sucrose, 3.8 mM KH₂PO₄, 10.8 mM Na₂HPO₄, 4.9 mM L-glutamine) as previously described (50). Plasmid cloning was done by *in vivo* homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. The *E. coli* strains BL21 (DE3, Invitrogen), Origami (DE 3, Novagen) and XL-1 Blue (Stratagene) were used for protein purification and plasmid amplification.

Generation of stable cell lines expressing shRNA using Lentivirus. Plasmids for Generation of Lentiviral particles were obtained from Addgene, plasmids coding shRNA against Syndapin 2 were obtained from Merck (TRCN0000037979, TRCN0000037980, TRCN0000037981, TRCN0000037982 and TRCN0000037983). HEK293-T cells were seeded in a 6 well plate and grown overnight to a confluency of 60 – 70 %. Cotransfection of the transfer plasmid, packing plasmid and the envelope plasmid was done using Turbofect (Thermo Scientific). Lentiviral Virus for delivering shRNA into cells were propagated in HEK293-T cells as described (51)

Plasmid constructs, cloning procedures

For protein expression and transfection, *cpn0677* was amplified from *C. pneumoniae* GiD genomic DNA and integrated into pSL4, pKM55 or pKM95 to generate C-terminal 10His-Tag, GFP-tagged or mCherry-tagged constructs. *Cpn677*ΔAPH, ΔP1 N1, N2, C1, C2 and Mito-C2 were amplified by PCR from WT and integrated into pSL4, pKM55 or pKM95. GST-Syndapin 2 and GST-N-WASP were generated by cloning the Syndapin 2 and N-WASP coding sequences into the *Bam*HI and *Not*I sites of pGEX5X.1. The GFP-N-WASP variants (WH1, BR_CRIB and VCA) were amplified from a WT construct and fused to GFP by integration into pKM55. Tom20 mitochondria tracker was obtained from Addgene. Syndapin 2 shRNA plasmids used for generation of stable cell lines were obtained by Merck.

Giant unilamellar vesicle (GUV) preparation and microscopical analysis

GUVs were prepared as described in (52). Briefly, lipid mixtures of (74,75 mol %, 20 -25 mol % cholesterol, 5 mol % PIPs, 20 mol % DOPS and 0,25 mol % Texas Red) were prepared and added into a chamber build of ITO coated slides (Präzisions Glas & Optik) fixed together with Vitrex (Vitrex Medical). Cavity in between the slides was filled with 10% Sucrose Solution and sealed with Vitrex. The slides were coupled with clamps on a frequency generator and a voltage of 11 Hz, and 02.0 Vp-p was applied. The GUVs were grown for 2 – 3 h in the dark at room temperature. For microscopic analysis μ -slides (Ibidi) are coated for 5-10 min RT with beta casein (2mg/ ml) and washed with PBS. 10 μ l GUV solution is mixed with 30 μ l PBS and added to the slides to allowed GUVs to settle down. 2 μ g labelled recombinant protein is added and incubated for 15 min at RT. Images were acquired and quantified using ImageJ. For each lipid and protein 50 GUVs were analysed for their maximum fluorescence intensity on the membrane.

Microscopy and image processing

General imaging was performed using an inverse Nikon TiE Live Cell Confocal C2plus with 100 x TIRF objective and a C2 SH C2 Scanner. All images were generated with Nikon NIS Elements software and quantified using ImageJ.

Co-immunoprecipitation using μ MACS Protein G MicroBeads and GFP-Trap

HEp-2 cells were cultivated to 100% confluency in 6-well plates and infected with gradient-purified *C. pneumoniae* EBs (MOI 100) by centrifugation for 20 min (25°C at 2900 rpm). After centrifugation, cells were shifted to 37°C and grown under 6% CO₂ for 15 min. Infected cells were washed three times with HBSS and lysed with Phospho-Lysis buffer (1% NP40, 1% Triton X100, 20 mM Tris, 140 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM Na₂VO₄, Merck Protease Inhibitor Cocktail). The lysate was cleared by centrifugation for 10 min at 4°C at 10,000 g . The supernatant was mixed with Protein G MicroBeads (Miltenyi Biotec) that had been preincubated with the specific antibodies used for the Pulldowns. Co-IP assays of co-transfected cells were performed using GFP-Trap following manufacturers protocol. Eluted proteins were resolved by SDS/PAGE and detected by immunoblot.

Pulldown assay

Recombinant His- or GST-tagged proteins were expressed in *E. coli* BL21 and purified according to the manufacturer's protocols for *cOmplete* His-Tag purification resin (Roche) and Pierce Glutathione Agarose (Thermo Scientific). Aliquots (200 μ g) of purified protein were incubated for 2 h at 4°C with either His-Tag purification resin or Glutathione Agarose, then 200 μ g of the test protein was added and incubated for an additional 2 h at 4°C or the incubation sequence was reversed. The mixture was washed four times with PBS containing 50 mM imidazole (Merck) or 50 mM TRIS/HCL pH 8 (Merck). Eluted fractions were collected by adding 100 μ l of 500 mM imidazole in PBS or 50 mM TRIS/HCL and 10 mM reduced glutathione in PBS, resolved by SDS/PAGE and detected by immunoblot.

Immunofluorescence staining

Transfected and/or infected cells were fixed at the indicated time points with 3% paraformaldehyde in PBS (PFA) for 10 min, then washed three times with PBS, and permeabilized with either 100% methanol for 10 min, 0,3% Triton and 0,1% Tween or with 2% saponin (Merck) in PBS for 15 min at rt. Depending on the permeabilization protocol, primary antibodies were diluted in PBS, in 0.5% saponin solution, or 5% BSA and incubated for 60 min at rt or 37°C. Cells were washed three times with PBS with or without 0.5% saponin and incubated with secondary antibodies (anti-rabbit/mouse Alexa488/594) for 60 min at rt or 37°C in PBS with or without 0.5% saponin. DAPI was used to visualize DNA.

Infection experiments

HEp-2 cells either stably expressing, or transiently transfected with, the appropriate constructs were infected with *C. pneumoniae* EBs (MOI 1) by short centrifugation as described before, then shifted to 37°C for 2 h before the infection medium was replaced by fresh medium and the cells were incubated for 48 h. The number of inclusions formed was quantified by confocal imaging, using an antibody directed against the inclusion membrane protein Cpn0147 and anti-rabbit Alexa594, as described previously.

Internalization assay

HEp-2 cells stably expressing the appropriate constructs were cultivated to 70% confluency in 24-well plates on glass coverslips (Ø 1 cm²), then infected with purified *C. pneumoniae* EBs (MOI 5) by centrifugation for 20 min (25°C at 2900 rpm). After centrifugation, cells were shifted to 37°C and grown under 6% CO₂ for 2 h, washed three times with PBS and fixed with 3% paraformaldehyde in PBS (PFA) for 10 min. Internalization rates were determined by immunostaining with anti-Chlamydia and anti-rabbit Alexa488 and DAPI. Cells were imaged by confocal microscopy and internalization ratios were determined by counting external Alexa488-positive and all DAPI-positive bacteria.

Supplementary Figures

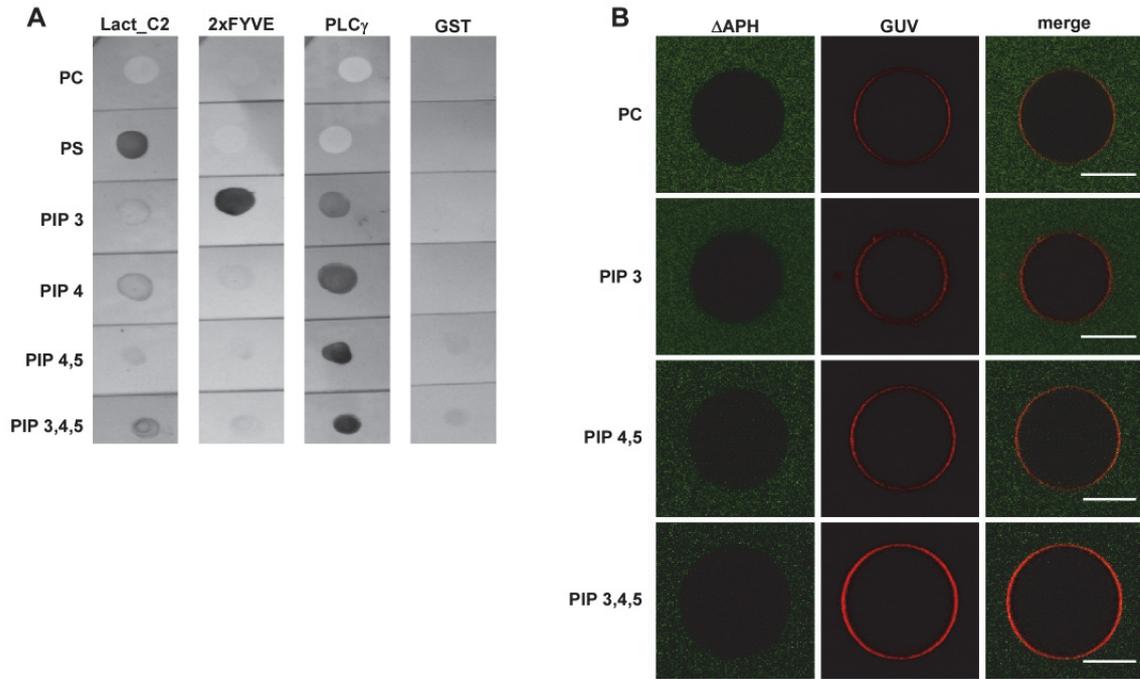


Figure S1:

(A) Membrane lipid strip assay with recombinant Lact_C2, 2xFYVE, PLC γ and GST. Membrane lipid strips were incubated with 1 μ g/ml His-tagged proteins and analysed with anti-His antibody. (B) Protein binding assay to artificial membranes using FITC-labelled recombinant Δ APH and texas red stained GUVs consisting of the indicated lipids. Confocal images of GUVs incubated for 10 min with rCPn0677. (Scale bars 10 μ m).

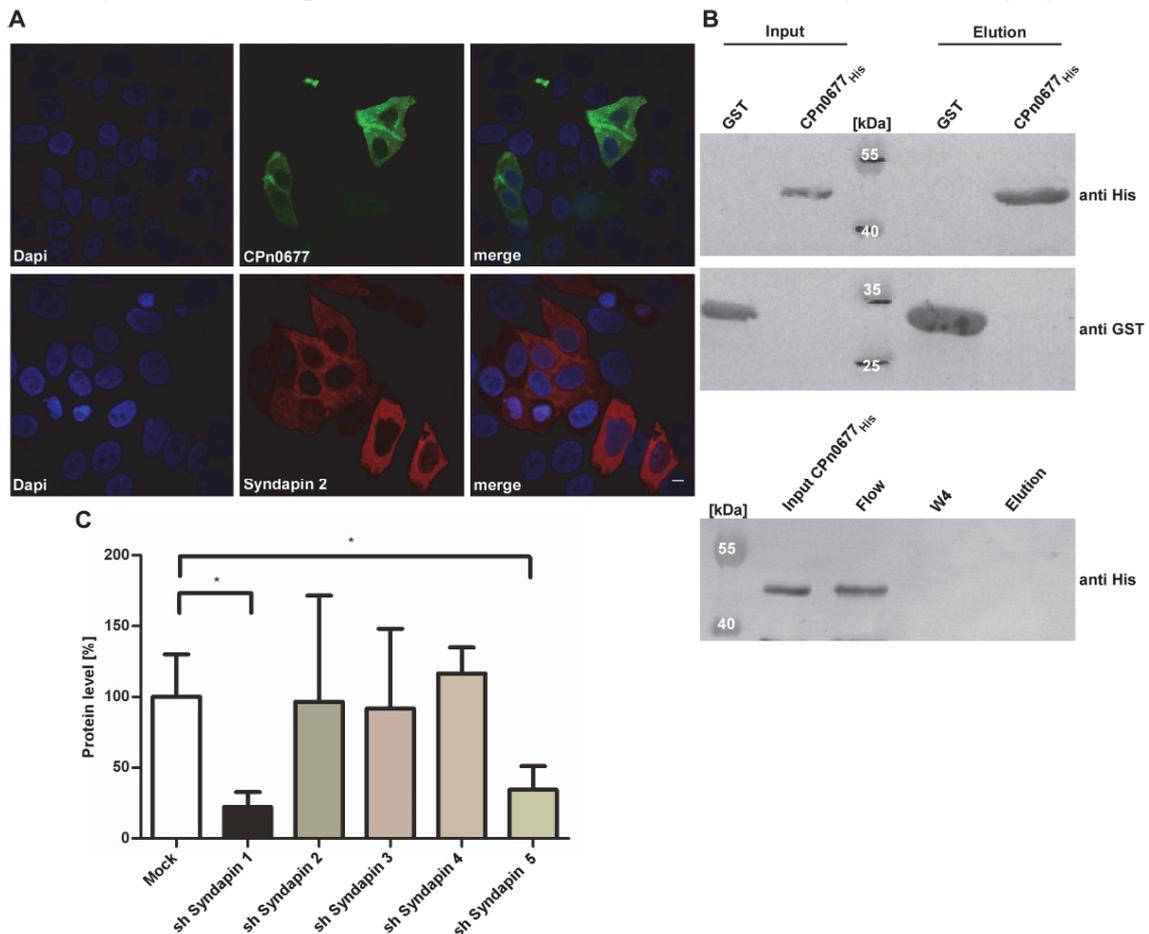


Figure S2:

4. Wilmore C. Webley, David L. Hahn, Infection-mediated asthma: etiology, mechanisms and treatment options, with focus on *Chlamydia pneumoniae* and macrolides. *Respir Res* 18, 1–12 (2017).
5. P. Zhan, L. J. Suo, Q. Qian, X. K. Shen, L. X. Qiu, L. K. Yu, Y. Song, *Chlamydia pneumoniae* infection and lung cancer risk: a meta-analysis. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 47 (2011).
6. D. Cossu, K. Yokoyama, N. Hattori, Bacteria–Host Interactions in Multiple Sclerosis. *Front. Microbiol.* 9, 2966 (2018).
7. B. J. Balin, C. J. Hammond, C. S. Little, S. T. Hingley, Z. Al-Atrache, D. M. Appelt, J. A. Whittum-Hudson, A. P. Hudson, *Chlamydia pneumoniae*: An Etiologic Agent for Late-Onset Dementia. *Frontiers in Aging Neuroscience* 10 (2018).
8. P. Cossart, A. Helenius, Endocytosis of viruses and bacteria. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6 (2014).
9. Bethany A. Weigele, Robert C. Orchard, Alyssa Jimenez, Gregory W. Cox, Neal M. Alto, A systematic exploration of the interactions between bacterial effector proteins and host cell membranes. *Nat Commun* 8, 1–14.
10. M. M. Weber, R. Faris, Subversion of the Endocytic and Secretory Pathways by Bacterial Effector Proteins. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6 (2018).
11. M. M. Kessels, B. Qualmann, The syndapin protein family: linking membrane trafficking with the cytoskeleton. *J Cell Sci* 117, 3077–3086 (2004).
12. Max Rodnick-Smith, Qing Luan, Su-Ling Liu, Brad J. Nolen, Role and structural mechanism of WASP-triggered conformational changes in branched actin filament nucleation by Arp2/3 complex. *PNAS* 113, E3834–E3843 (2016).
13. Annie Quan, Phillip J. Robinson, Syndapin – a membrane remodelling and endocytic F-BAR protein. *The FEBS Journal* 280, 5198–5212 (2013).
14. D. A. Adamovich, F. Nakamura, A. Worth, S. Burns, A. J. Thrasher, J. H. Hartwig, S. B. Snapper, Activating mutations of N-WASP alter *Shigella* pathogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 384, 284–289 (2009).
15. Nathan A. Sallee, Gonzalo M. Rivera, John E. Dueber, Dan Vasilescu, R. Dyche Mullins, Bruce J. Mayer, Wendell A. Lim, The pathogen protein EspF U hijacks actin polymerization using mimicry and multivalency. *Nature* 454, 1005–1008 (2008).
16. S. Fadel, A. Eley, *Chlamydia trachomatis* OmcB protein is a surface-exposed glycosaminoglycan-dependent adhesin. *Journal of medical microbiology* 56, 15–22 (2007).
17. K. Moelleken, J. H. Hegemann, The *Chlamydia* outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding. *Molecular microbiology* 67, 403–419 (2008).
18. K. Mölleken, E. Schmidt, J. H. Hegemann, Members of the Pmp protein family of *Chlamydia pneumoniae* mediate adhesion to human cells via short repetitive peptide motifs. *Molecular microbiology* 78, 1004–1017 (2010).
19. K. Mölleken, E. Becker, J. H. Hegemann, The *Chlamydia pneumoniae* invasin protein Pmp21 recruits the EGF receptor for host cell entry. *PLOS Pathogens* 9, e1003325 (2013).
20. Rafat Zrieq, Corinna Braun, J. Hegemann, The *Chlamydia pneumoniae* Tarp Ortholog CPn0572 Stabilizes Host F-Actin by Displacement of Cofilin. *undefined* (2017).
21. Sebastian Hänsch, Dominik Spona, Gido Murra, Karl Köhrer, Agathe Subtil, Ana Rita Furtado, Stephan F. Lichtenthaler, Bastian Dislich, Katja Mölleken, Johannes H. Hegemann, *Chlamydia*-induced curvature of the host-cell plasma membrane is required for infection. *PNAS* 117, 2634–2644 (2020).
22. M. M. Kessels, B. Qualmann, Syndapins integrate N-WASP in receptor-mediated endocytosis. *The EMBO Journal* 21, 6083–6094 (2002).
23. Olga Alekhina, Ezra Burstein, Daniel D. Billadeau, Cellular functions of WASP family proteins at a glance. *J Cell Sci* 130, 2235–2241 (2017).
24. P. A. Leventis, S. Grinstein, The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annual review of biophysics* 39 (2010).

25. G. R. Hammond, M. P. Machner, T. Balla, A novel probe for phosphatidylinositol 4-phosphate reveals multiple pools beyond the Golgi. *The Journal of cell biology* 205 (2014).
26. D. E. Otzen, K. Blans, H. Wang, G. E. Gilbert, J. T. Rasmussen, Lactadherin binds to phosphatidylserine-containing vesicles in a two-step mechanism sensitive to vesicle size and composition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1818, 1019–1027 (2012).
27. H. Stenmark, R. Aasland, P. C. Driscoll, The phosphatidylinositol 3-phosphate-binding FYVE finger. *FEBS Letters* 513, 77–84 (2002).
28. W. S. Park, W. D. Heo, J. H. Whalen, N. A. O'Rourke, H. M. Bryan, T. Meyer, M. N. Teruel, Comprehensive Identification of PIP3-Regulated PH Domains from *C. elegans* to *H. sapiens* by Model Prediction and Live Imaging. *Molecular cell* 30, 381–392 (2008).
29. L. J. Ball, R. Kühne, J. Schneider-Mergener, H. Oschkinat, Recognition of proline-rich motifs by protein-protein-interaction domains. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 44 (2005).
30. N. Bendris, S. L. Schmid, Endocytosis, metastasis and beyond: Multiple facets of SNX9. *Trends in cell biology* 27, 189–200 (2016).
31. M. Murtaza, L. A. Jolly, J. Gecz, S. A. Wood, La FAM fatale: USP9X in development and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 72, 2075–2089 (2015).
32. N. Ramesh, Im Antón, J. H. Hartwig, R. S. Geha, WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (1997).
33. L. Luo, J. Xue, A. Kwan, R. Gamsjaeger, J. Wielens, L. von Kleist, L. Cubeddu, Z. Guo, J. L. Stow, M. W. Parker, J. P. Mackay, P. J. Robinson, The Binding of Syndapin SH3 Domain to Dynamin Proline-rich Domain Involves Short and Long Distance Elements*. *The Journal of Biological Chemistry* 291, 9411–9424 (2016).
34. J. Modregger, B. Ritter, B. Witter, M. Paulsson, M. Plomann, All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis. *Journal of Cell Science* 113, 4511–4521 (2000).
35. Yosuke Senju, Yuzuru Itoh, Kazunori Takano, Sayaka Hamada, Shiro Suetsugu, Essential role of PACSIN2/syndapin-II in caveolae membrane sculpting. *J Cell Sci* 124, 2032–2040 (2011).
36. Yijian Rao, Qingjun Ma, Ardeschir Vahedi-Faridi, Anna Sundborger, Arndt Pechstein, Dmytro Puchkov, Lin Luo, Oleg Shupliakov, Wolfram Saenger, Volker Haucke, Molecular basis for SH3 domain regulation of F-BAR-mediated membrane deformation. *PNAS* 107, 8213–8218 (2010).
37. Hui-Chun Cheng, Brian M. Skehan, Kenneth G. Campellone, John M. Leong, Michael K. Rosen, Structural mechanism of WASP activation by the enterohaemorrhagic *E. coli* effector EspF U. *Nature* 454, 1009–1013 (2008).
38. J. Okrut, S. Prakash, Q. Wu, M. J. S. Kelly, J. Taunton, Allosteric N-WASP activation by an inter-SH3 domain linker in Nck. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, E6436-45 (2015).
39. A. E. Kelly, H. Kranitz, V. Dötsch, R. D. Mullins, Actin Binding to the Central Domain of WASP/Scar Proteins Plays a Critical Role in the Activation of the Arp2/3 Complex*s. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 10589–10597 (2006).
40. R. Zrieq, C. Braun, J. H. Hegemann, The Chlamydia pneumoniae Tarp Ortholog CPn0572 Stabilizes Host F-Actin by Displacement of Cofilin. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 511 (2017).
41. M. Herrmann, A. Schuhmacher, I. Mühldorfer, K. Melchers, C. Prothmann, S. Dammeier, Identification and characterization of secreted effector proteins of Chlamydia pneumoniae TW183. *Research in Microbiology* 157, 513–524 (2006).
42. Stefanie Benesch, Simona Polo, Frank P. L. Lai, Kurt I. Anderson, Theresia E. B. Stradal, Juergen Wehland, Klemens Rottner, N-WASP deficiency impairs EGF

- internalization and actin assembly at clathrin-coated pits. *Journal of Cell Science* 118, 3103–3115 (2005).
43. B. Qualmann, R. B. Kelly, Syndapin Isoforms Participate in Receptor-Mediated Endocytosis and Actin Organization. *The Journal of cell biology* 148, 1047–1062 (2000).
 44. M. Kaksonen, A. Roux, Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 19 (2018).
 45. E. Dharmalingam, A. Haeckel, R. Pinyol, L. Schwintzer, D. Koch, M. M. Kessels, B. Qualmann, F-BAR Proteins of the Syndapin Family Shape the Plasma Membrane and Are Crucial for Neuromorphogenesis. *The Journal of Neuroscience* 29, 13315–13327 (2009).
 46. N. Naslavsky, S. Caplan, EHD proteins: Key conductors of endocytic transport. *Trends in cell biology* 21, 122–131 (2011).
 47. A. Braun, R. Pinyol, R. Dahlhaus, D. Koch, P. Fonarev, B. D. Grant, M. M. Kessels, B. Qualmann, EHD Proteins Associate with Syndapin I and II and Such Interactions Play a Crucial Role in Endosomal Recycling. *Molecular Biology of the Cell* 16, 3642–3658 (2005).
 48. L. Grube, R. Dellen, F. Kruse, H. Schwender, K. Stühler, G. Poschmann, Mining the Secretome of C2C12 Muscle Cells: Data Dependent Experimental Approach To Analyze Protein Secretion Using Label-Free Quantification and Peptide Based Analysis. *Journal of proteome research* 17, 879–890 (2018).
 49. G. Poschmann, K. Seyfarth, D. Besong Agbo, H.-W. Klafki, J. Rozman, W. Wurst, J. Wiltfang, H. E. Meyer, M. Klingenspor, K. Stühler, High-fat diet induced isoform changes of the Parkinson's disease protein DJ-1. *Journal of proteome research* 13, 2339–2351 (2014).
 50. D. Li, A. Vaglenov, T. Kim, C. Wang, D. Gao, B. Kaltenboeck, High-yield culture and purification of Chlamydiaceae bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 61, 17–24 (2005).
 51. R. Zufferey, D. Nagy, R. J. Mandel, L. Naldini, D. Trono, Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nature biotechnology* 15 (1997).
 52. L. Mathivet, S. Cribier, P. F. Devaux, Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an AC electric field. *Biophysical Journal* 70, 1112–1121 (1996).

5 Teil III: Weitere Ergebnisse

5.1 Einleitung und Zusammenfassung bisheriger Ergebnisse

Durch frühere Experimente konnte gezeigt werden, dass sowohl CPn0677 als auch CPn0678 Typ 3 sekretierte Effektorproteine sind und eine wichtige Rolle in der frühen *C. pn.* Infektion übernehmen, indem sie an der Aufnahme der EBs beteiligt sind (214, 216). Im ersten Manuskript wurde die Rolle von CPn0678 während der frühen Infektion untersucht. Durch biochemische Experimente wurde nachgewiesen, dass CPn0678 über eine N-terminale APH in der Lage ist, Phospholipide in synthetischen und in der humanen Membran zu binden. Zusätzlich besitzt die APH eine Membran-krümmende Funktion, wodurch humanes SNX9 zur chlamydialen Infektionsstelle rekrutiert wird. Durch die erste konservierte PRR im C-Terminus wird eine stabile Bindung mit der SH3-Domäne von SNX9 etabliert. Dies ist eine relevante Interaktion für die Infektion, da Zellen mit einem SNX9 Knockdown eine signifikant verringerte Infektiosität im Vergleich zur Kontrolle aufweisen. Auch die ektopische Expression von CPn0678 in humanen Epithelzellen hat einen dominant negativen Effekt auf eine darauffolgende Infektion und verringert signifikant die Aufnahme von *C. pn.* EBs.

Im zweiten Manuskript wurde die Funktion von CPn0677 während der Infektion von Humanzellen detailliert analysiert. CPn0677 und CPn0678 besitzen Homologien im N-terminalen Teil der Proteine (Abb. 11). CPn0677 hat ebenfalls eine APH, die in der Lage ist, Phospholipide zu binden, und identische Lipidpräferenzen aufweist wie die APH von CPn0678. Trotz der Ähnlichkeit der beiden Proteine im N-Terminus zeigt sich bei CPn0677 ein gänzlich anderer Wirkungsmechanismus in der Infektion. Durch im C-Terminus befindliche PRRs kann CPn0677 mit Syndapin 2 interagieren, einem Membran-modulierenden und Endozytose-relevanten F-BAR-Protein. Durch die Etablierung einer Syndapin 2-Knockdown-Zelllinie konnte die Relevanz von Syndapin 2 für die *C. pn.* Infektion nachgewiesen werden, da die Zellen eine verringerte Infektiosität von *C. pn.* im Vergleich zur Kontrolle zeigten. Unabhängig von diesem Interaktionsmechanismus rekrutiert und interagiert CP0677 mit dem humanen Protein N-WASP, einem potenten Aktin-Nukleator, welcher in der Endozytose von Humanzellen involviert ist. Sowohl N-WASP als auch Syndapin 2 können durch CPn0677 in GUV-Experimenten zur Membran rekrutiert werden. Durch initiale Experimente konnte auch bestätigt werden, dass das Aktin-Zytoskelett in diese Prozesse involviert ist und voraussichtlich auch in diesem Kontext an der Internalisierung von chlamydialen EBs beteiligt ist.

5.2 Zielsetzung

Außer den im zweiten Manuskript beschriebenen Interaktionspartnern konnte bei der quantitativen massenspektrometrischen Analyse eine Vielzahl von weiteren potenziellen Interaktionspartnern identifiziert werden. Diese werden in diesem Teil der Arbeit teilweise analysiert. Durch die ektopische Expression in humanen Epithelzellen von CPn0677 bzw. CPn0678, zusammen mit den identifizierten humanen Proteinen, sollte zunächst eine mögliche Kollokalisierung überprüft werden. Sofern diese Ergebnisse erste Hinweise auf räumliche Nähe lieferten, wurden biochemische Proteininteraktionsstudien durchgeführt, um die Ergebnisse zu verifizieren und die potenziellen Interaktionspartner zu bestätigen.

In vorherigen Studien wurde postuliert, dass CPn0678 Oligomere ausbildet und ein biologisch stabiles Trimer formt (216). Deshalb wurden Experimente mit nativ gefaltetem rekombinantem Protein durchgeführt, um die mögliche Oligomerisierung zu untersuchen. Zu CPn0677 gibt es bezüglich einer möglichen Oligomerisierung keine Daten, weshalb das Protein ebenfalls auf eine mögliche Oligomerisierung untersucht wurde.

Abschließend wurde der Effekt der EGF-induzierten Endozytose auf die Lokalisation von ektopisch exprimierten CPn0677 untersucht. Der Signalweg der EGFR-vermittelten Endozytose wird in der *C. pn.* Infektion durch Bindung des Adhäsins Pmp21 aktiviert (187). Ergebnisse in diesem Kontext lassen Rückschlüsse auf das Infektionsgeschehen zu und beleuchten die Funktionsweise von CPn0677 während der frühen Infektion.

5.3 Material

5.3.1 Gebrauchsmaterialien

Tab. 1: Verwendete Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterialien	Hersteller
1,5 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt
2,0 ml Mikroschraubröhrchen	Sarstedt
2,0 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt
Deckgläschen ø 12 mm	Roth
Dialyseklammern	Pierce/Roth
Dialyseschlauch (Ausschlussgröße 12 - 14 kDa)	Serva
Einmalspritzen Luer-Gewinde	Bio-Rad
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad
Falcon 15 ml und 50 ml	Sarstedt
Fernbachkolben (1 L)	Duran
Filtereinheit mit Leur-Gewinde (0,2 µm), steril	Whatman
Filterpapiere Blotting PAD 707	VWR International
Glasbecher (1 L und 500 ml)	Duran
Glasflaschen (2 L, 1 L, 500 ml, 250 ml und 100 ml)	Duran/Schott
Glaskolben (5 L, 500 ml, 350 ml und 100 ml)	Duran
Glasperlen ø ~ 0,5 mm	Braun
HiTrap™ 5 ml Chelating HP	GE Healthcare
Küvette, Polystyrol	Sarstedt
Latexhandschuhe	Meditrade
NativePAGE™ Novex® Bis-Tris Gel	Life Technologies
Nitrilhandschuhe	VWR
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt
Petrischalen	Sarstedt
pH-Indikatorstreifen	Matchery-Nagel
Pipettenspitzen (1-10 µl, 2 -200 µl und 100 – 1000 µl)	Sarstedt
Protein-Säulen/Polyethylen Filterstopfen	Thermo Scientific
PVDF Transfer Membran	Millipore
Reagenzglas	Duran/Schott
Superdex™ 200 Increase 3.2/300 GL Säule	GE Healthcare
Ultra-Zentrifugationsröhrchen	Beckmann
Zellkulturflasche (75 cm ² und 25 cm ²)	Thermo Scientific
Zellkulturplatte (24-Well und 6-Well)	Thermo Scientific
Zellkultur-Zentrifugationsröhrchen (12 ml)	Greiner
Zellschaber	Nunc
Zentrifugationsröhrchen	Korex

5.3.2 Geräte und Maschinen

Tab. 2: Verwendete Geräte und Maschinen

Geräte und Maschinen	Hersteller
- 80 °C Freezer Modell 720	Thermo Electron Corporation
ÄKTA Explorer	GE Healthcare
Analysenwaage Cubis H110	Satorius
Bio Photometer-plus	Eppendorf
Blotapparatur G2 Fast Blotter	Pierce
Brutschrank HEPA-Class 100	Thermo Electron Corporation
Electrophoresis Power Supply EPS 301 und EPS 601	Amersham Biosciences
Elektroporationsapparatur Gene Pulser	Bio-Rad
FACSaria 2	BD biosciences
Feinwaage	Scaltec
Geldokumentationssystem	Bio-Rad
Gene Controller	Bio-Rad
Gene Pulser	Bio-Rad
Heiz-/Magnetrührer RH basic 2	IKA-Werke GmbH & CO. KG
Homogenisator Preccellys 24	Bertin technologies
Inkubator (30 °C)	Memmert
Inkubator (37 °C)	Heraeus
Laborwaage TE3102S	Satorius
Magnetrührer KMO 2 basic	IKA-Werke GmbH & CO. KG
Mikropipette Pipetman (0 – 2 µl)	Gilson
Mikropipette Pipetman (2 – 20 µl)	Gilson
Mikropipette Pipetman (20 – 200 µl)	Gilson
Mikropipette Pipetman (100 – 1000 µl)	Gilson
Mikroskop Axiovert 25C	Zeiss
Mikroskop Eclipse Ti-E mit A1R confocal laser	Nikon
Mikrowelle	Bosch
Nano-Drop 2000C	Peqlab
PCR-Thermocycler PTC-200	MJ Research
pH-Meter WTW pH720	inoLab
Photometer DU-800 Spectrophotometer	Beckmann
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Schüttler Unitron	Infors
SDS-Elektrophorese Apparatur SE-260	Hofer
Sicherheitswerkbank Herasafe	Heraeus
Speed-Vac Vacuum-Konzentrator SC110	Savant
Thermo Electron Corporation	Applied Biosystems
Thermoblock West 6100	West Instruments
Ultraschallstab Sonoplus HD2200	Bandelin
Ultraschallwasserbad RK102H	Bandelin
Vortex-Genie 2	Scientific Industries

Geräte und Maschinen	Hersteller
Wasserheizbad	Grant
XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System	Thermo Fisher
Zangenschweißgerät 100GE	Polystar
Zentrifuge Avanti J-25, Rotoren: JLA10.500, JA25-50	Beckmann
Zentrifuge Beckmann J2-21, Rotoren: JA10, JA20	Beckmann
Zentrifuge Biofuge pico, Rotor #3324	Heraeus
Zentrifuge Biofuge Primo R, Rotor #7593	Heraeus
Zentrifuge Megafuge 1.0R, Rotor #3360	Heraeus
Zentrifuge Multifuge 3SR+	Heraeus
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich

5.3.3 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
µMACS™ Protein G Beads	Miltenyi Biotec
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)	Sigma
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30) Roth	Roth
Adenin	Roth
Agar	Difco
Agarose	Biozym
Alanin	Merck
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Ammoniumsulfat	Roth
Ampicillin	Sigma
Arginin	Fluka
Asparagin	Merck
Asparaginsäure	Merck
Biofreeze	AppliChem
Blue 1,2-Dihexadecanoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoethanolamine	Thermo Fisher
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
Calciumchlorid	Riedel-deHaën
Chloramphenicol	Merck
Cholesterol	Merck
Ciprofloxacin	SantaCruz
Coomassie Brilliant Blau G250	Merck
Cycloheximid	Sigma
Cystein	Merck
D (+) -Galaktose	AppliChem

Bezeichnung	Hersteller
D (+) -Glucose	Roth
D (+) -Raffinose	Sigma
Desoxynucleosid-5`-Triphosphate (dNTPs)	Fermentas
Diisopropylfluorphosphat (DFP)	Arcos Organics
Dimethylformamid (DMF)	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem
DMEM GlutaMAX™	Invitrogen
Essigsäure	Roth
Ethanol (96 %)	VWR
Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)	Roth
Ethylendiamintetraacetat (Na ₂ -EDTA)	AppliChem
Ficoll	GE Healthcare
Fötale Kälberserum (FKS)	Invitrogen
Fungizone (Amphotericin B)	Invitrogen
Gastrographin	Schering
Gentamicin	Invitrogen
GFP-Trap Agarose	Chromotek
Glutamin	Merck
Glutaminsäure	Sigma
Glutathion-Agarose	Sigma
Glycerin	Roth
Glycin	AppliChem
Guanidin	Serva
Hanks' Salzlösung (HBSS)	Invitrogen
Harnstoff	Sigma
Hefe Stickstoff Basis (YNB)	Difco
Hefeextrakt	Bacto
Heparin	Sigma
Histidin	Roth
Imidazol	Appllichem
Inositol	Sigma
Isoleucin	Roth
Isopropanol	Roth
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Thermo Scientific
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumacetat	Grüssing
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
L (+) -Arabinose	Sigma
Lachssperma-DNA (Carrier-DNA)	Sigma
Leucin	Roth
Lithiumacetat	Roth

Bezeichnung	Hersteller
Lysin	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
MEM Nicht-essenzielle Aminosäuren	Invitrogen
MEM Vitaminlösung	Invitrogen
Methanol	Riedel-deHaën
Methionin	Merck
Methyl- β -Cyclodextrin	Sigma
Milchpulver	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	VWR
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Riedel-deHaën
Natriumhydroxid	VWR
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma
N-Lauroylsarcosine (Sarkosyl)	Sigma
Para-Aminobenzoessäure	Fluka
Para-Formaldehyd (PFA)	Fluka
Pepton	Bacto
Phenylalanin	Acros Organics
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Phosphoethanolamin	Avanti Lipids
Phospholipid 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin	Avanti Lipids
Phospholipid L-a-phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat	Avanti Lipids
Phospholipid L-a-phosphatidylinositol-3-phosphat	Avanti Lipids
Phospholipid L-a-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat	Avanti Lipids
Phospholipid L-a-phosphatidylinositol-4-phosphat	Avanti Lipids
Phospholipid Phosphatidsäure	Life Technologies
Phospholipid TexasRed-1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3	Avanti Lipids
Plasmocin	InvivoGen
Polyethylenglykol 3350 (PEG)	Roth
Prolin	Merck
Protease-Inhibitor-Cocktail (EDTA frei)	Roche
Puffer für Restriktionsenzyme (diverse)	Fermentas
Reduziertes L-Glutathion	Sigma
Roti-Phenol	Roth
Saccharose	Roth
Salzsäure	Merck
Tetracyclin	Sigma
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Threonin	Merck
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Roth

Bezeichnung	Hersteller
Triton X-100	Merck
Trypton	Difco
Tryptophan	AppliChem
TurboFect™	Thermo Scientific
Tween 20	Merck
Tyrosin	AppliChem
Uracil	Roth
Valin	AppliChem
Vectashield (<i>Anti-fade, mountig fluid</i>)	Linias
Vitaminlösung	Invitrogen
Xylencyanol	Serva
Zell-Dissoziations-Lösung	Sigma

5.3.4 Lösungen und Puffer

Tab. 4: Verwendete Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
4 x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
4 x Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS
BSA Blockierungslösung	5 % BSA 0,05 % Tween 20 in PBS
Coomassie-Lösung	0,008 % (w/v) CBB-G-250 35 mM HCl in ddH ₂ O
Detektionspuffer	0,1 M Tris/HCl pH 9,5 0,1 M NaCl 50 mM MgCl ₂ in ddH ₂ O
DNA-Blaumarker	0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylen-Cyanol FF 15 % Ficoll 10 mM Tris/HCl 10 mM EDTA
Farbsubstratpuffer	0,33 % BCIP 0,33 % NBT in Detektionspuffer

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
GFP-Trap Dilution/Wash buffer	10 mM Tris/Cl pH 7.5 150 mM NaCl 0.5 mM EDTA
Kopplungspuffer	0,5 M NaCl 0,2 M NaHCO ₃ in Wasser pH 8,6
Laufpuffer	0,05 M Tris 0,2 M Glycin in ddH ₂ O
Lithiumacetat	1M Lithiumacetate pH 8,4-8,9 in ddH ₂ O
Lysepuffer	1 mM PMSF 1 mM DIFP 0,2 mg/ml Lysozym 0,3 % Sarkosyl 0,3 % Triton X100 0,01 % Protease Inhibitor in PBS
Milch Blockierungslösung	3 % Milchpulver 0,05 % Tween 20 in PBS
NaPi (0,1 M Natriumphosphat-Puffer)	77,4 mM Na ₂ HPO ₄ 22,6 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7,4 (HCl/NaOH)
Native PAGE Anoden Puffer	10 ml 20x Native PAGE Laufpuffer 1 ml Kathoden Additive ad 200 ml ddH ₂ O
Native PAGE Kathoden Puffer	50 ml 20x Native PAGE Laufpuffer ad 1 L ddH ₂ O
Native PAGE Laufpuffer (20 x)	50 mM Bis Tris 50 mM Tricine pH 6.8
Native PAGE Proben Puffer (4 x)	6 N HCl 50 mM NaCl 10 % Glycerol 0.001 % Ponceau S 50 mM Bis Tris pH 7,2
NBT-Lösung	5 % (w/v) in 70 % DMF

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
PEG (Polyethylenglykol)	50 % (w/v) PEG in ddH ₂ O
PFA Stocklösung	30 % (w/v) PFA 60 mM NaOH in PBS
Phosphate Buffered Saline (PBS)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ in ddH ₂ O
Phospho-Lysis Puffer	1 % Triton X100 1 % NP40 40 mM EDTA 1 mM NaVO ₄ 20 mM TrisHCl pH 7,5
Protein-Ladepuffer (4-fach)	200 mM Tris/HCl pH 6,9 8 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 20 % Glycerin
Puffer B	8 M Harnstoff 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris pH 8,0 (HCl/NaOH)
Puffer C	8 M Harnstoff 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris pH 6,3 (HCl/NaOH)
Puffer P1	50 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0 100 µg/ml RNase in ddH ₂ O
Puffer P2	200 mM NaOH 1 % SDS in ddH ₂ O
Puffer P3	2,55 M KOAc in ddH ₂ O
SNaPi (Saccharose-Natriumphosphat-Puffer)	4 % Saccharose in NaPi-Puffer
SPG-Puffer (Saccharose-Phosphat-Glutaminsäure) (1 L)	75 g Saccharose 0,52 g KH ₂ PO ₄ 1,53 g Na ₂ HPO ₄ 0,72 g Glutaminsäure pH 7,5

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
TBE-Puffer (pH 7,5, pH7,8 pH8; pH9,5)	89 mM Tris/HCl 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
Transferpuffer (Westernblot)	25 mM Tris 150 mM Glycin 10 % MeOH 0,05 % SDS in ddH ₂ O
Zellkulturmedium (500 ml)	DMEM GlutaMAX™ (500 ml) 10 % hitzeinaktiviertes FKS 1 x Amphotericin 1 x Vitamine 1 x nicht-essenzielle Aminosäuren 50 µg/ml Gentamicin
Zellkulturmedium, chlamydiales	Zellkulturmedium 1,2 µg/ml Cycloheximid

5.3.5 Enzyme

Die eingesetzten Restriktionsenzyme wurden nach Herstellerangaben für Restriktionsanalysen von Plasmiden oder zur Linearisierung von Plasmiden für die homologe Rekombination verwendet.

Tab. 5: Verwendete Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
ALLin™ HiFi DNA-Polymerase, 2 U/µl	HighQu
DNase	Sigma
Lysozym	Sigma
Proteinase K	Roche
Restriktionsenzyme (<i>Accl</i> , <i>Aval</i> , <i>Bpu10I</i> , <i>BstBI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>HincII</i> , <i>HindIII</i> , <i>Scal</i> , <i>SmaI</i> , <i>XagI</i>)	Thermo Fisher
RNAse A	Qiagen
Taq-Polymerase	Eigene Herstellung
Trypsin/EDTA	Thermo Fisher

5.3.6 Agarosen

Tab. 6: Verwendete Agarosen

Bezeichnung	Hersteller
GFP-Trap Agarose	Chromotek
Glutathion Agarose	Sigma
NHS Sepharose	Sigma
Nickel-NTA-Agarose	Qiagen

5.3.7 Färbemittel

Tab. 7: Verwendete Färbemittel und Fluoreszenzfarbstoffe

Bezeichnung	Hersteller
DAPI	Sigma
DyLight 488 NHS Ester	Thermo Scientific
DyLight 594 NHS Ester	Sigma
DyLight 647 NHS Ester	Qiagen
NHS- Fluorescein	Thermo Scientific
Rhodamin Phalloidin	Invitrogen

5.3.8 Antikörper

5.3.8.1 Primäre Antikörper

Tab. 8: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Spezifität	Ursprung	Verdünnung		Referenz
			Westernblot	IF	
α - β -Aktin	Humanes Aktin	Maus	1:1000	1:200	Sigma
α -Clathrin HC	Humanes Clathrin <i>heavy chain</i>	Maus	1:1000	1:200	Abcam
α -CPn0677	rCPn0677 _{6xHIS}	Kaninchen	1:200	1:50	Murra 2009
α -CPn0677	rCPn0677C _{10xHIS}	Ratte	1:500	1:50	Eurogentec
α -CPn0678	rCPn0678 _{6xHIS}	Kaninchen	1:1000	1:50	Murra2009
α -CPn0678	rCPn067810 _{xHIS}	Ratte	1:1000	1:50	Eurogentec
α -dsRED	rdsRed2	Maus	1:400		SantaCruz
α -Dynamamin II	Humanes Dynamamin	Kaninchen	1:1000	1:200	Abcam
α -EGFR	Humaner EGFR	Kaninchen		1:400	Invitrogen
α -EGFR	Humaner EGFR	Maus		1:400	Thermo Fisher
α -GFP	GFP	Ratte	1:500		Chromotek
α -GST	GST	Kaninchen	1:1000		Santa Cruz

Antikörper	Spezifität	Ursprung	Verdünnung		Referenz
			Westernblot	IF	
α -LPS	Chlamydiales LPS	Maus		1:4	Bio-Rad
α -mCherry	mCherry	Kaninchen	1:1000		Invitrogen
α -Pacsin II	Humanes Pacsin II	Kaninchen	1:1000	1:200	Abcam
α -Penta-His	10 x Histidin-Tag	Maus	1:2500		Qiagen
α -SNX9	Humanes SNX9	Kaninchen	1:1000	1:200	Invitrogen
α -SNX9	Humanes SNX9	Maus	1:500		Invitrogen

5.3.8.2 Sekundäre Antikörper

Tab. 9: Verwendete Sekundäantikörper

Antikörper	Spezifität	Ursprung	Verdünnung		Referenz
			Westernblot	IF	
α -Kaninchen-AP	Kaninchen	Maus	1:7500		Promega
α -Maus-AP	Maus	Kaninchen	1:7500		Promega
α -Ratte-AP	Ratte	Ziege	1:30000		Promega
α -Kaninchen-Alexa ⁴⁸⁸	Kaninchen	Ziege		1:200	Thermo Fisher
α -Kaninchen-Alexa ⁵⁹⁴	Kaninchen	Ziege		1:200	Thermo Fisher
α -Kaninchen-Alexa ⁶⁴⁷	Kaninchen	Ziege		1:200	Thermo Fisher
α -Maus-Alexa ⁴⁸⁸	Maus	Ziege		1:200	Thermo Fisher
α -Maus-Alexa ⁵⁹⁴	Maus	Ziege		1:200	Thermo Fisher
α -Maus-Alexa ⁶⁴⁷	Maus	Ziege		1:200	Thermo Fisher
α -Ratte-Alexa ⁴⁸⁸ P	Ratte	Esel		1:200	Thermo Fisher
α -Ratte-Alexa ⁵⁹⁴	Ratte	Ziege		1:200	Thermo Fisher

5.3.9 Kits

Tab. 10: Verwendete Kits

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

5.3.10 Größenstandards

Tab. 11: Verwendete Proteingrößenstandards

Protein Größenstandards	Fragment-/Protein-Größen	Hersteller
PageRuler™ Prestained	180, 130, 100, 70 , 55, 40, 35, 25, 15, 10 [kDa]	Thermo Fisher
PageRuler™ Prestained Plus	250, 130, 95, 72 , 55, 36, 28 , 17, 11 [kDa]	Thermo Fisher

Protein Größenstandards	Fragment-/Protein-Größen	Hersteller
NativeMark Unstained Protein Standard	1.236, 1.048, 720, 480, 242, 146, 66, 20 [kDa]	Invitrogen

Tab. 12: Verwendeter DNA-Größenstandard

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

5.3.11 Plasmide und Oligonukleotide

5.3.11.1 Eingesetzte Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von Sigma bezogen. In der folgenden Auflistung werden alle genutzten Oligonukleotide aufgeführt, die nicht in den Manuskripten verwendet wurden.

Tab. 13: Verwendete Oligonukleotide

Interne Nr.	Name	Sequenz (5´ - 3´)
C-1490	Seq hin mCherry	TTTAGTGAACCGTCAGATCC
C-1491	Seq her mCherry	GCCATGTTATCCTCCTCGCC
C-3370	Fwd pDS23	ATTTACACAGAATTCATTAAGAGGAGAAATT AACTATGGGAATCAATCCTTCGGGTAA
C-3371	Rev pDS23	CAGGAGTTCAATGGTGATGGTGATGATGGTGG TGATGGTGTTCAAAAAGATCCCCGATTA
C-3372	Fwd pDS24	ATTTACACACAGAATTCATTAAGAGGAGAAATT AACTATGTCTGTTAATCCATCAGGAAA
C-3373	Rev pDS24	CAGGAGTTCAATGGTGATGGTGATGATGGTGG TGATGGTGATCTTCGTCAGACCAGCTGA
C-3484	2xFYVE in pKM36 hin	GGATCTGATCGAAGGTCGTGGGATCCCCGGGA ATTCATCGTACTCAGATCTCGAGCTCAA
C-3485	2xFYVE in pKM36 her	ACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGATCG TCAGTCAGTCAGGCAGCGGAACCATGGC
C-3486	PLCgamma in pKM36 hin	ATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAAC AGTATTCATGGACTCGGGCCGGGACTT
C-3487	PLCgamma in pKM36 her	CAAGGCCCTTAATTTTCCAATAACCTAGTATAG GGGACATGGTGGCGACCGGTGGATCCT
C-3798	pDS68 Fwd primer	TCGGGAGAGCCGGAGCGAGCAAGCTTACCCG GGTGAATTCATGGGAATCAATCCTTCGGG
C-3799	pDS68 Rev primer	TGATGATGGCCATGTTATCCTCCTCGCCCTTGC TCACCATTTCAAAAAGATCCCCGATTA
C-3851	pDS70 Fwd	GGGCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAG CTGTACAAGATGTCCGACAGCGAGAAGCT
C-3852	pDS70 Rev	ATCAGTTATCTAGATCCGGTGGATCCCCGGGCC CGCGGTACCGTCGATCGAGATCTGAGTATTAT CTAGATCCGGTGGATC

5.3.11.2 Verwendete und neu generierte Plasmide

In der folgenden Auflistung sind die genutzten Plasmide aufgezählt, die nicht in den Manuskripten verwendet wurden.

Tab. 14: Verwendete und neu generierte Plasmide

Interne Nr.	Name	Vektor	Konstruktion
# 1895	pKM55	pEYFP-EGFR	Transfektionsvektor: C-terminal EYFP
# 2300	pAE66	pEGFP_FYVE	Transfektionsvektor: N-terminal mCherry
# 2301	pAE67	pEGFP_FYVE	Transfektionsvektor: N-terminal EYFP
# 2373	pKM95	pKM55	Transfektionsvektor: C-terminal mCherry
# 2561	pEGFP_Lact-C2	pEGFP-C1	Transfektionsvektor: Lactadherin-C2
# 2841	pDS23	pFT25	Expressionsvektor: CPn0677 mit C-terminalen 10x His-Tag
# 2842	pDS24	pFT25	Expressionsvektor: CPn0678 mit C-terminalen 10x His-Tag
# 2931	pLVTHM	pLVTH	Empty Backbone) 2nd gen lentivector expressing shRNA from H1 promoter and GFP. For direct cloning of shRNA or sub-cloning of an H1-shRNA cassette from pSUPER.
# 2961	pmCherryC1 human WIP	pmCherryC1	Humane WAS/WASL-interacting protein family member #29573
# 2962	pEGFP(C1) - PP1alpha	pEGFP(C1)	Humane Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit #44224
# 2964	pEGFP-C1-Abi1	pEGFP(C1)	Transfektionsvektor: Humane Abl interactor 1 #74905
# 3056	pDS68	pKM95	Transfektionsvektor: CPn0677 mit C-terminalen mCherry-Tag
# 3058	pDS70	pAE66	Transfektionsvektor: Humanes PP1(catalytic subunit C1) α mit N-terminalen mCherry-Tag

5.3.12 Zellen und Zelllinien

5.3.12.1 Prokaryotische Zellen und Zelllinien

Tab. 15: Verwendete *E. coli* und *Chlamydia spp.* Stämme

<i>Escherichia coli</i>	Genotypische Beschreibung
BL21 (DE3)	$F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3) (Invitrogen)
GM48	$F^- thr leu thi lacY galK galT ara fhuA tsx dam dcm glnV44$
Origami (DE3)	$\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74 \Delta phoA P_{vull} phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F^+[lac^+ lacI^q pro]$ (DE3)

<i>Escherichia coli</i>	Genotypische Beschreibung
	<i>gor522::Tn10 trxB pLysS (Cam^R, Str^R, Tet^R) (Novagen)</i>
XL ₁ -blue	<i>F' ::Tn10 proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15/ recA1 endA1 gyrA96 (Nal^R) thi hsdR17 (rK⁻ mK⁺) glnV44 relA1 lac (Stratgene)</i>
Chlamydia spp.	Herkunft
<i>Chlamydia pneumoniae</i> GID	Gießener Isolat eines Patienten (217)

5.3.12.2 Eukaryotische Zellen und Zelllinien

Tab. 16: Verwendete Eukaryotische Zellen und Zelllinien

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Genotypische Beschreibung
CEN.PK2_1C:	<i>MATα ura3-52; trp1-289; leu2-3, 11; his3-Δ1 (218)</i>
Adhärente Zellkulturlinien	Beschreibung
HEp-2-Zelllinie	Epitheliale Larynxkarzinom-Zelllinie menschlichen Ursprungs, HeLa-Morphologie, 46 Chromosomen (ATCC Nr.: CCL-23)
HEK 293 FT Zelllinie	Die Zelllinie HEK293-FT ist eine transformierte embryonale Nierenzelllinie menschlichen Ursprungs (ATCC Nr.: PTA-5077)

5.3.13 Medien

LB-Medium (*E. coli*):

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

Den abgewogenen Ansatz in 1 L deionisiertem Wasser lösen und autoklavieren. Nach Abkühlen des Mediums auf ca. 50 °C können Antibiotika wie Ampicillin (Endkonzentration 50 µg/ml) oder Kanamycin (Endkonzentration 15 µg/ml) hinzugefügt werden.

YPD⁺-Medium (*Saccharomyces cerevisiae*):

Hefeextrakt	10 g
Casein Hydrolysat (Pepton)	20 g
Glucose	20 g
Adenin-Stocklösung (2 mg/ml)	2 ml
Tryptophan-Stocklösung (4 mg/ml)	4 ml

Agar (nur bei Festmedium) 13,5 g

SD-Medium (*Saccharomyces cerevisiae*):

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

Den abgewogenen Ansatz in 1 L deionisiertem Wasser lösen und autoklavieren. Das SD-Medium wird vor dem Autoklavieren mit 1 M NaOH auf einen pH von 6 eingestellt. Die Bestandteile des Aminosäuremixes sind in der Tabelle 17 aufgelistet. Durch Weglassen bestimmter Aminosäuren kann eine Selektion erfolgen.

Tab. 17: Bestandteile des Aminosäuremixes

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

Zellkulturmedium

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GlutaMAX) 500 ml
 FKS (hitzeinaktiviert, Endkonzentration: 10 %) 50 ml
 MEM nicht essenzielle Aminosäuren (100 x) 5 ml
 MEM Vitamine (10 x, Endkonzentration: 1 x) 5 ml
 Amphotericin (200 mM, Endkonzentration: 2 mM) 5 ml
 Gentamicin (50 mg/ml, Endkonzentration 50 µg/ml) 500 µl

Die Komponenten des Mediums werden unter sterilen Bedingungen vermischt und anschließend bei 4 °C gelagert. Zur Verhinderung von Mykoplasmen-Kontaminationen erfolgt die Zugabe von 25 µg/ml Plasmocin beim Passagieren und Auftauen der Zellen.

5.4 Methoden

5.4.1 Molekularbiologische Methoden

5.4.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Im LB-Medium erfolgte die Zellkultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*) 37 °C unter ständigem Schütteln und aeroben Bedingungen. Zur Transformanten-Selektion können dem Medium, je nach Selektionsmarker, 50 µg/ml Ampicillin oder 15 µg/ml Kanamycin zugesetzt werden.

5.4.1.1.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Zur Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* Zellen, werden elektrokompetente Zellen benötigt. Die Transformation erfolgte in, je nach Anwendungszweck, in die folgenden *E. coli* Stämme: XL1-blue, Origami (DE3), BI21-(DE3) oder GM21. Die Herstellung der kompetenten Zellen erfolgte wie beschrieben in (219).

5.4.1.1.2 Plasmid-DNA Isolation aus *E. coli*

Mittels der Plasmid-Minipräparation erfolgte die DNA-Isolierung aus kleinen Kulturmengen (bis zu 5 ml). Die erlangte Plasmid-DNA wird nicht weiter aufgereinigt.

- Am Tag zuvor wird die Kultur in 5 ml LB-Medium, mit dem entsprechenden Selektionsmarker, inokuliert und ü/N, schüttelnd bei 37 °C inkubiert.
- Sofern die Kulturen gewachsen sind, ca. 2 ml der Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführen und das Gemisch für 5 Sekunden bei 13000 UPM zentrifugieren.
- Den Überstand verwerfen und das Zellpellet in 100 µl P1 Puffer resuspendieren.
- 100 µl P2 Puffer hinzugeben und vorsichtig vermischen und anschließend 100 µl P3 Puffer hinzugeben und vorsichtig vermischen.
- Die Zellsuspension für 10 min bei 13000 UPM zentrifugieren.
- Den Überstand ohne feste Bestandteile in ein neues Reaktionsgefäß überführen.
- Zu dem gesamten Ansatz 1 ml Isopropanol hinzufügen und gut mischen.
- Für 20 min bei 13000 UPM zentrifugieren und anschließend den Überstand verwerfen.
- Das DNA-Präzipitat mit 500 µl 70 % Ethanol waschen und anschließend im Vakuum-Konzentrator (SpeedVac) trocknen.
- Das getrocknete DNA-Präzipitat in 50 µl ddH₂O aufnehmen.

5.4.1.1.3 Plasmid-Midi Präparation aus *E. coli*

Die Plasmid-Midi-Präparation wird angewendet, um größere Mengen an aufgereinigter Plasmid-DNA zu erlangen. Das Protokoll wird mit dem „Qiagen Plasmid Midi Kit“, nach Herstellerangaben durchgeführt.

5.4.1.1.4 Transformation in *E. coli* durch Elektroporation

Die Elektroporation ist eine Transformationsmethode, bei der die Membran vorübergehend permeabel wird, um Plasmid-DNA aufzunehmen. Bei dieser Methode werden kompetente *E. coli* Zellen einer elektrischen Spannung ausgesetzt, wodurch die Zellen in der Lage sind, DNA aufzunehmen.

- Die sterilen Elektroporationsküvetten werden auf Eis vorgekühlt und zeitgleich die kompetenten Zellen bei 4 °C aufgetaut.
- 10 µl Plasmid-DNA, bzw. 2 µl aufgereinigte Plasmid-DNA mit 200 µl ddH₂O mischen und in die Elektroporationsküvette überführen.
- Den Elektroporationansatz im Gene Pulser der Spannung aussetzen (Geräteparameter: Spannung 2.1 kV, 100 Ohm und 25 µF).
- Zu dem Ansatz 1 ml LB-Medium pipettieren und den gesamten Ansatz in ein neues Reaktionsgefäß überführen.
- Den gesamten Ansatz bei 37 °C für 30 bis 60 min unter ständigem Schütteln inkubieren.
- Die Zellsuspension für 5 Sekunden bei 13000 UPM zentrifugieren, den Überstand bis auf 100 µl entnehmen und verwerfen.
- Anschließend das Zellpellet resuspendieren und auf den entsprechenden LB-Platten mit Selektionsmarker ausstreichen.
- Die Platten ü/N bei 37 °C inkubieren.

5.4.1.2 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Zellkultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) erfolgte in YPD⁺-Medium bei 30 °C unter ständigem Schütteln und unter aeroben Bedingungen. Sofern eine Selektion von Transformanten notwendig war, wurden die Zellen in SD-Medium mit den entsprechenden fehlenden Aminosäuren (AS) des Selektionsmarkers herangezogen.

5.4.1.2.1 Transformation in *Saccharomyces cerevisiae* *CenPK2*

Zur Integration von DNA-Sequenzen in einen linearisierten Vektor wird der Modellorganismus *S. cerevisiae* genutzt. Hierfür wird basierend auf der Lithiumacetat-Methode, die amplifizierte DNA-Sequenz zusammen mit dem linearisierten Zielvektor in die

Hefe *S. cerevisiae*, transformiert. Mit Hilfe der homologen Rekombination der Hefe *S. cerevisiae*, wird das DNA-Fragment in den Zielvektor integriert.

- Eine 5 ml Übernachtkultur vom Hefestamm CenPK2 in YPD⁺-Medium ansetzen.
- Durch eine photometrische Messung wird am nächsten Tag die Zellzahl der ü/N Kultur ermittelt und die Kultur auf eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,1 im Endvolumen von 50 ml (YPD⁺-Medium) eingestellt.
- Die Kultur bei 30 °C unter ständigem Schütteln für ca. 4 – 6 Stunden inkubieren.
- Bei einer OD₆₀₀ von 1 werden die Zellen geerntet und für 10 min mit 4600 UPM bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert und anschließend mit 25 ml ddH₂O gewaschen.
- Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 1 ml 100 mM LiAc pH 8,4 – 8,9 resuspendiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.
- Die Zellen für 5 Sekunden bei 13.000 UPM bei RT (Heraeus Biofuge pico) sedimentieren und in 100 mM LiAc pH 8,4 – 8,9 (Zellmenge 2 x 10⁹ Zellen/ml) resuspendieren.
- Für jeden Reaktionsansatz werden die Zellen in 50 µl Aliquotes aufgeteilt.
- Die Zellen erneut sedimentieren und den Überstand werfen.
- Die Carrier DNA (2 mg/ml) wird bei 100 °C für 10 min denaturiert und auf Eis abgekühlt.
- Zu den aliquotierten Zellen folgenden Transformationsmix hinzugeben:

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

- Die Transformationsansätze für 30 min bei 30 °C inkubieren.
- Anschließend die Transformationsansätze für weitere 30 min bei 42 °C inkubieren.
- Der gesamte Transformationsansatz wird für 5 Sekunden bei 13.000 UPM zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet anschließend in 200 µl ddH₂O resuspendiert.
- Im letzten Schritt werden 80 % bzw. 20 % des Ansatzes auf das entsprechende SD-Selektionsmedium ausplattiert und bei 30 °C für 2 Tage inkubiert.

5.4.1.2.2 DNA-Isolation aus *Saccharomyces cerevisiae*

Um die in *S. cerevisiae* erhaltenen rekombinierten Plasmide weiter zu vervielfältigen, muss das Plasmid aus der Hefe isoliert werden.

- In 5 ml SD-Medium *S. cerevisiae* Zellen inokulieren und bei 30°C ü/N wachsen lassen.
- 2 ml der Kultur in ein Schraubröhrchen überführen und für 5 Sekunden bei 13000 UPM zentrifugieren. Den Überstand verwerfen und das Zellpellet 1-mal mit ddH₂O waschen.
- Das Zellpellet wird in 600 µl eiskaltem P1 Puffer resuspendiert und anschließend mit 600 µl P2 Puffer vorsichtig vermischt.
- Zu der Zellsuspension werden ca. zu 1/3 des Volumens Glasperlen hinzugefügt.
- Der Zellaufschluss erfolgte für 2 x 30 Sekunden im Homogenisator (Precellys24).
- Die Suspension wird für 2 min bei 2000 UPM sedimentiert und der Überstand vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt.
- Zu dem Gemisch werden vorsichtig 500 µl P3 Puffer pipettiert und vorsichtig gemischt und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert.
- Nach der Inkubation wird das Gemisch für 10 min bei 13000 UPM zentrifugiert und ca. 750 µl des Gemischs in ein neues Reaktionsgefäß überführt.
- Zu der Suspension wird 750 µl Isopropanol hinzugeben und für 30 min bei 13000 UPM zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen (das Pellet nicht resuspendieren).
- Das DNA-Präzipitat wird im Vakuum-Konzentrator (SpeedVac) getrocknet und anschließend in 20 µl ddH₂O aufgenommen.

5.4.1.3 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Die Zellkultivierung eukaryotischer Zellen (HEp-2 und HEK293 FT) erfolgt im Zellkulturmedium bei 37 °C und 6 % CO₂.

5.4.1.3.1 Herstellung der Medien und Lösungen für die Zellkultur

In der Zellkultur wird Fötales Kälber-Serum (FKS) eingesetzt, da es zahlreiche verschiedene Wachstumsfaktoren und Proteine enthält. Diese Faktoren sind essenziell für die erfolgreiche Kultivierung von Zellen. Trypsin ist eine Sequenzunspezifische Protease, welche eingesetzt wird, um adhärente Zellen vom Trägermaterial abzulösen. Durch den Einsatz von FKS nach der Zellablösung, bietet FKS ein alternatives Substrat 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 Aliquotes bei -20 °C lagern.
- Bei Bedarf auftauen und in 95 ml Hank`s-Lösung ohne CaCl₂ und MgCl₂ (HBSS) verdünnen.
- Lagerung der 0,5 x Trypsin/EDTA-Lösung bei 4 °C.

Alle genutzten Zelllinien werden in DMEM + GlutaMAX kultiviert. Zu 500 ml des entsprechenden Mediums werden folgende Zusätze hinzugegeben:

- 50 ml hitzeinaktiviertes FKS (Endkonzentration: 10 %)
- 1 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)

5.4.1.3.2 Trypsin Behandlung von eukaryotischen Epithelzellen

Zum Passagieren der HEP-2-Zellen müssen die Zellen von den Zellkulturflaschen abgelöst werden. Unter Anwendung der Sequenzunspezifischen Protease Trypsin, können die adhärenen Epithelzellen von der Zellkulturflasche abgelöst werden. Die Inkubationszeit der Zellen mit der Trypsinlösung sollte hierbei 10 min bei 37 °C nicht überschreiten.

- Vorsichtiges Abnehmen des alten Zellkulturmediums.
- Zellen mit 10 ml HBSS waschen und den Überstand verwerfen.
- Zugabe von ca. 5 ml 0,5 x Trypsin/EDTA-Lösung, sodass die Zellen komplett überschichtet sind
- Die Zellen werden bei 37 °C inkubiert und gelegentlich geschwenkt, bis die Zellen sich ablösen.
- Zum Stoppen der Trypsinreaktion werden 5 ml Zellkulturmedium hinzugeben und die gesamte Suspension in ein 10 ml Zentrifugationsröhrchen überführt.
- Die Zentrifugation erfolgt für 10 min bei 500 UPM (Rotanta 460R) bei 25 °C.
- Das erhaltene Zellpellet wird in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert.

5.4.1.3.3 Passagieren von Epithelzellen in großen Zellkulturflaschen (75 cm²)

- 15 ml Zellkulturmedium in einem 50 ml Falcon abfüllen.
- Zu dem Medium im Falcon werden 500 µl Trypsin behandelte Zellen hinzugegeben und gut gemischt.
- Die Suspension wird dann in eine neue Zellkulturflasche überführt und die Lösung wird gleichmäßig verteilt
- Anschließend werden die Zellen für 2 – 3 Tage bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert.

5.4.1.3.4 Passagieren von Epithelzellen in kleinen Zellkulturflaschen (25 cm²)

Kleine Zellkulturflaschen mit Epithelzellen werden für die Herstellung von Gradientengereinigten Chlamydien benötigt. Insgesamt befinden sich in einer 25 cm² Flasche, bei konfluentem Wachstum, ca. $2,5 \times 10^7$ Epithelzellen.

- 5 ml Zellkulturmedium in ein 15 ml Falcon vorlegen.
- 250 µl der Trypsin-behandelten HEp-2-Zellen ins Medium überführen.
- Inkubation für 2 – 3 Tage bei 37 °C und 6 % CO₂

5.4.1.3.5 Passagieren von Epithelzellen in 24- und 6-Well Platten

Für Untersuchungen mit dem Mikroskop und Koimmunpräzipitation-Studien müssen die Epithelzellen in 24- bzw. 6-Well Platten angezogen werden.

- Die zuvor mit Trypsin behandelten Zellen werden je nach Bedarf mit Zellkulturmedium verdünnt.
- Aus dieser Verdünnung wird jeweils 1 ml entnommen und in die Wells pipettiert.
- Die Inkubation erfolgt, je nach gewünschter Konfluenz der Zellen für weitere 1 – 2 Tage bei 37 °C und 6 % CO₂.

5.4.1.4 Kultivierung von *Chlamydia pneumoniae*

Chlamydia pneumoniae sind obligat intrazelluläre Bakterien, die für die Vermehrung eine Wirtszelle benötigen. Um die Infektion zu synchronisieren können die chlamydialen EBs auf die Wirtszellen zentrifugiert werden.

5.4.1.4.1 Primärinfektion mit Chlamydien

Zur Kultivierung von Chlamydien werden HEp-2-Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen genutzt. Die Zellkulturflächen sollten möglichst konfluent bewachsen sein.

- Aus dem 80 °C-Schrank eins oder mehrere Aliquotes mit Chlamydien entnehmen und bei 37 °C aufwärmen.
- Die aufgetaute Chlamydien-Suspension durch Zugabe von Zellkulturmedium auf ein Volumen von 5 ml pro 25 cm² Zellkulturflasche einstellen.
- Mit HEp-2-Zellen konfluent bewachsenen 25 cm² Zellkulturflaschen werden einmal mit HBSS gewaschen und der Überstand anschließend verworfen.
- Die aufgefüllte Chlamydien-Suspension vorsichtig in die Flaschen pipettieren, pro Flasche 5 ml.
- Die Flaschen für 60 Minuten bei 30 °C und 1560 x g (2920 UPM/Rotanta 460R) zentrifugieren und für 1 Stunde bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubieren.

- Das alte Zellkulturmedium wird vorsichtig abgenommen und die infizierten Zellen mit 5 ml frischen Zellkulturmedium + 1,2 µg/ml Cycloheximid versetzt.
- Anschließend die Zellkulturflaschen bei 37 °C und 6 % CO₂ für 72 Stunden inkubieren.
- Nach der Inkubationszeit können mit einem sterilen Zellschaber die infizierten Zellen vom Flaschenboden gelöst werden.
- Die gesamte Suspension der infizierten Zellen (40 ml), wird in einem Falcon-Röhrchen vereint und für 45 Sekunden bei 40 % Leistung mit dem Ultraschallstab (Sonoplus HD2200) sonifiziert.
- Die Suspension wird für 10 Minuten bei 2670 UPM (Rotanta 460R) und 20 °C zentrifugiert (Differentialzentrifugation).
- Der Überstand wird in ein neues Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert.
- Der Überstand des zweiten Zentrifugationsschrittes kann zur weiteren Infektion Zellkulturflaschen verwendet oder bei – 80 °C eingefroren werden.

5.4.1.4.2 Sekundär-Infektion von Chlamydien

Die Sekundär-Infektion wird durchgeführt, um die Anzahl infektiöser chlamydialer Partikel zu erhöhen. Sie wird ebenfalls auf HEP-2-Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen durchgeführt.

- Der Überstand einer primären Chlamydien-Infektion (5.1.4.1) wird mit 5 ml Zellkulturmedium pro 25 cm² Zellkulturflasche gemischt.
- Das Medium mitsamt den infektiösen Chlamydien wird auf bis zu 32 konfluent bewachsenen 25 cm² Zellkulturflaschen verteilt.
- Die Flaschen werden für 60 Minuten bei 30 °C und 1560 x g (2920 UPM/Rotanta 460R) zentrifugiert und für 1 Stunde bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert.
- Das Medium wird vorsichtig abgenommen und die infizierten Zellen mit 5 ml DMEM-Medium + 1,2 µg/ml Cycloheximid.
- Die Flaschen werden bei 37 °C und 6 % CO₂ für 72 bis 96 Stunden inkubiert.
- Die infizierten Zellen werden mit einem sterilen Zellschaber vom Flaschenboden gelöst.
- Die Suspension wird in 50 ml Falcon-Röhrchen für 45 Sekunden bei 40 % Leistung mit dem Ultraschallstab (Sonoplus HD2200) sonifiziert.
- Die Suspension wird für 10 Minuten bei 2670 UPM (Rotanta 460R) und 20 °C zentrifugiert (Differentialzentrifugation).
- Der Überstand wird in ein neues Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert.
- Der Überstand des zweiten Zentrifugationsschrittes kann anschließend mittels Dichtegradientenzentrifugation gereinigt werden.

5.4.1.4.3 Aufreinigung von chlamydialen EBs mittels Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation wird eingesetzt, um Chlamydien aus eukaryotischen Zelltrümmern aufzureinigen. Gradienten-gereinigte Chlamydien können im Folgenden für weitere Experimente, wie beispielsweise Infektionsstudien verwendet werden.

- Den Überstand einer sekundären Infektion in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführen und für 30 min bei 4°C und 30.000 g (15.000 UPM/Beckmann Avanti J-
- Den Überstand verwerfen und das Pellet in 1 ml HBSS resuspendieren und für 30 min bei 4°C und 21885 g (15.000 UPM/Heraeus Biofuge Primo R) zentrifugieren.
- Das Pellet nun in 1 ml HBSS im Ultraschallwasserbad vollständig resuspendieren.
- Ein steriles Zentrifugenröhrchen mit 9 ml 30 % Gastrographin in sterilem ddH₂O befüllen.
- Der Gastrographin-Gradienten wird mit der Chlamydien suspension überschichtet und für 1 h bei 4°C und 30.000 g (15.000 UPM/Beckmann J2-21) zentrifugiert.
- Den Überstand abnehmen und das Chlamydienpellet in 1 ml HBSS resuspendieren.
- Den gesamten Ansatz erneut für 30 min bei 4°C und 21885 g (15.000 UPM/Heraeus Biofuge Primo R) zentrifugieren.
- Das Pellet nun in 200 µl SPG-Puffer vollständig resuspendieren (Ultraschallwasserbad) und auf 1 ml mit SPG-Puffer auffüllen.
- Die Gradienten-gereinigten Chlamydien können in 200 µl Aliquotes bei -80 °C gelagert werden.
- Die Infektiosität wird bei 60-facher Vergrößerung in einer 24 Well Platte durch Auszählen aller Zellen und darin eingeschlossener Inklusionen ermittelt.

5.4.2 Biochemische Methoden

5.4.2.1 *Induktion der Genexpression in E. coli Zellen*

In *E. coli* transformierte Expressionsplasmide ermöglichen die Induktion der Genexpression. Das Gen im Expressionsplasmid steht unter der Kontrolle des T7-Promotors, für die Expression dieses Gens muss die T7-RNA Polymerase an den spezifischen T7-Promotor binden. Die Induktion der Genexpression erfolgt durch Zugabe von IPTG.

- Eine Kultur in 50 ml LB-Medium (+ Selektionsmarker) inokulieren und ü/N bei 37 °C, schüttelnd inkubieren.
- Die Zellzahl der ü/N Kultur photometrisch bestimmen.

- Eine 1 L Induktionskultur mit einer $OD_{600} = 0,1$ in LB-Medium (+ Selektionsmarker) animpfen und bei 37 °C unter ständigem Schütteln, bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ inkubieren.
- Vor der Induktion der Genexpression eine Probe (t_0) mit der $OD_{600} = 0,5$ nehmen und einfrieren (-20 °C). Anschließend die Genexpression induzieren, durch die Zugabe von 1 ml 1 M IPTG.
- Die Kultur für 4 Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubieren und nach der Inkubation eine Probe nehmen (t_4) und auf eine OD_{600} von 0,5 einstellen und einfrieren (-20 °C).
- Die Induktionskultur bei 5000 UPM für 10 min zentrifugieren (Beckmann J2-21).
- Den Überstand verwerfen und das Zellpellet mit 40 ml PBS waschen.
- Das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendieren und anschließend die Zellen lysieren oder bei -20 °C lagern.
- Die Expression (t_0 und t_4 Probe) kann mittels SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese analysiert werden.

5.4.2.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen

Die Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen wird eingesetzt, um rekombinante Proteine aus einem Zelllysats zu isolieren. Hierfür müssen die Proteine einen sogenannten Protein-Tag aufweisen, der eine spezifische Affinität zu dem genutzten Trägermaterial hat. Nach der Lyse des Zellmaterials können die Proteine über diesen Tag an das Trägermaterial binden. Wird nun ein Kompetitor hinzugefügt, welcher mit einer höheren Affinität zum Trägermaterial bindet, können die Proteine vom Trägermaterial gelöst werden.

Die Aufreinigung der in dieser Arbeit genutzten Proteine erfolgte, je nach Protein, unter nativen oder denaturierten Konditionen.

5.4.2.2.1 Lyse der *E. coli* Zellen und Aufarbeitung des Zelllysats

Zur Isolation der Proteine aus den *E. coli* Zellen, müssen die Proteine in den Überstand gebracht werden. Hierfür werden die *E. coli* Zellen unter Anwendung des Enzyms Lysozym lysiert und anschließend, nach der erfolgreichen Lyse, erfolgt die Sonifikation der Zellsuspension, um die vorhandene genomische DNA aufzubrechen. Abhängig von den Proteinen erfolgt die Lyse unter nativen Bedingungen (PBS; CPn0677) oder denaturierten Bedingungen (Puffer B; CPn0678)

- Das Zellpellet der 1 l Induktionskultur in 20 ml Lysis-Puffer resuspendieren und ü/N auf Eis inkubieren.

- Das Zelllysat dreimal für 10 Sekunden auf Eis sonifizieren. Zwischen den einzelnen Sonifikationsschritten dem Lysat genug Zeit zur Abkühlung geben.
- Anschließend das Zelllysat für eine Stunde bei 4 °C und 24000 UPM zentrifugieren (Avanti J-25).
- Der Überstand kann nun für die Aufreinigung verwendet werden.

5.4.2.2.2 Reinigung unter nativen Bedingungen über den His_{6/10}-Tag

Für die Aufreinigung der Proteine wird die Affinität His-getaggtter Proteine zu zweiwertigen Nickel-Ionen (Ni²⁺ - Ionen) genutzt. Die Ni²⁺ - Ionen sind über Nitrilotriessigsäure (NTA) an Agarose gebunden. Die Bindung der His-getaggtten Proteine erfolgt im Austausch mit Wassermolekülen, welche an den Ionen angelagert sind. Zur Elution der Proteine, muss eine Verdrängung der Proteine von der Trägersubstanz erfolgen. Dies wird durch Zugabe des Kompetitors Imidazol bewerkstelligt. Imidazol zeigt eine größere Bindung zu der Nickel-NTA Agarose und verdrängt die Proteine vom Trägermaterial, sodass die Proteine eluiert werden. Die Aufreinigung wird bei 4 °C durchgeführt und mit vorgekühlten Puffern.

- Für eine 1 L Induktionskultur 500 µl Nickel-NTA-Agarose auf eine Proteinsäule mit Gazestopfen geben und 2 x mit 10 ml PBS waschen.
- Die Agarose abnehmen und zusammen mit dem Überstand einer lysierten Induktionskultur vermischen und für 2 Stunden bei 4 °C rotierend inkubieren.
- Das gesamte Gemisch auf eine Proteinsäule mit Gazestopfen geben und durchlaufen lassen, davon eine Probe nehmen (FT). Die getaggtten Proteine gebunden an die Nickel-NTA-Agarose verbleiben vor dem Gazestopfen.
- Die Säule anschließend mit 10 ml gekühltem Waschpuffer I (PBS, 50 mM Imidazol und Protease Inhibitor (1:100)) waschen und eine Probe nehmen (W1).
- Die Säule mit 10 ml gekühltem Waschpuffer II (PBS, 80 mM Imidazol und Protease Inhibitor (1:100)) waschen und eine Probe nehmen (W2).
- Die Elution der Proteine erfolgt durch Zugabe von 4 x 1 ml Elutions-Puffer (PBS, 500 mM Imidazol und Protease Inhibitor (1:25)). Die Elutionen komplett auffangen (E1 – E4)
- Jede Elution 10 min auf der Säule inkubieren.

5.4.2.2.3 Reinigung unter nativen Bedingungen über den GST-Tag

Proteine mit einem GST-Tag (Glutathion-S-Transferase) können ebenfalls über die Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Hierbei wird die Interaktion von GST zu Glutathion genutzt um die Proteine aus dem Zelllysat aufzureinigen. Als Trägermaterial dient Glutathion, welches an die Agarose gebunden ist. Als Kompetitor wird reduziertes

Glutathion verwendet. Die Aufreinigung wird bei 4 °C durchgeführt und mit vorgekühlten Puffern.

- Für eine 1 l Induktionskultur 500 µl Glutathion-Agarose auf eine Proteinsäule mit Gazestopfen geben und 2 x mit 10 ml PBS waschen.
- Die Agarose abnehmen und zusammen mit dem Überstand einer lysierten Induktionskultur vermischen und für 2 Stunden bei 4 °C rotierend inkubieren.
- Das gesamte Gemisch auf eine Proteinsäule mit Gazestopfen geben und durchlaufen lassen, davon eine Probe nehmen (FT). Die getaggtten Proteine gebunden an die Glutathion-Agarose verbleiben vor dem Gazestopfen.
- Die Säule anschließend 2 x mit 10 ml PBS waschen und eine Probe nehmen (W1).
- Die Säule 2 x mit 2 ml 50 mM Tris/HCl pH 9 waschen und eine Probe nehmen (W2).
- Die Elution der Proteine erfolgt durch Zugabe von 4 x 1 ml Elutions-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 9, 10 mM reduzierte Glutathion und Protease Inhibitor (1:25)). Die Elutionen komplett auffangen (E1 – E4).
- Jede Elution 10 min auf der Säule inkubieren.

5.4.2.2.4 Reinigung unter denaturierten Bedingungen über den His_{6/10}-Tag

- Für eine 1 l Induktionskultur 500 µl Nickel-NTA-Agarose auf eine Proteinsäule mit Gazestopfen geben und 2 x mit 10 ml Puffer B waschen.
- Die Agarose abnehmen und zusammen mit dem geklärten Überstand einer lysierten Induktionskultur vermischen und für 2 Stunden bei RT °C rotierend inkubieren.
- Das gesamte Gemisch auf eine Proteinsäule mit Gazestopfen geben und durchlaufen.
- Die Säule anschließend mit 10 ml gekühltem Waschpuffer I (Puffer B + 50 mM Imidazol und Protease Inhibitor (1:100)) waschen und eine Probe nehmen (W1).
- Die Säule mit 10 ml gekühltem Waschpuffer II (Puffer C, 80 mM Imidazol) waschen und eine Probe nehmen (W2).
- Die Elution der Proteine erfolgt durch Zugabe von 4 x 1 ml Elutions-Puffer (Puffer C + 500 mM Imidazol). Die Elutionen komplett auffangen (E1 – E4)
- Jede Elution 10 min auf der Säule inkubieren.

5.4.2.3 Proteinmengenbestimmung mittels Bradford Reagenz

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau, enthalten in der Bradford Reagenz, ist in der Lage an Proteine zu binden. Wenn der Farbstoff an die Proteine bindet, kommt es zur Verschiebung des Absorptionsmaximum. In der ungebundenen roten Form liegt das Absorptionsmaximum bei 470 nm. Nach Bindung an die Proteine kommt es zu einer

Komplexbildung und der Farbstoff wird in seiner deprotonierten, anionischen Sulfonatform stabilisiert. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 595 nm. In einer Lösung lässt sich dadurch die Proteinkonzentration aus der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 595 nm berechnen.

- 780 µl Wasser werden mit 20 µl Proteinlösung und 200 µl Bradford Reagenz gemischt und für 10 Minuten bei RT inkubiert.
- Als Leer-Kontrolle dient ein Mix aus 800 µl Wasser und 200 µl Bradford Reagenz.
- Die Absorption wird bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch bestimmt (Eppendorf Spektrometer).
- Aus einer Eichkurve mit 0,5 – 10 µg BSA wird ein Faktor bestimmt, der unter Anwendung der folgenden Formel für die Berechnung der Proteinkonzentration genutzt wird: $\text{Konzentration} = \text{Absorption bei 595 nm} / (\text{Faktor} * \text{Verdünnungsfaktor})$

5.4.2.4 Dialyse der Proteine

Während der Aufreinigung rekombinanter Proteine werden Kompetitoren eingesetzt, um die Assoziation der Proteine vom Trägermaterial zu lösen. Für nachfolgende Experimente ist es jedoch notwendig die Kompetitoren aus den Proteingemischen zu entfernen, um eine Beeinflussung auszuschließen. Hierfür wird die Dialyse von Proteinen eingesetzt. Durch die Dialyse können auch unter denaturierten Bedingungen aufgereinigte Proteine in ihre native Konformation überführt werden.

- Für jede Elutionsfraktion einen ca. 5 cm langen Dialyseschlauch zurechtschneiden und für 60 min in einem Glasbecher in ddH₂O aufkochen und anschließend abkühlen lassen.
- Eine Seite des Dialyseschlauchs mit einer Klemme verschließen und anschließend das Proteingemisch mit einer Pipette in den Dialyseschlauch überführen.
- Die andere Seite des Dialyseschlauchs mit einer Klammer fest verschließen.
- Die Dialyseschläuche ü/N in 1 L PBS bei 4 °C dialysieren. Bei denaturierten Proteinen erfolgen noch zwei weitere Puffer austausche.
- Am nächsten Tag die Lösungen in ein neues Reaktionsgefäß überführen und mit 10°µl Protease Inhibitor pro ml vermengen.
- Die Reinheit der Proteinlösung kann über SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese analysiert werden.
- Die Proteine kurzfristig bei 4 °C lagern. Für eine längere Aufbewahrung wird das Protein in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei – 80 °C gelagert.

5.4.2.5 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Im Polyacrylamid-Gel werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch Anlegung eines Spannungsfeldes wandern die Proteine zur Anode der Elektrophorese-Kammer. Größere Proteine wandern langsamer durch das Gel als kleinere Proteine. Um eine einheitliche negative Ladung der Proteine zu generieren, wird SDS eingesetzt. SDS lagert sich an die Proteine an und verleiht ihnen eine konstante negative Ladung.

5.4.2.5.1 Proteinprobenaufarbeitung für SDS-PAGE

Die Proteinproben müssen vor Auftragung auf das SDS-Gel durch Hitze denaturiert werden. Durch die Zugabe von DTT (Dithiothreitol) werden zusätzlich Disulfidbrücken zerstört, was wiederum in der Regel die Tertiärstruktur der Proteine auflöst.

- Die Proteinproben mit ddH₂O auf ein Volumen von 32,5 µl einstellen.
- Zugabe von 5 µl DTT und 12,5 µl 4x Proteinladepuffer.
- Die Proben für 10 min bei 100 °C aufkochen und anschließend für 5 Sekunden bei 13000 UPN zentrifugieren.
- 10 – 20 µl der Proteinproben auf ein SDS-PAGE-Gel laden.

5.4.2.5.2 Herstellung des SDS-Polyacrylamidgels

SDS-Polyacrylamidgele bestehen aus 2 Komponenten. Es setzt sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammen. Im Sammelgel werden die Proteine aufkonzentriert, bevor sie in das Trenngel ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die Gele unterscheiden sich hinsichtlich ihres pH-Werts und der TRIS Konzentration.

Tab. 18: Mengenangaben für SDS-Polyacrylamid Trenn- und Sammelgel

Sammelgel (Ansatz für 4 Gele)				
Acrylamid	ddH ₂ O	4 x Sammelgelpuffer	APS	TEMED
1,5 ml	6 ml	2,5 ml	200 µl	50 µl
10 % Trenngel (Ansatz für 4 Gele)				
Acrylamid	ddH ₂ O	4 x Trenngelpuffer	APS	TEMED
6,7 ml	8,4 ml	5 ml	200 µl	70 µl

- Glasplatte auf eine Teflonplatte, getrennt durch zwei Abstandshaltern, legen und in die Gießapparatur klemmen
- Das Trenngel in der genannten Reihenfolge zusammen pipettieren und in die vorgesehene Kammer zwischen Glasplatte und Teflonplatte gießen.
- Sofort Isopropanol auf das Trenngel geben, um mögliche Luftblasen zu entfernen und eine gerade Kante zu erlangen.

- Sobald das Gel auspolymerisiert ist, Isopropanol abnehmen und mit ddH₂O waschen.
- Sammelgel nach der oben aufgeführten Rezeptur anmischen und auf das Trenngel gießen.
- Sofort einen Kamm in das Sammelgel drücken.
- Nach Auspolymerisation kann das Gel bei 4 °C gelagert werden

5.4.2.5.3 SDS-Gelelektrophorese

- Den Kamm aus dem zuvor vorbereiteten Gel entfernen und das Gel in die SDS-PAGE-Apparatur einspannen.
- Die gesamte Apparatur mit Laufpuffer auffüllen.
- 10 – 20 µl der Proteinproben in die Taschen überführen.
- Die Elektrophorese bei 200 V für 1 Stunde und 20 min laufen lassen (Power Supplies Electrophoresis).
- Im Anschluss kann das Gel mit Coomassie Blau gefärbt werden oder gefärbt oder auf eine Polyvinylidenfluorid (PDVF)-Membran übertragen werden.

5.4.2.6 NATIVE PAGE

Das Trennprinzip der nativen Gelelektrophorese ist dem der SDS-PAGE gleich, der Unterschied besteht darin, dass die Proteine in ihrer nativen Form aufgetrennt werden. In der nativen Form können Proteinkomplexe entstehen, die mittels NATIVE PAGE analysiert werden können. Die verwendeten Gele (NativePAGE Novex Bis-Tris Gele) sind mit einem Acrylamid Gradient von 3 % bis 12 % ausgestattet.

- Die Proteinproben werden auf eine Gesamtmenge von 2 µg eingestellt und mit Native PAGE Probenpuffer (4 x) vermischt, mit ddH₂O auf 20 µl einstellen.
- Das Gel vorsichtig der Verpackung entfernen, den Klebestreifen abziehen, die Geltaschen markieren, den Kamm entfernen und das Gel in die Native PAGE Apparatur einspannen.
- Die hintere Kammer mit Native PAGE Kathoden-Puffer bis zur markierten Grenze auffüllen
- Die vordere Kammer mit Native PAGE Anoden-Puffer befüllen, sodass die Geltaschen mit Puffer gefüllt sind.
- Die Proteinproben in die Taschen pipettieren.
- 5 µl des NativeMark Unstained Protein Standards in eine freie Tasche pipettieren und Apparatur fest mit dem Deckel verschließen

- Die Elektrophorese erfolgt nun bei 4 °C für 60 min und 150 V (8-10 mA). Danach wird die Spannung für weitere 60 min, oder bis der Proteinmarker durchgelaufen ist auf 250 V (2-4 mA) eingestellt.
- Zur Detektion der Proteinbanden wird das Gel im Anschluss mit Coomassie Blau gefärbt oder auf eine Polyvinylidenfluorid (PDVF)-Membran übertragen werden.

5.4.2.7 Färbung von Protein-Gelen mit Coomassie-Blau

Die im SDS-PAGE-Gel aufgetrennten Proteinbanden sind ohne weitere Behandlung nicht sichtbar. Zum Anfärben der Proteinbanden wird der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 eingesetzt. Der Farbstoff lagert sich an basische AS-Seitenketten an und kann Proteinbanden bis zu einer Konzentration von 500 ng sichtbar machen.

- Nach der elektrophoretischen Auftrennung wird das Gel vorsichtig von der Teflonplatte gelöst und in einen mit ddH₂O gefüllten Behälter überführt.
- Das Gel in der Mikrowelle für 30 Sekunden bei 360 Watt erhitzen und für 10 min auf einen Schüttler waschen.
- Das Wasser abkippen und den vorherigen Schritt 2 x wiederholen.
- Dann Coomassie hinzugeben, sodass das Gel gut bedeckt ist und das Gel erneut in der Mikrowelle für 30 Sekunden bei 360 Watt erhitzen.
- Die Detektion erfolgt auf einem Schüttler, so lange bis die gewünschten Banden in ausreichender Intensität sichtbar sind.
- Die Coomassie-Lösung abnehmen und das Gel mit ddH₂O waschen.
- Das Gel kann nun im Geldokumentationssystem dokumentiert werden.

5.4.2.8 Westernblotanalyse

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können in der Westernblotanalyse auf eine Polyvinylidenfluorid (PDVF)-Membran übertragen werden. Durch diesen Prozess werden die Proteinbanden immobilisiert und können im Anschluss mittels einer Antikörperfärbung spezifisch detektiert werden.

5.4.2.8.1 Aufbau der Blotapparatur und Transfer auf eine PVDF Membran

Vor der Übertragung der Proteinbanden auf die Polyvinylidenfluorid (PDVF)-Membran, muss eine Aktivierung der Membran durch Methanol stattfinden.

- Gewünschte Menge an Filterpapieren mit den Maßen 7 x 10 cm und die PDVF-Membran mit den Maßen 7 x 9 cm zurechtschneiden.
- Die Filterpapiere in Transferpuffer einlegen und die PDVF-Membran für 1 min in Methanol einlegen.

- Ein Filterpapier auf die Blottingapparatur legen, die PDVF-Membran auf dem Filterpapier platzieren, das SDS-PAGE-GEL auf die Membran und zuletzt ein weiteres Filterpapier drauflegen.
- Vorsichtig mit einer Walze die möglichen vorhandenen Luftblasen rausdrücken.
- Den Deckel der Apparatur auflegen und die Kassette in die dazugehörige Stromquelle einschieben.
- Der Transfer der Proteine erfolgt bei 25 V und 1 A für 20 bis 25 min
- Nach dem Transfer die PDVF-Membran in Blockierlösung überführen und für 30 min auf den Schüttler bei RT inkubieren.

5.4.2.8.2 Antikörperreaktion auf der PDVF-Membran

Die durch den Transfer immobilisierten Proteine lassen sich unter Anwendung spezifischer Antikörper anfärben. Hierbei wird ein primärer Antikörper, welcher eine spezifische Affinität zu der AS-Sequenz des Proteins besitzt, genutzt. Ein zweiter Antikörper (sekundärer Antikörper) ist ein Enzym gekoppelter Antikörper, welcher an die konstante Region des primären Antikörpers bindet. Die Detektion der Proteinbanden erfolgt über das Enzym des sekundären Antikörpers. Es handelt sich um eine alkalische Phosphatase (AP), die durch Umsetzung von Substraten, spezifische Banden der markierten Proteine erzeugt.

- Den primären Antikörper gemäß den Hersteller Angaben in Blockierlösung verdünnen und die Lösung zusammen mit der PDVF-Membran für 1 Stunde bei RT inkubieren.
- Die Antikörperlösung abnehmen und die Membran 3 x für 10 min bei RT in PBS waschen.
- Den sekundären Antikörper gemäß den Hersteller Angaben in Blockierlösung verdünnen und die Lösung zusammen mit der PDVF-Membran für 1 Stunde bei RT inkubieren.
- Die Antikörperlösung abnehmen und die Membran 3 x für 10 min bei RT in PBS waschen.

5.4.2.8.3 Farbentwicklung mittels Alkalischer Phosphatase

Die Alkalische Phosphatase (AP) ist an den sekundären Antikörper gekoppelt und ist für die zu beobachteten Farbreaktion verantwortlich. Das Prinzip beruht auf der Spaltung von Phosphaten durch die AP, als Substrate werden die organischen Phosphatverbindungen 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) und Nitroblau Tetrazoliumchlorid (NBT) genutzt. Durch die Abspaltung der Phosphate reagieren die Substrate BCIP und NBT miteinander, wobei BCIP durch NBT zu einem wasserunlöslichen blauen Indigo-Farbstoff oxidiert wird. NBT wird zu einem wasserunlöslichen blauen Formazan-Farbstoff reduziert. Die so

erzeugten Farbstoffe fallen an der Position auf der Membran nieder, wo der sekundäre Antikörper am primären Antikörper gebunden hat.

- Zu 20 ml Detektionspuffer 66 µl BCIP und 66 µl NBT hinzugeben.
- Zu der mit Antikörpern behandelte Membran den Detektionspuffer geben.
- Die Membran so lange inkubieren, bis die gewünschte Färbungsintensität erreicht ist.
- Die Farbreaktion durch mehrmaliges Waschen mit Wasser abstoppen.
- Die Membran trocken und dokumentieren (Geldokumentationssystem).

5.4.2.9 Fluoreszenz-Markierung von rekombinanten Proteinen

Für mikroskopische Untersuchungen können rekombinant hergestellte Proteine mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt werden.

5.4.2.9.1 Fluorescein Markierung rekombinanter Proteine

NHS-Fluorescein ist ein aminreaktives Derivat des Fluoresceins-Farbstoffs. Der NHS-Ester interagiert dabei mit primären Aminogruppen und formt eine stabile Amidbindung zwischen dem Protein und dem Fluorescein unter Abspaltung des NHS. Fluorescein-markierte Proteine können bei einer Wellenlänge von 494 nm angeregt werden.

- 1 mg NHS-Fluorescein in 100 µl DMSO lösen.
- Fluorescein in 20-fachem Überschuss zur Proteinlösung geben unter Berücksichtigung der folgenden Formel:
- $$\frac{\text{mg Protein}}{\text{MW Protein [Da]}} * x * 47,340 = \mu\text{l Fluorescein Lösung}$$

MW = Molekulargewicht; x = Überschuss NHS-Fluorescein
- Das Protein- Fluorescein Gemisch für 1 Stunde auf Eis inkubieren.
- Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 1 M TRIS/HCL pH 8 in einer finalen Konzentration von 50 mM. Das Gemisch für zwei weitere Stunden auf Eis inkubiert.
- Überschüssiges Fluorescein durch Dialyse ü/N bei 4 °C entfernen.
- Die erfolgreiche Markierung kann mittels UV-Licht Anregung überprüft werden.

5.4.2.9.1 Markierung mit DyLight-Farbstoffen

Die DyLight Farbstoff Markierung von rekombinantem Protein liegt dem gleichen Prinzip zu Grunde wie die Fluorescein Maskierung. In dieser Arbeit wurden die Farbstoffe DyLight 594 und DyLight 647 eingesetzt

- Reaktionsgefäß mit DyLight Farbstoff mit 1,25 mg der Proteinlösung vermengen und für 2 Stunden auf Eis inkubieren.

- Die Reaktion durch Zugabe von 1 M TRIS/HCl pH 8 in einer finalen Konzentration von 50 mM für 1 Stunde abstoppen.
- Überschüssiger Farbstoff durch Dialyse ü/N bei 4 °C entfernen.
- Die erfolgreiche Markierung kann mittels UV-Licht Anregung überprüft werden

5.4.3 Zellbiologische Methoden

5.4.3.1 Infektionen von Humanzellen mit *Chlamydia pneumoniae*

Für Infektionsexperimente werden HEp-2-Zellen mit einer Konfluenz von 70 % in 24-Well Platten ausgesät.

- HEp-2-Zellen in eine 24-Well Platte mit Deckgläschen aussäen und bei 37 °C und 6 % CO₂ ü/N inkubiert (HEPA Class 100).
- Chlamydiengradient bei 37 °C auftauen, vortexen und im Wasserbad sonifizieren.
- Die HEp-2-Zellen mit HBSS waschen.
- Chlamydien Suspension mit 500 µl DMEM pro Well versetzten und auf die HEp-2-Zellen geben.
- Die 24-Well Platte für 15 min, 37 °C bei 2920 UPM zentrifugieren
- Die Platte für 15 min (Kurzzeitinfektion) oder 48 Stunden (Langzeitinfektion) bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubieren
- Die Zellen vorsichtig mit Methanol oder 3% PFA Überschichten und für 10 min bei RT inkubieren, anschließend die Zellen 3-mal mit HBSS waschen.
- Die Zellen können bis zur Färbung in 1 ml HBSS bei 4 °C gelagert werden.

5.4.3.2 Ektopische Expression in Humanzellen

Durch die Transfektion von Expressionsplasmiden ist es möglich ektopische DNA in Humanzellen einzuschleusen. Die Expression der Gene unterliegt der Kontrolle viraler konstitutiver Promotoren. Zur Transfektion der DNA wurde das Turbofect-Reagenz genutzt.

5.4.3.2.1 Transfektion in HEp-2-Zellen

- HEp-2-Zellen in eine 24-Well Platte mit Deckgläschen aussäen und bei 37 °C und 6 % CO₂ ü/N inkubiert (HEPA Class 100).
- Die Zellen 1-mal mit HBSS waschen, 500 µl serumfreies DMEM-Medium hinzugeben und für 2 – 4 Stunden bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubieren
- 500 ng Plasmid DNA zu 100 µl Serumfreien- und Antibiotikafreien DMEM Medium geben und gut durchmischen.
- 2 µl Turbofect-Reagenz hinzugeben, den gesamten Ansatz erneut gut durchmischen und für 15 min bei RT inkubieren.

- Den Mix tröpfchenweise zu den HEp-2-Zellen pipettieren und anschließend die 24-Well Platte vorsichtig schwenken.
- Bei 37 °C und 6 % CO₂ ü/N inkubieren.
- Zellen mit 3 % PFA Überschichten und für 10 min bei RT inkubieren.
- Anschließend die Zellen 3-mal mit HBSS waschen.
- Die fixierten Zellen können bei 4 °C gelagert werden.

5.4.3.2.2 Transfektion mit Infektion

- Die HEp-2-Zellen wie in 5.4.3.2.1 beschrieben transfizieren.
- Chlamydiengradient bei 37 °C auftauen, vortexen und im Wasserbad sonifizieren.
- Die HEp-2-Zellen mit HBSS waschen.
- Chlamydien Suspension mit 500 µl DMEM pro Well versetzten und auf die HEp-2-Zellen geben.
- Die 24-Well Platte für 15 min, 37 °C bei 2920 UPM zentrifugieren
- Die Platte für 15 min (Kurzzeitinfektion) oder 48 Stunden (Langzeitinfektion) bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubieren
- Die Zellen vorsichtig mit Methanol oder 3% PFA Überschichten und für 10 min bei RT inkubieren, anschließend die Zellen 3-mal mit HBSS waschen.

5.4.3.2.3 Transfektion mit Endozytose-Induktion

- Die HEp-2-Zellen wie in 5.4.3.2.1 beschrieben transfizieren.
- Das alte Medium entfernen und die Zellen 2-mal mit 37 °C warmen serumfreien- und Antibiotikafreien DMEM waschen.
- Zu den Zellen 500 µl serumfreien- und Antibiotikafreien DMEM geben und für 5 bis 6 Stunden bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubieren.
- Das alte Medium verwerfen und durch 500 µl serumfreies- und Antibiotikafreies DMEM mit 100 ng/ml EGF₅₉₄ die Endozytose induzieren und die Zellen für 15 min bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubieren.
- Das alte Medium verwerfen und die Zellen 2-mal mit SNaPi-Puffer waschen.
- Die Zellen vorsichtig mit Methanol oder 3% PFA Überschichten und für 10 min bei RT inkubieren, anschließend die Zellen 3-mal mit HBSS waschen.

5.4.4 Mikroskopie

5.4.4.1 Permeabilisierung von Humanzellen

Um intrazelluläre Proteine in den Zellen mit Antikörpern anzufärben, muss zuvor die Zellmembran permeabilisiert werden. Hierfür wurden verschiedene Permeabilisierungspuffer genutzt.

Tab. 19: Eingesetzte Permeabilisierung Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendungszweck	Inkubationszeit
Triton-Puffer	PBS mit 0,3 % Triton X-100	Standard Permeabilisierung Puffer	60 min bei RT
Saponin-Puffer	PBS mit 2 % Saponin	Aktin-Zytoskelett Färbungen	30 min bei RT
Methanol-Puffer	Methanol	Markierung von chlamydialen LPS	10 min bei RT

5.4.4.2 **Antikörpermarkierung von Proteinen**

Zur Analyse von Proteinen in einer Zelle, können diese mittels sekundärer Antikörperfärbung markiert werden. Hierfür wird ein primärer Antikörper eingesetzt, welcher spezifisch für das Protein ist. Der sekundäre Antikörper vermittelt die Fluoreszenz und bindet an den primären Antikörper.

- Die fixierten Zellen 1-mal mit HBSS waschen.
- Den primären Antikörper nach Herstellerangabe in 30 µl PBS-T (PBS mit 0,05 % Tween) lösen und das Deckgläschen mit der Lösung benetzen, für 1 Stunde bei RT inkubieren.
- Die Zellen 3 x mit HBSS waschen.
- Den sekundären Antikörper nach Herstellerangabe in 30 µl PBS-T lösen und das Deckgläschen mit der Lösung benetzen, für 1 Stunde bei RT im Dunkeln inkubieren.
- Die Zellen 3 x mit HBSS waschen

5.4.4.3 **Antikörperfärbung von chlamydialen Einschlüssen**

Die Färbung von chlamydialen Einschlüssen wird mit Hilfe der Reagenz Pathfinder ermöglicht. Es handelt sich um eine Fluoreszenz markierten monoklonalen Maus-Antikörper gerichtet gegen Lipopolysaccharide.

- Die Stocklösung 1 zu 6 in PBS-T verdünnen.
- 30 µl der verdünnten Lösung auf die zuvor fixierten Zellen geben.
- Inkubation der 24-Well Platte bei 30 °C für 30 min.
- Die Zellen 3 x mit HBSS waschen und in 500 µl HBSS bei 4 °C lagern.

5.4.4.4 **Färbung eukaryotischer Zellkerne**

Bei DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) handelt es sich um einen fluoreszenten Farbstoff, der an AT-reiche Regionen in der DNA bindet. Durch Anregung des Farbstoffs durch Licht im Bereich von 385, wird blaues Licht emittiert.

- Ausgehend von einer 1 mg/ml Stocklösung eine 1:500 Verdünnung in HBSS herstellen.
- 30 µl dieser Verdünnung auf die Zellen tropfen.
- Die Platte bei RT für 10 min inkubieren.
- Die Zellen 3 x mit HBSS waschen und in 500 µl HBSS bei 4 °C lagern.

5.4.5 Bioinformatische Programme

Zur Quantifizierung und Auswertung von Ergebnissen wurden in dieser Arbeit verschiedene Computerprogramme genutzt, die im Folgenden aufgeführt werden.

Tab. 20: Verwendete Bioinformatik Programme

Name	Anwendung	Link
CAi Fiji Package	Quantifizierung von mikroskopischen Aufnahmen	https://www.cai.hhu.de/service/service/cai-fiji-package.html
Nikon NIS-Elements	Aufnahme und Bearbeitung von mikroskopischen Aufnahmen	https://www.microscope.healthcare.nikon.com/de_EU/products/software/nis-elements
heliQuest	Helix-Projektionen und Simulation der hydrophoben Eigenschaften	https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/
GORIV	Sekundärstruktur-Vorhersagen	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html
NCBI Blastp	Proteinsequenzvergleiche gegen NCBI-Datenbank	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins

5.5 Ergebnisse

5.5.1 Identifikation weiterer potenzieller humaner Interaktionspartner

5.5.1.1 *Quantitative massenspektrometrische Analyse zur Identifizierung von humanen Proteinen, die als potenzielle Interaktionspartner von CPn0677 und CPn0678 fungieren können*

In vorherigen Studien konnte SNX9 als humaner Interaktionspartner für CPn0678 identifiziert werden, indem es über die erste konservierte, C-terminale, Prolin-reiche Region (PRR) mit der Src homology 3 (SH3)-Domäne von SNX9 interagiert (214, 216). Sowohl CPn0677 als auch CPn0678 besitzen konservierte PRRs, die prinzipiell in der Lage sind, weitere Interaktionen mit SH3-Domänen-enthaltenden Proteinen einzugehen. In Humanzellen existieren ca. 300 weitere SH3-Domänen-Proteine, die sich als potenzielle Bindungspartner eignen (220). Um diese Vielzahl von hypothetischen Kandidaten für eine Interaktion einzugrenzen, wurde eine quantitative massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Durch die ektopische Expression von CPn0677 und CPn0678 als GFP-getaggte Fusionsproteine in HEp-2-Zellen und anschließender Affinitätsreinigung, gerichtet gegen den GFP-Tag, wurden die Proben für die Massenspektrometrie generiert (Abb. 12). Die Daten wurden zur besseren Übersichtlichkeit in Tabellen zusammengefasst und können anhand der \log_2 -Intensitäten, welche die Abundanz der Proteine in den Proben widerspiegelt, verglichen werden. Je höher die Intensität in den CPn0677 und CPn0678 Proben im Vergleich zur GFP-Kontrolle, desto häufiger ist das identifizierte Protein in den Proben vorhanden.

Für CPn0677 wurden vier in der logarithmischen Intensität signifikant erhöhte Proteine im Vergleich zur Kontrolle und ein tendenziell angereichertes Protein gefunden (Tab. 21). Im zweiten Manuskript wurde die Interaktion von CPn0677 mit N-WASP und Syndapin 2 untersucht und bestätigt. Für die weiteren Kandidaten SNX9 und WIP wurden initiale Experimente durchgeführt, die darauf schließen lassen, dass SNX9 ein Interaktionspartner ist und WIP nur akzessorisch an N-WASP gebunden ist (Kapitel 5.5.1.2). Zu USP9X wurden bislang keine Untersuchungen durchgeführt.

Die quantitative massenspektrometrische Analyse ergab für CPn0678 insgesamt acht signifikant angereicherte Proteine in den Proben (Tab. 22). Im ersten Manuskript wurde die Interaktion von CPn0678 mit SNX9 untersucht und verifiziert. Die denkbaren Interaktionen für CPn067 und Syndapin 2 wurden anhand von initialen Experimenten geprüft. Sie konnten bislang allerdings nicht endgültig bestätigt werden (Kapitel 5.5.1.3). Die Proteine ABI1, PPP1 $\alpha/\beta/\gamma$, CYFIP1/2, BRK1, WASF1/2 und NCKAP1 waren derzeit noch nicht Gegenstand der Untersuchung. Zur abschließenden Verifikation, ob es sich bei den

gefundenen Proteinen tatsächlich um Interaktionspartner handelt und welchen Effekt sie auf die Infektion von *C.pn.* haben, müssen weiterführende Experimente folgen.

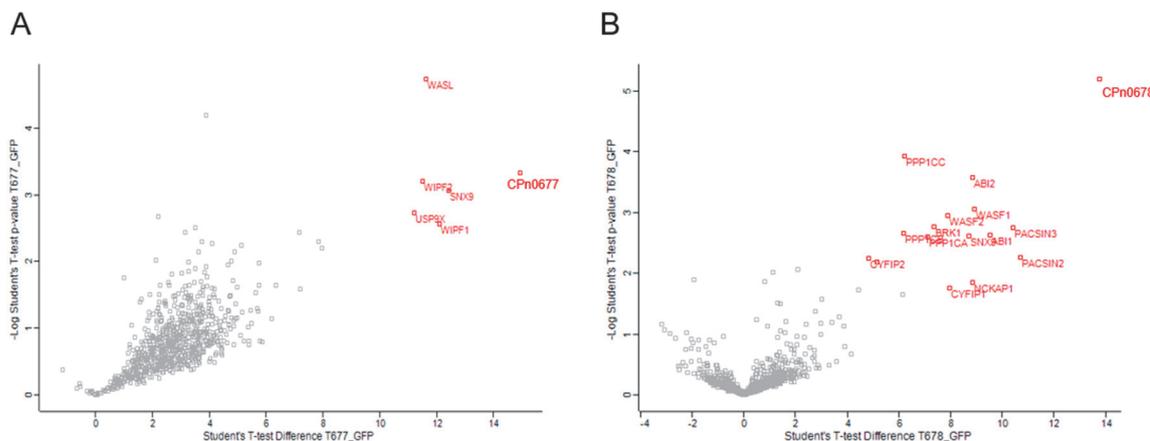


Abbildung 12: Quantitative Massenspektrometrie zeigt weitere potenzielle Interaktionspartner

Volcanoplots von Proteinen, die durch CPn0677 (A) und CPn0678 (B) in den Proben für die Massenspektrometrie angereichert wurden. Die Proteine wurden aus HEp2-Zellen durch Affinitätsreinigung unter Verwendung von CPn0677-GFP- und CPn0678-GFP-Fusionsproteinen als Köder angereichert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur GFP exprimierten. Die angereicherten Proteine wurden anschließend durch quantitative Massenspektrometrie analysiert. Proteine aus der CPn0677-GFP-Anreicherung ($n = 3$) und der CPn0678-GFP-Anreicherung ($n = 3$), die im Vergleich zur GFP-Kontrolle ($n = 3$) höhere Intensitäten aufweisen, werden durch rote Quadrate dargestellt, während alle anderen Proteine als graue Kreise markiert sind.

Tab. 21: Identifizierte potenzielle Interaktionspartner für CPn0677

Protein	Signifikant	GFP log ₂ Intensität	CPn0677 log ₂ Intensität
Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X (USP9X)	ja	11,108	22,326
Neurales Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (N-WASP)	ja	8,886	20,519
Sorting Nexin 9 (SNX9)	ja	8,630	18,664
WAS/WASL-interacting protein family member 1/2 (WIP1/2)	ja	8,456	19,177
Syndapin 2/3	nein	8,361	15,296

Tab. 22: Identifizierte potenzielle Interaktionspartner für CPn0678

Protein	Signifikant	GFP log ₂ Intensität	CPn0678 log ₂ Intensität
Serine/threonine-protein phosphatase PP1- $\alpha/\beta/\gamma$ -catalytic subunit (PPP1CA/CB/CC)	ja	8,630	18,664
Syndapin 2/3	ja	8,838	18,553
Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 1/2 (WASF 1/2)	ja	10,551	18,450
Nck-associated protein 1 (NCKAP1)	ja	9,071	17,914

Protein	Signifikant	GFP log ₂ Intensität	CPn0678 log ₂ Intensität
Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1/2 (CYFIP1/2)	ja	9,996	17,911
Abl interactor 1/2 (Abi1/2)	ja	8,228	17,759
Protein BRICK1 (BRK1)	ja	6,664	16,003
Sorting Nexin 9 (SNX9)	ja	8,883	14,943

5.5.1.2 CPn0677 Lokalisations- und Interaktionsstudien mit den identifizierten humanen Proteinen

Im zweiten Manuskript wurde dargelegt, dass CPn0677 direkt mit N-WASP und Syndapin 2 interagiert und diese Wechselwirkungen zwischen den Proteinen eine Relevanz für die *C. pn* Infektion besitzen. In der quantitativen Massenspektrometrie konnten drei weitere Proteine identifiziert werden, wovon im Folgenden die mögliche Bindung von CPn0677 mit SNX9 und WIP analysiert wurde. Um die initialen Ergebnisse der Massenspektrometrie zu verifizieren, wurden Lokalisationsstudien in Humanzellen mittels ektoptischer Expression in HEp-2-Zellen durchgeführt. Die Lokalisation der Proteine, bzw. eine voraussichtliche Kolo­kalisierung dieser, lässt Rückschlüsse auf eine mögliche Interaktion zu. Darüber hinaus wurden Protein-Protein-Interaktionsstudien durchgeführt, um die potenzielle direkte Bindung an CPn0677 zu bestätigen oder zu falsifizieren.

5.5.1.2.1 CPn0677 Interaktion mit SNX9

Die Interaktion von CPn0678 mit SNX9 wird über die erste PRR mit der SH3-Domäne von SNX9 etabliert. Die erste PRR enthält ein konserviertes RxxPxxP-Motiv, das ebenfalls in der ersten PRR von CPn0677 existiert. Bereits in früheren Arbeiten wurde postuliert, dass CPn0677 auf eine ähnliche Weise wie CPn0678 mit SNX9 interagieren kann (216). Aus diesem Grunde wurde untersucht, ob und auf welche Weise CPn0677 mit SNX9 interagiert. Hierfür wurde zunächst der ektoptische Expressionsphänotyp der beiden Proteine in HEp-2-Zellen untersucht (Abb. 13 A). HEp-2-Zellen, die CPn0677-GFP exprimierten, zeigten einen zytosolischen Phänotypen mit einer leichten Membranassoziation. Die Expression von mCherry-SNX9 in HEp-2-Zellen führt ebenfalls zu einer zytosolischen Lokalisation mit einigen, in der Größe variierenden „Akkumulationen“ innerhalb des Zytoplasmas. Bei der Kotransfektion von CPn0677-GFP mit mCherry-SNX9 ändert sich der Phänotyp der beiden Proteine (Abb. 13 A). Der überwiegende zytosolische Phänotyp wird ergänzt durch eine Kolo­kalisierung der beiden in Strukturen innerhalb des Zytosols, sowie durch eine ausgeprägte Kolo­kalisierung in fadenartigen Strukturen.

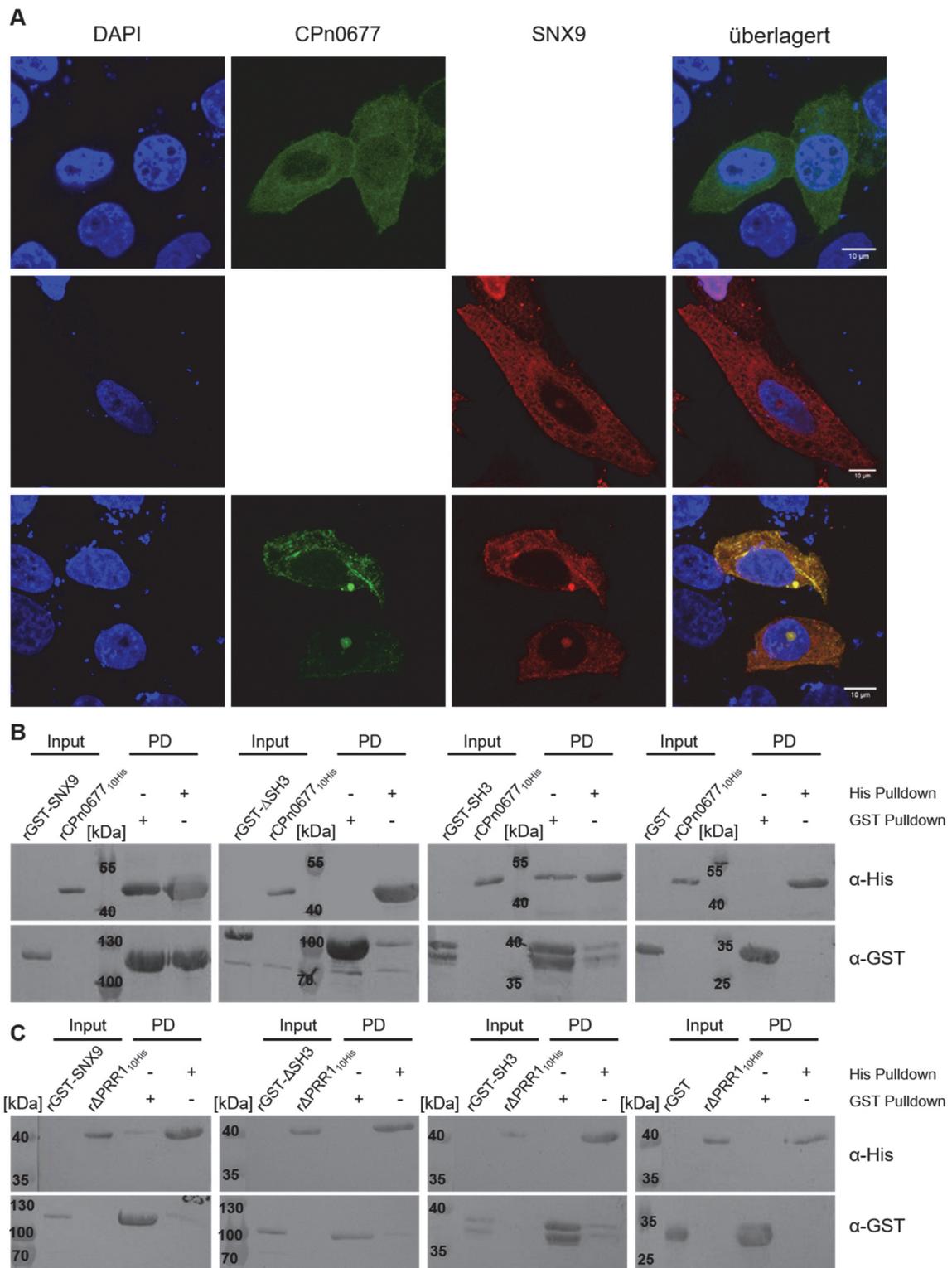


Abbildung 13: Lokalisationsanalyse und Proteininteraktionsstudien zu CPn0677 und SNX9

(A) Transfektionen zur Untersuchung der Lokalisation von CPn0677-GFP, mCherry-SNX9 als Einzeltransfektionen (oben) und Kotransfektion (unten). Die Zellen wurden nach 15 h fixiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt (Größenstandard = 10 µm). (B + C) Proteininteraktionsstudie durch Pulldown-Experimente mit gereinigten rekombinanten GST- oder GST-SNX9-Varianten (ΔSH3, SH3) und CPn0677^{10His} (A) bzw. CPn0677ΔPRR1^{10His} (C). Die Proben stammen aus His-Pulldowns und GST-Pulldowns und wurden durch SDS-PAGE fraktioniert und mit α-His und α-GST Antikörpern detektiert.

Eine durch die ektopische Expression hervorgerufene Kolo-kalisation von Proteinen in Zellen lässt nur begrenzt Rückschlüsse auf eine direkte Interaktion zu. Der beobachtete

Phänotyp könnte durch den Einfluss weiterer endogener Proteine oder anderer zellulärer Bestandteile beeinflusst werden. Um die unerwünschten Effekte der endogenen Proteine auszuschließen, wurde die CPn0677-SNX9-Wechselwirkung in Pulldown-Experimenten mit rekombinanten GST- oder GST-SNX9 Varianten (Δ SH3, SH3) und CPn0677_{10His} untersucht. Bei den Pulldowns mit His- oder GST-Agarose konnte gezeigt werden, dass eine direkte Interaktion zwischen CPn0677_{10His}-GST-SNX9 vorliegt (Abb. 13 B). Die Bindung ist spezifisch und beruht auf Wechselwirkungen zwischen CPn0677_{10His} und SNX9, da CPn0677_{10His} über GST nicht koeluiert wird (Abb. 13 B). Analog zu den Interaktionsstudien von CPn0678 und SNX9 wurde überprüft, ob die Interaktion auf der ersten PRR mit der SH3-Domäne beruht. Bei Deletion der SH3-Domäne ist keine Bindung an CPn0677_{10His} mehr möglich, wohingegen die SH3-Domäne ausreicht, um mit CPn0677_{10His} zu interagieren (Abb. 13 B). Sofern die erste PRR von CPn0677_{10His} deletiert wurde, ist in allen Pulldown-Experimenten keine Bindung mit den GST-SNX9-Varianten mehr sichtbar. Zusammenfassend kann daher postuliert werden, dass SNX9 ein direkter Interaktionspartner ist, der auf dieselbe Weise mit CPn0677 und CPn0678 interagiert.

5.5.1.2.2 CPn0677 kolokalisiert mit WIP

WIP wird in der Literatur eine Rolle bei der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts zugetragen, da es mit NCK1 und GRB2 zur Rekrutierung und Aktivierung von N-WASP führen kann. Darüber hinaus ist es an der Regulierung der subzellulären Lokalisation von N-WASP beteiligt (221, 222). Im zweiten Manuskript konnte gezeigt werden, dass CPn0677 in der Lage ist, direkt mit N-WASP zu interagieren. Möglicherweise ist WIP ein falsch positiver Kandidat, der lediglich aufgrund der Sensitivität der Massenspektrometrie und der Assoziation an N-WASP in den Proben detektiert wurde und deshalb kein direkter Interaktionspartner von CPn0677 ist.

Zunächst wurde der ektopische Expressionsphänotyp beider Proteine in HEp-2-Zellen untersucht (Abb. 14 A). HEp-2-Zellen, die CPn0677-GFP exprimieren, zeigten erneut den zuvor beobachteten überwiegend zytosolischen Phänotyp mit einer leichten Membranassoziation. Die Expression von mCherry-WIP in HEp-2-Zellen weist eine hauptsächlich zytosolische Lokalisation mit einigen größeren Akkumulationen innerhalb der Zelle auf (Abb. 14 A). Die Kotransfektion der beiden Proteine in HEp-2-Zellen resultiert in einer Kolokalisation in den zuvor beobachteten Akkumulationen von CPn0677-GFP und mCherry-WIP in Flecken mit unterschiedlicher Stärke.

Durch Pulldown-Experimente in transfizierten HEp-2-Zellen wurde untersucht, ob mCherry-WIP durch CPn0677-GFP präzipitiert wird (Abb. 14 B). In der Tat war es möglich, WIP über CPn0677-GFP zu präzipitieren. Dies legt nahe, dass WIP zumindest indirekt, womöglich über die Assoziation an N-WASP, mit CPn0677 eluiert. Um abschließend zu beurteilen, ob es sich um eine direkte oder eine indirekte Interaktion handelt, müssen Pulldown-

Experimente mit rekombinantem Protein durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit dies zu überprüfen, bietet die Analyse, ob endogenes N-WASP in den Elutions-Proben vorhanden ist und somit Rückschlüsse auf die indirekte Interaktion gibt.

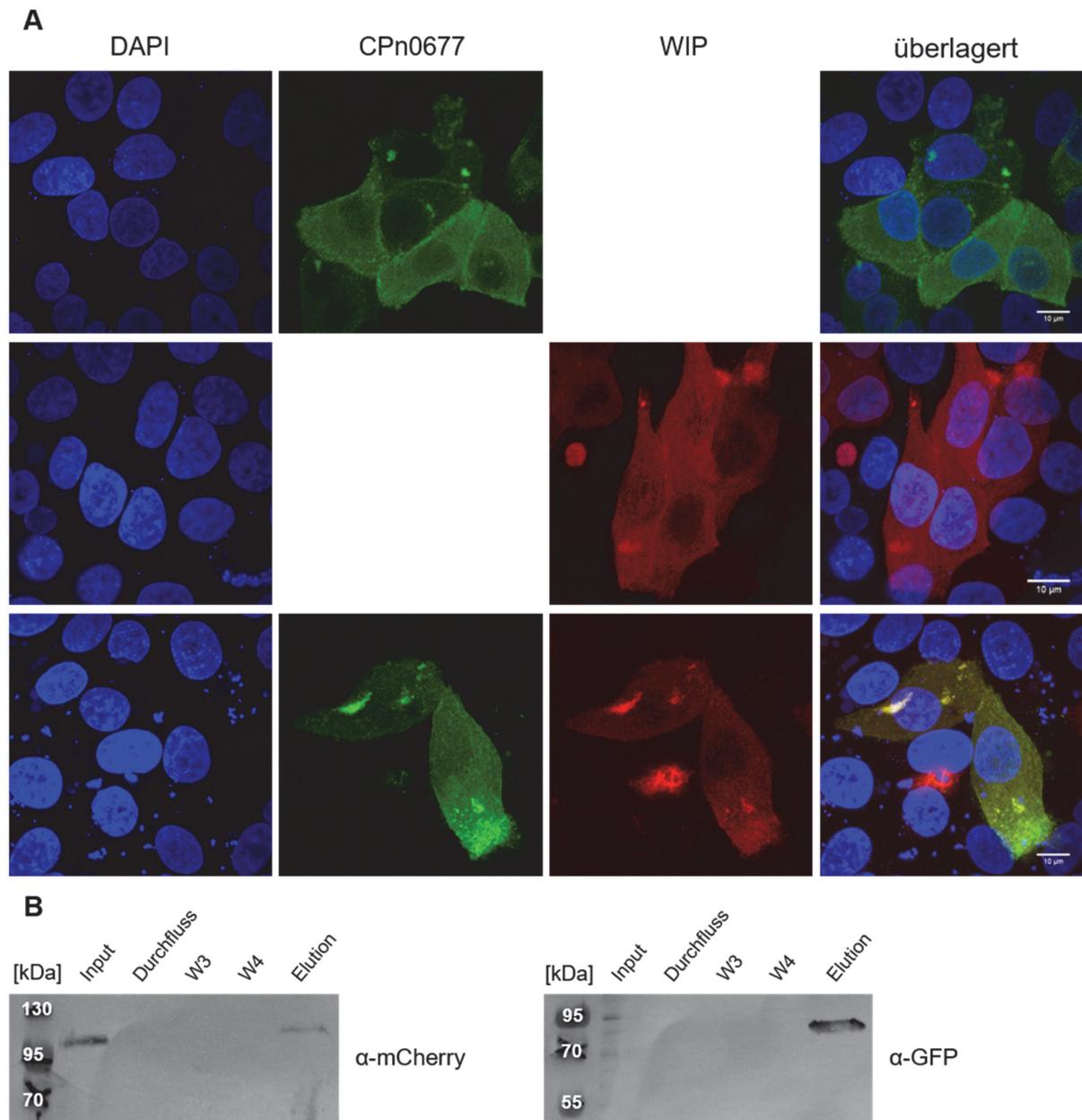


Abbildung 14: Lokalisationsanalyse und Proteininteraktionsstudien zu CPn0677 und WIP

(A) Transfektionsexperimente zur Untersuchung der Lokalisation von CPn0677-GFP, mCherry-WIP als Einzeltransfektionen (oben) und Kotransfektion (unten). Die Zellen wurden nach 15 h fixiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt (Größenstandard = 10 μ m). (B) Proteininteraktionsstudie durch Pulldown-Experimente mit gereinigten transfizierten CPn0677-GFP und mCherry-WIP. Die Proben stammen aus GFP-Trap-Pulldowns und wurden durch SDS/PAGE fraktioniert und mit α -mCherry und α -GFP-Antikörpern detektiert.

5.5.1.3 CPn0678 Lokalisations- und Interaktionsstudien mit den identifizierten humanen Proteinen

Neben den potenziellen Interaktionspartnern von CPn0677 war es das Ziel dieser Arbeit, weitere humane Proteine zu identifizieren, die mit CPn0678 interagieren und als mögliche

Manipulationsziele durch *C. pn.* gelten. Ein interessanter Kandidat, der bewiesenermaßen mit CPn0677 interagiert, ist Syndapin 2. In der Massenspektrometrie wurde Syndapin 2 als signifikant erhöht für CPn0678 nachgewiesen. Zunächst wurde der ektopische Expressionsphänotyp der beiden Proteine in HEp-2-Zellen untersucht (Abb. 15).

5.5.1.3.1 CPn0678 Interaktion mit Syndapin 2

Bei HEp-2-Zellen, die CPn0678-GFP exprimieren, ist eine deutliche Akkumulation in Form von Flecken in der Nähe des Zellkerns zu erkennen, zusätzlich ist eine Membranassoziation zu beobachten (Abb. 15 B). Zellen, die mCherry-Syndapin 2 exprimieren, zeigen einen starken zytosolisch ausgeprägten Phänotypen, mit teils kleineren punktaktigen Anhäufungen (Abb. 15 B). In der Kotransfektion ist eine starke Relokalisation von mCherry-Syndapin 2 zu den CPn0678-positiven Strukturen zu erkennen. Es kommt zu einer Überlagerung der Signale an der Membran und in Akkumulationen, die sich auf fadenartige Strukturen beschränken (Abb. 15 B). Sobald die Membranbindefähigkeit von CPn0678 durch Deletion der APH aufgehoben wird, ändert sich der Kotransfektionsphänotyp. Es ist keine Membranassoziation mehr zu erkennen und Δ APH-GFP sowie mCherry-Syndapin 2 lokalisieren lediglich in kleineren fleckenartigen Strukturen (Abb. 15 B). Die Kolokalisation der beiden Proteine scheint dabei abhängig vom C-terminus von CPn0678 zu sein, da bei der Transfektion der N-terminalen Variante mit mCherry-Syndapin die vorherige, bei der Vollängen-Variante beobachtete, Kolokalisation komplett aufgehoben ist (Abb. 15 B). Zur Überprüfung, ob es sich um eine direkte Interaktion handelt, wurden Pulldown-Experimente mit rekombinant aufgereinigten GST-Syndapin 2 und CPn0678_{10His}-Varianten durchgeführt (Abb. 16). rGST-Syndapin 2 bindet durch im Protein vorhandene Histidine an Nickel-NTA Agarose, weshalb die Pulldown-Experimente nur über den GST-Tag und Pierce™ Glutathion Agarose durchgeführt wurden (Daten nicht gezeigt). Anhand der Experimente konnte eine direkte Interaktion von CPn0678 mit Syndapin 2 belegt werden. Diese Bindung beruht auf einer im C-terminus enthaltenen Domäne von CPn0678. Der C-terminus von CPn0678 besteht aus drei sich wiederholenden PRRs, die vermutlich funktionell, analog zur CPn0678-SNX9-Interaktion, mit der SH3-Domäne von Syndapin 2 wechselwirken. Das kann jedoch bislang nicht eindeutig ausschlaggebend bewiesen werden.

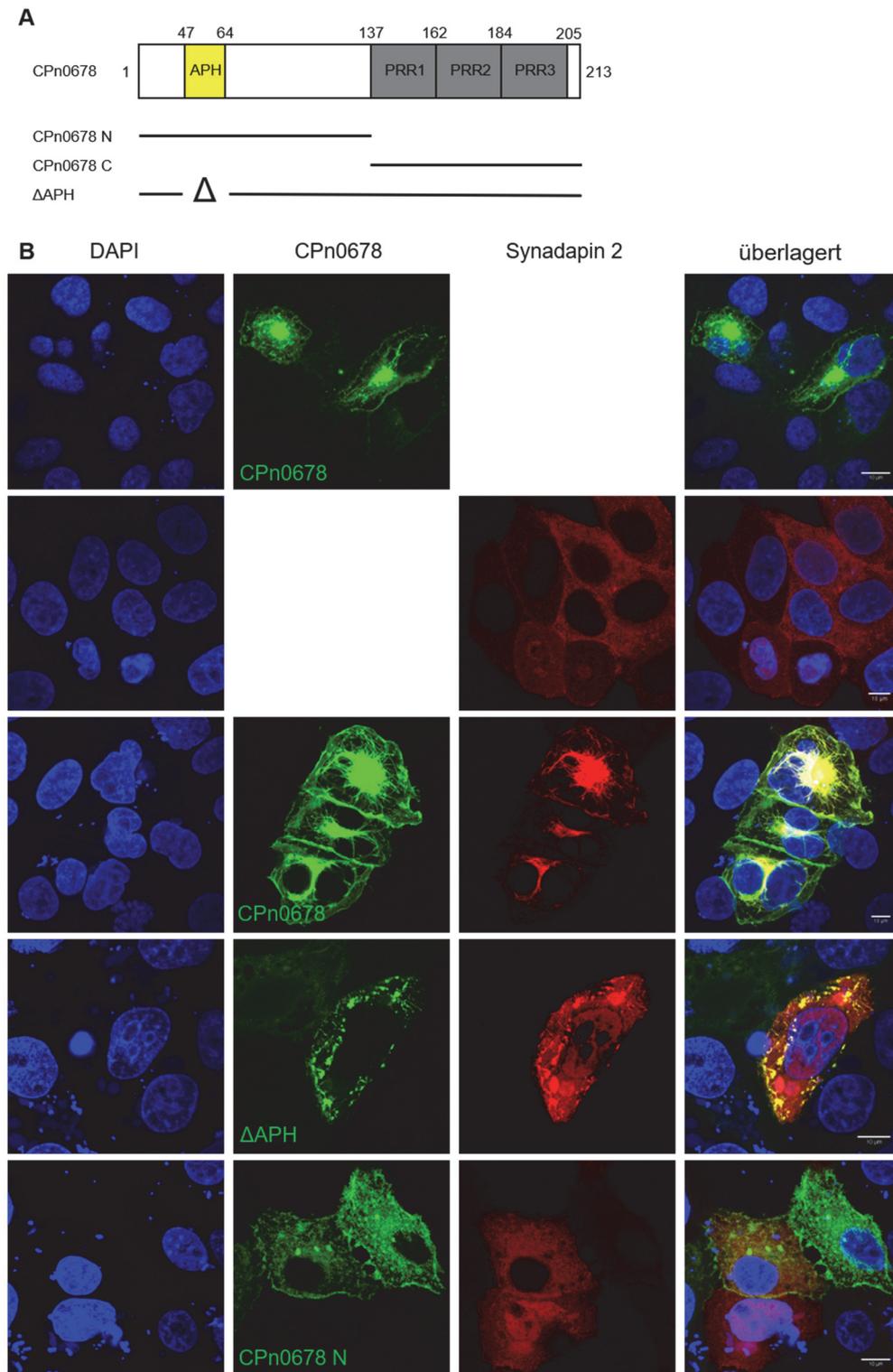


Abbildung 15: Ektopische Expression von CPn0678 und Syndapin2 in HEp-2-Zellen.

(A) Schematische Darstellung von CPn0678 mit Domänenübersicht. (B) Ektopische Expression von CPn0678-Varianten mit Syndapin 2 zur Untersuchung der Lokalisation in Humanzellen. Die Zellen wurden nach 15 h fixiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt (Größenstandard = 10 µm).

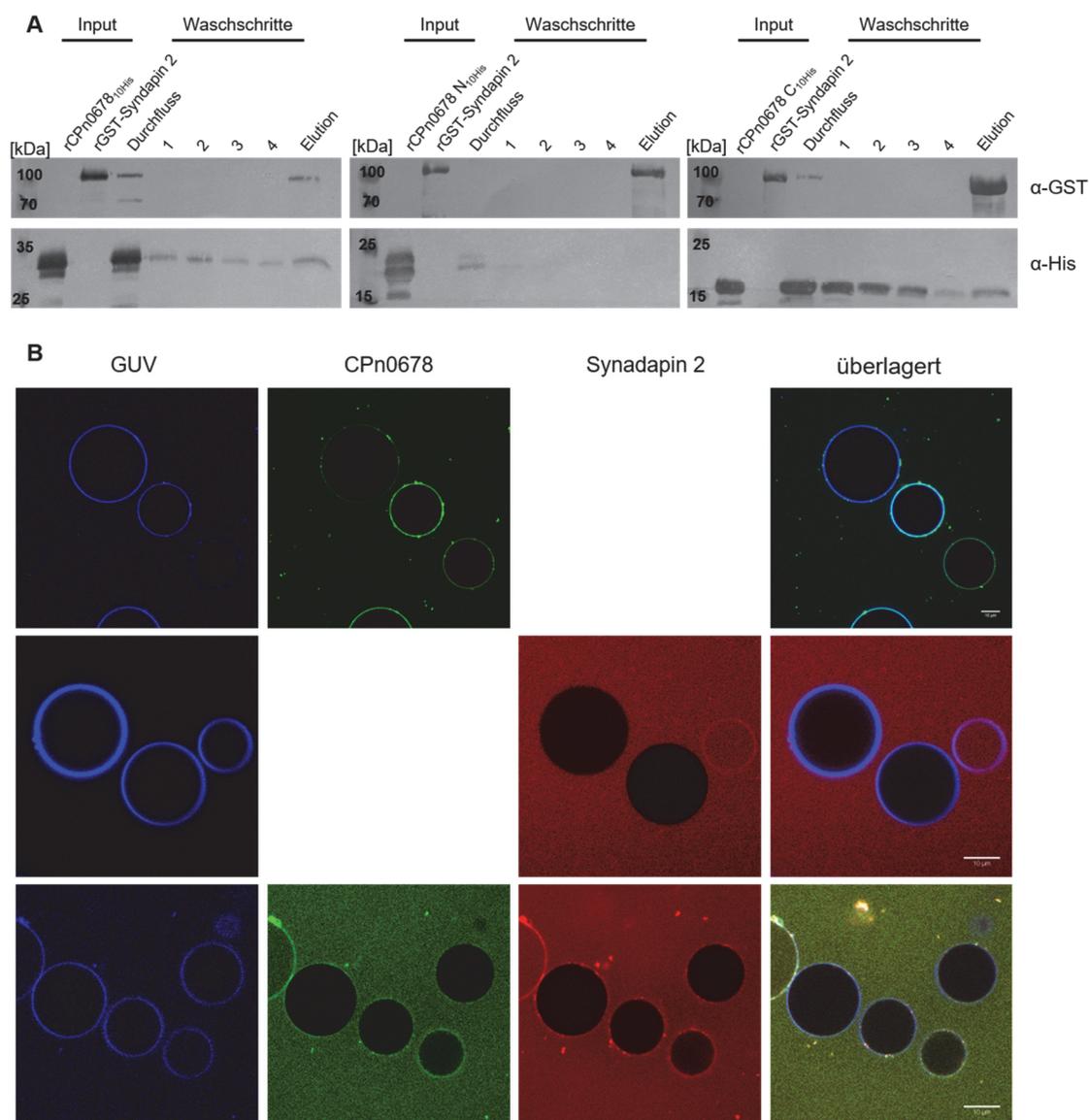


Abbildung 16: Proteininteraktionsstudien mit CPn0678 und Syndapin

(A) Proteininteraktionsstudie durch Pull-down-Experimente mit gereinigten, rekombinanten GST-Syndapin 2 und CPn0678^{10His}-Varianten (CPn0678^{10His}, CPn0678 N, CPn0678 C). Die Proben stammen aus GST-Pulldowns und wurden durch SDS-PAGE fraktioniert und mit α-His und α-GST Antikörpern detektiert. (B) Lipidbindungsassay von FITC-gefärbtem CPn0677 und Alexa594-gefärbtem Syndapin 2 an Marina Blue-gefärbte DOPS GUVs. konfokale Mikroskopische Aufnahmen von GUVs, die mit CPn0678 (oben), Syndapin 2 (Mitte) oder beiden Proteinen zugleich (unten) für 10 min inkubiert wurden (Größenstandard = 10 µm).

Für SNX9 und CPn0678 konnte eine Rekrutierung zur Membran über GUV-Experimente nachgewiesen werden. Analog zu diesen Experimenten sollte untersucht werden, ob CPn0678 in der Lage ist, Syndapin 2 zur GUV-Membran zu rekrutieren (siehe Manuskript I). Aufgrund der starken Affinität von CPn0678 zu DOPS-GUVs wurden diese in den Experimenten verwendet. Es konnte eine Bindung von CPn0678 an DOPS-haltige GUVs nach spätestens 10 min beobachtet werden (Abb. 16 B). Eine Bindung von Syndapin 2 an DOPS-GUVs konnte nach einer 10-minütigen Inkubationszeit nicht erkannt werden (Abb. 16 B). Erst nach der zusätzlichen Zugabe von CPn0678 war eine Assoziation von CPn0678 und Syndapin 2 an der Membran der GUVs erkennbar (Abb. 16 B). Ob diese Rekrutierung

allein über die PRR zustande kommt oder über die durch CPn0678 induzierte Membrankrümmung, die Syndapin 2 über die F-Bar-Domäne erkennen kann (223), muss durch weiterführende Experimente geklärt werden.

5.5.2 Stabile Trimerbildung durch CPn0678 und CPn0677 Monomere

In früheren Studien wurde bereits eine mögliche Oligomerisierung von CPn0678 thematisiert und postuliert, dass CPn0678 stabile Trimere ausbildet (216). Die initialen Experimente wurden unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt mit Einsatz von Crosslinkern, damit das Protein im oligomeren Zustand fixiert bleibt. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Ansatz gewählt, CPn0677 und CPn0678 unter nativen Bedingungen zu untersuchen. Eine Möglichkeit, Oligomerisierung unter nativen Bedingungen zu analysieren, liegt in der Größenauftrennung mittels Blue Native PAGE (Abb. 17 A). Dies wurde für rekombinant aufgereinigtes rCPn0677 und rCPn0678 durchgeführt. Bei CPn0677 sind im Coomassie-gefärbtem Blue Native Gel Proteinbanden bei ca. 40, 144 und 350 kDa erkennbar (Abb. 17 A). Durch die Detektion mittels α -His Antikörpern gegen den His-Tag des Proteins können nur zwei spezifische Banden bei ca. 40 und 146 kDa detektiert werden (Abb. 17 A). Das errechnete Molekulargewicht für CPn0677 beträgt 43 kDa, folglich würden die Ergebnisse der Blue Native PAGE auf einen Monomer und einen Trimer-Zustand von CPn0677 hinweisen. Im direkten Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse des SEC-Laufs. Das Chromatogramm der Analyse weist nur einen Peak mit UV-Absorptionsmaximum bei 17,5 ml auf. Dies deutet daraufhin, dass nur eine Proteinspezies existiert. Nach Berechnungen und einem Vergleich mit Standardproteinen wurde ein Molekulargewicht von 41,7 kDa berechnet, was ungefähr der monomären Größe von CPn0677 entspricht (Abb. 17 B). Das zuvor beobachtete Trimer oder andere Oligomere wurden nicht detektiert.

Das errechnete Molekulargewicht für CPn0678 liegt bei 24 kDa. Im Coomassie-gefärbten Blue Native Gel sind Banden bei ca. 30 und 146 kDa erkennbar (Abb. 17 A). Nach Transfer der Proteine auf eine Membran und nach Detektion mittels α -His Antikörpern, sind keine spezifischen Banden für CPn0678 zu erkennen. Lediglich eine verlaufene große Bande, die bei ca. 30 kDa anfängt und bis zu 480 kDa läuft, ist sichtbar (Abb. 17 A). In diesem Fall scheint CPn0678 neben dem Monomer auch weitere oligomäre Zustände einzunehmen.

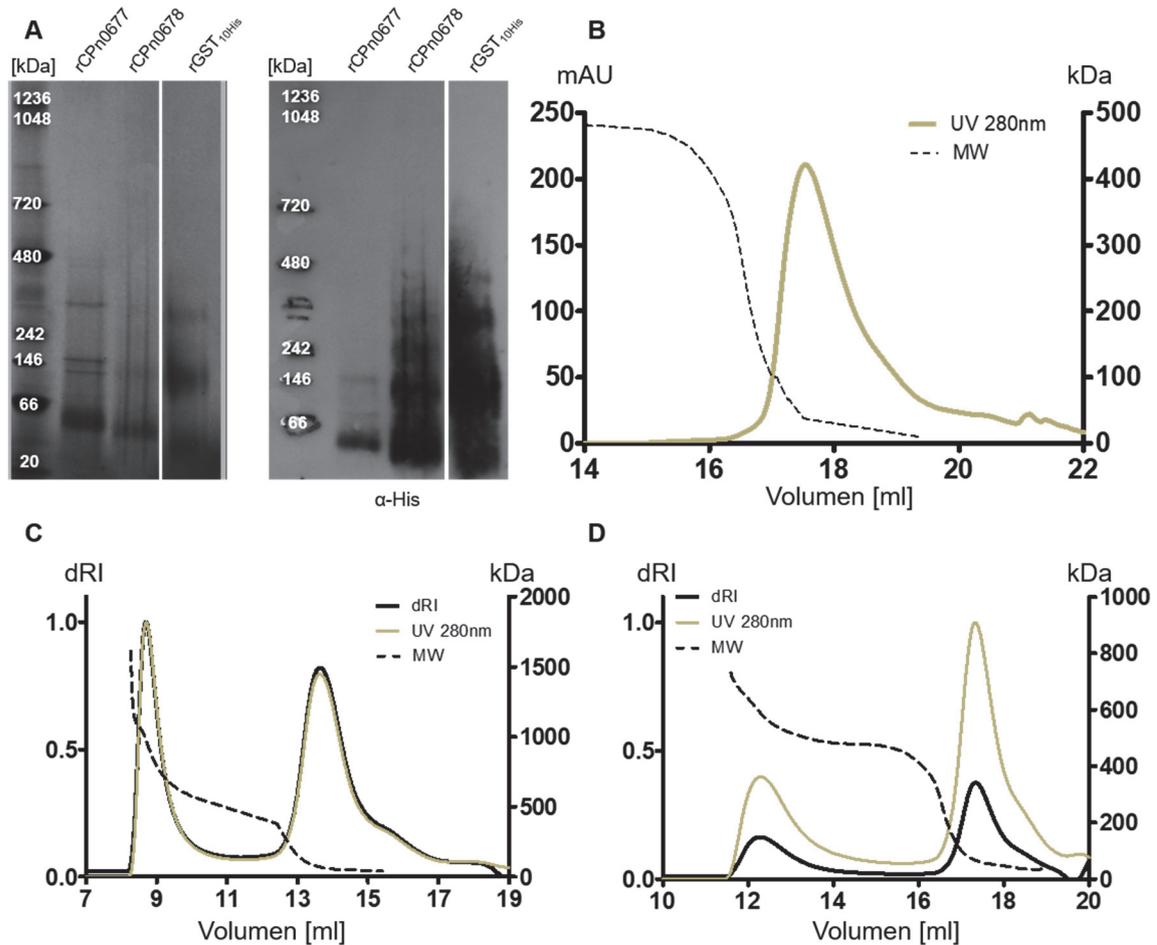


Abbildung 17: Oligomerisierungs-Analyse zu CPn0677 und CPn0678

(A) Oligomerisierungs-Analyse im Blue Native Gele 4 – 16 %. Die rekombinanten Proteine wurden für 60 min bei 100.000 g zentrifugiert. Pro Bande wurden 2 µg Protein geladen. Im Anschluss zur Elektrophorese wurden die Gele mit Coomassie gefärbt (Linkes Gel) oder auf eine PVDF-Membran übertragen und die Banden mit α-His Antikörpern detektiert. Darstellung eines repräsentativen Gels/Blots (n = 2). (B) Superdex 200 increase 10/300 GL Größenausschluss-Chromatographie von nativem CPn0677. Das rekombinante Protein wurde bei 100.000 g für 60 min zentrifugiert. Geladen wurden 500 µl mit einer Konzentration von 1,5 mg/ml. Das Chromatogramm zeigt die gemessene Absorption (braune Linie) und das berechnete Molekulargewicht (schwarz gestrichelte Linie) (n = 2). Superdex 200 (C) und Superose 6 (D) Größenausschluss-Chromatographie von CPn0678. Das Protein wurde bei 100.000 g für 60 min zentrifugiert. Geladen wurden 500 µl mit einer Konzentration von 2,0 mg/ml. Das Chromatogramm zeigt die gemessene Absorption (braune Linie), den differentiellen Brechungsindex (schwarze Linie) und das berechnete Molekulargewicht (schwarz gestrichelte Linie) (n = 3).

Interessanterweise sind in der SEC-Analyse von CPn0678 ähnliche oligomäre Zustände von CPn0678 zu beobachten. Das Chromatogramm der Superdex 200 Säule zeigt zwei gemessene Peaks, die nahezu identisch verlaufen für die UV-Absorption und für den differentiellen Brechungsindex (Proteinkonzentrationsabhängig); die Maxima liegen hierfür bei ca. 9 und 14 ml (Abb. 17 C). Dies spricht dafür, dass mindestens zwei distinkte Proteinzustände existieren. Der erste Peak befindet sich zum Teil im *void*-Volumen, weshalb eine präzise Auswertung des Molekulargewichts nicht möglich ist. Es handelt sich bei dieser Spezies um ein höheres Oligomer. Der zweite Peak hat eine berechnete Masse von 70,34 kDa, dies entspricht einem Trimer. Zur Überprüfung der Ergebnisse und durch die Verwendung einer zweiten Säule, der Superose 6 mit leicht veränderten

Trenneigenschaften im Vergleich zur Superdex 200, ist das Ergebnis für CPn0678 reproduzierbar. Das Chromatogramm zeigt zwei Peaks bei ca. 12,4 und 17,6 ml. In diesem Fall liegt der erste Peak nicht im *void*-Volumen und die Größenberechnungen ergaben eine Spezies mit einer Masse zwischen 563 und 587 kDa. Das würde einem CPn0678 Oligomer von 24 oder 25 Molekülen entsprechen. Der zweite Peak hat eine errechnete Größe zwischen 66 und 77 kDa. Die Bestimmung ist aufgrund der nicht gleich verlaufenden Linien der UV-Messung und des differentiellen Brechungsindex nicht exakt möglich. Erneut entspräche die Größe dieser Spezies einem Trimer.

Zusammengefasst sind die Ergebnisse für CPn0677 widersprüchlich. Im Blue Native Gel existierte neben dem Monomer ein Trimer, welches jedoch im SEC-Lauf nicht bestätigt werden konnte. Kongruent zu früheren Analysen konnte für CPn0678 ein Trimer-Zustand bestätigt werden und darüber hinaus ein größeres Oligomer von 24 bis 25 Molekülen.

5.5.3 Lokalisation von CPn0677 zur Plasmamembran durch einen EGF-Stimulus

Die Aktivierung des EGFR durch Pmp21 ist ein essenzieller Schritt für die *C. pn.* Infektion (187). Da CPn0677 ein früh sekretierter Effektor ist, sollte mit der Induktion der Endozytose durch EGF dieser Prozess in HEp-2-Zellen simuliert werden. Durch die ektopische Expression sollten Änderung in der Lokalisation des CPn0677-Phänotyps analysiert werden. In HEp-2-Zellen ohne EGF-induzierte Endozytose weist CPn0677 zu 86,7 % einen zytosolisch lokalisierten Phänotypen auf. Lediglich in 13,3 % der Fälle ist eine Assoziation von CPn0677 mit der Membran vorhanden (Abb. 18 B und C). Im Fall der N-terminalen CPn0677-Variante kommt es zu einer drastischen Umverteilung der Signale und nur noch 36,7 % der Zellen haben einen zytosolischen Phänotypen, während 63,3 % der Zellen eine Membranassoziation von CPn0677 zeigen. In vielen Fällen ist der erlangte Phänotyp denen der ektopischen Expression von CPn0678 ähnlich und bildet tubuläre Strukturen innerhalb der Zelle aus (siehe Manuskript I und II). Der Einfluss der CPn0677-APH wird in den Varianten CPn0677 C und Δ APH deutlich. Sobald die Membranbindedomäne fehlt, führt das zum Verlust der Membranassoziation und zu einer 100 % zytosolischen Lokalisation von CPn0677.

Um die Endozytose zu simulieren und damit eine Pmp21-EGFR ähnliche Stimulation zu erlangen, wurde mit den zuvor genutzten Varianten und der Zugabe von EGF das Experiment wiederholt (Abb. 18 D und E). Nach 15-minütiger EGF-Induktion zeigten 43,5 % von CPn0677 Membranassoziationen bzw. Kolo-kalisation von CPn0677 und EGF₅₉₄ und 56,5 % der Zellen wiesen den zytosolischen Phänotypen von CPn0677 auf. Im direkten Vergleich zu den nicht-induzierten Zellen ist das eine Steigerung der Membranassoziation

um ca. 30 %. Die CPn0677 N-Variante zeigt keine großen Auswirkungen durch die EGF-Induktion und nur ein leichter Anstieg auf 68,3 % der Zellen, die eine CPn0677- und EGF₅₉₄ Membranassoziation aufweisen, ist zu erkennen. Ebenfalls keinen Effekt hat die EGF-Induktion auf die Lokalisation von CPn0677 C und Δ APH, erneut zeigten nahezu 100 % der Zellen den zytosolischen Phänotypen.

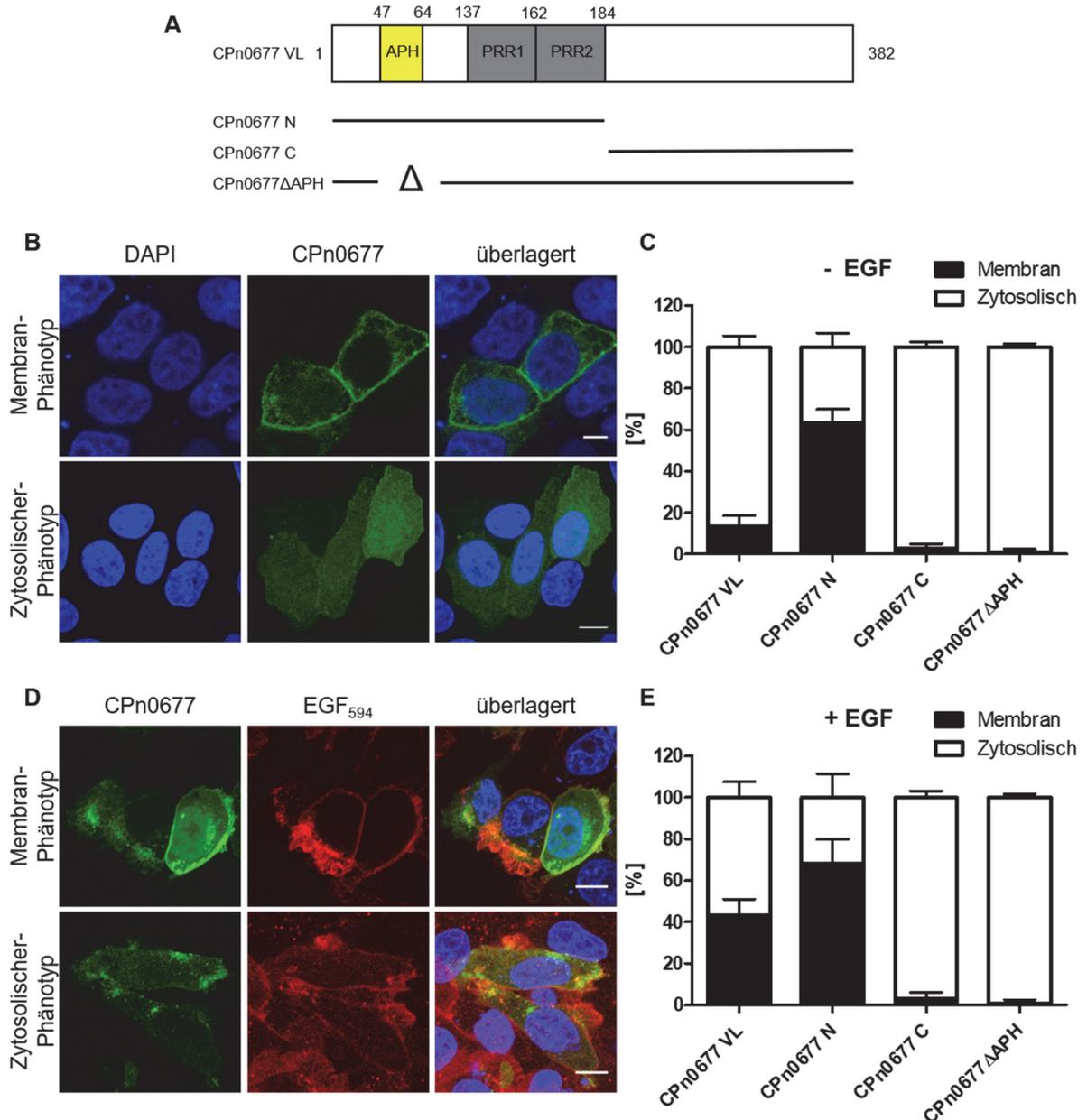


Abbildung 18: Einfluss der EGFR-vermittelten Endozytose auf die CPn0677 Lokalisation

(A) Schematische Darstellung von CPn0677 mit Domänenübersicht. (B) Repräsentative Mikroskopie-Aufnahmen der Transfektionsphänotypen von CPn0677 in HEP-2-Zellen. Die Zellen wurden nach 15 h fixiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt (Größenstandard = 10 μ m). (C) Quantifizierung der Phänotypen aus B. Für jede Variante wurden 10 Gesichtsfelder ausgezählt und der prozentuale Anteil des Membran- oder zytosolischen Phänotyps pro Gesichtsfeld berechnet und als Mittelwert + Standardabweichung darstellt (n = 2). (D) Repräsentative Mikroskopie-Aufnahmen der Transfektionsphänotypen von CPn0677 in HEP-2-Zellen nach 15-minütiger EGF₅₉₄ Inkubation. Die HEP-2-Zellen wurden nach 15 Stunden Transfektionszeit für weitere 6 Stunden im Mangel-Medium inkubiert. Anschließend wurde Rezeptor-vermittelte Endozytose mittels markiertem EGF induziert. Die Zellen wurden nach weiteren 15 min fixiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt

(Größenstandard = 10 μm). **(E)** Quantifizierung der Phänotypen aus D. Für jede Variante wurden 10 Gesichtsfelder ausgezählt und der prozentuale Anteil des Membran- oder zytosolischen Phänotyps pro Gesichtsfeld berechnet und als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt ($n = 2$).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die EGF-induzierte Endozytose einen Einfluss auf die CPn0677 Lokalisation hat und es zu einer Relokalisation zur EGF-positiven Membran kommt. Dies ist abhängig von der APH, da sämtliche Varianten ohne APH keine Membranbindung zeigen. Möglicherweise hat der C-terminus einen dominant negativen Einfluss auf die Membranlokalisation, da in der volllängen Variante die Membranbindung im Vergleich zur N-terminalen Variante reduziert ist.

5.6 Diskussion

Chlamydien sind obligat intrazelluläre Pathogene, die aufgrund ihres einzigartigen biphasischen Lebenszyklus auf Wirtszellen angewiesen sind. Zu allen Zeitpunkten der *C. pn.* Infektion werden Effektorproteine, die in biologische Prozesse der Wirtszellen eingreifen, über das T3SS sekretiert. Auch in der frühen Infektionsphase werden bakterielle Effektoren sezerniert, die eine Internalisierung von *C. pneumoniae* begünstigen. Zwei dieser früh sekretierten Effektoren sind CPn0677 und CPn0678, die an der Endozytose von infektiösen EBs beteiligt sind.

5.6.1 Die bakteriellen Interaktionsplattformen CPn0677 und CPn0678

Die chlamydialen Effektorproteine CPn0677 und CPn0678 werden während der frühen Phase der *C. pn.* Infektion in die Wirtszelle sezerniert. Durch die PRRs von CPn0677 und CPn0678, in denen konservierte RxxPxxP-Motive enthalten sind, wird insbesondere die Interaktion mit humanen Proteinen, die SH3-Domänen tragen, etabliert. Bereits in früheren Arbeiten wurde eine Bindung von CPn0678 an SNX9 beschrieben (214, 216). Aufgrund der Aminosäuren-Identität innerhalb der ersten zwei PRRs von CPn0677 und CPn0678 wurde auch für CPn0677 eine Interaktion mit SNX9 postuliert (216). In dieser Arbeit wurde durch weitere Experimente eine Interaktion zwischen CPn0677 und SNX9, CPn0677 und N-WASP sowie CPn0677 und Syndapin 2 nachgewiesen (Manuskript II und Kapitel 5.5.1.3.1). Für CPn0678 wurde ebenfalls eine Interaktion von SNX9 und Syndapin 2 bestätigt (Manuskript I und Kapitel 5.5.1.2). Interessanterweise zeigen die Ergebnisse der quantitativen Massenspektrometrie eine Vielzahl von weiteren potenziellen humanen Interaktionspartnern für CPn0677 und CPn0678 (Abb. 12). In der Annahme, dass es sich bei diesen Proteinen um verifizierte weitere humane Interaktionspartner handelt, kann die Theorie abgeleitet werden, dass CPn0677 und CPn0678, multifunktionale, sekretierte bakterielle Interaktionsplattformen sind. In den nächsten Kapiteln wird diese These dahingehend diskutiert.

5.6.1.1 CPn0677 und USP9X vermittelte Regulation der EGFR-Endozytose

In der quantitativen Massenspektrometrie wurde USP9X als ein signifikant angereichertes Protein identifiziert. Es ist im Vergleich zu den anderen signifikanten Proteinen das am stärksten angereicherte Protein in den Proben (Kapitel 5.5.1).

Die Ubiquitin-spezifische Protease 9X (USP9X) ist eine substratspezifische Deubiquitinase, die ein außerordentlich hohes Maß an Sequenzkonservierung von Drosophila bis hin zu Säugetieren aufweist (224). USP9X kann enzymatisch Mono-Ubiquitin und eine Vielzahl von Ubiquitin-Ketten von Substraten abspalten und interagiert mit mindestens 35 Proteinen (225). Als Ubiquitin-modifizierendes Protein ist USP9X sowohl direkt als auch indirekt in zahlreiche zelluläre Prozesse involviert. Beispiele sind hier die Regulation der Zellpolarität, die Kontrolle der Apoptose und die Aktivität von USP9X in der Embryogenese (226–228). Im Kontext dieser Arbeit ist der Einfluss von USP9X auf die EGFR-vermittelte Endozytose besonders interessant.

Die Ubiquitinierung des EGFR nimmt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Lokalisation, der Stabilität und für den Internalisierungsschritt an der PM ein (229). Der Ubiquitinierungsstatus des EGFR ist das Ergebnis eines Gleichgewichts zwischen den Aktivitäten von E3-Ubiquitinligasen und deubiquitinierenden Proteinen (DUP) wie USP9X (230). Die DUP-Aktivität kann den intrazellulären Weg von EGFR entweder direkt beeinflussen, indem es EGFR selbst deubiquitiniert oder indirekt durch Regulierung des Ubiquitinierungsstatus von Adapterproteinen (231). Beispielsweise unterliegen Adapterproteine, die für die Internalisierung (z. B. Eps15 und Epsin) und der Sortierung (z. B. STAM) des EGFR erforderlich sind, einer EGF-induzierten Monoubiquitinierung. USP9X kann durch Deubiquitinierung der Adapterproteine vor dem proteasomalen Abbau schützen und dadurch die EGFR-Halbwertszeit bei der EGF-Stimulation verlängern oder verringern (231–233).

Zusammenfassend ist USP9X ein Regulator der EGFR-Endozytose. USP9X modifiziert, durch Zyklen von Ubiquitinierungs- und Deubiquitinierungsereignissen, die Internalisierung des EGFRs und bestimmt die Transportroute zu den endosomalen Kompartimenten (231). Durch die Rekrutierung von USP9X durch CPn0677 zur EB-Eintrittsstelle kann somit aktiv Einfluss auf die EGFR-vermittelte Endozytose genommen werden. Es bedarf jedoch weiterer Forschung, um die Relevanz von USP9X für die chlamydiale Infektion näher zu beschreiben.

5.6.1.2 CPn0677 und WIP – eine direkte oder indirekte Interaktion?

Neben N-WASP wurde WIP (*WAS/WASL-interacting protein family member*) als ein weiteres, signifikant angereichertes Protein in den Proben ermittelt (Kapitel 5.5.1). WIP

spielt eine wichtige Rolle bei der Aktin-Remodellierung durch Regulation der Aktinpolymerisation mittels Verknüpfung der Aktinmaschinerie mit diversen Signalkaskaden. Wie der Name des Proteins bereits verdeutlicht, wurde es als N-WASP Interaktionsprotein bekannt, das in zahlreichen Prozessen mit N-WASP assoziiert auftritt (234). Die Bindung von WIP an N-WASP reguliert dabei die zelluläre Verteilung und Funktion von N-WASP. Außerdem wird die Stabilität von N-WASP durch die Bindung von WIP beeinflusst, indem es die Ubiquitinierung von N-WASP verhindert und damit N-WASP vor proteasomalen Abbau schützt (235). Somit wird ersichtlich, dass WIP eng mit N-WASP verknüpft ist. Anhand der durchgeführten Experimente ist bislang nicht erkenntlich, inwiefern es sich bei der CPn0677-WIP-Wechselwirkung um eine direkte oder indirekte Bindung handelt (s. Kapitel 5.5.1.2.2). Bedingt durch die ektopische Expression in humanen Epithelzellen und der daraus resultierenden Überexpression von CPn0677 kann es zu einer Anreicherung von N-WASP kommen, an dem WIP gebunden ist. Die sensitive Massenspektrometrie detektiert WIP daraufhin als angereichertes Protein in den Proben. Jedoch ist WIP möglicherweise ein falsch-positiver Kandidat.

Da jedoch der endgültige Beweis der Bindung von WIP an CPn0677 aussteht, ist es auch möglich, dass WIP direkt mit CPn0677 interagiert. WIP zeichnet sich durch eine Multidomänenstruktur aus, die es ihm ermöglicht, an verschiedene Proteine zu binden. Der N-Terminus von WIP weist einen hohen Grad an Homologie zu Verprolin (Vrp1p) auf, einem in Hefe vorhandenen Aktin-Bindeprotein, das für die Organisation von Aktin, die Zellpolarität sowie die Endozytose von Bedeutung ist (236). Dadurch ist WIP, auch unabhängig von N-WASP, in der Lage, die Regulation des Aktin-Zytoskeletts zu steuern und würde im Kontext der bisherigen Erkenntnisse auch ohne die Assoziation an N-WASP als möglicher Interaktor für CPn0677 interessant sein.

5.6.1.3 CPn0678 und der WAVE-regulatory-complex - Parallelen zu CPn0677 und N-WASP

Für CPn0678 wurden als weitere, potenzielle Bindungspartner sämtliche Mitglieder des WAVE-regulatory-complex (WRC) identifiziert. Der WRC steuert die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts in der gesamten Zelle, indem er die Aktin-Keimbildungsaktivität des Arp 2/3-Komplexes an verschiedenen Membranstellen stimuliert.

Das Verprolin-homologe Protein WAVE kommt in allen Eukaryoten vor und spielt eine zentrale Rolle bei vielen zellulären Prozessen, einschließlich der Adhäsion, Migration, Zellteilung und -fusion (145). In Säugetier-Zellen wird WAVE konstitutiv in einen konservierten, heteropentameren Komplex mit einer Größe von ~ 400 kDa eingebaut, der als WRC bezeichnet wird. Dieser Komplex besteht aus den folgenden fünf Komponenten: Cyfip1 (Ortholog Cyfip2), Nap1 / Hem2 (Ortholog Hem1), Abi2 (Orthologe: Abi1 und Abi3),

HSPC300 / Brick1 und WAVE1 / SCAR (Ortholog: WAVE2 und WAVE3) (237). Der WRC wird als Reaktion auf Upstream-Signale von über 120 diversen Membranproteinen zur Membran rekrutiert und aktiviert. Bedingt durch die Aktivierung kommt es zu Konformationsänderungen im WRC und die Auto-Inhibition, durch intrakomplexe Sequestrierung der VCA, wird aufgehoben (238, 239). Durch diesen Prozess kann die VCA-Domäne an den Arp 2/3-Komplex binden und diesen aktivieren. Es kommt zu einer rasanten Aktinpolymerisierung an den Seiten bestehender Aktin-Filamente und somit wird ein verzweigtes Aktin-Netzwerk in der Nähe der PM erzeugt. Das polymerisierende Aktin übt eine gerichtete Kraft gegen die PM aus und induziert dadurch lokal begrenzte negative Membranausstülpungen in Richtung des Extrazellulärraums (240). Aufgrund dieser Eigenschaft wird die Aktivität des WRC als essenziell bei der Lamellipodien- oder Filopodien-Bildung erachtet (137).

Wird die Funktion vom WRC mit der von N-WASP verglichen, ergeben sich sowohl Parallelen als auch Unterschiede. Die Aktivierung von N-WASP ist abhängig von Rho-GTPasen und führt zu einer Arp 2/3 abhängigen Polymerisierung von Aktin, wobei die Aktin-Filamente in Richtung des Zytosols gerichtet sind und durch die Polymerisierung eine in das Zytosol gerichtete Kraft ausüben. Im Gegensatz dazu ist die Aktivierung des WRC von Rac-GTPasen abhängig und die Polymerisierung der neuen F-Aktin-Filamente ist in Richtung der PM gerichtet und erzeugt eine Kraftausübung in Richtung des Extrazellulärraums (137). Im Kontext der Infektionen erscheint es logisch, dass beide Mechanismen manipuliert werden. Die PM-Verformungen, die durch WASP oder dem WRC induziert werden, könnten unterstützend auf die Aufnahme chlamydialer EBs wirken und werden durch die Sekretion von T3SS-Effektoren in Gang gesetzt und können dem Trigger-Mechanismus zugeordnet werden. Da *C. pn.* durch die Bindung von Pmp21 an EGFR und dessen Aktivierung auch zusätzlich den Zipper-Mechanismus einsetzt, kommt es wahrscheinlich zu einer Mischung des Zipper- und Trigger-Mechanismus, um eine effektive Aufnahme der EBs in die Wirtszelle zu ermöglichen

Die Interaktionen von CPn0677 mit N-WASP scheint spezifisch zu sein, da der WRC nicht als möglicher Kandidat für CPn0677 in der Massenspektrometrie identifiziert wurde. Dasselbe gilt für die CPn0678-WRC-Interaktion, da in der Massenspektrometrie N-WASP nicht als Interaktionspartner von CPn0678 identifiziert wurde. Anscheinend manipulieren CPn0677 und CPn0678 unterschiedliche Wirtszellprozesse und Aktinregulatoren.

5.6.1.4 Konservierte Mechanismen unter Bakterien – Funktionelle Ähnlichkeit zum bakteriellen Effektor EspF

EspF ist ein zentrales Effektorprotein von enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) und enteropathogenen *E. coli* (EPEC), welches über das T3SS in Wirtszellen sekretiert wird.

EspF übernimmt eine zentrale Rolle in der bakteriellen Infektion und ist essenziell für die Invasion von Epithelzellen. Es gilt als bakterielle Interaktionsplattform, da 10 verschiedene Proteine als Interaktionspartner identifiziert wurden (241). Die Interaktionen mit den Proteinen haben diverse Auswirkungen auf Wirtszellprozesse. So wird beispielsweise durch die aktive Modulation zellulärer Mechanismen, wie die Umgestaltung des Zytoskeletts, Veränderungen der Mikrovilli oder sogenannter tight junctions, die Aufnahme der Bakterien ermöglicht (241).

Die C-terminale Region von EspF besteht aus 3 PRRs, in denen SH3-Bindungsmotive enthalten sind, ebenso wie eine Cdc42/Rac-interaktive Bindedomäne und eine Aktin-Bindedomäne (241). Durch ein konserviertes RxxPxxP-Motiv in den PRRs kann EspF spezifisch an die SH3-Domäne von SNX9 binden. Außerdem kann EspF direkt an N-WASP binden und aktivieren. Die Bindung von EspF hebt die intramolekulare Wechselwirkung der N-WASP-CRIB-Domäne mit der VCA-Domäne auf und gibt die VCA-Domäne frei. Daraufhin kann N-WASP mit der VCA-Domäne an den Arp 2/3-Komplex binden, welcher an die Seite bestehender Aktin-Filamente bindet. Dadurch wird das Wachstum eines neuen F-Aktin-Filaments initiiert und ein verzweigtes Aktin-Netzwerk generiert (242). Während der bakteriellen Invasion von EPEC wird ein Proteinkomplex, bestehend aus EspF, SNX 9 und N-WASP, gebildet, um die endogenen SNX9/N-WASP-Signalwege zu imitieren und die Regulation der Membran und des Aktin-Zytoskeletts zu beeinflussen. Hiermit wird die Kolonisierung und Internalisierung der pathogenen Bakterien in Darmepithelzellen gefördert (243).

Ein ähnlicher Mechanismus scheint für CPn0677 und CPn0678 wahrscheinlich, weshalb schon in früheren Arbeiten die Hypothese eines konvergenten Mechanismus geäußert wurde (214). CPn0677, CPn0678 und EspF besitzen ein konserviertes RxxPxxP-Motiv in den PRRs wodurch SNX9 als humaner Interaktionspartner für CPn677 und CPn0678 identifiziert werden konnte. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit die Interaktion von CPn0677 mit N-WASP bewiesen (Manuskript II). Chlamydien bilden eine einzigartige, bakterielle Evolutionsgruppe, die sich vor etwa einer Milliarde Jahren von anderen Bakterien getrennt hat (6, 244). Dennoch ist auffallend, dass zwei unterschiedliche Spezies ähnliche Invasionsstrategien entwickelt haben, was ein Indiz für eine konvergente Entwicklung darstellt.

5.6.2 Oligomerisierung von CPn0678 – ein bifunktionaler Mechanismus

Durch die Größenausschluss-Chromatographie-Analyse von nativem rCPn0678 wurde ein biologisch stabiles Trimer nachgewiesen (Kapitel 5.5.2). Die Trimer-Bildung von CPn0678 liefert eine mögliche Erklärungsgrundlage für zwei funktionale Eigenschaften von CPn0678. Die Ergebnisse des ersten Manuskripts zeigten, dass CPn0678 eine APH besitzt, die

negativ geladene Phospholipide bindet und Membrankrümmungen induziert. Das Membrankrümmungsereignis ist dabei lokal begrenzt auf die Bindestelle von CPn0678. Durch die Trimerisierung konzentrieren sich drei CPn0678-Moleküle lokal an der Membran und verstärken synergistisch den Membrankrümmungseffekt. Durch die halbseitige Insertion der CPn0678 APH in die PM-Lipiddoppelschicht kann die Membran gespreizt werden, was die Membran-Fluidität erhöht und eine Krümmung initiiert (245). Eine ähnliche Funktionsweise zeigen diverse BAR-Domänen-Proteine. Beispielsweise bildet SNX9, in Abhängigkeit von der BAR-Domäne, Homo- und Heterodimere aus, die nach der Dimerisierung Membrankrümmungen detektieren und verstärken, was im Extremfall zur Tubulation der Membran führen kann (125).

Des Weiteren wird durch die Trimerisierung von CPn0678 die Anzahl an freien Proteinbindestellen erhöht. Das würde erklären, wie die Bindung einer Vielzahl von potenziellen Interaktionspartnern an CPn0678 möglich ist (Kapitel 5.5.1). Die Gemeinsamkeit der Mehrzahl der identifizierten potenziellen humanen Interaktionspartner von CPn0678 liegt darin, dass sie SH3-Domänen (SNX9, Syndapin 2 und Abi 1/2), enthalten (246–249). Die Interaktion von CPn0678 mit SNX9 wird über die PRR mit der SH-3-Domäne etabliert und eben diese Interaktionsart ist auch für die weiteren SH-3-Domänen enthaltende Proteine möglich. Unwahrscheinlich ist jedoch, dass alle Proteine zeitgleich an ein monomeres CPn0678 binden, da es zu sterischen Hinderungseffekten kommen kann, bzw. sämtliche Bindestellen bereits durch humane Proteine, wie beispielsweise SNX9, besetzt sind. Eine mögliche Lösung dieser Problematik liegt in der Ausbildung des Trimers von CPn0678. Dadurch wird die Anzahl an PRRs erhöht, was die zeitgleiche Bindung von mehreren humanen Proteinen ermöglicht. Dieses Prinzip ist beispielsweise ein grundlegender Mechanismus von Adapterproteinen. Bekannt aus dieser Protein-Kategorie ist die 14-3-3 Proteinfamilie, die durch Dimerisierung simultan zwei Liganden binden kann und somit räumliche Nähe der beiden Liganden erzeugt (250).

Wie sich diese Effekte auf die frühe Infektion auswirken könnten, ist im folgenden Modell schematisch dargestellt. **(1)** CPn0678 wird in die Wirtszelle sezerniert. **(2)** Durch die APH wird zunächst eine Bindung an die PM vermittelt, gefolgt von einer Insertion der APH von CPn0678 in die PM und der Induktion lokaler Membrankrümmungseffekte. **(3)** CPn0678 rekrutiert SNX9 zur PM und bindet an SNX9. **(4)** Durch die Trimerisierung von CPn0678 und die Insertion weiterer APHs in die PM wird der Effekt der Membrankrümmung regional verstärkt. Dies stellt ein Signal für SNX9 dar, das zur SNX9-Dimerisierung führt und dadurch die Membrankrümmung unterstützt. Dies könnte eine positive Rückkopplung auslösen und weiteres SNX9 rekrutieren, um die Membran dementsprechend zu verformen, sodass eine effektive Aufnahme von EBs erleichtert wird. In diesem Kontext ist auch eine Rekrutierung

von Syndapin 2 mit einem ähnlichen Effekt, bzw. die weitere Bindung der identifizierten Proteine in der Massenspektrometrie, möglich.

Zusammengefasst kann die Oligomerisierung von CPn0678 als bifunktionaler Mechanismus betrachtet werden, da die Trimerisierung einerseits den Effekt der Membrankrümmung verstärken kann und andererseits die Bindung mit weiteren humanen Proteinen ermöglicht.

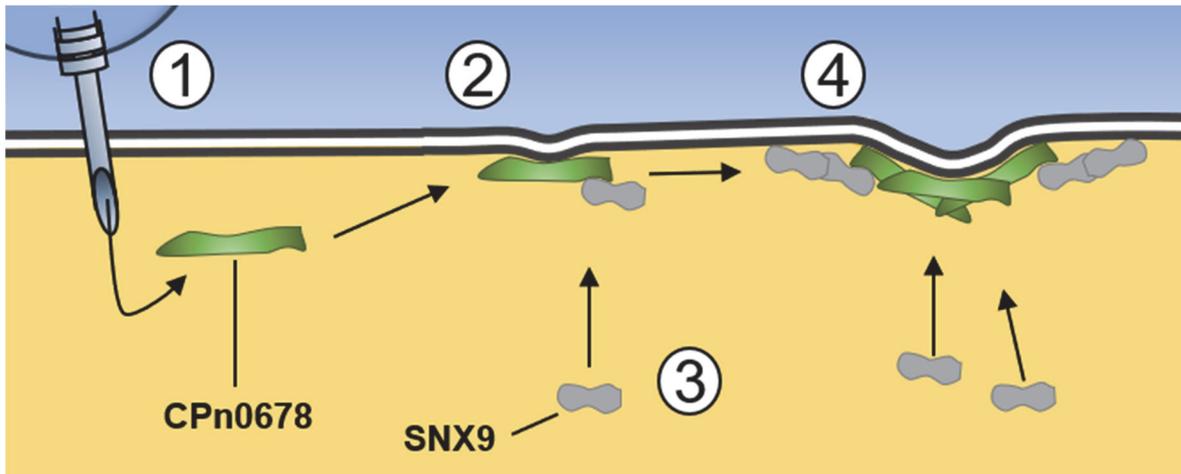


Abbildung 19: Oligomerisierung von CPn0678 und der potenzielle bifunktionelle Mechanismus.
Schematische Darstellung des bifunktionalen Mechanismus der CPn0678-Trimerisierung und dessen mögliche Auswirkungen auf die Infektion.

5.6.3 Beeinflussung der intrazellulären Lokalisation von CPn0677 durch einen EGF-Stimulus

Durch bioinformatische Analysen konnte eine N-terminale APH von CPn0677 identifiziert werden, die experimentell an synthetische Membranen bindet (Manuskript II). Allgemein müssen APHs einige Kriterien erfüllen, um Lipide binden zu können. APHs sollten ein hydrophobisches Moment ($\langle\mu_H\rangle$) von $\sim 0,5$ und eine Nettoladung zwischen $+1$ bis $+3$ aufweisen. Zusätzlich müssen polare AS, wie Lysin(K) und Arginin (R), sowie hydrophobe AS, wie Isoleucin, innerhalb der alpha-Helix existieren (251). Im Rahmen dieser Parameter bewegen sich die APHs von CPn0677 und CPn0678 (Abb. 20). In früheren Arbeiten wurde bereits eine ähnliche Funktion der CPn0677-APH zu der von CPn0678 postuliert (216). Im Rahmen dieser Arbeit konnte für die CPn0677 und CPn0678 APH eine Bindung an synthetische Membranen (GUVs) mit hoher Affinität an negativ geladene Phospholipide bewiesen werden (Manuskript I & II).

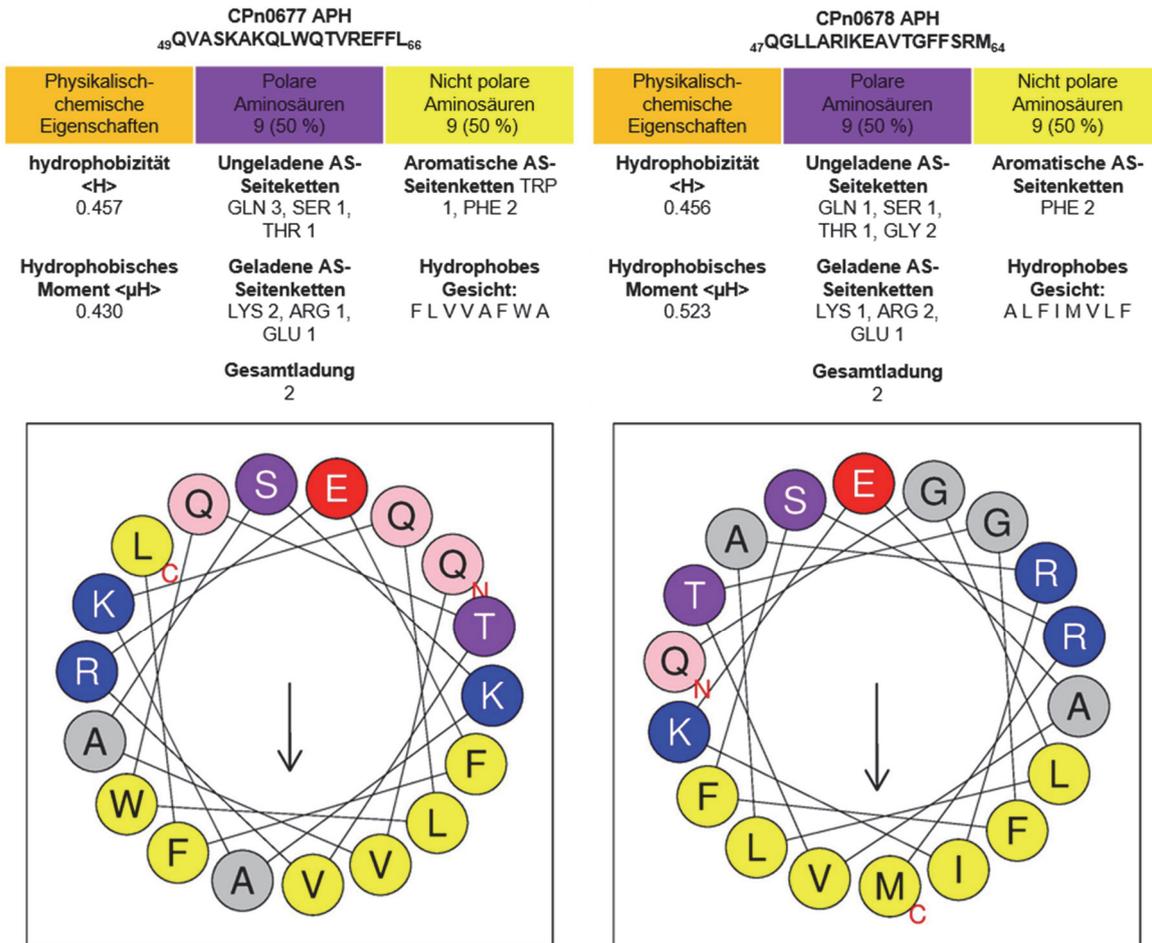


Abbildung 20: Schematische Darstellung der APHs von CPn0677 und CPn0678.

Helikale Projektion der Aminosäuren in den jeweiligen APHs. Die Projektion sowie die gezeigten Werte wurden mit „heliQuest“ erstellt. Der Pfeil in der Darstellung gibt die Richtung des hydrophoben Moments an. Die chemischen Eigenschaften der AS-Reste sind farbkodiert: Ungeladene Seitenketten Amidisch (Rosa), ungeladene Seitenketten hydroxyl (Lila), polare negative geladene Seitenkette (Rot), polare positive geladene Seitenketten (Blau), hydrophobe Seitenkette (Gelb), sonstige (Grau). Die Aminosäureabfolge ist von N nach C angedeutet.

Interessanterweise führte jedoch die ektopische Expression von CPn0677 und CPn0678 in HEp-2-Zellen zu unterschiedlichen Phänotypen und verschiedenen Lokalisationen von CPn0677 und CPn0678 innerhalb der Humanzellen. Die Expression von CPn0677-GFP resultiert in einem überwiegend zytosolischen Phänotypen (Manuskript II). Im Vergleich dazu führt die ektopische Expression von CPn0678-GFP in HEp-2-Zellen zu einem PM-assoziierten Phänotypen (Manuskript I). Dieser CPn0678-GFP Phänotyp konnte lediglich bei der ektopischen Expression der N-terminalen CPn0677-Variante (CPn0677-N1) beobachtet werden und ist definiert durch die Bindung an die PM und die Tubulation der PM (Manuskript II).

Grundsätzlich deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die CPn0677-APH identische Binde- und Tubulationseigenschaften wie die CPn0678-APH besitzt. Die gegensätzlichen Ergebnisse der Phänotypen der Volllängen-Variante von CPn0677 und der CPn0677-N1-Variante werden voraussichtlich durch die Deletion des C-Terminus bedingt. Prinzipiell ist

jedoch auch ein Einfluss auf die Lokalisation von CPn0677 durch humane Proteine denkbar.

Die Aktivierung des EGFR durch Pmp21 ist ein essenzieller Schritt der *C. pn.* Infektion und führt zur Rekrutierung Endozytose-relevanter Proteine zu der EB-Bindestelle (187). Da CPn0677 ein früh sekretierter Effektor ist, sollte mit der EGF-Induktion der Endozytose dieser Prozess in HEp-2-Zellen simuliert werden. Durch die ektopische Expression sollten Änderung in der Lokalisation des CPn0677-Phänotyps analysiert werden. Interessanterweise änderte sich die Lokalisation von CPn0677 nach der Induktion der Endozytose und CPn0677 lokalisierte zur PM (Kapitel 5.5.3). Diese Beobachtung liefert eine mögliche Erklärung für die zytosolische Lokalisation von CPn0677 in HEp-2-Zellen, in denen keine EGF-induzierte Endozytose stattfindet. Erst der EGF-Stimulus und die dadurch initialisierten Signalkaskaden zur Aufnahme des EGF-EGFR-Komplexes führen zur Rekrutierung von Endozytose-relevanten Proteinen zur PM. Infolgedessen werden möglicherweise auch Interaktionspartner von CPn0677 zum EGF-EGFR-Komplex rekrutiert, die daraufhin eine Interaktion mit CPn0677 eingehen können und deswegen für die Relokalisation von CPn0677 zur PM verantwortlich sind. Möglicherweise induziert die Bindung eine Konformationsänderung bei CPn0677, wodurch die APH freigesetzt wird, die erst daraufhin in der Lage ist, an die PM zu binden. Dies könnte einen molekularen Mechanismus darstellen, der die zeitliche Regulierung von CPn0677, während der Endozytose steuert. Erst ab einem definierten Zeitpunkt und durch die Rekrutierung relevanter Proteine, wie Syndapin oder N-WASP, wird CPn0677 aktiviert und somit die Funktionalität von CPn0677 während der EB-Internalisierung zeitlich abgestimmt. Das Konzept der Aktivierung oder Inhibierung von bakteriellen Proteinen durch Konformationsänderungen ist beispielsweise von der Aktivierung der *Shigella flexneri* Typ 3-Sekretion bekannt. Die Sekretion von Effektorproteinen von *Shigella flexneri* erfordert eine Konformationsänderung der Translokon-Pore des T3SS, die durch Wirts-Intermediärfilamente induziert wird (252, 253).

6 Teil IV: Abschließende Diskussion

6.1 Weiterer Ausblick für die Proteine CPn0677 und CPn0678

Die zahlreichen weiteren potenziellen Interaktionspartner für CPn0677 und CPn0678 deuten auf weitere mögliche funktionelle Aspekte in der frühen *C. pn.* Infektionen hin. Interessant ist in diesem Kontext vor allem die mögliche Manipulation des Wirtszell-Aktin-Zytoskeletts durch CPn0677 und CPn0678. Im zweiten Manuskript wurde gezeigt, dass CPn0677 und N-WASP in transfizierten Zellen kolokalisieren und durch darauffolgende *in vitro*-Pull-downs konnte eine direkte Interaktion der beiden Proteine bestätigt werden.

N-WASP gilt als einer der Hauptregulatoren des Arp 2/3-Komplexes (143). So kann N-WASP in Reaktion auf vorgeschaltete Signale aktiviert werden. Durch die Bindung von Rho-GTPasen, wie beispielsweise Cdc42, wird die intramolekulare Wechselwirkung der CRIB-Domäne mit der VCA-Domäne von N-WASP aufgehoben, und die VCA-Domäne wird freigesetzt. Die N-WASP-VCA-Domäne kann nun an den Arp 2/3-Komplex binden, wodurch die Aktin-Keimbildungsaktivität des Arp 2/3-Komplex reguliert werden kann (151). Der aktivierte Arp 2/3-Komplex bindet wiederum an die Seiten bestehender „Mutter“-Aktin-Filamente und initiiert das Wachstum eines neuen „Tochter“-Filaments. Dadurch wird ein verzweigtes Aktin-Netzwerk generiert (111). Die durch N-WASP-induzierte Aktinpolymerisation wirkt kooperativ mit der durch Dynamin induzierten Vesikelabspaltung bei der Endozytose (106). Für das sekretierte Effektorprotein CPn0677 ist die Einflussnahme auf den Mechanismus der Aktinpolymerisation durch die Interaktion mit N-WASP möglich und könnte von CPn0677 effektiv zum Vorteil für die chlamydiale EB Internalisierung manipuliert werden.

In vielen anderen Pathogenen ist die Manipulation von Aktin-Regulatoren für eine erfolgreiche Infektion von Wirtszellen ein etablierter Mechanismus. Die Modulation des Wirtszell-Aktin-Zytoskeletts fördert zahlreiche Prozesse, die für Erreger von Vorteil sind, einschließlich der Internalisierung von Bakterien, der strukturellen Integrität bakterienhaltiger Einschlüsse und der Verbreitung von Erregern (254). Ein prominentes Beispiel für diese Art der Manipulation von Aktin-Regulatoren stellt der bakterielle sekretierte Effektor EspF von EHEC dar. Der T3SS-sekretierte Effektor bindet an die Autoinhibitorische GTPase-Bindungsdomäne (CRIB) von N-WASP und ahmt die Cdc42-N-WASP Interaktion nach (241). Ebenfalls, wie bei der Bindung von Cdc42 an N-WASP, führt die Bindung von EspF an N-WASP zur Auflösung der intramolekularen Wechselwirkung der CRIB-Domäne mit der VCA-Domäne, woraufhin es zur Konformationsänderung von N-WASP kommt. Die durch die Konformationsänderung freigesetzte VCA-Domäne von N-WASP kann nun an den Arp 2/3-Komplex binden und dadurch die Aktin-Nukleation an bereits existierenden Filamenten starten. In EHEC werden die notwendigen PM-

Verformungen zur Aufnahme des Pathogens, in Zusammenhang mit der EspF-N-WASP-Interaktion gebracht (255). Auch innerhalb der Chlamydien, ist die Manipulation des Aktin-Zytoskeletts der Wirtszelle eine gängige Strategie, um die erforderlichen Umgestaltungsereignisse der Wirtszell-PM in Gang zu setzen und final die Aufnahme der EBs in die Wirtszelle zu unterstützen. Der T3SS-sekretierte Effektor TmeA von *C. tr.* bindet direkt an N-WASP, um die Arp 2/3-abhängige Aktinpolymerisation zu fördern (256, 257).

Die Daten der quantitativen Massenspektrometrie deuten auf eine Interaktion von CPn0678 mit den Proteinen des WRC hin (Kapitel 5.5.1). Der WRC steuert die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts in der gesamten Zelle, indem er die Aktin-Keimbildungsaktivität des Arp 2/3-Komplexes an verschiedenen Stellen der Membran, in Reaktion auf spezifische Signale, stimuliert. Die Rolle des WRC wird dabei maßgeblich mit der Lamellipodien-Ausbildung in Zusammenhang gebracht. In Säugetier-Zellen werden die WAVE-Proteine konstitutiv in einen konservierten, heteropentameren Komplex mit einer Größe von ~ 400 kDa eingebaut. Der WRC wird als Reaktion auf Upstream-Signale, die durch Rac-GTPasen vermittelt werden, induziert. Außerdem wird der WRC von über 120 diversen Membranproteinen zur Membran rekrutiert und aktiviert. Bedingt durch die Aktivierung von Rac-GTPasen kommt es zu Konformationsänderungen im WRC. Die Auto-Inhibition, durch intrakomplexe Sequestrierung der VCA-Domäne der WAVE-Proteine, wird aufgehoben und die VCA-Domäne der WAVE-Proteine kann an den Arp 2/3-Komplex binden und diesen aktivieren (238, 239). Es kommt zu einer rasanten Aktinpolymerisierung an der Membran. Das polymerisierende Aktin übt eine gerichtete Kraft gegen die Zellmembran aus und induziert dadurch lokal begrenzte Membranausstülpungen in Richtung des Extrazellulärraums (240). Sofern sich für CPn0678 der WRC, oder einzelne Proteine des WRC, als Interaktionspartner bestätigen, würde dies zeigen, dass die zwei Effektoren, CPn0677 und CPn0678, unterschiedliche Aktin-Regulatoren manipulieren. Der WRC ist ebenfalls ein Ziel für sekretierte Effektoren, um das Aktin-Zytoskelett der Wirtszelle zu manipulieren. Beispielsweise hemmt der Effektor EspG von EHEC indirekt die Aktivität des WRC, um der WRC-abhängigen Phagozytose entgegen zu wirken (258). Dahingehend erscheint die Manipulation der beiden Aktin-Regulatoren, N-WASP und der des WRC-Komplexes, im Zusammenhang mit der Aufnahme von chlamydialen EBs logisch.

Die in dieser Arbeit bestätigten Interaktionen von CPn0678 mit SNX9 (Manuskript I), bzw. CPn0677 mit N-WASP und Syndapin (Manuskript II), bestätigen dass Chlamydien nicht einen spezifischen Endozytose-Mechanismus bevorzugen. So beschreibt die Literatur für SNX9 eine Beteiligung an der CAE, CUE und der Makropinozytose (125), für Syndapin eine Beteiligung an der CUE und ADBE (100) und legt dar, dass N-WASP an der CUE, CAE und Makropinozytose beteiligt ist (57, 259). Die Beteiligung von SNX9, Syndapin und N-WASP in diversen Endozytose-Mechanismen, und die bestätigte Interaktion mit den Effektoren

CPn0677 und CPn0678 deutet deswegen daraufhin, dass verschiedene Elemente der Endozytose-Mechanismen manipuliert werden und keine klare Abgrenzung des Endozytose-Mechanismus von Chlamydien möglich ist. Ein Beispiel für die Rekrutierung verschiedener Elemente von Endozytose-Mechanismen liegt in der Infektion von Wirtszellen durch *Listeria monocytogenes*. Das Pathogen gelangt in Wirtszellen, indem es Oberflächenrezeptoren aktiviert, die durch CAE, CUE und schnelle Endophilin-vermittelte Endozytose aufgenommen werden können (260). In diesem Kontext erscheint es sinnvoll, das Wirkungsgefüge zwischen spezifischen Effektoren und Wirtszellproteinen zu untersuchen und keine Begrenzung auf einen spezifischen Endozytose-Mechanismus zu setzen. Dahingehend bieten CPn0677 und CPn0678 weitere Forschungsmöglichkeiten, da die bereits verifizierten und die weiteren potenziellen Interaktionspartner in eine Vielzahl von Endozytose-Mechanismen involviert sind (s. Kapitel 5.6).

Eine umfassende Betrachtung der frühen Infektionsprozesse könnte ebenfalls mögliche Wirkungsgeflechte zwischen CPn0677, CPn0678 und durch die von Pmp21 induzierte EGFR-Signalkaskade aufdecken (s. Kapitel 1.2.41.2.5 Die Endozytose dient als Eintrittsmechanismus für intrazelluläre Pathogene). Die Ergebnisse im Kapitel 5.5.3 zeigen, dass die EGF-induzierte Endozytose einen Effekt auf die Lokalisation von transfizierten CPn0677 hat. Es kommt zur Relokalisation des im Zytoplasma befindlichen CPn0677 zur PM. Wird der durch EGF-induzierte Signalprozess gleichgesetzt mit der Pmp21-EGFR-Interaktion, ergeben sich Überschneidungs-Effekte von Pmp21 und der beiden Proteine CPn0677 und CPn0678 (187). Die Adhäsionsprozesse von *C. pn.* sollten daher mit den Wirkungsmechanismen von sekretierten Effektoren verknüpft und zusammenfassend betrachtet werden. Zusätzlich könnten womöglich weitere Funktionen von sekretierten Effektoren in Zusammenhang mit den Funktionen von CPn0677 und CPn0678 gebracht werden. Beispielsweise könnte eine Betrachtung der Funktionen von TarP/CPn0572 Aufschluss über die Internalisierung von EBs geben. CPn0572 bindet und polymerisiert Aktin an der bakteriellen Invasionsstelle und fördert die Internalisierung des Bakteriums in die Wirtszelle (190, 261). Die möglichen Einflüsse von CPn0677 und CPn0678 auf die Aktin-Regulatoren N-WASP und den WRC könnten, zusammen mit der durch CPn0572 induzierten Aktinpolymerisation, synergistisch wirken.

6.2 CPn0677 und CPn0678 als Schlüsselproteine der frühen chlamydialen Infektion

Abschließend wird ein theoretisches Modell aufgestellt, das die möglichen Funktionen von CPn0677 und CPn0678 in der frühen Infektion im Detail abbildet (Abb. 21).

(1) Nach der reversiblen Adhäsion von OmcB an Heparansulfat-ähnliches Glykosaminoglykan erfolgt die stabile Adhäsion durch Pmp21 an EGFR und führt zu dessen

Aktivierung (187, 194, 207). Zusätzlich ist LipP an dem stabilen Adhäsionsprozess beteiligt (201). LipP wird vermutlich in die Plasmamembran eingebaut, wo es an PS bindet und dieses auf die äußere Seite der PM externalisiert (202). Die Externalisierung von PS kann ferner zur Relokalisierung von menschlichen membrangebundenen Proteinen, wie Rac-Proteinen, und zur Membrankrümmung führen, was die Internalisierung des EBs unterstützt (202, 211). Infolge des stabilen Kontakts wird das T3SS der Bakterien aktiviert und Effektorproteine werden in die Wirtszelle sekretiert. Ein solches Protein stellt CPn0572 dar, welches in der Lage ist, Aktin zu binden und zu polymerisieren. Über das T3SS werden außerdem die Effektorproteine CPn0677 und CPn0678 in die Wirtszelle sekretiert. Nach der Sekretion von CPn0677 und CPn0678 assoziieren die Proteine über die N-terminale APH an die innere Seite der PM. Gleichzeitig kommt es durch die EGFR-Aktivierung zur Rekrutierung von Endozytose-relevanten Proteinen, darunter SNX9 und Syndapin 2. **(2)** Nach der initialen Assoziation von CPn0678 an die PM kommt es zur Insertion der APH, wodurch erste, lokal begrenzte Membrankrümmungen induziert werden. Dieser Effekt wird durch eine Trimerisierung von CPn0678 verstärkt. SNX9 detektiert die Krümmung der PM, wodurch es in räumlicher Nähe zur Membran lokalisiert und von CPn0678 gebunden wird. Wahrscheinlich wird SNX9 durch die Bindung an CPn0678 aktiviert, worauf es infolgedessen dimerisiert und regional begrenzt unterstützend auf die Membrankrümmung an der Internalisierungsstelle wirkt. Aktiviertes SNX9 kann N-WASP binden, was zu einer Arp 2/3-induzierten Aktinpolymerisation und zur Generierung neuer F-Aktin Verzweigungen an bereits existierenden Filamenten führen kann. Außerdem bindet CPn0677 an Syndapin 2, wodurch es aktiviert wird und wahrscheinlich infolgedessen dimerisiert und ebenfalls die Membranverformungen unterstützt. Analog zu SNX9 wird durch Syndapin 2 der Aktin-Nukleator N-WASP rekrutiert. Unabhängig davon ist CPn0677 ebenfalls in der Lage, N-WASP zu binden und damit die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts zu steuern. Das Zusammenwirken der Membranverformungen durch die APHs von CPn0677 und CPn0678 und der BAR-Domänen von SNX9 und Syndapin 2 führt dazu, dass die PM lokal in Richtung des Zytosols ausgestülpt wird und eine positive Membrankrümmung aufweist. Mit Fortschreiten der Endozytose bildet sich eine Membranstruktur aus, die das EB umschließt, welches über einen „Hals“ mit der PM verknüpft ist. **(3)** Im letzten Schritt wird durch die SNX9- und Syndapin 2-induzierte Aktivierung von Dynamin die Vesikelabschnürung ausgelöst. Möglicherweise vermittelt die durch N-WASP induzierte Aktinpolymerisation eine Kraft, die den Abschnürungsprozess unterstützt. Vermutlich stabilisieren die APHs von CPn0677 und CPn0678 das Vesikel, indem sie die notwendige Membrankrümmung aufrechterhalten.

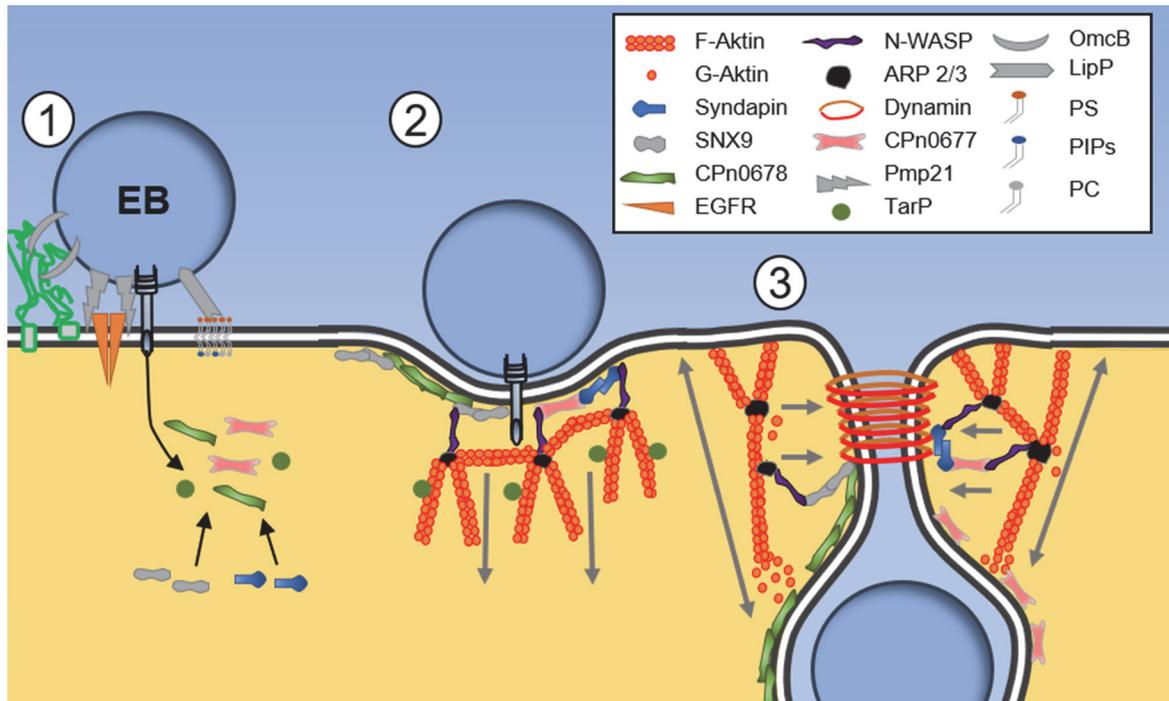


Abbildung 21: Schematische Darstellung der durch CPn0677/0678 induzierten Prozesse während der Internalisierung von EBs.

Die einzelnen Aspekte mit den entsprechenden Nummerierungen werden im Fließtext erklärt. Schwarze Pfeile kennzeichnen Bewegungen, graue Pfeile implizieren die ausgeübten Kräfte durch das Aktin-Zytoskelett.

Die sekretierten Effektorproteine nehmen somit eine zentrale Rolle bei der Internalisierung von chlamydialen EBs ein. Durch die aktive Bindung von humanen Proteinen werden sowohl die PM als auch das Aktin-Zytoskelett restrukturiert, um eine Aufnahme der EBs zu gewährleisten. Die weiteren potenziellen Interaktionspartner könnten die Theorie, dass CPn0677 und CPn0678 bakterielle Interaktionsplattformen sind, untermauern. Die weitere Erforschung der Wechselwirkungen zwischen den Effektorproteinen und den humanen Proteinen könnte die Funktion von CPn0677 und CPn0678 als chlamydiale Schlüsselproteine bestärken und weitreichende Einblicke in den Internalisierungsprozess von *C. pn.* liefern.

Literaturverzeichnis

1. D. Corsaro, M. Valassina, D. Venditti, Increasing Diversity within Chlamydiae. *Critical Reviews in Microbiology* **29**, 37–78 (2003).
2. K. D. Everett, R. M. Bush, A. A. Andersen, 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* **49 Pt 2** (1999).
3. Fred R. Rurangirwa, Pamela M. Dilbeck, Timothy B. Crawford, Travis C. McGuire, Terry F. McElwain, 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 and Evolutionary Microbiology* **49**, 577–581 (1999).
4. Y. M. AbdelRahman, R. J. Belland, The chlamydial developmental cycle. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 949–959 (2005).
5. M. Horn, Chlamydiae as symbionts in eukaryotes. *Annual review of microbiology* **62**, 113–131 (2008).
6. Matthias Horn, Astrid Collingro, Stephan Schmitz-Esser, Cora L. Beier, Ulrike Purkhold, Berthold Fartmann, Petra Brandt, Gerald J. Nyakatura, Marcus Droege, Dmitriy Frishman, Thomas Rattei, Hans-Werner Mewes, Michael Wagner, Illuminating the Evolutionary History of Chlamydiae. *Science* **304**, 728–730 (2004).
7. J. W. Moulder, Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiological Reviews* **55**, 143–190 (1991).
8. R. S. Stephens, G. Myers, M. Eppinger, P. M. Bavoil, Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of Chlamydia resolved. *FEMS Immunol Med Microbiol* **55**, 115–119 (2009).
9. Trestan Pillonel, Claire Bertelli, Nicolas Salamin, Gilbert Greub, Taxogenomics of the order Chlamydiales. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65**, 1381–1393 (2015).
10. D. M. Ojcius, T. Darville, P. M. Bavoil, Can chlamydia be stopped? *Scientific American* **292**, 72–79 (2005).
11. L. Newman, J. Rowley, S. Vander Hoorn, N. S. Wijesooriya, M. Unemo, N. Low, G. Stevens, S. Gottlieb, J. Kiarie, M. Temmerman, Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting. *PloS one* **10**, e0143304 (2015).
12. C. Bébéar, B. de Barbeyrac, Genital Chlamydia trachomatis infections. *Clinical Microbiology and Infection* **15**, 4–10 (2009).
13. V. H. Hu, E. M. Harding-Esch, M. J. Burton, R. L. Bailey, J. Kadimpeul, D. C. Mabey, Epidemiology and control of trachoma: systematic review. *Tropical medicine & international health : TM & IH* **15** (2010).
14. S. S. Witkin, E. Minis, A. Athanasiou, J. Leizer, Im Linhares, Chlamydia trachomatis: the Persistent Pathogen. *Clinical and vaccine immunology : CVI* **24** (2017).
15. A. R. Katz, Insights in Public Health: The Hidden Epidemic: Sexually Transmitted Diseases in 2014. *Hawai'i Journal of Medicine & Public Health* **73**, 265–267 (2014).
16. R. Detels, Am Green, J. D. Klausner, D. Katzenstein, C. Gaydos, H. Handsfield, W. Pequegnat, K. Mayer, T. D. Hartwell, T. C. Quinn, The incidence and correlates of

- symptomatic and asymptomatic *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections in selected populations in five countries. *Sexually transmitted diseases* **38** (2011).
17. Iwona Lesiak-Markowicz, Anna-Margarita Schötta, Hannes Stockinger, Gerold Stanek, Mateusz Markowicz, *Chlamydia trachomatis* serovars in urogenital and ocular samples collected 2014–2017 from Austrian patients. *Sci Rep* **9**, 1–4.
 18. M. de Roche, M. Sawatzki, L. Degen, P. Itin, U. Flückiger, R. Frei, D. Goldenberger, Lymphogranuloma venereum. Eine alte Krankheit in neuem Kleid. *Der Internist* **52**, 584–589 (2011).
 19. D. L. Hahn, A. A. Azenabor, W. L. Beatty, G. I. Byrne, *Chlamydia pneumoniae* as a respiratory pathogen. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **7** (2002).
 20. A. Kutlin, P. M. Roblin, M. R. Hammerschlag, In Vitro Activities of Azithromycin and Ofloxacin against *Chlamydia pneumoniae* in a Continuous-Infection Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 2268–2272 (1999).
 21. D. C. Van, D. S. Beeckman, K. Verminnen, M. Marien, H. Nauwynck, L. T. Boesinghe, D. Vanrompay, Simultaneous zoonotic transmission of *Chlamydophila psittaci* genotypes D, F and E/B to a veterinary scientist. *Veterinary microbiology* **135** (2009).
 22. J. F. Moroney, R. Guevara, C. Iverson, F. M. Chen, S. K. Skelton, T. O. Messmer, B. Plikaytis, P. O. Williams, P. Blake, J. C. Butler, Detection of chlamydiosis in a shipment of pet birds, leading to recognition of an outbreak of clinically mild psittacosis in humans. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **26** (1998).
 23. H. Fukushi, K. Hirai, Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. *International journal of systematic bacteriology* **42** (1992).
 24. J. Jee, F. J. Degraives, T. Kim, B. Kaltenboeck, High Prevalence of Natural *Chlamydophila* Species Infection in Calves. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 5664–5672 (2004).
 25. A. Poudel, T. H. Elsasser, K. Rahman, E. U. Chowdhury, B. Kaltenboeck, Asymptomatic endemic *Chlamydia pecorum* infections reduce growth rates in calves by up to 48 percent. *PloS one* **7** (2012).
 26. D. Longbottom, G. Entrican, N. Wheelhouse, H. Brough, C. Milne, Evaluation of the impact and control of enzootic abortion of ewes. *Veterinary journal (London, England : 1997)* **195** (2013).
 27. D. Longbottom, L. J. Coulter, Animal chlamydioses and zoonotic implications. *Journal of comparative pathology* **128**, 217–244 (2003).
 28. J. C. Hartley, S. Stevenson, A. J. Robinson, J. D. Littlewood, C. Carder, J. Cartledge, C. Clark, G. L. Ridgway, Conjunctivitis due to *Chlamydophila felis* (*Chlamydia psittaci* feline pneumonitis agent) acquired from a cat: case report with molecular characterization of isolates from the patient and cat. *The Journal of infection* **43** (2001).
 29. Y. Cai, H. Fukushi, S. Koyasu, E. Kuroda, T. Yamaguchi, K. Hirai, An etiological investigation of domestic cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease in Japan. *The Journal of veterinary medical science* **64** (2002).
 30. Olga M. Sigalova, Andrei V. Chaplin, Olga O. Bochkareva, Pavel V. Shelyakin, Vsevolod A. Filaretov, Evgeny E. Akkuratov, Valentina Burskaia, Mikhail S. Gelfand, *Chlamydia* pan-genomic analysis reveals balance between host adaptation and selective pressure to genome reduction. *BMC Genomics* **20**, 1–17 (2019).

31. N. L. Bachmann, A. Polkinghorne, P. Timms, Chlamydia genomics: providing novel insights into chlamydial biology. *Trends in microbiology* **22** (2014).
32. R. S. Stephens, S. Kalman, C. Lammel, J. Fan, R. Marathe, L. Aravind, W. Mitchell, L. Olinger, R. L. Tatusov, Q. Zhao, E. V. Koonin, R. W. Davis, Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: Chlamydia trachomatis. *Science (New York, N.Y.)* **282** (1998).
33. G. W. Liechti, E. Kuru, E. Hall, A. Kalinda, Y. V. Brun, M. VanNieuwenhze, A. T. Maurelli, A new metabolic cell-wall labelling method reveals peptidoglycan in Chlamydia trachomatis. *Nature* **506**, 507–510 (2014).
34. Anna Klöckner, Christian Otten, Adeline Derouaux, Waldemar Vollmer, Henrike Bühl, Stefania De Benedetti, Daniela Münch, Michaelae Josten, Katja Mölleken, Hans-Georg Sahl, Beate Henrichfreise, AmiA is a penicillin target enzyme with dual activity in the intracellular pathogen Chlamydia pneumoniae. *Nat Commun* **5**, 1–10.
35. A. J. McCoy, A. T. Maurelli, Building the invisible wall: updating the chlamydial peptidoglycan anomaly. *Trends in microbiology* **14** (2006).
36. T. P. Hatch, Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in chlamydiae? *Journal of Bacteriology* **178**, 1–5 (1996).
37. K. Wolf, E. Fischer, T. Hackstadt, Ultrastructural Analysis of Developmental Events in Chlamydia pneumoniae-Infected Cells. *Infection and Immunity* **68**, 2379–2385 (2000).
38. T. Hackstadt, W. J. Todd, H. D. Caldwell, Disulfide-mediated interactions of the chlamydial major outer membrane protein: role in the differentiation of chlamydiae? *Journal of Bacteriology* **161**, 25–31 (1985).
39. Robert J. Bastidas, Cherilyn A. Elwell, Joanne N. Engel, Raphael H. Valdivia, Chlamydial Intracellular Survival Strategies. *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**, a010256 (2013).
40. Reynaldo A. Carabeo, David J. Mead, Ted Hackstadt, Golgi-dependent transport of cholesterol to the Chlamydia trachomatis inclusion. *PNAS* **100**, 6771–6776 (2003).
41. K. Hybiske, R. S. Stephens, Mechanisms of Chlamydia trachomatis entry into nonphagocytic cells. *Infection and Immunity* **75** (2007).
42. H. A. Saka, J. W. Thompson, Y. S. Chen, Y. Kumar, L. G. Dubois, M. A. Moseley, R. H. Valdivia, Quantitative proteomics reveals metabolic and pathogenic properties of Chlamydia trachomatis developmental forms. *Molecular microbiology* **82** (2011).
43. Katerina Wolf, Elizabeth Fischer, Ted Hackstadt, Degradation of Chlamydia pneumoniae by Peripheral Blood Monocytic Cells. *Infection and Immunity* **73**, 4560–4570 (2005).
44. Hammerschlag, Chlamydia pneumoniae and the lung. *The European respiratory journal* **16** (2000).
45. C. C. Kuo, La Jackson, La Campbell, J. T. Grayston, Chlamydia pneumoniae (TWAR). *Clinical microbiology reviews* **8** (1995).
46. R. J. Belland, S. P. Ouellette, J. Gieffers, G. I. Byrne, Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. *Cellular microbiology* **6** (2004).
47. D. L. Hahn, R. W. Dodge, R. Golubjatnikov, Association of Chlamydia pneumoniae (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adult-onset asthma. *JAMA* **266** (1991).

48. M. M. Ieven, V. Y. Hoymans, Involvement of Chlamydia pneumoniae in Atherosclerosis: More Evidence for Lack of Evidence. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 19–24 (2005).
49. J. Ngeh, V. Anand, S. Gupta, Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis – what we know and what we don't. *Clinical Microbiology and Infection* **8**, 2–13 (2002).
50. Lee Ann Campbell, Cho-cho Kuo, Chlamydia pneumoniae — an infectious risk factor for atherosclerosis? *Nat Rev Microbiol* **2**, 23–32 (2004).
51. I. Choroszy-Król, M. Frej-Mądrzak, M. Hober, J. Sarowska, A. Jama-Kmiecik, Infections caused by Chlamydophila pneumoniae. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University* **23** (2014).
52. T. J. Bodetti, E. Jacobson, C. Wan, L. Hafner, A. Pospischil, K. Rose, P. Timms, Molecular evidence to support the expansion of the host range of Chlamydophila pneumoniae to include reptiles as well as humans, horses, koalas and amphibians. *Systematic and applied microbiology* **25** (2002).
53. G. S. A. Myers, S. A. Mathews, M. Eppinger, C. Mitchell, K. K. O'Brien, O. R. White, F. Benahmed, R. C. Brunham, T. D. Read, J. Ravel, P. M. Bavoil, P. Timms, Evidence that human Chlamydia pneumoniae was zoonotically acquired. *Journal of Bacteriology* **191**, 7225–7233 (2009).
54. C. M. Johnson, D. J. Fisher, Site-Specific, Insertional Inactivation of incA in Chlamydia trachomatis Using a Group II Intron. *PloS one* **8** (2013).
55. Kensuke Shima, Maximilian Wanker, Rachel J. Skilton, Lesley T. Cutcliffe, Christiane Schnee, Thomas A. Kohl, Stefan Niemann, Javier Geijo, Matthias Klinger, Peter Timms, Thomas Rattei, Konrad Sachse, Ian N. Clarke, Jan Rupp, The Genetic Transformation of Chlamydia pneumoniae. *mSphere* **3** (2018).
56. S. Mukherjee, R. N. Ghosh, F. R. Maxfield, Endocytosis. *Physiological reviews* **77** (1997).
57. Sudha Kumari, Swetha MG, Satyajit Mayor, Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res* **20**, 256–275 (2010).
58. C. Rosales, E. Uribe-Querol, Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *BioMed Research International* **2017** (2017).
59. R. S. Flannagan, V. Jaumouillé, S. Grinstein, The cell biology of phagocytosis. *Annual review of pathology* **7**, 61–98 (2012).
60. J. Günther, H.-M. Seyfert, The first line of defence: insights into mechanisms and relevance of phagocytosis in epithelial cells. *Seminars in immunopathology* **40**, 555–565 (2018).
61. J. A. Swanson, J. S. King, The breadth of macropinocytosis research. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **374** (2019).
62. J. Mercer, A. Helenius, Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol* **11**, 510–520 (2009).
63. F. Sallusto, M. Cella, C. Danieli, A. Lanzavecchia, Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *The Journal of experimental medicine* **182**, 389–400 (1995).
64. Parisa Foroozandeh, Azlan Abdul Aziz, Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* **13**, 1–12 (2018).

65. J. Rejman, V. Oberle, I. S. Zuhorn, D. Hoekstra, Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochemical Journal* **377**, 159–169 (2004).
66. L. Maldonado-Báez, C. Williamson, J. G. Donaldson, Clathrin-independent endocytosis: A cargo-centric view. *Experimental Cell Research* **319**, 2759–2769 (2013).
67. Marko Kaksonen, Aurélien Roux, Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 313–326 (2018).
68. S. Sigismund, E. Argenzio, D. Tosoni, E. Cavallaro, S. Polo, P. P. Di Fiore, Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Developmental cell* **15**, 209–219 (2008).
69. D. Banerjee, A. P. Liu, N. Voss, S. L. Schmid, M. G. Finn, Multivalent Display and Receptor-Mediated Endocytosis of Transferrin on Virus-Like Particles. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **11**, 1273–1279 (2010).
70. D. Nunez, C. Antonescu, M. Mettlen, A. Liu, S. L. Schmid, D. Loerke, G. Danuser, Hotspots organize clathrin-mediated endocytosis by efficient recruitment and retention of nucleating resources. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **12** (2011).
71. W. M. Henne, E. Boucrot, M. Meinecke, E. Evergren, Y. Vallis, R. Mittal, H. T. McMahon, FCHO Proteins are Nucleators of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Science (New York, N.Y.)* **328**, 1281–1284 (2010).
72. C. N. Antonescu, F. Aguet, G. Danuser, S. L. Schmid, Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates clathrin-coated pit initiation, stabilization, and size. *Molecular biology of the cell* **22** (2011).
73. Bernard T. Kelly, Airlie J. McCoy, Kira Späte, Sharon E. Miller, Philip R. Evans, Stefan Höning, David J. Owen, A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP2 complex. *Nature* **456**, 976–979 (2008).
74. Brett M. Collins, Airlie J. McCoy, Helen M. Kent, Philip R. Evans, David J. Owen, Molecular Architecture and Functional Model of the Endocytic AP2 Complex. *Cell* **109**, 523–535 (2002).
75. M. Messa, R. Fernández-busnadiego, E. W. Sun, H. Chen, H. Czapla, K. Wrasman, Y. Wu, G. Ko, T. Ross, B. Wendland, P. D. Camilli, Epsin deficiency impairs endocytosis by stalling the actin-dependent invagination of endocytic clathrin-coated pits. *eLife Sciences Publications, Ltd* (2014).
76. Bernard T. Kelly, Stephen C. Graham, Nicole Liska, Philip N. Dannhauser, Stefan Höning, Ernst J. Ungewickell, David J. Owen, AP2 controls clathrin polymerization with a membrane-activated switch. *Science* **345**, 459–463 (2014).
77. S. M. Ferguson, A. Raimondi, S. Paradise, H. Shen, K. Mesaki, A. Ferguson, O. Destaing, G. Ko, J. Takasaki, O. Cremona, E. O' Toole, P. D. Camilli, Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits. *Developmental cell* **17**, 811–822 (2009).
78. P. Wigge, K. Köhler, Y. Vallis, C. A. Doyle, D. Owen, S. P. Hunt, H. T. McMahon, Amphiphysin Heterodimers: Potential Role in Clathrin-mediated Endocytosis. *Molecular biology of the cell* **8**, 2003–2015 (1997).
79. U. Salzer, J. Kostan, K. Djinović-Carugo, Deciphering the BAR code of membrane modulators. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **74**, 2413–2438 (2017).
80. Sharon M Sweitzer, Jenny E Hinshaw, Dynamin Undergoes a GTP-Dependent Conformational Change Causing Vesiculation. *Cell* **93**, 1021–1029 (1998).

81. Jenny E. Hinshaw, Sandra L. Schmid, Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* **374**, 190–192 (1995).
82. D. K. Cureton, R. H. Massol, S. Saffarian, T. L. Kirchhausen, S. P. Whelan, Vesicular stomatitis virus enters cells through vesicles incompletely coated with clathrin that depend upon actin for internalization. *PLoS pathogens* **5** (2009).
83. Y. Sun, N. T. Leong, T. Jiang, A. Tangara, X. Darzacq, D. G. Drubin, Switch-like Arp2/3 activation upon WASP and WIP recruitment to an apparent threshold level by multivalent linker proteins in vivo. *eLife* **6** (2017).
84. C. J. Merrifield, B. Qualmann, M. M. Kessels, W. Almers, Neural Wiskott Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) and the Arp2/3 complex are recruited to sites of clathrin-mediated endocytosis in cultured fibroblasts. *European journal of cell biology* **83** (2004).
85. E. Ungewickell, H. Ungewickell, S. E. Holstein, R. Lindner, K. Prasad, W. Barouch, B. Martin, Le Greene, E. Eisenberg, Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature* **378** (1995).
86. D. M. Schlossman, S. L. Schmid, W. A. Braell, J. E. Rothman, An enzyme that removes clathrin coats: purification of an uncoating ATPase. *The Journal of cell biology* **99** (1984).
87. Harvey T. McMahon, Emmanuel Boucrot, Membrane curvature at a glance. *J Cell Sci* **128**, 1065–1070 (2015).
88. Tom Kirchhausen, Bending membranes. *Nat Cell Biol* **14**, 906–908 (2012).
89. I. R. Cooke, M. Deserno, Coupling between Lipid Shape and Membrane Curvature. *Biophysical Journal* **91**, 487–495 (2006).
90. Harvey T. McMahon, Jennifer L. Gallop, Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* **438**, 590–596 (2005).
91. K. Hammond, M. D. Reboiras, I. G. Lyle, M. N. Jones, Characterisation of phosphatidylcholine/phosphatidylinositol sonicated vesicles. Effects of phospholipid composition on vesicle size. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **774**, 19–25 (1984).
92. M. M. Kessels, B. Qualmann, The syndapin protein family: linking membrane trafficking with the cytoskeleton. *Journal of Cell Science* **117**, 3077–3086 (2004).
93. T. Itoh, T. Takenawa, "Regulation of Endocytosis by Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate and ENTH Proteins" in *Phosphoinositides in Subcellular Targeting and Enzyme Activation*, H. Stenmark, Ed. (Springer Berlin Heidelberg, 2004), pp. 31–47.
94. Marijn G. J. Ford, Ian G. Mills, Brian J. Peter, Yvonne Vallis, Gerrit J. K. Praefcke, Philip R. Evans, Harvey T. McMahon, Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* **419**, 361–366 (2002).
95. N. Unwin, Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *Journal of Molecular Biology* **346** (2005).
96. Harvey T. McMahon, Michael M. Kozlov, Sascha Martens, Membrane Curvature in Synaptic Vesicle Fusion and Beyond. *Cell* **140**, 601–605 (2010).
97. M. M. Kozlov, F. Campelo, N. Liska, L. V. Chernomordik, S. J. Marrink, H. T. McMahon, Mechanisms shaping cell membranes. *Current opinion in cell biology* **29** (2014).
98. J. Zimmerberg, M. M. Kozlov, How proteins produce cellular membrane curvature. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7** (2006).

99. O. Daumke, A. Roux, V. Haucke, BAR domain scaffolds in dynamin-mediated membrane fission. *Cell* **156** (2014).
100. B. Qualmann, R. B. Kelly, Syndapin isoforms participate in receptor-mediated endocytosis and actin organization. *The Journal of cell biology* **148** (2000).
101. Richard Lundmark, Sven R. Carlsson, SNX9 – a prelude to vesicle release. *J Cell Sci* **122**, 5–11 (2009).
102. D. A. Fletcher, R. D. Mullins, Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* **463**, 485–492 (2010).
103. C. H. Coles, F. Bradke, Coordinating neuronal actin-microtubule dynamics. *Current biology : CB* **25** (2015).
104. E. Smythe, K. R. Ayscough, Actin regulation in endocytosis. *Journal of Cell Science* **119** (2006).
105. H. Riezman, A. Munn, M. I. Geli, L. Hicke, Actin-, myosin- and ubiquitin-dependent endocytosis. *Experientia* **52**, 1033–1041 (1996).
106. B. J. Galletta, O. L. Mooren, J. A. Cooper, Actin dynamics and endocytosis in yeast and mammals. *Current opinion in biotechnology* **21**, 604–610 (2010).
107. J. Samaj, F. Baluska, B. Voigt, M. Schlicht, D. Volkmann, D. Menzel, Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling. *Plant physiology* **135**, 1150–1161 (2004).
108. L. G. Tilney, D. J. DeRosier, A. Weber, M. S. Tilney, How *Listeria* exploits host cell actin to form its own cytoskeleton. II. Nucleation, actin filament polarity, filament assembly, and evidence for a pointed end capper. *The Journal of cell biology* **118** (1992).
109. O. L. Mooren, B. J. Galletta, J. A. Cooper, Roles for actin assembly in endocytosis. *Annual review of biochemistry* **81**, 661–686 (2012).
110. A. Collins, A. Warrington, K. A. Taylor, T. Svitkina, Structural Organization of the Actin Cytoskeleton at Sites of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Current Biology* **21**, 1167–1175 (2011).
111. E. D. Goley, M. D. Welch, The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 713–726 (2006).
112. M. A. McNiven, L. Kim, E. W. Krueger, J. D. Orth, H. Cao, T. W. Wong, Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *The Journal of cell biology* **151** (2000).
113. T. Uruno, J. Liu, P. Zhang, Y. N. Fan, C. Egile, R. Li, S. C. Mueller, X. Zhan, Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nature cell biology* **3** (2001).
114. Kenneth G. Campellone, Matthew D. Welch, A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 237–251 (2010).
115. Esteban Veiga, Pascale Cossart, The role of clathrin-dependent endocytosis in bacterial internalization. *Trends in Cell Biology* **16**, 499–504 (2006).
116. L. K. Medina-Kauwe, “Alternative” endocytic mechanisms exploited by pathogens: New avenues for therapeutic delivery?☆. *Advanced Drug Delivery Reviews* **59**, 798–809 (2007).
117. R. C. Kurten, D. L. Cadena, G. N. Gill, Enhanced degradation of EGF receptors by a sorting nexin, SNX1. *Science (New York, N.Y.)* **272** (1996).
118. Peter J. Cullen, Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 574–582 (2008).

119. Olena Pylypenko, Richard Lundmark, Erika Rasmuson, Sven R Carlsson, Alexey Rak, The PX-BAR membrane-remodeling unit of sorting nexin 9. *The EMBO Journal* **26**, 4788–4800 (2007).
120. Q. Wang, H. Y. K. Kaan, R. N. Hooda, S. L. Goh, H. Sondermann, Structure and plasticity of Endophilin and Sorting Nexin 9. *Structure (London, England : 1993)* **16**, 1574–1587 (2008).
121. R. D. Teasdale, B. M. Collins, Insights into the PX (phox-homology) domain and SNX (sorting nexin) protein families: structures, functions and roles in disease. *The Biochemical journal* **441**, 39–59 (2012).
122. O. Pylypenko, A. Ignatev, R. Lundmark, E. Rasmuson, S. R. Carlsson, A. Rak, A combinatorial approach to crystallization of PX–BAR unit of the human Sorting Nexin 9. *Journal of Structural Biology* **162**, 356–360 (2008).
123. F. Soulet, D. Yarar, M. Leonard, S. L. Schmid, SNX9 regulates dynamin assembly and is required for efficient clathrin-mediated endocytosis. *Molecular biology of the cell* **16**, 2058–2067 (2005).
124. O. Marchès, M. Batchelor, R. K. Shaw, A. Patel, N. Cummings, T. Nagai, C. Sasakawa, S. R. Carlsson, R. Lundmark, C. Cougoule, E. Caron, S. Knutton, I. Connerton, G. Frankel, EspF of enteropathogenic Escherichia coli binds sorting nexin 9. *Journal of Bacteriology* **188**, 3110–3115 (2006).
125. N. Bendris, S. L. Schmid, Endocytosis, Metastasis and Beyond: Multiple Facets of SNX9. *Trends in Cell Biology* **27** (2017).
126. R. Lundmark, S. R. Carlsson, Sorting nexin 9 participates in clathrin-mediated endocytosis through interactions with the core components. *The Journal of biological chemistry* **278**, 46772–46781 (2003).
127. R. Lundmark, S. R. Carlsson, The beta-appendages of the four adaptor-protein (AP) complexes: structure and binding properties, and identification of sorting nexin 9 as an accessory protein to AP-2. *Biochemical Journal* **362**, 597–607 (2002).
128. I. C. Fields, S. M. King, E. Shteyn, R. S. Kang, H. Fölsch, Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate localization in recycling endosomes is necessary for AP-1B-dependent sorting in polarized epithelial cells. *Molecular biology of the cell* **21**, 95–105 (2010).
129. N. Shin, N. Ahn, B. Chang-Ileto, J. Park, K. Takei, S.-G. Ahn, S.-A. Kim, G. Di Paolo, S. Chang, SNX9 regulates tubular invagination of the plasma membrane through interaction with actin cytoskeleton and dynamin 2. *Journal of Cell Science* **121**, 1252–1263 (2008).
130. K. Badour, M. K. H. McGavin, J. Zhang, S. Freeman, C. Vieira, D. Filipp, M. Julius, G. B. Mills, K. A. Siminovitch, Interaction of the Wiskott-Aldrich syndrome protein with sorting nexin 9 is required for CD28 endocytosis and cosignaling in T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 1593–1598 (2007).
131. D. Yarar, M. C. Surka, M. C. Leonard, S. L. Schmid, SNX9 activities are regulated by multiple phosphoinositides through both PX and BAR domains. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **9**, 133–146 (2008).
132. M. Plomann, R. Lange, G. Vopper, H. Cremer, U. A. Heinlein, S. Scheff, S. A. Baldwin, M. Leitges, M. Cramer, M. Paulsson, D. Barthels, PACSIN, a brain protein that is upregulated upon differentiation into neuronal cells. *European journal of biochemistry* **256**, 201–211 (1998).

133. B. Ritter, J. Modregger, M. Paulsson, M. Plomann, PACSIN 2, a novel member of the PACSIN family of cytoplasmic adapter proteins. *FEBS Letters* **454**, 356–362 (1999).
134. L. Sumoy, R. Pluvinet, N. Andreu, X. Estivill, M. Escarceller, PACSIN 3 is a novel SH3 domain cytoplasmic adapter protein of the pacsin-syndapin-FAP52 gene family. *Gene* **262** (2001).
135. B. Qualmann, J. Roos, P. J. DiGregorio, R. B. Kelly, Syndapin I, a Synaptic Dynamin-binding Protein that Associates with the Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein. *Molecular biology of the cell* **10**, 501–513 (1999).
136. F. Simpson, N. K. Hussain, B. Qualmann, R. B. Kelly, B. K. Kay, P. S. McPherson, S. L. Schmid, SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation. *Nature cell biology* **1**, 119–124 (1999).
137. T. Takenawa, S. Suetsugu, The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 37–48 (2007).
138. H. N. Higgs, T. D. Pollard, Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annual review of biochemistry* **70** (2001).
139. A. S. Kim, L. T. Kakalis, N. Abdul-Manan, G. A. Liu, M. K. Rosen, Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* **404**, 151–158 (2000).
140. M. D. Welch, R. D. Mullins, Cellular control of actin nucleation. *Annual review of cell and developmental biology* **18** (2002).
141. A. Quan, P. J. Robinson, Syndapin--a membrane remodelling and endocytic F-BAR protein. *The FEBS journal* **280**, 5198–5212 (2013).
142. H. Miki, S. Suetsugu, T. Takenawa, WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *The EMBO Journal* **17**, 6932–6941 (1998).
143. T. H. Millard, S. J. Sharp, L. M. Machesky, Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *The Biochemical journal* **380**, 1–17 (2004).
144. M. A. de La Fuente, Y. Sasahara, M. Calamito, I. M. Antón, A. Elkhal, M. D. Gallego, K. Suresh, K. Siminovitch, H. D. Ochs, K. C. Anderson, F. S. Rosen, R. S. Geha, N. Ramesh, WIP is a chaperone for Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 926–931 (2007).
145. Alice Y. Pollitt, Robert H. Insall, WASP and SCAR/WAVE proteins: the drivers of actin assembly. *Journal of Cell Science* **122**, 2575–2578 (2009).
146. H. Miki, T. Sasaki, Y. Takai, T. Takenawa, Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature* **391**, 93–96 (1998).
147. T. Takenawa, H. Miki, WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *Journal of Cell Science* **114**, 1801–1809 (2001).
148. S. H. Zigmond, How WASP regulates actin polymerization. *J Cell Biol* **150**, F117–20 (2000).
149. B. Qualmann, M. M. Kessels, "Endocytosis and the cytoskeleton" in *International review of cytology: A survey of cell biology*, K. W. Jeon, Ed. (Academic Press, 2002), pp. 93–144.

150. A. J. Thrasher, S. O. Burns, WASP: a key immunological multitasker. *Nature reviews. Immunology* **10**, 182–192 (2010).
151. M. Fukuoka, S. Suetsugu, H. Miki, K. Fukami, T. Endo, T. Takenawa, A novel neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) binding protein, WISH, induces Arp2/3 complex activation independent of Cdc42. *J Cell Biol* **152**, 471–482 (2001).
152. E. Torres, M. K. Rosen, Contingent Phosphorylation/Dephosphorylation Provides a Mechanism of Molecular Memory in WASP. *Molecular Cell* **11**, 1215–1227 (2003).
153. L. Pelkmans, A. Helenius, Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Current Opinion in Cell Biology* **15**, 414–422 (2003).
154. S. B. Siczekarski, G. R. Whittaker, Dissecting virus entry via endocytosis. *The Journal of general virology* **83**, 1535–1545 (2002).
155. P. Cossart, P. J. Sansonetti, Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science (New York, N.Y.)* **304**, 242–248 (2004).
156. P. Cossart, Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends in Cell Biology* **13**, 23–31 (2003).
157. Oliver Meier, Urs F. Greber, Adenovirus endocytosis. *The Journal of Gene Medicine* **6**, S152-S163 (2004).
158. Matthew J. Duncan, Jeoung-Sook Shin, Soman N. Abraham, Microbial entry through caveolae: variations on a theme. *Cellular microbiology* **4**, 783–791 (2002).
159. M. J. Rust, M. Lakadamyali, F. Zhang, X. Zhuang, Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nature structural & molecular biology* **11** (2004).
160. K. S. Matlin, H. Reggio, A. Helenius, K. Simons, Pathway of vesicular stomatitis virus entry leading to infection. *Journal of Molecular Biology* **156** (1982).
161. H. A. Anderson, Y. Chen, L. C. Norkin, Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Molecular biology of the cell* **7** (1996).
162. E.-M. Damm, L. Pelkmans, J. Kartenbeck, A. Mezzacasa, T. Kurzchalia, A. Helenius, Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J Cell Biol* **168**, 477–488 (2005).
163. Jason Mercer, Ari Helenius, Vaccinia Virus Uses Macropinocytosis and Apoptotic Mimicry to Enter Host Cells. *Science* **320**, 531–535 (2008).
164. P. Cossart, C. R. Roy, Manipulation of host membrane machinery by bacterial pathogens. *Current opinion in cell biology* **22** (2010).
165. O. Dussurget, J. Pizarro-Cerda, P. Cossart, Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annual review of microbiology* **58**, 587–610 (2004).
166. J. Pizarro-Cerdá, A. Kühbacher, P. Cossart, Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: an updated view. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2** (2012).
167. J. Mengaud, H. Ohayon, P. Gounon, R.-M. N. Mege, P. Cossart, E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* **84** (1996).
168. H. Bierne, P. Cossart, InlB, a surface protein of *Listeria monocytogenes* that behaves as an invasin and a growth factor. *Journal of Cell Science* **115** (2002).
169. Y. Shen, M. Naujokas, M. Park, K. Ireton, InlB-Dependent Internalization of *Listeria* Is Mediated by the Met Receptor Tyrosine Kinase. *Cell* **103**, 501–510 (2000).

170. Serge Mostowy, To Nam Tham, Anne Danckaert, Stéphanie Guadagnini, Stéphanie Boisson-Dupuis, Javier Pizarro-Cerdá, Pascale Cossart, Septins Regulate Bacterial Entry into Host Cells. *PLOS ONE* **4**, e4196 (2009).
171. M. Bonazzi, L. Vasudevan, A. Mallet, M. Sachse, A. Sartori, M. C. Prevost, A. Roberts, S. B. Taner, J. D. Wilbur, F. M. Brodsky, P. Cossart, Clathrin phosphorylation is required for actin recruitment at sites of bacterial adhesion and internalization. *The Journal of cell biology* **195** (2011).
172. E. Veiga, P. Cossart, Listeria hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. *Nature cell biology* **7**, 894–900 (2005).
173. D. Ribet, P. Cossart, How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes and Infection* **17**, 173–183 (2015).
174. D. B. N. Vinh, D. C. Ko, R. A. Rachubinski, J. D. Aitchison, S. I. Miller, Expression of the Salmonella Spp. Virulence Factor SifA in Yeast Alters Rho1 Activity on Peroxisomes. *Molecular biology of the cell* **21**, 3567–3577 (2010).
175. N. Carayol, N. G. van Tran, Tips and tricks about Shigella invasion of epithelial cells. *Current opinion in microbiology* **16** (2013).
176. R. L. Hodinka, C. H. Davis, J. Choong, P. B. Wyrick, Ultrastructural study of endocytosis of Chlamydia trachomatis by McCoy cells. *Infection and Immunity* **56**, 1456–1463 (1988).
177. M. Majeed, E. Kihlström, Mobilization of F-actin and clathrin during redistribution of Chlamydia trachomatis to an intracellular site in eucaryotic cells. *Infection and Immunity* **59**, 4465–4472 (1991).
178. P. B. Wyrick, J. Choong, C. H. Davis, S. T. Knight, M. O. Royal, A. S. Maslow, C. R. Bagnell, Entry of genital Chlamydia trachomatis into polarized human epithelial cells. *Infection and Immunity* **57**, 2378–2389 (1989).
179. H. Boleti, A. Benmerah, D. M. Ojcius, N. Cerf-Bensussan, A. Dautry-Varsat, Chlamydia infection of epithelial cells expressing dynamin and Eps15 mutants: clathrin-independent entry into cells and dynamin-dependent productive growth. *J Cell Sci* **112** (Pt 10), 1487–1496 (1999).
180. M. E. Ward, H. Salari, Control mechanisms governing the infectivity of Chlamydia trachomatis for hela cells: modulation by cyclic nucleotides, prostaglandins and calcium. *Journal of general microbiology* **128**, 639–650 (1982).
181. A. Nans, H. R. Saibil, R. D. Hayward, Pathogen–host reorganization during Chlamydia invasion revealed by cryo-electron tomography. *Cellular microbiology* **16**, 1457–1472 (2014).
182. R. A. Carabeo, S. S. Grieshaber, E. Fischer, T. Hackstadt, Chlamydia trachomatis Induces Remodeling of the Actin Cytoskeleton during Attachment and Entry into HeLa Cells. *Infection and Immunity* **70**, 3793–3803 (2002).
183. R. A. Carabeo, S. S. Grieshaber, A. Hasenkrug, C. Dooley, T. Hackstadt, Requirement for the Rac GTPase in Chlamydia trachomatis invasion of non-phagocytic cells. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **5**, 418–425 (2004).
184. D. R. Clifton, K. A. Fields, S. S. Grieshaber, C. A. Dooley, E. R. Fischer, D. J. Mead, R. A. Carabeo, T. Hackstadt, A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 10166–10171 (2004).
185. T. J. Jewett, E. R. Fischer, D. J. Mead, T. Hackstadt, Chlamydial TARP is a bacterial nucleator of actin. *PNAS* **103**, 15599–15604 (2006).

186. T. J. Jewett, N. J. Miller, C. A. Dooley, T. Hackstadt, The conserved Tarp actin binding domain is important for chlamydial invasion. *PLoS pathogens* **6**, e1000997 (2010).
187. Katja Mölleken, Elisabeth Becker, Johannes H. Hegemann, The Chlamydia pneumoniae Invasin Protein Pmp21 Recruits the EGF Receptor for Host Cell Entry. *PLOS Pathogens* **9**, e1003325 (2013).
188. A. Sorkin, L. K. Goh, Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Experimental Cell Research* **314**, 3093–3106 (2008).
189. M. Hamon, H. Bierne, P. Cossart, *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat Rev Microbiol* **4**, 423–434 (2006).
190. R. Zrieq, C. Braun, J. H. Hegemann, The Chlamydia pneumoniae Tarp Ortholog CPn0572 Stabilizes Host F-Actin by Displacement of Cofilin. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **7** (2017).
191. J. T. Korhonen, M. Puolakkainen, A. Haveri, A. Tammiruusu, M. Sarvas, R. Lahesmaa, Chlamydia pneumoniae entry into epithelial cells by clathrin-independent endocytosis. *Microbial pathogenesis* **52**, 157–164 (2012).
192. A. Dautry-Varsat, A. Subtil, T. Hackstadt, Recent insights into the mechanisms of Chlamydia entry. *Cellular microbiology* **7**, 1714–1722 (2005).
193. Tim Fechtner, Sonja Stallmann, Katja Moelleken, Klaus L. Meyer, Johannes H. Hegemann, Characterization of the Interaction between the Chlamydial Adhesin OmcB and the Human Host Cell. *Journal of Bacteriology* **195**, 5323–5333 (2013).
194. K. Moelleken, J. H. Hegemann, The Chlamydia outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding. *Molecular microbiology* **67**, 403–419 (2008).
195. M. Bernfield, M. Götte, P. W. Park, O. Reizes, M. L. Fitzgerald, J. Lincecum, M. Zako, Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annual review of biochemistry* **68** (1999).
196. R. J. Linhardt, T. Toida, Role of Glycosaminoglycans in Cellular Communication. *Accounts of Chemical Research* **37**, 431–438 (2004).
197. F. N. Wuppermann, Katja Mölleken, Marion Julien, C. Jantos, J. Hegemann, Chlamydia pneumoniae GroEL 1 Protein Is Cell Surface Associated and Required for Infection of HEp-2 Cells †. *UR - <https://www.semanticscholar.org/paper/Chlamydia-pneumoniae-GroEL-1-Protein-Is-Cell-and-of-Wuppermann-M%C3%B6lleken/e0bef4c94273c2f35a0a71192703cfd9de344f8?p2df>* (2007).
198. O. Finco, A. Bonci, M. Agnusdei, M. Scarselli, R. Petracca, N. Norais, G. Ferrari, I. Garaguso, M. Donati, V. Sambri, R. Cevenini, G. Ratti, G. Grandi, Identification of new potential vaccine candidates against Chlamydia pneumoniae by multiple screenings. *Vaccine* **23** (2005).
199. S. Montigiani, F. Falugi, M. Scarselli, O. Finco, R. Petracca, G. Galli, M. Mariani, R. Manetti, M. Agnusdei, R. Cevenini, M. Donati, R. Nogarotto, N. Norais, I. Garaguso, S. Nuti, G. Saletti, D. Rosa, G. Ratti, G. Grandi, Genomic approach for analysis of surface proteins in Chlamydia pneumoniae. *Infection and Immunity* **70** (2002).
200. M. Soriani, P. Petit, R. Grifantini, R. Petracca, G. Gancitano, E. Frigimelica, F. Nardelli, C. Garcia, S. Spinelli, G. Scarabelli, S. Fiorucci, R. Affentranger, M. Ferrer-Navarro, M. Zacharias, G. Colombo, L. Vuillard, X. Daura, G. Grandi, Exploiting antigenic diversity for vaccine design: the chlamydia ArtJ paradigm. *The Journal of biological chemistry* **285** (2010).

201. T. Fechtner, J. N. Galle, J. H. Hegemann, The novel chlamydial adhesin CPn0473 mediates the lipid raft-dependent uptake of *Chlamydia pneumoniae*. *Cellular microbiology* **18**, 1094–1105 (2016).
202. Jan N. Galle, Tim Fechtner, Thorsten Eierhoff, Winfried Römer, Johannes H. Hegemann, A *Chlamydia pneumoniae* adhesin induces phosphatidylserine exposure on host cells. *Nat Commun* **10**, 1–10.
203. Philipp Timo Hanisch, *Die Funktion des Chlamydia pneumoniae Adhäsins LIPP und seines humanen Interaktionspartners 14-3-3zeta in der Infektion* (2019).
204. J. Grimwood, L. Olinger, R. S. Stephens, Expression of *Chlamydia pneumoniae* polymorphic membrane protein family genes. *Infection and Immunity* **69**, 2383–2389 (2001).
205. J. Grimwood, R. S. Stephens, Computational analysis of the polymorphic membrane protein superfamily of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*. *Microbial & comparative genomics* **4**, 187–201 (1999).
206. D. D. Rockey, J. Lenart, R. S. Stephens, Genome sequencing and our understanding of chlamydiae. *Infection and Immunity* **68**, 5473–5479 (2000).
207. K. Mölleken, E. Schmidt, J. H. Hegemann, Members of the Pmp protein family of *Chlamydia pneumoniae* mediate adhesion to human cells via short repetitive peptide motifs. *Molecular microbiology* **78**, 1004–1017 (2010).
208. S. E. T. Luczak, S. H. J. Smits, C. Decker, L. Nagel-Steger, L. Schmitt, J. H. Hegemann, The *Chlamydia pneumoniae* Adhesin Pmp21 Forms Oligomers with Adhesive Properties. *The Journal of biological chemistry* **291**, 22806–22818 (2016).
209. K. Haglund, I. Dikic, The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting. *J Cell Sci* **125**, 265–275 (2012).
210. A. Sorkin, M. von Zastrow, Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 609–622 (2009).
211. K. Mölleken, J. H. Hegemann, Acquisition of Rab11 and Rab11-Fip2-A novel strategy for *Chlamydia pneumoniae* early survival. *PLoS pathogens* **13**, e1006556 (2017).
212. S. Chatterjee, S. Chaudhury, A. C. McShan, K. Kaur, R. N. de Guzman, Structure and biophysics of type III secretion in bacteria. *Biochemistry* **52**, 2508–2517 (2013).
213. H. J. Betts-Hampikian, K. A. Fields, The Chlamydial Type III Secretion Mechanism: Revealing Cracks in a Tough Nut. *Frontiers in Microbiology* **1** (2010).
214. Guido Murra, *Identifizierung und Charakterisierung von Adhäsionsproteinen des humanpathogenen Erregers Chlamydia pneumoniae* (2009).
215. Sonja Stallmann, *Funktionsanalyse chlamydialer Adhäsionsproteine* (2010).
216. Sebastian Hänsch, *Analyse der neuen potentiellen Effektorproteine CPn0712, CPn0677 und CPn0678 von Chlamydia pneumoniae* (2016).
217. C A Jantos, S Heck, R Roggendorf, M Sen-Gupta, J H Hegemann, Antigenic and molecular analyses of different *Chlamydia pneumoniae* strains. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 620–623 (1997).
218. K.-D. Entian, T. Schuster, J. H. Hegemann, D. Becher, H. Feldmann, U. Güldener, R. Götz, M. Hansen, C. P. Hollenberg, G. Jansen, W. Kramer, S. Klein, P. Kötter, J. Kricke, H. Launhardt, G. Mannhaupt, A. Maierl, P. Meyer, W. Mewes, T. Munder, R. K. Niedenthal, M. Ramezani Rad, A. Röhmer, A. Römer, M. Rose, B. Schäfer, M.-L. Siegler, J. Vetter, N. Wilhelm, K. Wolf, F. K. Zimmermann, A. Zollner, A. Hinnen,

- Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol Gen Genet* **262**, 683–702 (1999).
219. M. F. Gonzales, T. Brooks, S. U. Pukatzki, D. Provenzano, Rapid Protocol for Preparation of Electrocompetent *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*. 10.3791/50684 (2013).
220. J. Schlessinger, SH2/SH3 signaling proteins. *Current Opinion in Genetics & Development* **4**, 25–30 (1994).
221. V. Moreau, F. Frischknecht, I. Reckmann, R. Vincentelli, G. Rabut, D. Stewart, M. Way, A complex of N-WASP and WIP integrates signalling cascades that lead to actin polymerization. *Nature cell biology* **2** (2000).
222. N. Ramesh, Im Antón, J. H. Hartwig, R. S. Geha, WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94** (1997).
223. M. Plomann, J. G. Wittmann, M. G. Rudolph, A Hinge in the Distal End of the PACSIN 2 F-BAR Domain May Contribute to Membrane-Curvature Sensing. *Journal of Molecular Biology* **400**, 129–136 (2010).
224. P.-Y. Khut, B. Tucker, M. Lardelli, S. A. Wood, Evolutionary and expression analysis of the zebrafish deubiquitylating enzyme, usp9. *Zebrafish* **4**, 95–101 (2007).
225. M. Murtaza, L. A. Jolly, J. Gecz, S. A. Wood, La FAM fatale: USP9X in development and disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **72**, 2075–2089 (2015).
226. H. Nagai, T. Noguchi, K. Homma, K. Katagiri, K. Takeda, A. Matsuzawa, H. Ichijo, Ubiquitin-like sequence in ASK1 plays critical roles in the recognition and stabilization by USP9X and oxidative stress-induced cell death. *Molecular Cell* **36**, 805–818 (2009).
227. M. J. Stinchfield, N. T. Takaesu, J. C. Quijano, A. M. Castillo, N. Tiusanen, O. Shimmi, E. Enzo, S. Dupont, S. Piccolo, S. J. Newfeld, Fat facets deubiquitylation of Medea/Smad4 modulates interpretation of a Dpp morphogen gradient. *Development (Cambridge, England)* **139**, 2721–2729 (2012).
228. J. A. Zallen, Planar polarity and tissue morphogenesis. *Cell* **129**, 1051–1063 (2007).
229. A. Conte, S. Sigismund, Methods to Investigate EGFR Ubiquitination. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1652**, 81–100 (2017).
230. M. J. Clague, S. Urbé, Endocytosis: the DUB version. *Trends in Cell Biology* **16**, 551–559 (2006).
231. M. G. Savio, N. Wollscheid, E. Cavallaro, V. Algisi, P. P. Di Fiore, S. Sigismund, E. Maspero, S. Polo, USP9X Controls EGFR Fate by Deubiquitinating the Endocytic Adaptor Eps15. *Current biology : CB* **26**, 173–183 (2016).
232. M. Katz, K. Shtiegman, P. Tal-Or, L. Yakir, Y. Mosesson, D. Harari, Y. Machluf, H. Asao, T. Jovin, K. Sugamura, Y. Yarden, Ligand-independent degradation of epidermal growth factor receptor involves receptor ubiquitylation and Hgs, an adaptor whose ubiquitin-interacting motif targets ubiquitylation by Nedd4. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **3**, 740–751 (2002).
233. E. Klapisz, I. Sorokina, S. Lemeer, M. Pijnenburg, A. J. Verkleij, P. M. P. van Bergen en Henegouwen, A ubiquitin-interacting motif (UIM) is essential for Eps15 and Eps15R ubiquitination. *The Journal of biological chemistry* **277**, 30746–30753 (2002).
234. N. Ramesh, M. J. Massaad, L. Kumar, S. Koduru, Y. Sasahara, I. Anton, M. Bhasin, T. Libermann, R. Geha, Binding of the WASP/N-WASP-interacting protein WIP

- to actin regulates focal adhesion assembly and adhesion. *Molecular and cellular biology* **34**, 2600–2610 (2014).
235. S. Fried, O. Matalon, E. Noy, M. Barda-Saad, WIP: more than a WASp-interacting protein. *Journal of Leukocyte Biology* **96**, 713–727 (2014).
236. T. Thanabalu, R. Rajmohan, L. Meng, G. Ren, P. R. Vajjhala, A. L. Munn, Verprolin function in endocytosis and actin organization. Roles of the Las17p (yeast WASP)-binding domain and a novel C-terminal actin-binding domain. *The FEBS journal* **274**, 4103–4125 (2007).
237. S. Eden, R. Rohatgi, A. V. Podtelejnikov, M. Mann, M. W. Kirschner, Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* **418**, 790–793 (2002).
238. A. M. Lebensohn, M. W. Kirschner, Activation of the WAVE complex by coincident signals controls actin assembly. *Molecular Cell* **36**, 512–524 (2009).
239. Z. Chen, D. Borek, S. B. Padrick, T. S. Gomez, Z. Metlagel, A. M. Ismail, J. Umetani, D. D. Billadeau, Z. Otwinowski, M. K. Rosen, Structure and control of the actin regulatory WAVE complex. *Nature* **468**, 533–538 (2010).
240. M. C. Mendoza, Phosphoregulation of the WAVE regulatory complex and signal integration. *Seminars in cell & developmental biology* **24**, 272–279 (2013).
241. A. Holmes, S. Mühlen, A. J. Roe, P. Dean, The EspF effector, a bacterial pathogen's Swiss army knife. *Infection and Immunity* **78**, 4445–4453 (2010).
242. N. M. Alto, A. W. Weflen, M. J. Rardin, D. Yazar, C. S. Lazar, R. Tonikian, A. Koller, S. S. Taylor, C. Boone, S. S. Sidhu, S. L. Schmid, G. A. Hecht, J. E. Dixon, The type III effector EspF coordinates membrane trafficking by the spatiotemporal activation of two eukaryotic signaling pathways. *J Cell Biol* **178**, 1265–1278 (2007).
243. A. W. Weflen, N. M. Alto, V. K. Viswanathan, G. Hecht, E. coli secreted protein F promotes EPEC invasion of intestinal epithelial cells via an SNX9-dependent mechanism. *Cellular microbiology* **12**, 919–929 (2010).
244. G. Greub, D. Raoult, History of the ADP/ATP-translocase-encoding gene, a parasitism gene transferred from a Chlamydiales ancestor to plants 1 billion years ago. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 5530–5535 (2003).
245. G. Drin, B. Antonny, Amphipathic helices and membrane curvature. *FEBS Letters* **584**, 1840–1847 (2010).
246. H. Ebsen, M. Lettau, D. Kabelitz, O. Janssen, Identification of SH3 domain proteins interacting with the cytoplasmic tail of the α disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *PLOS ONE* **9**, e102899 (2014).
247. A. Echarri, M. J. Lai, M. R. Robinson, A. M. Pendergast, Abl interactor 1 (Abi-1) wave-binding and SNARE domains regulate its nucleocytoplasmic shuttling, lamellipodium localization, and wave-1 levels. *Molecular and cellular biology* **24**, 4979–4993 (2004).
248. L. Luo, J. Xue, A. Kwan, R. Gamsjaeger, J. Wielens, L. von Kleist, L. Cubeddu, Z. Guo, J. L. Stow, M. W. Parker, J. P. Mackay, P. J. Robinson, The Binding of Syndapin SH3 Domain to Dynamin Proline-rich Domain Involves Short and Long Distance Elements. *The Journal of biological chemistry* **291**, 9411–9424 (2016).
249. L. Yeow-Fong, L. Lim, E. Manser, SNX9 as an adaptor for linking synaptojanin-1 to the Cdc42 effector ACK1. *FEBS Letters* **579**, 5040–5048 (2005).
250. H. Fu, R. R. Subramanian, S. C. Masters, 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annual review of pharmacology and toxicology* **40**, 617–647 (2000).

251. M. Giménez-Andrés, A. Čopič, B. Antony, The Many Faces of Amphipathic Helices. *Biomolecules* **8** (2018).
252. X. Gao, Z. Mu, X. Yu, B. Qin, J. Wojdyla, M. Wang, S. Cui, Structural Insight Into Conformational Changes Induced by ATP Binding in a Type III Secretion-Associated ATPase From *Shigella flexneri*. *Front. Microbiol.* **9**, 1468 (2018).
253. B. C. Russo, J. K. Duncan, A. L. Wiscovitch, A. C. Hachey, M. B. Goldberg, Activation of *Shigella flexneri* type 3 secretion requires a host-induced conformational change to the translocon pore. *PLoS pathogens* **15**, e1007928 (2019).
254. P. M. Colonne, C. G. Winchell, D. E. Voth, Hijacking Host Cell Highways: Manipulation of the Host Actin Cytoskeleton by Obligate Intracellular Bacterial Pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **6**, 107 (2016).
255. Y. Hua, K. Yan, C. Wan, Clever Cooperation: Interactions Between EspF and Host Proteins. *Frontiers in Microbiology* **9** (2018).
256. R. Faris, A. McCullough, S. E. Andersen, T. O. Moninger, M. M. Weber, The *Chlamydia trachomatis* secreted effector TmeA hijacks the N-WASP-ARP2/3 actin remodeling axis to facilitate cellular invasion. *PLoS pathogens* **16**, e1008878 (2020).
257. G. Keb, J. Ferrell, K. R. Scanlon, T. J. Jewett, K. A. Fields, *Chlamydia trachomatis* TmeA Directly Activates N-WASP To Promote Actin Polymerization and Functions Synergistically with TarP during Invasion. *mBio* **12** (2021).
258. D. Humphreys, V. Singh, V. Koronakis, Inhibition of WAVE Regulatory Complex Activation by a Bacterial Virulence Effector Counteracts Pathogen Phagocytosis. *Cell reports* **17**, 697–707 (2016).
259. M. Innocenti, S. Gerboth, K. Rottner, F. P. L. Lai, M. Hertzog, T. E. B. Stradal, E. Frittoli, D. Didry, S. Polo, A. Disanza, S. Benesch, P. P. Di Fiore, M.-F. Carlier, G. Scita, Abi1 regulates the activity of N-WASP and WAVE in distinct actin-based processes. *Nature cell biology* **7**, 969–976 (2005).
260. J. Pizarro-Cerdá, A. Kühbacher, P. Cossart, Phosphoinositides and host-pathogen interactions. *Biochimica et biophysica acta* **1851**, 911–918 (2015).
261. C. Braun, A. R. Alcázar-Román, A. Laska, K. Mölleken, U. Fleig, J. H. Hegemann, 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* **14**, e0210403 (2019).

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Taxonomische Klassifizierung der Ordnung Chlamydiales	1
Abbildung 2: Darstellung des chlamydialen Entwicklungszyklus	4
Abbildung 3: Die verschiedenen Endozytose-Mechanismen von humanen Zellen	8
Abbildung 4: Schematischer Ablauf der Clathrin-abhängigen Endozytose	9
Abbildung 5: Einfluss der Membran und des Aktin-Zytoskeletts während der späten Endozytose.....	12
Abbildung 6: Funktionen- und Domänenübersicht von SNX9	15
Abbildung 7: Funktionen- und Domänenübersicht von Syndapin	18
Abbildung 8: Funktionen- und Domänenübersicht von WASP	19
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Zipper- und Trigger-Mechanismus	21
Abbildung 10: Schematische Darstellung der frühen Infektionsprozesse von <i>C. pn.</i>	24
Abbildung 11: Schematische Darstellung des <i>C. pn.</i> Genclusters <i>cpn0676-cpn0678</i> und der syntenischen Loci von <i>C. tr.</i> und <i>C. psittaci</i>	27
Abbildung 12: Quantitative Massenspektrometrie zeigt weitere potenzielle Interaktionspartner	127
Abbildung 13: Lokalisationsanalyse und Proteininteraktionsstudien zu CPn0677 und SNX9	129
Abbildung 14: Lokalisationsanalyse und Proteininteraktionsstudien zu CPn0677 und WIP	131
Abbildung 15: Ektopische Expression von CPn0678 und Syndapin2 in HEP-2-Zellen.	133
Abbildung 16: Proteininteraktionsstudien mit CPn0678 und Syndapin.....	134
Abbildung 17: Oligomerisierungs-Analyse zu CPn0677 und CPn0678	136
Abbildung 18: Einfluss der EGFR-vermittelten Endozytose auf die CPn0677 Lokalisation.....	138
Abbildung 19: Oligomerisierung von CPn0678 und der potenzielle bifunktionelle Mechanismus.....	145
Abbildung 20: Schematische Darstellung der APHs von CPn0677 und CPn0678. .	146
Abbildung 21: Schematische Darstellung der durch CPn0677/0678 induzierten Prozesse während der Internalisierung von EBs.	152

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Gebrauchsmaterialien	90
Tab. 2: Verwendete Geräte und Maschinen	91
Tab. 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	92
Tab. 4: Verwendete Lösungen und Puffer	95
Tab. 5: Verwendete Enzyme	98
Tab. 6: Verwendete Agarosen	99
Tab. 7: Verwendete Färbemittel und Fluoreszenzfarbstoffe	99
Tab. 8: Verwendete Primärantikörper	99
Tab. 9: Verwendete Sekundärantikörper	100
Tab. 10: Verwendete Kits	100
Tab. 11: Verwendete Proteingrößenstandards	100
Tab. 12: Verwendeter DNA-Größenstandard	101
Tab. 13: Verwendete Oligonukleotide	101
Tab. 14: Verwendete und neu generierte Plasmide	102
Tab. 15: Verwendete E. coli und Chlamydia spp. Stämme	102
Tab. 16: Verwendete Eukaryotische Zellen und Zelllinien	103
Tab. 17: Bestandteile des Aminosäurenmixes	104
Tab. 18: Mengenangaben für SDS-Polyacrylamid Trenn- und Sammelgel	117
Tab. 19: Eingesetzte Permeabilisierungs Puffer	124
Tab. 20: Verwendete Bioinformatik Programme	125
Tab. 21: Identifizierte potenzielle Interaktionspartner für CPn0677	127
Tab. 22: Identifizierte potenzielle Interaktionspartner für CPn0678	127

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Zeit dieser Arbeit unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Johannes Hegemann bedanken. Er betreute bereits meine Masterarbeit in dem Institut für Funktionelle Genomforschung, weshalb ich auch gerne für die Dissertation geblieben bin. Durch die Vergabe eines neuen Themas bekam ich die Möglichkeit, tiefe Einblicke in die Funktionsweise von Chlamydien zu erhalten und konnte diese auch im Rahmen von nationalen und internationalen Konferenzen weitergeben. Ebenfalls bedanke ich mich für die Unterstützung beim Schreiben und Einreichen meines eigenen Forschungs-Antrags.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Thomas Klein für seine Tätigkeit als Zweitgutachter bedanken und damit verbunden für die interessanten Gespräche und die konstruktive Kritik.

Ein besonderer Dank gilt meiner gesamten Familie. Insbesondere danke ich meinen Eltern und meinem Bruder. Vielen Dank, dass ihr mich nicht nur während meiner Promotion, sondern über meine gesamte Studienzeit hinweg unterstützt und an mich geglaubt habt. Lieber Manu, den angebotenen Taxi-Schein kann ich jetzt dankend ablehnen. Außerdem danke ich meinen Großeltern für unsere gemeinsame Zeit – für jedes Kartenspiel, das mich vom Arbeitsalltag abgelenkt hat; für jedes (Feierabend-)Bierchen und Schnäpschen und generell die wunderbare Verpflegung.

Ein riesiges Dankeschön geht an alle Mitglieder der AG Hegemann und der AG Fleig. Vielen Dank für die entspannte und gut gelaunte Arbeitsatmosphäre. Mit euch zu Arbeiten hat sehr viel Spaß gemacht und ihr standet mir stets mit Rat und Tat und dem ein oder anderen Bier zur Seite. Dank euch konnte ich die Doktorarbeit gut durchstehen.

Insbesondere gilt mein Dank meiner Betreuerin in Spe, Katja, die mir durch ihre exzellente Beratung bei so manch einem Problem geholfen hat. Ganz besonders möchte ich mich bei Philipp und Sebastian bedanken, die über die Zeit nicht nur Kollegen geblieben sind, sondern auch zu Freunden wurden. Ihr habt wahrlich den Humor in den frustrierenden Forschungsalltag gebracht und den Freitag zu dem besten Tag der Woche gemacht.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Manchot-Stiftung und bei Herrn Thomas Manchot für die Bewilligung meines Forschungsantrags und der dreijährigen Finanzierung in der Form eines Stipendiums.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei meiner Freundin Katharina bedanken. Du hast mich stets aufgemuntert und ermutigt weiterzuarbeiten, wenn es gebraucht habe. Zur richtigen Zeit hast du mich abgelenkt, wenn mein Kopf kurz vor dem Explodieren war. Deine moralische Unterstützung hat mir geholfen, meine Dissertation abzuschließen. Dafür bin ich dir sehr dankbar.

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 kenntlichgemacht.

Dominik Spona

(Düsseldorf, März 2021)