

**Wirkung des humanpathogenen *Chlamydia pneumoniae*
Proteins CPn0572 auf das Mikrotubuli-Zytoskelett und die
Genomstabilität der infizierten Wirtszelle**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Mona Iris Höhler
aus Solingen

Düsseldorf, den 20.02.2025

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. Ursula Fleig
2. Prof. Dr. Johannes H. Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.06.2025

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
I Zusammenfassung	8
II Summary	9
1 Einleitung	11
1.1 Evolution und Taxonomie der Chlamydien	11
1.2 Humanpathogene Chlamydien und die Relevanz für menschliche Gesundheit	12
1.2.1 <i>Chlamydia trachomatis</i>	13
1.2.2 <i>Chlamydia pneumoniae</i>	14
1.2.3 Zoonotisches Potential von Chlamydien.....	15
1.2.4 Behandlung von Chlamydieninfektionen und Notwendigkeit eines Impfstoffes	16
1.3 Methoden zur Analyse chlamydialer Infektionsprozesse	16
1.3.1 Chlamydien sind limitiert genetisch manipulierbar	17
1.3.2 Möglichkeiten zur Funktions-Identifizierung chlamydialer Proteine.....	18
1.4 Der chlamydiale Infektionszyklus	19
1.4.1 Der biphasische chlamydiale Infektionszyklus am Beispiel von <i>Chlamydia pneumoniae</i>	20
1.5 Die Adhäsion an die Wirtszelle	21
1.6 Internalisierung und Manipulation zellulärer Prozesse	23
1.6.1 Chlamydien manipulieren die Wirtszelle	24
1.6.2 Sekretierte Effektorproteine manipulieren das Wirtszell-Zytoskelett	25
1.7 Das eukaryotische Zytoskelett	26
1.7.1 Aufbau und Funktion des Aktin Zytoskeletts	26
1.7.2 Aufbau und Funktion des Mikrotubuli-Zytoskeletts	27
1.7.2.1 Aufbau und Funktion des mitotischen Mikrotubuli-Zytoskeletts.....	29
1.7.2.2 Die Komplexität des Mikrotubuli-Zytoskeletts	30
1.7.2.3 MT-assoziierte Proteine regulieren die Mikrotubuli Dynamik	32
1.8 Chlamydiale Effektorproteine manipulieren das dynamische Zytoskelett	34
1.8.1 Chlamydien manipulieren das Aktin Zytoskelett der Wirtszelle.....	34
1.8.1.1 Die TarP Effektorproteinfamilie induziert F-Aktin-Rekrutierung	35
1.8.1.2 Das <i>Chlamydia pneumoniae</i> TarP Ortholog CPn0572	38
1.8.2 Chlamydien nutzen das Mikrotubuli-Zytoskelett der Wirtszelle	38
1.9 Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskelett verknüpfende MAPs	39
2 Ziel dieser Arbeit	41

3 Manuskript I	42
3.1 Zusammenfassung	44
4 Manuskript II	75
4.1 Zusammenfassung	77
5 CPn0572 expression results in mitotic defects	102
5.1 Objective of this analysis	102
5.2 Results	102
5.2.1 CPn0572 ⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ association with spindle MTs results in aberrant mitosis	102
5.2.2 CPn0572 ⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ expression leads to genome instability in yeast and mammalian cells	104
5.2.3 Infection with <i>Cpn</i> results in mitotic defects of the host cell	106
5.3 Materials	110
5.3.1 Equipment	110
5.3.2 Chemicals	111
5.3.2 Solutions and buffer	112
5.3.3 Enzymes	113
5.3.4 Dye	113
5.3.5 Antibodies	114
5.3.6 Used plasmids	114
5.3.3 Cells and cell lines	115
5.3.4 Media and cultivation	115
5.4 Methods	117
5.4.1 Cultivation and transformation of <i>S. pombe</i> cells	117
5.4.1.1 Preparation of <i>S. pombe</i> cells for live-cell microscopy	117
5.4.1.2 Ch16 chromosome loss assay	118
5.4.2 Cultivation, transfection and infection of mammalian cells	118
5.4.3 Fixation, permeabilization and staining of transfected or infected mammalian cells	120
6 Abschließende Diskussion	122
6.1. Der Einfluss des MT-Zytoskeletts der Wirtszelle bei der frühen <i>Cpn</i> Infektion	122
6.2. Das <i>Cpn</i> Protein CPn0572 ist das erste bakterielle Protein, was beide dynamischen Zytoskelette der humanen Wirtszelle moduliert	125
6.2.1 Die Aktin-Assoziations-Fähigkeiten von <i>Ctr</i> L2 TarP und CPn0572	125
6.2.2 CPn0572 moduliert massiv die Interphasen-Mikrotubuli in humanen Epithelzellen	126
6.2.3 Die Modulation des MT-Zytoskeletts der Wirtszelle durch TarP ist spezifisch für <i>C. pneumoniae</i>	128

6.2.4 CPn0572 Expression führt zu genomischer Instabilität	129
6.2.5 <i>Cpn</i> Infektionen führen in Wirtszellen zu Mitosedefekten	130
6.2.6 Die Aktin- und MT-modulierenden Funktionen von CPn0572 unterliegen möglicherweise komplexen Regulationsmechanismen	131
Referenzen	136
Abbildungsverzeichnis	146
Tabellenverzeichnis	146
Danksagung	147
Eidesstattliche Erklärung	148

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
>	Mehr als
γ-TuRC	γ-tubulin ring complex
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
+TIP	Plus-end tracking protein
μm	Mikrometer
aa	Aminoacids
AB	Aberrant body
ABD	G-Aktin Bindedomäne
ADP	Adenosindiphosphat
APC	Adenomatous polyposis coli
Arp	Actin related protein
ATP	Adenosintriphosphat
bzw	Beziehungsweise
ca	Circa
CLIPs	Cytoplasmic linkerprotein
cOMC	Outer membrane complex
COPD	Chronische obstruktive Lungenerkrankung
CopN	Chlamydial outer protein N
CRISPRi	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats interference
CteG	<i>Chlamydia trachomatis</i> effector associated with the golgi
Ctr	<i>Chlamydia trachomatis</i>
CPAF	Chlamydial protease-like activity factor
Cpn	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
DNA	Deoxyribonucleic acid
EB	Elementary body
EB1	End binding protein 1
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	Und andere
FAB	F-Aktin Bindedomäne

F-Aktin	Filamentöses Aktin
GAGs	Glykosaminoglykane
G-Aktin	Globuläres Aktin
Gal1	Galectin-1
GFP	Green fluorescent protein
HDAC6	Histone deacetylase 6
hpi	Hours post infection
hrs	Hours
Inc	Inclusion membrane protein
IPAM	Inclusion protein actin on MTs
kDa	KiloDalton
M	Mole
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
Mb	Megabasen
MBR	Mikrotubuli-Binderegion
min	Minute
mL	Milliliter
MOI	Multiplicity of infection
MOMP	Major outer membrane protein
MT	Mikrotubuli
MTOC	Microtubule organizing center
nm	Nanometer
NPFs	Nucleation promoting factors
LD	Leucin-Aspartat Motif
OmcB	Outer membrane complex protein B
pH	Pondus Hydrogenii
Pmps	Polymorphoe Membranproteine
PTM	Post-translationale Modifikation
LGV	Lymphogranuloma Venereum
PM	Plasmamembran
Pmp	Polymorphes Membranprotein
PRD	Prolin-reiche Domäne
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PTMs	Post-translationale Modifikationen
RB	Reticulate body
rpm	Rounds per minute
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure

RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SEM	Standard error of the mean
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
STI	Sexually transmitted infection
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
TmeA	Translocated membrane-associated effector A
TarP	Translocated aktin-recruiting phosphoprotein
VBS	Vinculin Bindesequenz
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrom Protein
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)

I Zusammenfassung

Obligat intrazelluläre Bakterien sind für ihren Entwicklungszyklus vollständig auf ihre eukaryotische Wirtszelle angewiesen. Eine wichtige Gruppe obligat intrazellulärer Bakterien sind die humanpathogenen Chlamydien. Diese Gram-negativen Erreger sind weltweit für eine Reihe wichtiger Erkrankungen verantwortlich. So führt *Chlamydia pneumoniae* (*Cpn*) zu Erkrankungen des oberen und unteren Respirationstraktes und wird mit mehreren chronischen Krankheiten sowie Lungenkrebs assoziiert. Chlamydien manipulieren während ihres Entwicklungszyklus auf vielfältige Weise Prozesse ihrer Wirtszelle. Hierzu sekretieren Chlamydien im Rahmen ihres biphasischen Infektionszyklus über ihr Typ-III-Sekretionssystem Effektorproteine, welche unter anderem das Zytoskelett manipulieren. Während hierbei die Rolle des Aktin-Zytoskeletts bereits gut belegt ist, ist unklar, welche Rolle das MT-Zytoskelett im Infektionszyklus spielt und welche Effektorproteine beteiligt sein könnten.

Ich konnte zeigen, dass ein wildtypisches MT-Zytoskelett für den regulären Ablauf der frühen *Cpn* Infektion essentiell ist und der Verlust des MT-Zytoskeletts oder die Beeinträchtigung der MT-Dynamik zu einer massiven Reduktion der Infektionseffizienz führt. In einem umfangreichen Screen im Modell-Eukaryoten *Schizosaccharomyces pombe* konnte unser Labor insgesamt 13 neue MT-modulierende *Cpn* Proteine identifizieren, welche zu unterschiedlichen Zeiten im Infektionszyklus exprimiert werden.

In weiteren Arbeiten konnte ich für das früh sekretierte *Cpn* Effektorprotein CPn0572, welches ein Mitglied der in Chlamydien konservierten TarP-Proteinfamilie und bei der Rekrutierung von Aktin an die chlamydiale Eintrittsstelle involviert ist, eine neue Funktion als MT-assoziiertes Protein zeigen. Mit seiner C-terminalen MT-Binderegion kann CPn0572 *in vitro* und *in vivo* MT direkt binden und stabilisieren. Sowohl die ektopische Expression von CPn0572 in humanen Epithelzellen als auch dessen Sekretion während der Infektion führen zu einer massiven Modulation von Interphasen-MT. Damit ist CPn0572 das einzige bakterielle Protein, welches sowohl das Aktin- als auch das MT-Zytoskelett von eukaryotischen Wirtszellen binden und modulieren kann.

Interessanterweise moduliert ektopisch exprimiertes CPn0572 nicht nur Interphasen-MT, sondern assoziiert und moduliert auch mitotische Spindel-MT. Dies führt zu einem massiven, statistisch signifikanten Anstieg an aberranten mitotischen Zellen, welche verschiedene Defekte in der Spindelformation und -funktion zeigen. Schließlich konnte ich zeigen, dass auch eine *Cpn* Infektion von Epithelzellen zu einer Erhöhung von

Mitosedefekten führt, was möglicherweise genomische Instabilität auslöst und damit zur Transformation der epithelialen Wirtszelle zur Tumorzelle beitragen könnte.

Die Daten belegen die Relevanz des MT-Zytoskeletts für die *Cpn* Infektion, welchen Beitrag das Effektorprotein CPn0572 hierbei leistet und geben erste Hinweise darauf, welche Folgen die MT-Manipulation für die infizierte humane Wirtszelle haben könnte.

II Summary

For their development cycle obligate intracellular bacteria are completely dependent on their eukaryotic host cell. An important group of obligate intracellular bacteria are the human pathogenic chlamydia. These Gram-negative pathogens are responsible for a number of important diseases worldwide. *Chlamydia pneumoniae* (*Cpn*) causes diseases of the upper and lower respiratory tract and is associated with several chronic diseases and lung cancer. During the biphasic infection cycle Chlamydia manipulate processes of their host cells in a variety of ways. For this, chlamydia secrete effector proteins via the type-III-secretion system, which manipulate the host cytoskeleton. To date, the role of the actin cytoskeleton is well established, but the role of the MT cytoskeleton and its manipulation by chlamydial proteins is largely unclear.

I have shown that a wild-type MT cytoskeleton is essential for proper early *Cpn* infection and that loss of the MT cytoskeleton or alterations of its dynamics massively reduced infection efficiency. In a comprehensive screen using the model eukaryote *Schizosaccharomyces pombe*, our lab identified a total of 13 new MT-modulating *Cpn* proteins, which are expressed at different times in the infection cycle.

In further work, I was able to show that the early secreted *Cpn* effector CPn0572, which is a member of the conserved chlamydial TarP protein family involved in the recruitment of actin to the chlamydial entry site, also functions as a MT-modulating protein. With its C-terminal MT binding region, CPn0572 binds and stabilizes MT *in vitro* and *in vivo*. Ectopic expression in human epithelial cells and secretion during infection led to massive modulation of interphase MTs. Thus, CPn0572 is unique in being the only bacterial protein that binds to and modulates both the actin and MT cytoskeleton of the eukaryotic host cell.

Interestingly, ectopically expressed CPn0572 not only modulates interphase MTs but also associates with and alters spindle MTs of mitotic cells. This CPn0572-mediated alteration resulted in a massive, statistically significant increase of aberrant mitotic cells showing various defects in spindle formation and function. Finally, I was able to show that *Cpn*

infection of epithelial cells also leads to an increase of mitotic defects, potentially leading to genomic instability and the formation of tumor cells.

The data demonstrate for the first time the relevance of the MT cytoskeleton for the *Cpn* infection and how CPn0572 is involved in this process. My work provides the first indications about the consequences MT manipulation could have for the infected human host cell.

1 Einleitung

1.1 Evolution und Taxonomie der Chlamydien

Chlamydien sind Gram-negative, obligat intrazelluläre human- und tierpathogene Bakterien, die für eine Vielzahl an Krankheiten verantwortlich sind. Dabei handelt es sich um eine sehr alte Gruppe von bakteriellen Organismen. Es wird vermutet, dass die Ordnung der *Chlamydiales* von einem gemeinsamen Vorfahren (*Protochlamydia amoebophila*) abstammt, dessen Ursprung schätzungsweise 700 Millionen Jahre zurückliegt. Im Hinblick darauf, dass die Entstehung von Primaten etwa 75 Millionen Jahren zurückliegt und die Abstammungslinie des modernen Menschen nicht älter als eine Million Jahre ist, schließt sich daraus, dass Chlamydien viel älter als ihre humanen Wirtsorganismen sind [1, 2]. Aktuell existieren allerdings nur Spekulationen über die Entwicklung von Chlamydien und den Übergang zu den heutigen Wirtsorganismen. Es gibt Hinweise darauf, dass die Reduktion der Genomgröße der modernen Chlamydien von etwa 2 Mb bei *P. amoebophila* auf etwa 1 Mb, auf die evolutionäre Anpassung der Chlamydien an ihre eukaryotischen Wirte zurück zu führen ist [3]. Erstmals wurde „*Chlamydia*“ 1907 beschrieben und da sich Chlamydien durch ihre obligat intrazelluläre Lebensweise und einen einzigartigen biphasischen Infektionszyklus (erstmals 1932 beschrieben) auszeichnen und damit von prokaryotischem Verhalten abweichen, wurde damals fälschlicherweise davon ausgegangen, dass es sich bei den Chlamydien um Protozoen oder Viren handelt [1]. Aufgrund der Entdeckung, dass Chlamydien sowohl DNA, als auch RNA, Ribosomen und eine Zellwand wie Gram-negative Bakterien besitzen, gelten die *Chlamydiae* seit 1966 als Bakterien [1]. Dem Genus *Chlamydia* wurden anschließend im Laufe der Zeit die Spezies *C. trachomatis*, *C. muridarum*, *C. suis*, *C. pneumoniae*, *C. pecorum*, *C. caviae*, *C. psittaci*, *C. abortus* und *C. felis* mittels 16S rRNA-Analysen zugeordnet (Abb.1) [3-6]. Chlamydien haben eine kleine Genomgröße und die Spezies weisen, trotz einer hohen Wirts-Spezifität zwischen den Spezies, eine hohe genomische Ähnlichkeit auf [7].

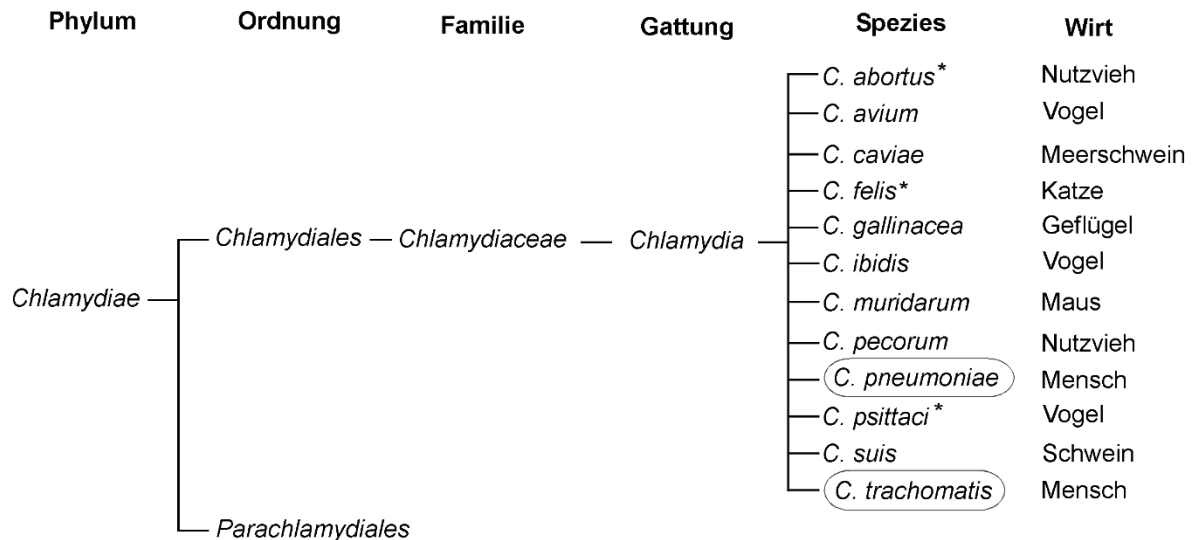


Abbildung 1: Taxonomische Einordnung des Phylums *Chlamydiae*.

Schematische taxonomische Darstellung des Phylums *Chlamydiae* mit Schwerpunkt auf der Gattung *Chlamydia* (Erstellt nach [6]). Mit einem * versehene Spezies zeigen zoonotisches Potential [8-10]. Bei den eingekreisten Spezies handelt es sich um Humanpathogene. Als Nutzvieh gelten Schweine, Rinder, Ziegen, Pferde und Schafe.

1.2 Humanpathogene Chlamydien und die Relevanz für menschliche Gesundheit

Zu den humanpathogenen Chlamydienspezies zählen *Chlamydia trachomatis* (*Ctr*) und *Chlamydia pneumoniae* (*Cpn*). Diese lösen Infektionen aus, die zu schwerwiegenden Krankheiten führen können [11]. Während *Ctr* ausschließlich Menschen infiziert, konnte *Cpn* aus Menschen und auch aus bestimmten Tieren wie Amphibien, Reptilien, Pferde oder Koalas isoliert werden [12]. Das früher entdeckte *Ctr* ist mit der Existenz von verschiedenen Serovaren verantwortlich für Infektionen des Augenepithels oder des Urogenital-Traktes. Die lokalen Infektionen können sich auch systemisch über das Lymphsystem ausbreiten. Das später entdeckte *Cpn* führt hingegen zu Infektionen des Lungenepithels im Respirationstrakt [13]. Insgesamt zeigt sich jedoch eine sehr hohe DNA-Homologie zwischen den beiden Spezies. Beispielsweise konnte für 80 % der Gene von *Ctr* Orthologe in *Cpn* gefunden werden. Das Vorhandensein oder Fehlen von Genen sorgt schließlich für Unterschiede zwischen beiden Spezies bezüglich der Biologie, Virulenz und Pathogenität [14].

1.2.1 *Chlamydia trachomatis*

Ctr ist der häufigste vorkommende bakterielle Erreger für sexuell übertragbare Krankheiten (STIs) sowie für infektiöse Erblindung weltweit [15, 16]. Ausgehend von einer Antigenvariation im Protein MOMP (*major outer membrane protein*), wird *Ctr* in 19 einzelne Serovare (Genovare) eingeteilt [17]. Während die Serovare A – C mit okularen Trachomen (Augeninfektionen) assoziiert sind und vermeidbare Erblindung verursachen können, lösen die Serovare D – K lokale urogenitale Infektionen aus, die zu chronischen Unterleibsschmerzen, Eileiterschwangerschaften und zu Unfruchtbarkeit bei Frauen führen können. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt die jährliche Infektionsrate mit Urogenital-infizierendem *Ctr* auf etwa 130 Millionen Menschen im Alter von 15 – 49 Jahren weltweit (Stand 2020) [18, 19]. Aufgrund des Vorkommens einer asymptomatischen oder minimal symptomatischen Infektion von Frauen und Männern (etwa 70 % Frauen und 50 % Männer), werden Infektionen meist nicht diagnostiziert und demnach nicht behandelt. Als Resultat, auch durch mögliche Reinfektionen, kommt es zu potentiellen Langzeitschäden wie Vernarbungen im Bereich der Eileiter. Diese Vernarbungen können schließlich zu Eileiterschwangerschaften oder sogar zu Unfruchtbarkeit der Frau führen [11, 20-24]. *Ctr* Infektionen (Serovare D – K) sind überwiegend bei der jüngeren Bevölkerung (18 – 25 Jahre) zu finden und machen 73 % aller Infektionen aus. Dabei werden mehr Infektionen von Frauen als von Männern dokumentiert [22]. In einer Studie wurden etwa 4,0 % der Frauen und 2,8 % der Männer in einem reproduzierbaren Alter positiv auf *Ctr* getestet [19]. Weiterhin zählen Cervicitis, Salpingitis und Endometritis zu den durch *Ctr* Infektionen ausgelösten Krankheiten des Urogenitaltrakts von Frauen [25, 26]. Bei Männern kann eine *Ctr* Infektion zu Urethritis, Epididymitis oder zu Prostatitis führen [27].

Infektionen mit den Serovaren L1 - L3 treten hauptsächlich bei Männern auf, welche einen gleichgeschlechtlichen Lebensstil leben, und werden, wie die Serovare D – K, durch sexuellen Kontakt übertragen. Diese Serovare führen zunächst zu einer lokalen Infektion im Genitalbereich, welche auch die Lymphknoten und Lymphgefäße befallen kann und sich so zu einer systemischen Infektion entwickeln kann. Dies führt schließlich zu invasivem Lymphogranuloma Venereum (LGV) [10, 24, 25].

Es kommt vor, dass eine *Ctr* Infektion des Urogenitaltrakts gemeinsam mit anderen Begleitinfektionen, wie Gonorrhö, bakterielle Vaginose oder humanem Papillomvirus, auftritt [25]. Ebenfalls wurde dokumentiert, dass *Ctr* in Verbindung mit verschiedenen Krebsarten wie zum Beispiel Gebärmutterhalskrebs steht. Eine epidemiologische Studie mit weiblichen Patienten konnte zeigen, dass eine Infektion mit *Ctr* ein erhöhtes Risiko für die spätere Entwicklung eines invasiven Karzinoms des Gebärmutterhalses birgt [28]. Wie eine

Ctr Infektion Krebs auslösen kann ist unklar. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass eine *Ctr* Infektion die Bildung von Krebszellen induzieren kann. Es wurde gezeigt, dass *Ctr* zentrosomale Defekte in sich teilenden Epithelzellen auslösen kann. Diese zentrosomalen Defekte, wie eine abnormal hohe Anzahl an Zentrosomen, können in Verbindung mit Fehlern bei der Chromosomensegregation stehen. Auch wurde gezeigt, dass *Ctr* Infektionen zu einer erhöhten Anzahl an multinuklearen Zellen führen, was ein weiterer Hinweis für die Bildung von Krebszellen darstellt [29, 30].

1.2.2 *Chlamydia pneumoniae*

Cpn gilt als das am häufigsten vorkommende intrazelluläre bakterielle Humanpathogen und Infektionen sind in der Bevölkerung weltweit sehr stark verbreitet [31]. Infektionen treten in allen Altersgruppen auf und die prozentuale Anzahl an *Cpn* Infektionen steigt mit dem Alter an. Bei Kindern in einem Alter von etwa 5 – 10 Jahren liegt die Infektionsrate bei ca. 10%. Bis zu 50 % der Menschen in einem Alter von bis zu 20 Jahren besitzen Antikörper gegen *Cpn* aus früheren oder akuten Infektionen und die Antikörper-Prävalenz steigt im Alter auf bis zu 80 % an [32-34]. Weiterhin kann eine *Cpn* Infektion zu akuten und in Einzelfällen auch zu chronischen Infektionen des oberen und unteren Respirationstraktes führen. Beginnend mit Epithelzellen ist *Cpn* dabei in der Lage ein Spektrum von verschiedenen Zelltypen zu infizieren. Die Infektion breitet sich anschließend auf infiltrierende Immunzellen, wie Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Neutrophile aus [35, 36]. Eine *Cpn* Infektion kann auch schwerwiegende respiratorische Krankheiten wie Pneumonien, Bronchitis, Sinusitis, Laryngitis oder Pharyngitis auslösen [32]. Es wird geschätzt, dass etwa 10% der *Cpn* verursachten Infektionen als Pneumonie und etwa 5% als Bronchitis verlaufen [32]. Auch wurde *Cpn* mit chronischen Herz-Lungenkrankheiten wie atherosklerotischen Herzerkrankungen, Asthma und chronischer obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) in Verbindung gebracht [32, 37]. Neben Herz-Lungenkrankheiten steht *Cpn* immer häufiger auch mit weiteren chronischen Krankheiten wie Alzheimer, Multipler Sklerose, Arthritis, Sarkoidose und Lungenkrebs in Verbindung. Allerdings konnte die kausale Rolle, die *Cpn* bei diesen Krankheiten spielt, bislang nicht aufgeklärt werden [32, 38]. So gibt es bisher nur zwei Analysen, die einen Zusammenhang zwischen einer *Cpn* Infektion und Lungenkrebs herstellen konnten. (i) In einer Meta-Analyse, welche 12 epidemiologische Studien umfasste, wurde festgestellt, dass Patienten, welche Antikörper gegen *Cpn* aufwiesen, ein erhöhtes Risiko haben an Lungenkrebs zu erkranken [39]. (ii) Eine experimentelle Analyse mit Ratten als Modellorganismus, welche inhalativ mit *Cpn* infiziert wurden, zeigte einen Zusammenhang zwischen *Cpn* Infektion und

einem erhöhten Lungenkrebs-Risiko. Im Vergleich zu nichtinfizierten Tieren, welche keine Lungentumore zeigten, wiesen 14,6 % der *Cpn* infizierten Tiere Tumore mit einem Durchmesser von bis zu 8 cm auf [40]. Wie eine *Cpn* Infektion mechanistisch das Risiko für Lungenkrebs erhöhen könnte, ist bisher völlig unklar. Ein möglicher Faktor, welcher zur Bildung von Krebszellen im Lungenepithel beiträgt, ist die sogenannte chromosomale Instabilität. Diese wird durch das Vorkommen von Fehlern während der Chromosomensegregation in mitotischen Zellen ausgelöst und beschreibt die fehlerhafte Segregation von Chromosomen, welche schließlich zu Abweichungen in der euploiden Chromosomenzahl (Aneuploidie) führen kann. Auslöser von chromosomaler Instabilität können beispielsweise Fehler in der Verankerung von mitotischen Spindel-Mikrotubuli an die Chromosomen oder Zentrosomen-Abnormalitäten darstellen. Im Vergleich zu *Ctr* (siehe Kapitel 1.2.1) gibt es bisher kein Wissen darüber, ob *Cpn* möglicherweise ebenfalls derartige Zentrosomen-Abnormalitäten und eine damit einhergehende chromosomale Instabilität induzieren kann [41].

1.2.3 Zoonotisches Potential von Chlamydien

Nicht nur *Ctr* und *Cpn* können beim Menschen Infektionen auslösen. Auch für die Spezies *C. psittaci*, *C. abortus* und *C. felis* konnte ein zoonotisches Potential identifiziert werden, bei denen Erreger dieser Spezies auf den Menschen übergehen und eine Infektion auslösen können [8-10]. Diese Infektionen können zu schwerwiegenden Krankheiten führen. Während *C. psittaci* in der Regel Vögel infiziert, kann eine Infektion durch Inhalation des Erregers auch auf den Menschen übergehen und dabei eine Psittakose (Papageienkrankheit) auslösen. Diese führt zu Influenza-ähnlichen Symptomen und kann Pneumonien und andere nicht-respiratorische Krankheiten auslösen [42, 43]. Auch für *C. abortus* (natürlicher Wirt: Schafe und Ziege) wurde dokumentiert, dass eine Infektion auf den Menschen übertreten und zu Schwangerschaftsabbrüchen und Totgeburten bei Frauen führen kann [44]. Eine weitere Spezies mit Verdacht auf ein zoonotisches Potential stellt *C. felis* dar. Eine *C. felis* Infektion löst bei Katzen (natürlicher Wirt) Bindehautentzündungen aus. Es gibt Hinweise darauf, dass eine zoonotische Übertragung von *C. felis* beim Menschen ebenfalls Bindehautentzündungen auslösen kann [10, 45].

1.2.4 Behandlung von Chlamydieninfektionen und Notwendigkeit eines Impfstoffes

Heutzutage ist eine Chlamydieninfektion durch den Einsatz von Antibiotika (z.B. Tetracycline, Makrolide, Rifamycine und Chinolone) gut behandelbar; allerdings kann es durch eine direkte oder indirekte (über Fliegen) Übertragung von Augen- und Nasensekret (*Ctr* Serovar A – C), neuen sexuellen Kontakt (*Ctr* Serovar D – K and L1-L3) oder Tröpfchen-infektion (*Cpn*) immer wieder zu neuen Infektionen kommen [46-49]. Die Behandlung mit Antibiotika garantiert zudem keine vollständige Heilung, da sich teilende Chlamydien unter Stressbedingungen durch eine spezielle Differenzierung in ABs (*aberrant bodies*) umwandeln können. Das Ergebnis ist die Persistenz. Bei Reduktion der Stressbedingungen können die persistenten ABs wieder zu RBs differenzieren und die Infektion weiterführen (siehe Kapitel 1.4). In Einzelfällen wird auch von dem Auftreten von Antibiotika-Resistenzen berichtet, welche die Behandlung einer chlamydialen Infektion zusätzlich erschweren [50].

Die Tatsache, dass eine Chlamydieninfektion immer wieder auftreten kann, zeigt, dass eine Impfung der einzig vollständige Schutz mit dauerhafter Wirkung darstellt. Bisher steht jedoch kein Impfstoff zur Verfügung [26, 51]. Die ersten Ganzorganismus-Impfstoffe (lebend oder inaktiviert) zeigten nur einen begrenzten Schutz gegen eine *Ctr*-Augeninfektion und führten bei erneuter Infektion häufig zu einer verstärkten Pathologie [52, 53]. Aufgrund dessen konzentrierten sich weitere Impfstoff-Forschungen auf Analysen auf einzelne auf der Oberfläche von Chlamydien lokalisierte Proteine. Aktuell stellt das Oberflächenprotein MOMP einen erstklassigen Impfstoffkandidaten dar, welcher in Tiermodellen und auch beim Menschen einen Schutz gegen eine *Ctr* Infektion entwickelt [52, 54-58].

1.3 Methoden zur Analyse chlamydialer Infektionsprozesse

Zur Entwicklung eines Protein-Impfstoffes gegen Chlamydien-Infektionen kann beispielsweise, wie bei Hepatitis-B, rekombinantes Protein verwendet werden [59]. Dabei handelt es sich entweder um ein vollständiges Protein oder um eine Proteinuntereinheit, welche biotechnologisch z.B. in Hefen, *E. coli*, Pflanzen oder Tieren hergestellt, isoliert und aufgereinigt wird. Das Immunsystem des Wirtsorganismus erkennt das rekombinante Protein, bildet B-Lymphozyten (B-Zellen / Gedächtniszellen), welche bei einer Infektion Antikörper produzieren und sekretieren [60, 61]. Allerdings eignet sich nicht jedes Protein zur Herstellung eines Impfstoffes. Oft werden Proteine verwendet, die auf der Oberfläche

des Pathogens präsentiert werden. Derartige Proteine müssen allerdings zunächst identifiziert und ihre Funktion aufgeklärt werden.

Auch müssen auftretende Chlamydien Infektionen medizinisch behandelt werden können. Dazu ist es notwendig ablaufende Infektionsprozesse und die Manipulationstechniken auf die Wirtszelle durch z.B. sekretierte chlamydiale Proteine genau zu verstehen. Hierzu bedient sich die Forschung einer Reihe an experimentellen Methoden. Im Folgenden wird auf die methodischen Möglichkeiten, aber auch auf die limitierenden Schwierigkeiten in der Forschung zur Identifizierung und Charakterisierung chlamydialer Proteine eingegangen.

1.3.1 Chlamydien sind limitiert genetisch manipulierbar

Viele Bakterien selbst tragen ein autonom-replizierendes zirkuläres extra-chromosomales genetisches Element (Plasmid). Durch Expression auf dem Plasmid kodierter Gene erhalten die Bakterien Überlebensvorteile, wie zum Beispiel Antibiotika-Resistenzen. Die Aufnahme exogener Plasmid-DNA, auch Transformation genannt, stellt einen natürlich ablaufenden Prozess bei vielen Bakterien dar [62, 63]. Für eine natürliche Transformation müssen Bakterien kompetent sein; d.h. sie benötigen Oberflächenproteine zur Erkennung von DNA und Proteine für die DNA-Aufnahme in die Zelle [64]. Die Methode der Transformation wird auch in der Forschung als Werkzeug benutzt, um spezifische DNA-Sequenzen in Bakterien zu exprimieren und dadurch genetisch manipulieren zu können. Sind Bakterien natürlicherweise nicht kompetent, werden diese durch molekularbiologische Methoden, wie Stromimpuls oder durch Behandlung mit CaCl_2 und einem Hitzeschock kompetent für eine Transformation gemacht [65]. Auch die meisten Chlamydien-Spezies, wie *Ctr*, enthalten natürlicherweise ein kleines Plasmid [63]. Allerdings sind Chlamydien aufgrund ihrer intrazellulären Lebensweise nur schwer transformierbar und demnach nur begrenzt genetisch manipulierbar. Chlamydien existieren innerhalb der Wirtszelle in einem membranumgebenen Kompartiment (Inklusion). Die zu transformierende Plasmid-DNA muss in diesem Fall durch eine Barriere von vier Membranschichten (Wirtszellmembran, Inklusionsmembran, doppelte Chlamydienmembran) dringen, bevor sie im Zytoplasma des Chlamydiums ankommt und exprimiert werden kann [66]. Auch die extrazelluläre infektiöse Chlamydienform ist durch eine Gram-negative Zellwand, die Anwesenheit des COMC (*chlamydial outer membrane complex*) mit Cystein-Verknüpfungen und eine geringe Stoffwechselaktivität nur schwer in der Lage externe DNA aufzunehmen [66-68]. Aus diesen Gründen war eine Transformation von Chlamydien eine sehr lange Zeit nicht möglich und es existierte demnach keine Möglichkeit Chlamydien genetisch zu manipulieren. 2011 konnte schließlich für *Ctr* die CaCl_2 -Transformation mittels Shuttle-

Vektor als Transformationsmethode etabliert werden [67, 69]. Durch die erfolgreiche Transformation von *Ctr* wurden weitere genetische Manipulationen wie ein Gruppe II Intron-basierter gezielter Gen-Knockout oder FRAEM (*fluorescence-reported allelic exchange mutagenesis*) möglich [67, 70, 71]. Für *Cpn* existieren diese Werkzeuge nicht. 2018 konnte allerdings erstmalig eine erfolgreiche Plasmid-Transformation von dem Koala-infizierenden Isolat *Cpn* LPCoLN durchgeführt werden [72].

1.3.2 Möglichkeiten zur Funktions-Identifizierung chlamydialer Proteine

Trotz der limitierten Möglichkeiten Chlamydien genetisch zu manipulieren, existieren viele etablierte *in vivo* und *in vitro* Methoden, um einzelne chlamydiale Proteine zu identifizieren und ihre Funktionsweise zu charakterisieren.

Die ersten Schritte zur Identifizierung von Genen und hypothetischen Proteinen einer Chlamydien-Spezies besteht in der Sequenzierung des Genoms und bioinformatischen Analysen bezüglich Proteindomänen und -Strukturen. Daran anschließend können Co-Immunopräzipitationen und eine folgende Massenspektrometrie als Screening-Methode zur Identifizierung von hypothetischen Proteinen zum Einsatz kommen [73, 74]. Da chlamydiale Gene zu unterschiedlichen Zeiten in der Infektion exprimiert werden können, wird für die Identifizierung dieser Proteine Zelllysat von infizierten Wirtszellen aus unterschiedlichen Infektionszeiten hergestellt und analysiert [75]. Die Ergebnisse aus der Massenspektrometrie können dann mit den Daten aus der Genom-Sequenzierung abgeglichen werden. Die so identifizierten hypothetischen Proteine müssen anschließend in ihrer Funktion charakterisiert werden. Dazu eignet sich zunächst der Einsatz von genetisch einfachen Modellorganismen wie Hefen, in denen das chlamydiale Gen in einen Shuttle-Vektor kloniert und mittels Plasmid-Transformation unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors exprimiert wird. Eine erfolgreiche Transformation wird durch Selektionsmarker, wie Aminosäure-Auxotrophien oder Antibiotikaresistenzen, auf dem Plasmid kontrolliert. Die Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) und die Knospungshefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) stellen dabei häufig genutzte Modellorganismen dar. Die Auswirkungen der Gen-Expression auf die Hefezellen werden anhand ihres Wachstumsverhalten bei unterschiedlichen Bedingungen analysiert und daraus Rückschlüsse auf die Funktion des chlamydialen Proteins gezogen. Auch Lebendzell-fluoreszenzmikroskopische Analysen mit fluoreszenzmarkierten transformierten Genen in Hefen dienen zum besseren Verständnis der Funktion chlamydialer Proteine [76, 77]. Eine weitere etablierte Methode zur Identifikation von

Proteinfunktionen stellt die Transfektion und eine anschließende Immuno-fluoreszenzmikroskopische Analyse in humanen Epithelzelllinien dar. Das auf einem Plasmid kodierte und mit einem Fluoreszenz-Tag versehene chlamydiale Gen wird in Epithelzellen ektopisch exprimiert und die Lokalisation und phänotypische Veränderungen innerhalb der Zellen analysiert [74, 78]. Könnte eine mögliche Funktion des chlamydialen Proteins mit Hilfe dieser Methoden näher identifiziert werden, können Protein-Interaktionsstudien weitere Aufschlüsse über eine spezifischere Funktion liefern. Um potentielle Interaktionsproteine zu identifizieren können erneut Co-Immunopräzipitationen und daran anschließende massenspektrometrische Analysen durchgeführt werden. Könnte ein oder mehrere potentielle Interaktionspartner identifiziert werden, können zum Beispiel *in vitro* Interaktionsanalysen mit rekombinanten Proteinen nähere Aufschlüsse auf direkte Protein-Interaktionen liefern. Dafür wird das chlamydiale Gen bzw. der potentielle Interaktionspartner in *Escherichia coli* (*E. coli*) exprimiert und anschließend affinitätschromatisch über einen Tag (z.B. Histidin- oder GST-Tag) aufgereinigt. Anschließend können die hergestellten rekombinanten Proteine mit einander inkubiert und eine direkte Protein-Interaktion mittels Western Blot analysiert werden [78]. Zuletzt muss die Rolle des identifizierten und charakterisierten Proteins in der chlamydialen Infektion verstanden werden. Dafür eignet sich die bereits beschriebene Transfektion in humane Epithelzellen und eine darauffolgende Infektion. Eine Verbesserung oder Verschlechterung der Infektion liefert weitere Hinweise auf die Relevanz des Proteins für die Infektion [78]. Sofern eine Transformation von Chlamydien-Spezies möglich ist, kann diese schließlich genutzt werden, um die Lokalisation eines spezifischen Proteins mit Hilfe eines Fluoreszenz-Tags oder eines hergestellten Antikörpers immuno-fluoreszenzmikroskopisch zu Analysieren und um weitere genetische Manipulationen wie die Deletion eines Gens durch FRAEM durchzuführen [78, 79].

1.4 Der chlamydiale Infektionszyklus

Als obligat intrazelluläre Bakterien benötigen alle Chlamydien-Spezies zur Replikation eine eukaryotische Wirtszelle und teilen einen einzigartigen biphasischen Infektionszyklus. Die Infektionszyklen der Chlamydien laufen dabei trotz der unterschiedlichen Wirtsspezifität, mit Ausnahme der zeitlichen Zyklusdauer, nahezu identisch ab. Chlamydien existieren innerhalb ihres Infektionszyklus als zwei distinkte Formen, welche sich morphologisch und funktional unterscheiden. Die extrazelluläre, infektiöse Form wird als EB (*elementary body*) bezeichnet, besitzt einen durchschnittlichen Durchmesser von etwa 0,3 µm und ist

metabolisch inaktiv. Im Kontrast dazu ist die intrazelluläre Form (ca. 1 µm Durchmesser) nicht-infektiös, metabolisch aktiv, teilt sich und wird als RB (*reticulate body*) bezeichnet [80, 81]. Neben EBs und RBs existiert ein weiterer Differenzierungszustand, die sogenannte Persistenz. Das sich teilende RB ist in der Lage bei Stress wie Nährstoffmangel, Immunantwort der Wirtszelle oder Behandlung mit β -Laktam-Antibiotika, in ein AB (*aberrant body*) zu differenzieren [42] [43]. Die weiterhin nicht infektiösen ABs können sich auf 3 µm bis 5 µm vergrößern, da sie ihr Genom (mehrfach) replizieren, allerdings ohne eine Zellteilung durchzuführen. Wenn sich die Umgebungsbedingungen für die Chlamydien wieder verbessern, re-differenzieren die ABs zurück zu der metabolisch aktiven RB Form und die Infektion wird weitergeführt [44, 45]. Für den Einsatz von Penicillin G konnte beispielsweise in Zellkulturen gezeigt werden, dass Chlamydien bis zu 9 Monate in diesem Zustand verharren können. Nach Entfernung des Antibiotikums re-differenzieren die ABs zurück zu RBs und führen die Infektion fort [46, 47]. *In vivo* konnte im Maus-Modell festgestellt werden, dass die Behandlung mit Antibiotikum während einer *C. muridarum* Infektion einen persistenten Zustand auslöst [48, 49]. Interessanterweise konnten persistente Formen auch bei *Ctr*-infizierten Menschen im Biopsie-Material der Endozervix nachgewiesen werden [82].

1.4.1 Der biphasische chlamydiale Infektionszyklus am Beispiel von *Chlamydia pneumoniae*

Zu Beginn bindet das infektiöse extrazelluläre EB an die Wirtszell-Oberfläche (i) und wird durch einen Endozytose-Mechanismus (Internalisierung (ii), 0 – 2 hpi) aufgenommen (Abb. 2). Anschließend befindet sich das EB in einem Membran-umgebenen Einschluss, der als Inklusion bezeichnet wird. Für *Ctr* konnten anschließend Hinweise auf einen intrazellulären Transport der Inklusion zu der peri-Golgi-Region bzw. zum Haupt-MTOC (*microtubule organizing centre*) in Zellkernnähe beobachtet werden [83] [84, 85]. Nach etwa 8 Stunden beginnt innerhalb der Inklusion die Differenzierung des EB in das metabolisch-aktive RB (iii). Dieses ist in der Lage sich durch binäre Spaltung zu teilen (12 – 36 hpi). Nach mehreren Replikationsrunden (iv) erfolgt die asynchrone Re-differenzierung der RBs zurück zu EBs (48 - 72 hpi (v)). Etwa 84 Stunden nach der Infektion erfolgt schließlich durch Lyse der Wirtszelle oder Extrusion die Freisetzung der EBs (vi) [81, 86, 87]). Unter Lyse wird die Permeabilisation bzw. Auflösung der Inklusionsmembran und Wirtszell-PM und dadurch das Absterben der Wirtszelle verstanden. Dadurch werden die infektiösen EBs in den extrazellulären Raum entlassen, sodass diese weitere Wirtszellen infizieren können. Bei der Extrusion wird die intakte chlamydiale Inklusion an der Wirtszell-PM eingeklemmt und

abgeschnürt. Es entsteht ein extrazelluläres mit zwei Membranen (Inklusionsmembran und PM der Wirtszelle) umgebenes Kompartiment, welches die infektiösen EBs enthält. Im Vergleich zur Lyse bleibt die Wirtszelle bei der Extrusion intakt [86, 88]. Die Extrusion verbessert das Überleben der Chlamydien im extrazellulären Raum. Außerdem konnte für *Ctr* gezeigt werden, dass Makrophagen die Extrusion aufnehmen und die Extrusionsmembranen auflösen können. Dadurch erfolgt die Freisetzung der infektiösen EBs aus den Makrophagen [89].

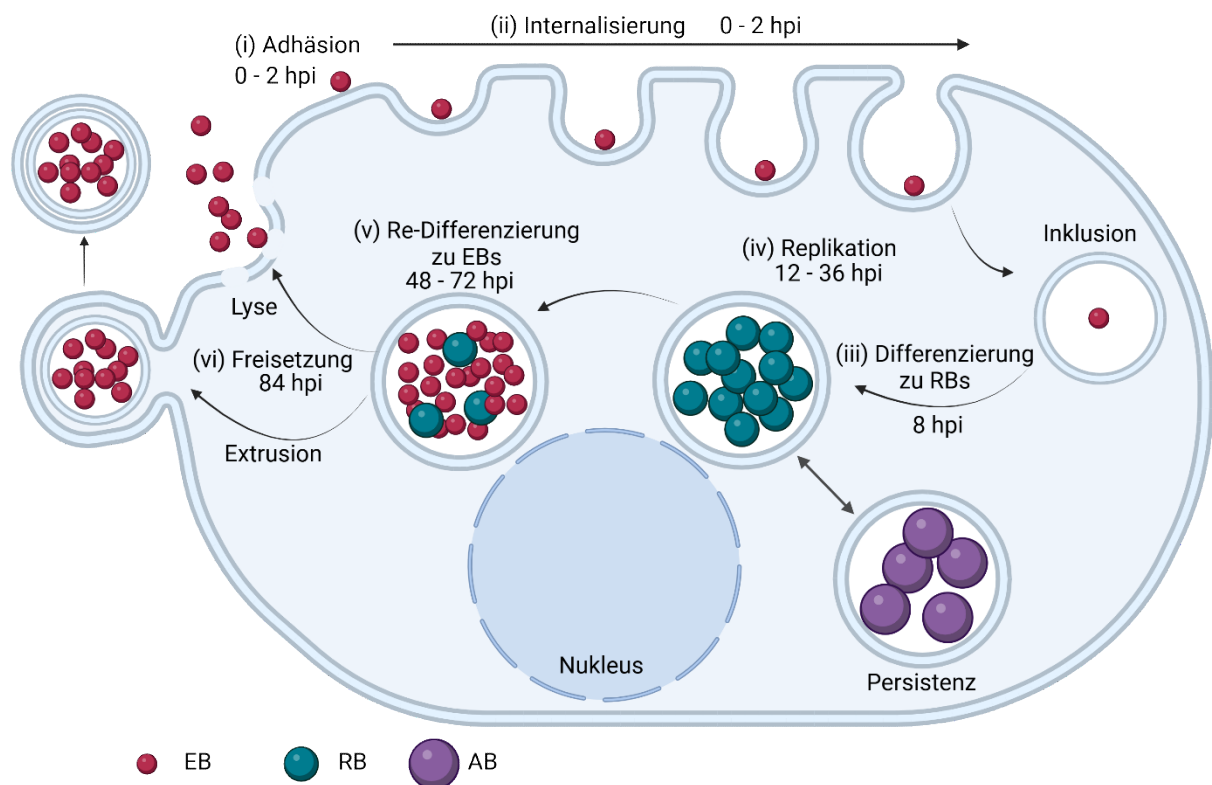


Abbildung 2: Der biphasische chlamydiale Infektionszyklus

Schematische Darstellung des einzigartigen biphasischen Infektionszyklus von Chlamydien. Die angegebenen Zeiten gelten exemplarisch für eine *Cpn* Infektion [81, 88]. EB = *elementary body*, RB = *reticulate body*, AB = *aberrant body*, hpi = Stunden nach der Infektion. (i) bis (vi) zeigt die in der Reihenfolge ablaufende Schritte der Infektion. Die Abbildung wurde mit BioRender erstellt.

1.5 Die Adhäsion an die Wirtszelle

Der erste Schritt der Infektion ist der reversible initiale Kontakt und die dann folgende Adhäsion des EBs an die Wirtszelloberfläche (0 – 2 Stunden nach der Infektion). Für den initialen Kontakt besitzt das infektiöse extrazelluläre EB das in der äußeren Membran

eingelagerte Adhäsion OmcB (*outer membrane complex protein B*). Für OmcB ist bekannt, dass es mit den Heparansulfat-ähnlichen GAGs (Glykosaminoglykanen) interagiert, welche sich auf der eukaryotischen Wirtszellmembran befinden. Die Bindung von OmcB an GAGs führt zu einer niedrig-spezifischen und reversiblen Verbindung zwischen Chlamydia und Wirtszelle [90-93]. Für einen höher affinen und stabileren Kontakt zwischen EB und Wirtszelloberfläche kommen weitere Adhäsion-Proteine zum Einsatz. Es konnten bereits einige *Cpn* Proteine mit adhäsiven Eigenschaften beschrieben werden, allerdings ist der genaue Adhäsionsprozess noch nicht von allen verstanden. Ein charakteristisches Adhäsion bei *Cpn* ist das GroEL1. GroEL1 ist ebenfalls auf der Oberfläche von EBs lokalisiert und es konnte gezeigt werden, dass eine vorherige Inkubation von Wirtszellen mit rekombinanten GroEL1 Protein eine signifikante Reduktion einer *Cpn* Infektion zu Folge hat. Gleichzeitig führt die Expression und Präsentation von GroEL1 auf der Außenseite von Hefezellen zu einer Adhäsion von Hefezellen an humane Epithelzellen. Für GroEL1 konnte allerdings bisher noch kein Rezeptor auf der Wirtszelloberfläche identifiziert werden [94]. Auch das *Cpn*-spezifische LipP (*Lipid-dependent internalization promoting protein*) konnte als Adhäsion identifiziert werden. Bei LipP handelt es sich wie GroEL1 um ein an der Oberfläche von EBs präsentiertes Protein. Bei der Adhäsion kommt LipP in räumliche Nähe zur Plasmamembran (PM) der Wirtszelle. Es wird vermutet, dass LipP in die PM integriert wird, oligomerisiert und die Bildung einer Membranpore induziert. Anhand von Analysen mit Epithelzellen und künstlich erzeugten Membranen konnte gezeigt werden, dass LipP das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) von der inneren Seite der PM auf die Außenseite externalisiert. Ein humaner Interaktionspartner für LipP ist bisher nicht bekannt [95, 96]. Die größte Gruppe von Adhäsionen stellt die Familie der Pmps (polymorphe Membranproteine) dar. In *Cpn* existieren 21 Pmp-Proteine. Für 16 Pmps konnte eine Expression nachgewiesen werden und sechs Proteine zeigen eine Lokalisation an der Oberfläche von *Cpn* EBs [97]. Als humaner Protein-Interaktionspartner konnte für das invasive Pmp21 Protein der EGFR (*epidermal growth factor receptor*) identifiziert werden. Diese Interaktion führt zur Aktivierung und damit zur Dimerisierung und Phosphorylierung des EGFR. Die Aktivierung des EGFR durch Pmp21 induziert anschließend zelluläre Signalwege, wodurch die Endozytose des EBs eingeleitet wird [98].

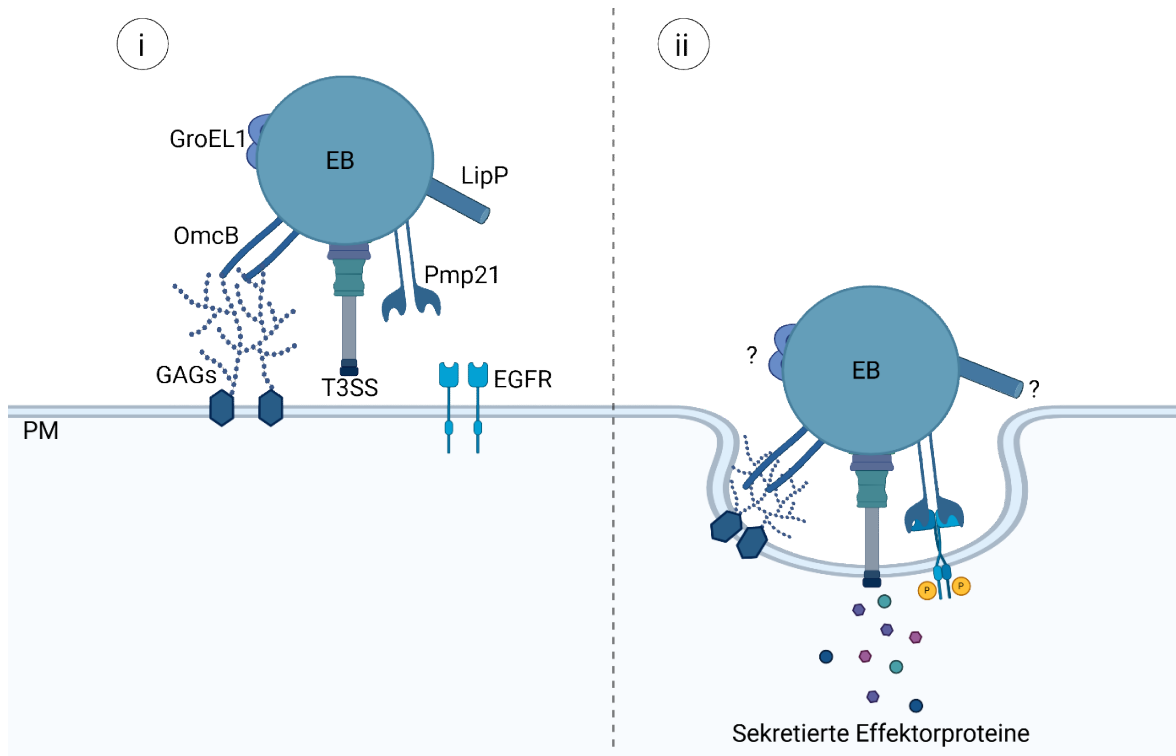


Abbildung 3: Der *Cpn* Adhäsionsprozess

Schematische Darstellung der Adhäsion und der relevanten Adhäsionsproteine und ihrer humanen Interaktionspartner am Beispiel von *Cpn*. (i) Initialer reversibler Kontakt des extrazellulären EBs an die Wirtszelle. (ii) Stabile Adhäsion des EBs an die Wirtszelloberfläche und Initiierung der Internalisierung durch Sekretion von Effektorproteinen. PM = Plasmamembran der Wirtszelle, P = Phosphorylierung, ? = Für das dargestellte Adhäsionsprotein ist kein Interaktionspartner bekannt. Die Abbildung wurde mit BioRender erstellt.

1.6 Internalisierung und Manipulation zellulärer Prozesse

Parallel zur Adhäsion und kurze Zeit darüber hinaus (0 – 2 Stunden nach der Infektion) erfolgt die asynchrone Aufnahme der EBs in die Wirtszelle. Dabei kommt es zur Interaktion des chlamydialen Typ-III-Sekretionssystems (T3SS) mit der Wirtszelle. Die T3SS-Nadel wird durch den Kontakt mit der Wirtszell-PM aktiviert, durchdringt daraufhin die PM und verschiedene Effektorproteine werden in das Wirtszell-Zytoplasma transloziert. Diese Effektorproteine manipulieren anschließend zelluläre Prozesse, sodass eine effektive Aufnahme von EBs gewährleistet ist (siehe Kapitel 1.6.1). Einige sekretierte chlamydiale Effektorproteine zielen auf Signalwege zur vermehrten Assemblierung von F-Aktin im Bereich der Eintrittsstelle der EBs ab (siehe Kapitel 1.6.2). Bisher ist der genaue Prozess der Internalisierung allerdings nur unvollständig verstanden. Für *Cpn* wird bisher vermutet, dass die EB-Aufnahme einem Clathrin-unabhängigen Endozytose-Mechanismus entspricht [99] und über den „Zipper“- und „Trigger“-Mechanismus stattfindet. Für die Durchführung

des „Zipper“-Mechanismus wird bei *Cpn* der EGFR durch Bindung des Adhäsins Pmp21 aktiviert (siehe Kapitel 1.5). Die EGFR Aktivierung führt dazu, dass die PI3 Kinase spezifische endozytotische Adapterproteine rekrutiert und eine EGFR-vermittelte Endozytose des *Cpn* EBs einleitet [98, 100, 101]. Auch der Effektorprotein-vermittelte „Trigger“-Mechanismus wird von *Cpn* zur Endozytose genutzt werden. Dabei induziert die Effektorprotein-ausgelöste erhöhte F-Aktin-Assemblierung starke Deformationen bzw. Ausstülpungen der PM an der Eintrittsstelle, wodurch die EB-Aufnahme erleichtert wird [101].

1.6.1 Chlamydien manipulieren die Wirtszelle

Chlamydien replizieren sich ausschließlich innerhalb der Wirtszelle und evolutionär haben sich Chlamydien durch eine massive Reduktion ihres Genoms, von etwa 2 Mb bei *P. amoebophila* auf etwa 1 Mb, an diese intrazelluläre Lebensweise angepasst [3, 102]. Ein vollständig selbstständig durchgeführter Stoffwechsel ist durch die Entnahme von lebenswichtigen chemischen Verbindungen aus der Wirtszelle nicht mehr notwendig und so sind Chlamydien heterotroph für viele Kohlenstoff-, Stickstoff-, Phosphor- oder Fettsäureverbindungen [7, 103, 104]. Weiterhin versorgen sich Chlamydien, trotz der Fähigkeit zur ATP (Adenosintri-phosphat)-Synthese, teilweise auch mit ATP aus der Wirtszelle [7]. Chlamydien haben darüber hinaus Mechanismen entwickelt, die das Überleben der Inklusion innerhalb der Wirtszelle sicherstellen. Damit das Bakterium-enthaltende Kompartiment beispielsweise nicht durch Fusion mit Lysosomen abgebaut wird, interagieren verschiedene endosomale Rab-GTPasen mit bestimmten Inc Proteinen, welche in der chlamydialen Inklusion sitzen. Die Präsenz oder Abwesenheit dieser Rab Proteine schützt die Inklusion schließlich vor dem Abbau durch Lysosomen, in dem es sich als „*recycling-endosome*“ tarnt [100]. Um ihren Infektionszyklus vollständig durchlaufen zu können, verhindern Chlamydien zudem ein frühzeitiges Absterben der infizierten Wirtszelle. In dem Zusammenhang existieren Hinweise darauf, dass anti-apoptotische Wirtszellproteine durch Chlamydien hochreguliert werden [105]. Außerdem verfügt *Ctr* über das Membranprotein OmpA, welches mitochondriale Apoptose in Humanzellen inhibiert [106].

1.6.2 Sekretierte Effektorproteine manipulieren das Wirtszell-Zytoskelett

Zur Manipulation der eukaryotischen Wirtszelle sezernieren Chlamydien Proteine während des gesamten Infektionszyklus unter Verwendung eines T3SS. Diese Proteine werden als Effektorproteine (EPs) bezeichnet. Für *Ctr* sind beispielsweise mehr als 70 dieser EPs bekannt, welche Funktionen im Zytoplasma der Wirtszelle, am Zellkern, in der Inklusionsmembran und im Inklusions-Lumen, sowie im extrazellulären Bereich ausüben [107-109]. Die weitreichenden Funktionen dieser EPs reichen zum Beispiel von der Umorganisation des Wirtszell-Zytoskeletts bis hin zu intrazellulären Transportmechanismen, Metabolismus und Immunsignalwege. Diese EP-ausgelösten Wirtszell-Manipulationen unterstützen unter anderem die Aufnahme und den Austritt des infektiösen Chlamydiums in bzw. aus der Wirtszelle, die Proliferation und Aufnahme von Nährstoffen [109, 110]. Die größte Gruppe von chlamydialen EPs, welche Interaktionen zwischen Bakterium und Wirtszelle kontrollieren, sind Inklusionsmembranproteine (Incs). Mit Hilfe von mindestens einer hydrophoben Transmembrandomäne sind Incs in der Inklusionsmembran eingelagert. Drei dieser *Ctr* Inc Proteine, IncA, IncE und CpoS, sind direkt bei dem vesikulären Transport der Inklusion innerhalb der Wirtszelle involviert. Weiterhin wurde für IncA gezeigt, dass es für die Fusion von Inklusionen innerhalb der infizierten Zelle essentiell ist. Weitere *Ctr* Inc Proteine, wie IPAM oder InaC, sind in der Lage, mit dem Aktin- oder MT-Zytoskelett zu interagieren und sorgen für eine Golgi-Umverteilung um die Inklusion herum [InaC] [84, 109] (siehe Kapitel 1.8.2).

Es konnten auch sekretierte zytoplasmatische EPs identifiziert werden, welche vor allem eine Funktion während der frühen Infektion bzw. Internalisierung ausüben. Für diese EPs konnte gezeigt werden, dass sie das Zytoskelett der Wirtszelle beeinflussen. Die EP-abhängige Manipulation des Aktin Zytoskeletts ist dabei bereits viel besser verstanden als die Manipulation des MT Zytoskeletts. In *Ctr* werden beispielsweise während der Internalisierung zwei sehr gut untersuchte Aktin-manipulierende EPs (TarP und TmeA) sekretiert [111]. In *Cpn* sind drei EPs bekannt, die während der EB-Aufnahme F-Aktin-Rekrutierung induzieren (CPn0572, SemC und SemD) [74, 101, 112] (siehe Kapitel 1.8.1). Ein MT-modulierendes EP während der frühen Infektion (Adhäsion, Internalisierung) ist allerdings bisher weder bei *Ctr* noch bei *Cpn* bekannt. Um ein besseres Verständnis für die Rolle des MT Zytoskeletts während der chlamydialen Infektion zu erhalten, habe ich in der vorliegenden Arbeit analysiert: (i) Welche Rolle das Interphasen-MT-Zytoskelett bei der frühen *Cpn* Infektion spielt, (ii) wie das *Cpn* EP CPn0572 die MTs manipuliert und (iii) welche Auswirkungen eine *Cpn* Infektion auf die Mitose und die mitotische Spindel hat.

1.7 Das eukaryotische Zytoskelett

Das eukaryotische Zytoskelett ist ein komplexes dreidimensionales aus Proteinfilamenten aufgebautes Netzwerk, welches für eine Vielzahl von zellulären Prozessen, wie die Erhaltung der Zellform, Mobilität der Zelle, intrazelluläre Organisation und Transport von Organellen und der Zellteilung beteiligt ist. Das Zytoskelett setzt sich aus vier Hauptkomponenten von Proteinpolymeren zusammen: Aktinfilamente, Mikrotubuli (MT), Intermediärfilamente und Septine [113, 114].

In der vorliegenden Arbeit habe ich mich auf ein frühes *Cpn* Effektorprotein, CPn0572, ein Mitglied der TarP Proteinfamilie, konzentriert. Für CPn0572 wurde bereits gezeigt, dass es 15 Minuten nach der Infektion in der Nähe von EBs lokalisiert und dort mit Aktin ko-lokalisiert. Weiterhin führt CPn0572 zu einer Reorganisation des Aktin Zytoskeletts der Wirtszelle [74, 115]. Da die Manipulation des MT Zytoskeletts als eine weitere neue Funktion von CPn0572 innerhalb dieser Arbeit identifiziert wurde, werde ich mich im Folgenden hauptsächlich auf das dynamische MT Zytoskelett konzentrieren und das Aktin Zytoskelett, welches CPn0572 ebenfalls moduliert, nur zusammenfassend beschreiben.

1.7.1 Aufbau und Funktion des Aktin Zytoskeletts

Das unter anderem in Säugetier- und Hefezellen konservierte Aktin-Zytoskelett ist ein wichtiger Bestandteil des Wirtszell-Zytoskeletts und ist mit assoziierten Motorproteinen (Myosin) vor allem an intrazellulären Transport-prozessen beteiligt. Weiterhin unterstützt das Aktin-Zytoskelett die Regulation der Zellform und Zelloberfläche, Zell-Migration, Morphogenese von Membranorganellen und Zell-Zell-Kontakte [116]. Durch Nukleation der zytosolischen monomeren globulären Aktin-Form (G-Aktin) kommt es zur Formation von G-Aktin Dimeren weitere G-Aktin Anlagerungen führen schließlich zur Bildung langer helikaler F-Aktin Filamente [117, 118]. Bei F-Aktin Filamenten handelt es sich um polare dynamische Strukturen. Sie besitzen ein langsam wachsendes Minus-Ende und ein schnell wachsendes Plus-Ende [118, 119].

Da die spontan ablaufende Aktin-Nukleation abhängig von der G-Aktin Konzentration im Zytoplasma ist, läuft diese nur sehr langsam ab. Zusätzliche zelluläre Faktoren, wie Formine oder der Arp2/3 Komplex, können die Aktin Polymerisation stimulieren und die Bildung von Aktin-Netzwerken unterstützen [120]. Der Arp2/3 Komplex besteht aus insgesamt sieben Proteinuntereinheiten. Die beiden G-Aktin-ähnlichen Untereinheiten Arp2 und Arp3 bilden ein Dimer. Dieses Aktindimer-ähnliches, aber stabileres Dimer dient als

Nukleationsursprung zur Formation neuer F-Aktin Filamente und zur Ausbildung von Aktin-Netzwerken [121-123]. Der Arp2/3 Komplex wird durch NPFs (*nukleation promoting factors*), wie die WASP/WAVE (Wiskott-Aldrich Syndrom Protein) Protein Familie aktiviert, indem diese durch Bindung eine Konformationsänderung auslösen, wodurch Arp2 und Arp3 in eine filamentartige Konformation gebracht werden. Dadurch bindet der Arp 2/3 Komplex an ein bestehendes F-Aktin Filament und initiiert einen Aktin Polymerisationsursprung, wodurch ein neues F-Aktin Filament in einem 70° Winkel zum bereits bestehenden F-Aktin Filament ausgebildet wird [122, 123].

Formine stimulieren die Formation von linearen, unverzweigten F-Aktin Filamenten und können an der Bildung von Aktin Stress-Fasern, zytokinetischer Aktin-Ringe und verdickten Aktin-Kabeln beteiligt sein. Formine binden mit ihrer FH2-Domäne mit hoher Affinität an das Plus-Ende von F-Aktin Filamenten und stabilisieren so neu gebildete Aktin-Dimere oder -Trimere [124].

1.7.2 Aufbau und Funktion des Mikrotubuli-Zytoskeletts

Bei MT handelt sich um die dynamischste Komponente des Zytoskeletts, welche bei einer Vielzahl an zellulären Prozessen beteiligt ist. Unter anderem spielen MT bei dem Vesikel-Transport, Zellmorphogenese, Organisation von Organellen und der Zellteilung eine wichtige Rolle [125, 126]. Der Hauptteil des eukaryotischen Zellzyklus besteht aus der Interphase mit einem definierten Interphasen-MT-Zytoskelett. Dieses Zytoskelett wird beim Eintritt in die Mitose-Phase komplett abgebaut und die mitotische Spindel wird aufgebaut. Die Spindel-MT übernehmen dabei die spezielle Funktion der Chromosomensegregation (siehe Kapitel 1.7.2.1) [127-129]. Die polaren und hochdynamischen MT bestehen aus 13 linearen lateral angeordneten Protofilamenten, welche sich aus den α/β -Tubulin-Heterodimeren zusammensetzen. Die zylindrischen, links-gängigen helikalen MT besitzen einen äußeren Durchmesser von 25 nm und weisen, abhängig von der Anordnung der Heterodimere, eine Polarität mit zwei distinkten Enden auf [130, 131] (Abb. 4). Die Nukleation von MT beginnt bei Säugetierzellen an den MT-Organisationszentren (MTOC). MT sind an den MTOCs mit der α -Tubulin-Untereinheit (Minus-Ende) durch Bindung an den γ -TuRC (*γ -tubulin ring complex*) verankert. MT besitzen die Eigenschaft durch Polymerisations- und Depolymerisations-Ereignisse am Plus-Ende zu wachsen und zu schrumpfen und stellen dadurch eine hoch dynamische Struktur dar. Im Vergleich zum Minus-Ende weist das Plus-Ende eine sehr viel höhere Dynamik auf, indem es im Zytoplasma freie α/β -Tubulin-Dimere bindet, die mit jeweils zwei GTP-Molekülen assoziiert

sind. Während das α -Tubulin ein nicht-hydrolysierbares GTP gebunden hat, besitzt das β -Tubulin ein hydrolysierbares GTP. Das an β -Tubulin gebundene GTP ist zur Polymerisation von MT nötig und wird bei Anlagerung eines neuen Tubulin-Dimers zu GDP hydrolysiert. Wenn die Bindung neuer GTP- α/β -Tubulin-Dimere an ein MT Plus-Ende schneller erfolgt als die destabilisierende GTP-Hydrolyse kommt es zur Bildung einer stabilisierenden sogenannten GTP-Kappe, wodurch MT zum Beispiel in der Lage sind bis zur Zellperipherie zu polymerisieren [131, 132]. Ein Pausieren der Polymerisation kann bei Säugetier-Epithelzellen durch den Kontakt mit der Zellperipherie erfolgen, wodurch anschließend eine Hydrolyse von GTP zu GDP am Plus-Ende stattfindet. Diese GTP-Hydrolyse führt zu einer Instabilität von MT, wodurch eine De-polymerisation induziert werden kann [133]. So ist es möglich, dass MT in zeitlicher und räumlicher Abhängigkeit einen stetigen Wechsel von GTP-stabilisiertem Wachstum und GDP-destabilisiertem Schrumpfen durchlaufen können, was als dynamische Instabilität bezeichnet wird [134] (Abb. 4).

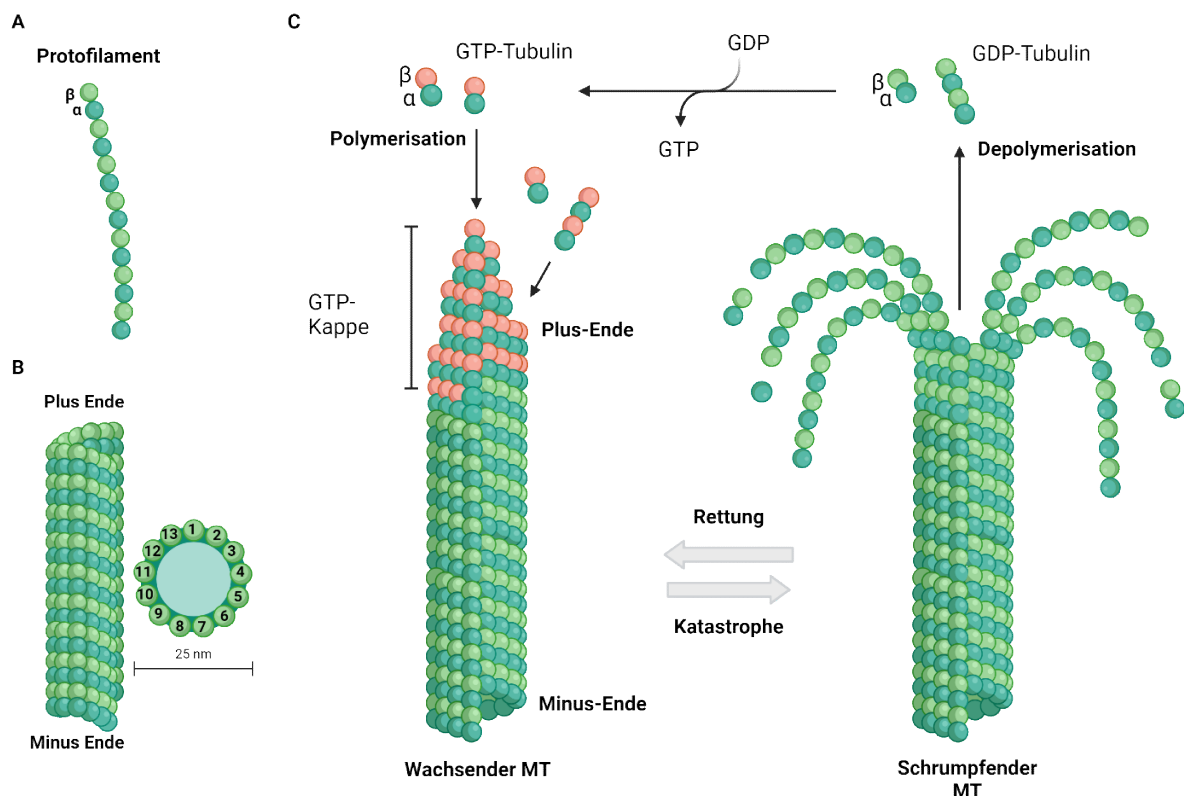


Abbildung 4: Aufbau und Dynamik von Mikrotubuli

A. MT bestehen aus α - und β -Tubulin Dimeren, die sich zu langen Protofilamenten zusammenschließen. **B.** 13 dieser Protofilamente bilden einen tubulären, polaren MT mit einem äußeren Durchmesser von 25 nm. MT haben ein Plus-Ende (freies β -Tubulin) und ein Minus-Ende (freies α -Tubulin). **C.** Bei der Polymerisation von MT werden GTP- α/β -Tubulin Dimere an das Plus-Ende von MT angelagert und eine sogenannte GTP-Kappe

wird ausgebildet. Nach Abbau der GTP-Kappe werden MT am Plus-Ende instabil und es kommt zum rapiden Abbau/Depolymerisation von MT, auch „Katastrophen-Ereignis“ genannt. Durch Einbau von neuen GTP-Tubulin Dimeren am Plus-Ende wird die Depolymerisation gestoppt und es kommt zu der erneuten Polymerisation (Rettungs-Ereignis). Die Abbildung wurde mit BioRender erstellt.

1.7.2.1 Aufbau und Funktion des mitotischen Mikrotubuli-Zytoskeletts

Wenn Säugetierzellen zur Zellteilung von der Interphase in die Mitose übergehen kommt es zu massiven strukturellen Veränderungen des Interphasen MT-Zytoskeletts. Am Anfang der Mitose, in der Prophase, werden die Interphasen MT kürzer und dynamischer, was schließlich zur Auflösung des Interphasen-MT-Zytoskeletts führt [135]. Auch das Interphasen-Aktin-Zytoskelett wird durch ein kortikales mitotisches Aktomyosin-Netzwerk, welches in Verbindung mit der Plasmamembran steht, ersetzt, sodass die mitotische Zelle ihre typische runde Form erhält [136, 137]. Zur anschließenden Orientierung der kondensierten Chromosomen und Segregation der Schwesterchromatide ist die Formation neuer MT zur Bildung der mitotischen Spindel essentiell. Dafür wurde in Säugetierzellen bereits das Zentrosom, welches gleichzeitig das MTOC darstellt, verdoppelt. Die beiden Zentrosomen werden anschließend separiert und auf die gegenüberliegenden Seiten der Zellen transportiert, wo sie Spindel MT bilden [129, 138]. In Säugetierzellen werden so, während des Übergangs von der Prophase zu der darauf folgenden Metaphase (Pro-Metaphase), drei unterschiedliche Arten von MT gebildet, die gemeinsam die mitotische Spindel darstellen: (i) Astral-MT, (ii) interpolare MT (ipMTs) und (iii) Kinetochor-MT (kMTs) [135].

Astral-MT wachsen ausgehend von den beiden Zentrosomen in Richtung des Zellkortex und spielen eine wichtige Rolle bei der Zentrosomensegregation während der Prophase und der Spindelpositionierung. Die ipMTs spiegeln den dynamischsten und den am häufigsten vorkommenden Teil der mitotischen Spindel wider. Diese MT werden ausgehend von den polaren Zentrosomen gebildet und polymerisieren in Richtung Spindelmittle, wo sie antiparallel mit den ipMTs des gegenüberliegenden Zentrosoms in Chromosomennähe überlappen und miteinander interagieren. IpMTs haben verschiedene Aufgaben. So dienen sie der Herstellung und Aufrechterhaltung der Spindelbipolarität und spielen eine Rolle bei der Chromosomenanordnung indem sie dynamisch mit den Chromosomen über Bindung von Chromokinesinen oder laterale Interaktionen mit dem Kinetochor am Zentromer der Chromosomen interagieren. Nichtsdestotrotz sind ipMTs nicht für die Segregation der Chromosomen während der Anaphase A verantwortlich. Für diese Aufgabe werden die kMTs ausgehend von den polaren Zentrosomen ausgebildet [135]. kMTs liegen in

gebündelter Form (20 – 40 parallel angeordnete MT) vor und binden, während der Metaphase, mit ihrem Plus-Ende über die Kinetochore an die Schwester-Chromosomen und organisieren diese zentral in der mitotischen Spindel zu der sogenannten Metaphasen-Platte. In der folgenden Anaphase kommt es zu dramatischen Änderungen in der Dynamik der kMTs, was zur Verkürzung dieser MT und schließlich zur Chromosomsegregation führt [135]. Die Anaphase stellt die zeitlich kürzeste Phase der Mitose dar und wird in Anaphase A und B unterteilt. In Anaphase A werden die Schwesterchromatide durch Proteaseaktivität der Separase, welche das Schwesterchromatid-verbindende Kohäsin (SCC1) proteolysiert und Ziehkräfte der schrumpfenden kMTs voneinander getrennt und beginnen sich zu den entgegengesetzten polaren Zentrosomen zu bewegen. In der Anaphase B befinden sich die getrennten Schwesterchromatiden an den jeweiligen Zentrosomen und es findet durch Elongation der ipMTs eine weitere Trennung der polaren Zentrosomen statt [129, 139, 140]. Bevor es zur finalen Zytokinese kommt, bilden sich in der Telophase um die separierten Chromatiden neue Zellkernhüllen und damit zwei neue Tochter-Nuklei. Gleichzeitig wird die Chromosom-DNA wieder de-kondensiert und die Spindel-MT beginnen sich durch Depolymerisation aufzulösen. Im Übergang von der Telophase zur Zytokinese führt die Kontraktion des kortikal lokalisierten mitotischen Aktomyosin-Netzwerks zur Spaltung des Zytoplasmas und schließlich zur Trennung der Tochterzellen [129, 141, 142].

Für eine fehlerfreie Durchführung der Mitose existieren eine Reihe von Regulationsmechanismen, die sogenannten Zellzyklus-Kontrollpunkte. Bei Defekten dieser Kontrollpunkte kann es zu Problemen bei der Chromosomensegregation und somit zur Chromosomen-Fehlverteilung kommen. Dies begünstigt Aneuploidie, dem Gewinn oder Verlust ganzer Chromosomen. Aneuploidie ist schließlich mit einer Vielzahl an Krebsarten assoziiert [129, 143].

1.7.2.2 Die Komplexität des Mikrotubuli-Zytoskeletts

Das MT-Zytoskelett von Säugetieren zeichnet sich durch seine hohe Diversität, Komplexität und funktionelle Heterogenität aus. Die Struktur und Funktionen von MT innerhalb einer Zelle werden dabei von verschiedenen Faktoren, wie verschiedene Tubulin-Isotypen und post-translationale Modifikationen (PTMs) beeinflusst. Das Konzept der Kombination dieser molekularen Einflüsse auf MT wird als „Tubulin-Code“ bezeichnet [144].

Eukaryotische Zellen besitzen mehrere Tubulin-Gene, welche als Tubulin-Isotypen bezeichnet werden. Diese kodieren für verschiedene α - und β -Tubulin-Proteine, die eine sehr ähnliche Funktion aufweisen. Tubulin-Isotypen bilden einen Teil des Tubulin-Codes

und beeinflussen durch ihre Anwesenheit die Struktur und Funktion innerhalb eines MT-Polymers. Die Anzahl an Tubulin-Isotypen variiert dabei stark zwischen verschiedenen eukaryotischen Spezies. Im humanen Genom existieren beispielsweise neun α - und zehn β -Tubulin-Gene [144]. In den Modell-Hefen *S. pombe* und *S. cerevisiae* existieren im Vergleich dazu zwei Gene, die für α -Tubulin codieren und nur ein Gen codiert für β -Tubulin [145]. Die generischen Isotypen α 1A (TUBA1A) und β I (TUBB) sind in Humanzellen allgegenwärtig. Andere seltener vorkommende Isotypen haben sich offenbar mit der Entstehung neuer MT-Funktionen entwickelt und werden Zell- oder Gewebe-spezifisch exprimiert [144, 146, 147]. Ein Beispiel hierfür stellt das humane β 1-Tubulin (TUBB1) dar. Dieses hat sich gemeinsam mit Blutplättchen entwickelt, welche nur in Säugetieren vorkommen. Die für die Blutgerinnung verantwortlichen Blutplättchen bilden eine spezielle Anordnung von MT aus, für welches das β 1-Tubulin benötigt wird. Die MT werden in einer MT-Spirale mit exakt 12 Windungen angeordnet, was schließlich für die runde Form und den definierten Durchmesser dieser Blutplättchen verantwortlich ist [144, 148]. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Expression bestimmter β -Tubulin-Isotypen in humanen Zellen zu unterschiedlichen relativen MT-Stabilitäten führen kann, was einen Einfluss auf die Behandlung von Krebszellen mit Antitubulin-Medikamenten hat [149-151].

Neben Tubulin-Isotypen führt auch eine Reihe von post-translationalen Modifikationen (PTMs) der Tubulin-Untereinheiten zu einer Diversifizierung von MT Subpopulationen. Dabei kommt es zu enzymatisch induzierten, oft reversiblen, biochemischen Veränderungen der α - oder β -Tubuline [146]. Die enzymatische zyklische Anheftung oder Entfernung der Aminosäure Tyrosin (Tyrosinierung bzw. Detyrosinierung) an das C-Terminale Ende von α -Tubulinen ist evolutionär konserviert. In Humanzellen kodieren die Majorität von α -Tubulin Genen für ein C-terminales Tyrosin (sieben von neun α -Tubuline). Damit liegt der Hauptteil der α -Tubuline tyrosiniert vor und die primäre Modifikation besteht daher in der Entfernung des Tyrosins durch eine Tubulin-Carboxypeptidase (TCP). Es entsteht ein detyrosiniertes α -Tubulin mit einer freien C-terminalen Glutaminsäure (Glu-Tubulin). Der Einbau des C-terminalen Tyrosins an α -Tubulin (Tyr-Tubulin) ist eine ATP-abhängige Reaktion, welche durch die Tubulin-Tyrosin-Ligase (TTL) katalysiert wird [152, 153]. Da detyrosinierte Tubuline nur in persistenten MT vorkommen, ist die Detyrosinierung ein Anzeichen für stabilere MT. Diese Modifikation führt zu einer höheren Resistenz gegenüber MT destabilisierenden Reagenzien wie Nocodazol. Im Vergleich dazu sind tyrosinierte MT dafür bekannt, sensitiv gegenüber Nocodazol zu sein [153].

Die meisten PTMs finden am dynamischen Plus-Ende von polymerisierten MT statt. Die einzige bekannte Ausnahme stellt die am Lumen von MT (MT Innenseite) stattfindende Acetylierung dar. Dabei handelt es sich um eine Modifikation des Lysin40 (K40) der luminal

lokalisierten α -Tubulin Untereinheit. Katalysiert wird die Acetylierung durch die α -Tubulin-Acetyltransferase α TAT1 [154]. Wie das Enzym das zu modifizierende α -Tubulin erreicht war lange Zeit ungeklärt. Mittlerweile konnten jedoch zwei Möglichkeiten festgestellt werden: (i) Über die offenen MT-Enden oder (ii) durch Beschädigungen entlang des MT-Polymers. Beschädigungen an MT-Polymeren können dabei durch fehlerhafte oder unvollständige Polymerisation, mechanische Kräfte oder Protein-Aktivitäten wie enzymatische Spaltung entstehen. Befindet sich α TAT1 innerhalb des MT Lumens, findet eine heterogene Acetylierung entlang von MT statt. Eine lokale Deacetylierung führt dazu, dass MT nur segmentartige Acetylierung aufweisen und nicht homogen acetyliert sind [155]. Deacetylierung erfolgt durch die Enzyme Histon-Deacetylase 6 (HDAC6) und Sirtuin Typ 2 (SIRT2). Beide Enzyme sind dabei in der Lage die Acetyl-Gruppe des K40 unabhängig voneinander zu entfernen. Während HDAC6 für Deacetylierung von zytoplasmatischen MT verantwortlich ist, führt SIRT2 diese eher bei peri-nukleären MT aus und ist Zellzyklus-abhängig [155]. Wie detyrosinierte MT gelten auch acetylierte MT als stabiler und langlebiger. In Analysen wurde beobachtet, dass chemische Stabilisation zu vermehrter Acetylierung von MT führt und dass eine reduzierte Acetylierung mit einer reduzierten MT-Stabilität einhergeht [154, 156].

Die MT-Dynamik wird durch das Zusammenspiel von Tubulin-Isotypen und PTMs stark moduliert. So kann die Zusammensetzung verschiedener Tubulin-Isotypen in einem MT-Polymer bestimmte PTMs verringern oder erhöhen und dadurch die Stabilität von MT verändern. Ebenso kann eine bestimmte Isotyp-Zusammensetzung zu einer vermehrten oder reduzierten Anlagerung bestimmter MT-assoziierten Proteinen und damit ebenso zu einer Veränderung der MT-Dynamik führen [157]. Über den Einfluss des Tubulin-Codes auf mitotische MT ist bisher nur wenig bekannt. Es gibt aber Hinweise darauf, dass Tubulin-PTMs von mitotischen Motorproteinen genutzt werden. So sind Subpopulationen der Spindel-MT detyrosiniert. Es konnte gezeigt werden, dass sich der MT Plus-End-gerichtete Kinetochormotor CENP-E entlang von detyrosinierten Spindel-MT bewegt, um Chromosomen während der Chromosomenkongression in Richtung der Spindelmitte zu bewegen [158, 159]. Unbekannt bleibt jedoch wie Tubulin-PTMs und -Isotypen die Eigenschaften der unterschiedlichen Arten von Spindel-MT verändern.

1.7.2.3 MT-assoziierte Proteine regulieren die Mikrotubuli Dynamik

Die Dynamik und Stabilität des MT Zytoskeletts werden in großem Maße durch an MT bindende MAPs (MT-assoziierte Proteine) reguliert. Die bereits hohe und immer

weiterwachsende Anzahl an identifizierten MAPs in verschiedensten Säugetierzell-Systemen zeigt wie vielfältig der Einfluss von MAPs auf das MT-Netzwerk ist [160]. Klassifiziert werden MAPs in (i) Motorproteine, (ii) MT-End-bindende Proteine, die spezifisch mit dem Plus- oder Minus-MT-Ende assoziiert sind und dort die Dynamik beeinflussen, (iii) enzymatische MAPs, die MT durchtrennen und instabile MT depolymerisieren können, (iv) MT-Nukleatoren, die die Formation neuer MT beeinflussen und (v) strukturelle MAPs, die wie andere MAPs an MT binden und diese stabilisieren, aber ihre genaue Funktion bisher unklar ist [160, 161]. Einen besonders großen Einfluss auf die Dynamik von MT haben die am wachsenden MT Plus-Ende lokalisierten +TIP (*plus-end tracking proteins*) Proteine. Dabei handelt es sich um strukturell und funktionell unterschiedliche konservierte MAPs, welche auf das dynamische MT Plus-Ende stabilisierend oder destabilisierend Einwirken können oder an Interaktionen von MT mit zellulären Strukturen beteiligt sind [162].

Ein sehr gut untersuchtes Beispiel für +TIP MAPs ist die EB-(*end-binding*) Proteinfamilie. Dazu gehören in Humanzellen die Familienmitglieder EB1, EB2 und EB3. Die etwa 300 Aminosäure-großen Proteine tragen jeweils eine N-terminale CH (*calponin homology*)-Domäne, zur Bindung an MT, eine flexible und unstrukturierte Linker-Region mittig im Protein und eine C-terminale Domäne, die unter anderem eine EBH (*end-binding homology*)-Domäne beinhaltet. Die EBH-Domäne dient dabei der EB-Homo- und Heterodimerisierung und Interaktion mit anderen Proteinbindepartnern [162-164]. Während EB3 hauptsächlich in Gehirn- und Muskelzellen vertreten ist, ist EB1 in den meisten vorkommenden Geweben stark exprimiert. Zusammen bilden diese beiden Proteine Homo- und Heterodimere im Zytoplasma von Humanzellen und zeigen vergleichbare Funktionen und Einflüsse auf MT Plus-Enden. Im Kontrast dazu heterodimerisiert das EB2 Protein nicht mit seinen Familienmitgliedern und zeigt im Vergleich eine schwächere Bindung an das MT Plus-Ende. Das meist analysierte EB1 ist nicht bei pausierenden oder depolymerisierenden MT zu finden, sondern akkumuliert ausschließlich am Ende von wachsenden MT. Dabei erkennt EB1 die am Plus-Ende befindlichen GTP/GDP-Moleküle, bindet mit Hilfe der CH-Domäne an benachbarte GTP/GDP-Tubulin-Dimere, unterstützt dadurch die MT-Polymerisation und schützt MT vor dem Pausieren [163, 165]. Eine der Hauptfunktionen von EB1 ist Bildung einer Plattform zur Bindung weiterer MAPs. Mittlerweile konnten mehr als 50 Proteine identifiziert werden, die eine EB1-abhängige Aktivität am MT Plus-Ende aufweisen [166]. Ein Beispiel stellt der MT Plus-End Faktor CLIP-170 (*cytoplasmic linker protein 170*) dar. CLIP-170 bindet an endozytische Vesikel und dient so dem intrazellulären MT-abhängigen Vesikel-Transport. Zusätzlich rekrutiert CLIP-170 den Dynein-Dynaktin Komplex an das MT Plus-Ende. Bisherige Studien zeigen, dass CLIP-170 mit seiner N-

terminalen CAP-Gly (*cytoskeleton-associated protein glycine-rich*) Domäne an EB1 durch die im EB1 C-Terminus befindliche EEY-Domäne bindet, welche dem C-terminalen Teil von α -Tubulin ähnelt [163, 166]. *In vitro* Analysen zeigen zudem, dass die Abwesenheit von EB1 am MT dazu führt, dass CLIP-170 ebenfalls nicht mehr am MT Plus-Ende, sondern entlang von MT lokalisiert. Dies zeigt die EB1-Abhängigkeit der CLIP-170 Aktivität. Obwohl CLIP-170 auch selbst in der Lage ist an α -Tubulin zu binden, wird jedoch eine viel höhere Affinität zu EB1 als zu dem Tubulin vermutet [166].

Verschiedene MAPs sind in der Lage durch Bindung an MT und Rekrutierung weiterer Proteine die Eigenschaften des MT Zytoskelett, wie Stabilität und Dynamik, zu verändern und so auch zelluläre Prozesse zu beeinflussen und zu unterstützen. Weiterhin zeigt auch die Anwesenheit einer Reihe von PTMs und Tubulin-Isotypen die hohe Komplexität dieses Zytoskeletts.

1.8 Chlamydiale Effektorproteine manipulieren das dynamische Zytoskelett

Chlamydien nutzen das Zytoskelett der eukaryotischen Wirtszelle um einen effizienten Infektionsverlauf zu gewährleisten. Die dafür T3SS-sekretierten Effektorproteine beeinflussen und modulieren die Struktur und Dynamik der einzelnen Zytoskelett-Komponenten zu unterschiedlichen Zeiten der Infektion, wie Internalisierung, intrazelluläre Mobilität des Pathogens, Replikation oder Persistenz [84, 111, 167].

1.8.1 Chlamydien manipulieren das Aktin Zytoskelett der Wirtszelle

Bereits früh in der Infektion machen sich Chlamydien das dynamische Aktin Zytoskelett zu Nutze und die Assemblierung von F-Aktin ist für die Internalisierung entscheidend. In frühen Studien mit *Ctr* konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Cytochalasin D, ein Inhibitor der Aktin Polymerisation, während der frühen Infektion zu einer signifikanten Reduktion der Internalisierung führt [168]. Mittlerweile ist bekannt, dass die Sekretion von chlamydialen Effektorproteinen während der Internalisierung zur Rekrutierung von F-Aktin an der Eintrittsstelle führt. Das in *Ctr* identifizierte Effektorprotein TmeA (*translocated membrane-associated effector A*) besitzt eine Aktin-rekrutierende Funktion während der Internalisierung. TmeA bindet an das humane AHNAK, ein Phosphoprotein, welches an der apikalen Membran polarisierter Epithelzellen lokalisiert ist [169, 170]. Dadurch ist TmeA

selbst auch an der PM der Wirtszelle lokalisiert, wo es N-WASP durch Bindung aktiviert. Aktiviertes N-WASP aktiviert anschließend den Arp2/3 Komplex und die Aktin Polymerisation wird stimuliert [171]. Ein weiteres Schlüsselprotein im Prozess der Internalisierung ist das ebenfalls Aktin-rekrutierende, in Chlamydien konservierte lösliche TarP Protein. Die Eigenschaften und Funktionsweise von TarP wird in Kapitel 1.8.1.1 näher erläutert.

Auch die T3SS-sekretierten *Cpn* Effektorproteine SemC und SemD spielen für den Prozess der Internalisierung eine wichtige Rolle. Bei diesen Proteinen handelt es sich nicht um zytoplasmatisch gelöst vorliegende Proteine, sondern in der PM der Wirtszelle eingelagerte Proteine. Das SemC bindet nach der Sekretion über seine amphipatische Helix (APH)-Domäne mit der PM der Wirtszelle, rekrutiert dort SNX9 und induziert dadurch Membrandeformationen, welche die Aufnahme des EBs unterstützen [101]. Auch das SemD wird im Anschluss an die Sekretion über seine APH-Domäne in der Membran der Wirtszelle verankert und führt selbst und durch Rekrutierung von SNX9 und Pacsin zu Membranverkümmungen. Gleichzeitig induziert SemD, durch Bindung und Aktivierung von N-WASP, eine Arp2/3-abhängige F-Aktin Polymerisation, wodurch Kräfte entwickelt werden um die PM um das EB herum zu führen und anschließend abzuschneiden [112]. Diese molekularen Wechselwirkungen konnten in einem Co-Kristall aus SemD und einem Teil von N-WASP aufgeklärt werden [172].

1.8.1.1 Die TarP Effektorproteinfamilie induziert F-Aktin-Rekrutierung

Während der Internalisierung ist die T3SS-sekretierte, in Chlamydien konservierte TarP (*translocated actin recruiting phosphoprotein*) Proteinfamilie beteiligt. Das *Ctr* TarP wurde mittels Immunopräzipitation durch Anwendung des Anti-phosphotyrosin-Antikörpers 4G10 isoliert und zunächst als hypothetisches Protein (CT456) mit unbekannter Funktion identifiziert. Folgende Elektronenmikroskopie- und Immunofluoreszenz-Studien zeigten schließlich die Translokation, Lokalisation auf der zytoplasmatischen Seite der PM der Wirtszelle an der chlamydialen Eintrittsstelle, Tyrosin-Phosphorylierung von TarP und die Funktion der Rekrutierung von F-Aktin [167, 173]. In allen bisher sequenzierten Chlamydien Spezies konnten Mitglieder der TarP Familie identifiziert werden [173]. Zwischen den verschiedenen *Ctr* Serovaren herrscht dabei eine sehr hohe Identität der Aminosäuresequenzen der TarP Proteine von etwa 94 % (*Ctr* L2 zu *Ctr* D). Doch obwohl die TarP Familienmitglieder der verschiedenen Spezies konservierte Proteindomänen enthalten, liegt die Identität der Aminosäuresequenzen der TarP Orthologe von *C.*

muridarum, *C. caviae* und *Cpn* zum *Ctr* TarP (*Ctr* L2) bei nur 40 – 60 % [173, 174]. Spezifisch für das *Ctr* TarP ist eine Tyrosin-reiche Phosphorylierungsdomäne im N-terminalen Bereich des Proteins. Diese Domäne ist in den TarP-Proteinen in anderen Spezies nicht existent und ist daher *Ctr* spezifisch [174] (Abb. 5). Die konservierten Domänen befinden sich mittig und im C-Terminus der Proteine. Diese sind zum einen eine Prolin-reiche Domäne (PRD) zur Unterstützung der Oligomerisierung von TarP, was wiederum die Aktin-Polymerisation stimuliert [167]. Weiterhin besitzen TarP Familienmitglieder mindestens eine Aktin Bindedomäne (G-Aktin Bindedomäne (ABD) und eine F-Aktin Bindedomäne (FAB)) und mindestens eine Vinculin Bindesequenz (VBS) zur Bindung an Vinculin und einer damit einhergehenden Unterstützung der F-Aktin Rekrutierung. Zusätzlich konnte in den TarP Proteinen von *Ctr*, *C. caviae*, *C. abortus*, *C. felis* und *C. muridarum* ein Leucin-Aspartat Motiv (LD) im C-Terminus identifiziert werden, welches dem LD2 Motiv von Paxillin, dem Bindepartner der Fokaladhäsionskinase (FAK), ähnelt. Durch das LD-Motiv rekrutiert TarP FAK, welches wiederum eine Arp2/3 abhängige Rekrutierung von F-Aktin auslöst (Abb. 5) [111, 175-177].

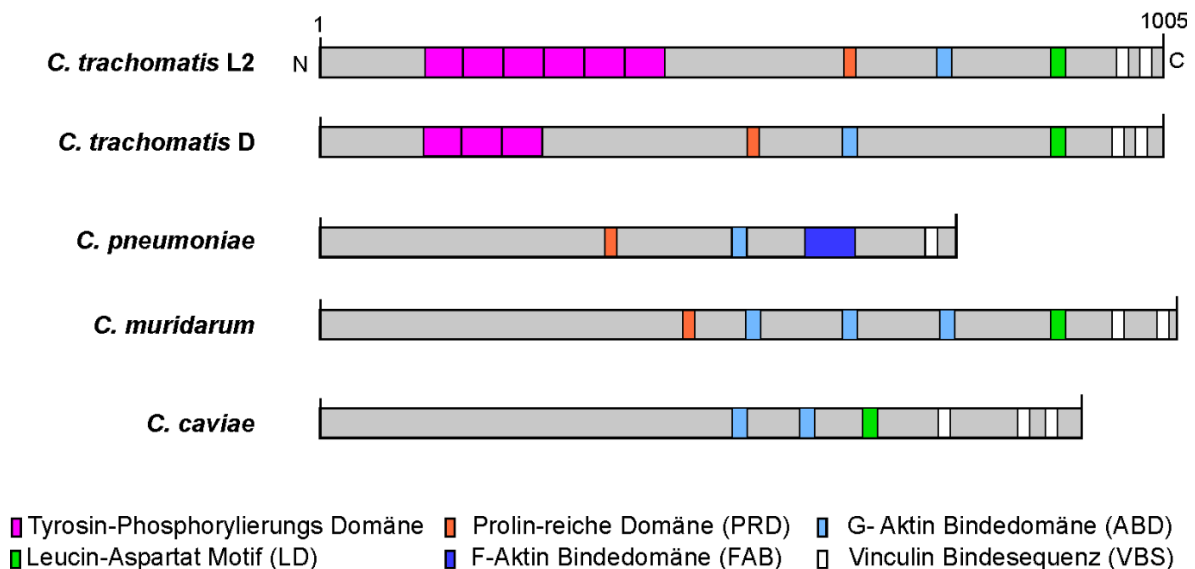


Abbildung 5: Vergleichende schematische Darstellung von TarP Familienmitgliedern

Dargestellt sind die TarP Proteine und ihre Domänen der Spezies *Ctr* (Serovar L2 und D), *Cpn*, *C. muridarum* und *C. caviae*. Spezifisch für *Ctr* ist die Tyrosin-reiche Phosphorylierungs Domäne. Konserviert sind eine Prolin-reiche Domäne (PRD), Aktin Bindedomänen (ABD und FAB), ein Leucin-Aspartat Motiv (LD), welches eine Fokaladhäsionskinase bindet. Vinculin-Bindesequenzen (VBS) [74, 111, 115, 175-177].

Für das *Ctr* TarP wurde gezeigt, dass wirtseigene Tyrosin-Kinase-Familienmitglieder wie Abl-, Syk- oder Src-Kinasen mit der N-terminalen Tyrosin-reichen

Phosphorylierungsdomäne interagieren und TarP an dieser Stelle phosphorylieren [178, 179]. In dem phosphorylierten Zustand ist das TarP Protein in der Lage die GTPase Rac1 zu aktivieren, welche wiederum zu einer Rac1- und WAVE-abhängigen Arp2/3-Aktivierung führt. Die ausgelöste Arp2/3 Aktivierung führt anschließend zu vermehrter Bildung von Aktin Nukleationsursprüngen an existierenden F-Aktin Filamenten an der chlamydialen Eintrittsstelle (Abb. 6) [180]. TarP ist auch unabhängig von einer Phosphorylierung in der Lage direkt an G-Aktin und F-Aktin zu binden und eine Aktin-Polymerisation auszulösen. Auch die Oligomerisierung von TarP durch die PRD unterstützt die Polymerisation von Aktin [167].

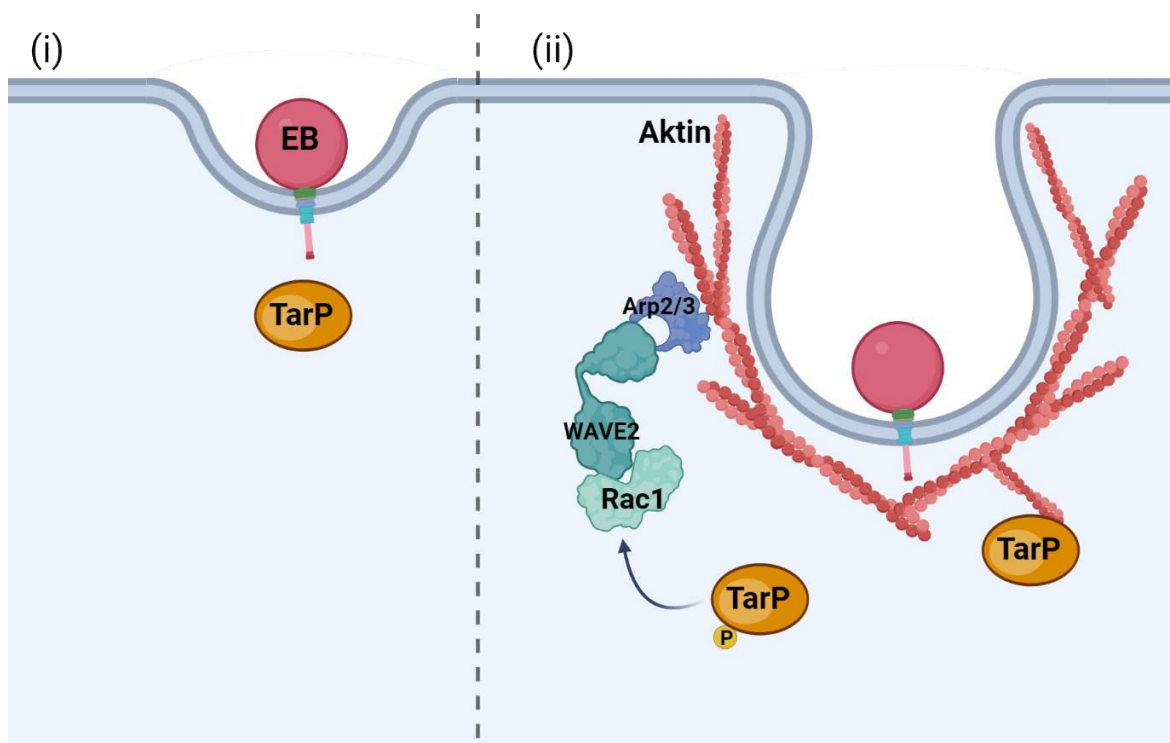


Abbildung 6: Sekretiertes TarP rekrutiert Aktin während der Internalisierung

Schematische Darstellung der Internalisierung eines chlamydialen EBs. (i) Das Effektorprotein TarP wird mittels T3SS in das Zytoplasma der Wirtszelle sekretiert. (ii) Sekretiertes *Ctr* TarP wird durch Kinasen der Wirtszelle phosphoryliert. Dies führt zu einer Proteinaktivierungs-Kaskade von Rac1, WAVE 2 und schließlich des Arp2/3 Komplexes. Die Aktivierung des Arp2/3 Komplexes führt zur Rekrutierung von F-Aktin an der Eintrittsstelle des EBs für dessen Internalisierung. TarP ist auch durch den Besitz von Aktin-Bindedomänen in der Lage in der Nähe der EB-Eintrittsstelle Aktin zu binden und eine Polymerisation zu induzieren. Die Darstellung wurde mit BioRender erstellt.

1.8.1.2 Das *Chlamydia pneumoniae* TarP Ortholog CPn0572

Innerhalb meiner Arbeit konzentrierte ich mich hauptsächlich auf das *Cpn* TarP Ortholog CPn0572. Bei CPn0572 handelt es sich um ein 755 AS großes Protein, welches 283 AS kürzer ist als das *Ctr* TarP. Im Vergleich zum *Ctr* TarP trägt es weder die Phosphorylierungs-Domäne noch das Leucin-Aspartat Motif. Wie für TarP konnte in CPn0572 eine Prolin-reiche Domäne, eine G-Aktin Bindedomäne und eine Vinculin Bindesequenz identifiziert werden. Außerdem besitzt CPn0572 im C-Terminus noch eine F-Aktin Bindedomäne (Abb. 5) [74, 115]. Bisherige Analysen haben gezeigt, dass sekretiertes CPn0572 mit Aktin-Akkumulationen während der frühen *Cpn* Infektion assoziiert und dass auch ektopisch exprimiertes CPn0572 in Hefe- und Humanzellen mit Aktin-Strukturen kolokalisiert und verdickte Aktin Filamente bildet. CPn0572-Expression in Hefe und *in vitro* Experimente zeigen außerdem eine durch CPn0572-Expression ausgelöste Stabilisation von F-Aktin Filamenten durch das Ersetzen oder durch Inhibierung von Cofilin [115]. Überraschenderweise wurde im Rahmen dieser Analysen beobachtet, dass CPn0572 neben Aktin auch mit einer weiteren zellularen filamentösen Struktur assoziiert, die dato nicht identifiziert wurde.

1.8.2 Chlamydien nutzen das Mikrotubuli-Zytoskelett der Wirtszelle

Es existiert bereits ein umfangreiches Wissen darüber, wie Chlamydien das Aktin-Zytoskelett während verschiedener Stadien ihres Infektionszyklus nutzen. Allerdings war zu Beginn meiner Doktorarbeit unklar in welchem Maße Chlamydien das zweite dynamische Zytoskelett, das MT-Zytoskelett, während des Infektionszyklus nutzen.

Für spätere Stadien der Infektion gibt es Hinweise für *Ctr*, dass die nach der Internalisierung gebildete Inklusion in nicht-polarisierten humanen Epithelzellen durch das MT Minus-Ende gerichtete Motorprotein Dynein entlang der MT von der Zellperipherie zu der peri-Golgi-Region bzw. zum Haupt-MTOC in Zellkernnähe transportiert wird und dort für die Dauer der Infektion verbleibt. Diese Aussage beruht auf der Beobachtung, dass sich gerade gebildete Inklusionen innerhalb der Zelle in die gleiche Richtung und mit ähnlicher Geschwindigkeit bewegen wie über MT transportierte Vesikel [83] [84, 85]. Bei diesem Transportprozess ist das *Ctr* Inc CT850 involviert, welches an den Dynein-Motorkomplex bindet [84, 181]. Für *Cpn* konnte ein derartiger Transportprozess bisher nicht identifiziert werden, obwohl auch hier die Inklusionen in der Nähe des Haupt-MTOC lokalisieren.

Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass sobald sich die *Ctr* Inklusion in der peri-Golgi Region befindet, *Ctr* einen „Käfig“ aus post-translational modifizierten MT, Aktin Filamenten, Septinen und Intermediär Filamenten um die Inklusion herum bildet. Verantwortlich für die Assemblierung von MT um die Inklusion herum ist das *Ctr* Inklusion-lokalisierte Effektorprotein IPAM (*Inclusion protein actin on MTs*). IPAM rekrutiert und aktiviert dabei das zentrosomale Protein CEP170. Es konnte gezeigt werden, dass die Zusammenarbeit von IPAM und CEP170 die MT-Assemblierung in der Nähe der Inklusion fördert [84, 182]. In humanen Epithelzellen wird bei *Ctr* die Formation von detyrosinierten MT um die Inklusion herum induziert, welche stabil gegenüber chemischer MT-Depolymerisation durch Nocodazol sind. Reduzierung dieser detyrosinierten MT durch Behandlung mit Parthenolid und Constunolid führt zu einer verminderten Replikation von *Ctr* in Epithelzellen und zeigt die Relevanz dieser post-translational modifizierten MT für die Infektion [183, 184]. Für die PTMs soll unter anderem das *Ctr* Protein InaC verantwortlich sein, welches mit den GTPasen ARF1 und ARF4 der Wirtszelle interagiert. Der genaue Mechanismus dahinter ist allerdings noch unklar. Für *Cpn* konnten bisher keine Hinweise auf einen MT-abhängigen Transportprozess der Inklusion zur peri-Golgi Region identifiziert werden. Für eine Formation von MT um die *Cpn* Inklusion existiert bisher nur ein Hinweis. Dabei wurde gezeigt, dass bei einer 48 Stunden *Cpn* Infektion MT sich zwar um die Inklusion herum befinden, diese aber, im Vergleich zu *Ctr*, nicht als deutliche Ring-Struktur formiert sind [184].

1.9 Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskelett verknüpfende MAPs

Neben zahlreichen ausschließlich MT-bindenden bzw. -assoziiierenden Proteinen existieren auch MAPs, für welche eine Fähigkeit zur Vernetzung von MT und dem Aktin Zytoskelett vorausgesagt wird. Dazu gehören beispielsweise die MAPs Adenomatous polyposis coli (APC) und Tau, sowie das Formin mDia1. APC besitzt die Fähigkeit, direkt mit MT und Aktin Filamenten zu interagieren und soll so eine Vernetzung beider Zytoskelette herstellen [185]. Mit Hilfe des C-Terminus ist APC in der Lage direkt an MT via EB1 am MT Plus-Ende zu assoziieren. Gleichzeitig wurde eine Lokalisation von APC an Aktin-reichen intrazellulären PM-Oberflächen in eukaryotischen Zellen beobachtet. *In vitro*-Studien zeigten zudem, dass APC Aktin Filamente direkt bindet, diese bündelt und eine Vernetzung von Aktin Filamenten und MT herstellt. Die Vernetzung beider Zytoskelette ist dabei durch die Assoziation von APC mit EB1 reguliert. Die direkte Bindung mit EB1 inhibiert dabei die Interaktion mit Aktin Filamenten [185]. Auch für das neuronale MAP Tau ist bekannt, dass es neben der Regulation der Dynamik und Organisation von MT, sowie dessen Bündelung und

Stabilisation auch Aktin Filamente bindet und bündelt [186, 187]. Tau soll zudem in der Lage sein eine Polymerisation von Aktin Filamenten entlang von MT zu induzieren und gleichzeitig das Wachstum von MT an gebündelten Aktin Filamenten auszulösen. Damit stellt Tau eine mögliche molekulare Verknüpfung beider Zytoskelett-Strukturen dar [188]. Formine, wie mDia1, stimulieren die Nukleation und Elongation von Aktin Filamenten und sind dabei für die Bildung von verschiedenen zellularen Aktin Strukturen, wie Aktin Bündel oder Stress-Filamente verantwortlich [189]. Gleichzeitig zeigen Analysen, dass mDia1 MT stabilisiert und parallel zu den gebündelten F-Aktin Filamenten organisieren kann [190, 191].

2 Ziel dieser Arbeit

Das erste Ziel dieser Arbeit war es heraus zu finden, ob das wildtypische Mikrotubuli (MT)-Zytoskelett der Wirtszelle wichtig für den erfolgreichen Ablauf der frühen *Chlamydia pneumoniae* (*Cpn*) Infektion ist. Dies konnte bestätigt werden, da eine Änderung der MT-Organisation und -Dynamik während der Infektion mittels chemisch oder Kälte-induzierter Destabilisation oder MT-Hyperstabilisation durch ektopische Expression des *Cpn* Effektorproteins CPn0572 die Infektionseffizienz signifikant reduzierte. Somit ist das wildtypische Interphasen-MT-Zytoskelett der Wirtszelle für *Cpn* eine wichtige Zielstruktur.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Identifikation und Charakterisierung von *Cpn* Proteinen, die das MT-Zytoskelett modulieren können. Mit Hilfe eines umfangreichen Screens konnte eine hohe Anzahl an MT-modulierenden *Cpn* Proteinen identifiziert werden. Die Funktion des Aktin-modulierenden *Cpn* TarP-Orthologs CPn0572 wurde intensiv analysiert. Dabei wurde eine neue Funktion des Proteins identifiziert: die Fähigkeit zur direkten Bindung und Modulation von Interphasen und mitotischen MT.

3 Manuskript I

A Functional Yeast-Based Screen Identifies the Host Microtubule Cytoskeleton as a Target of Numerous *Chlamydia pneumoniae* Proteins

Carolin Wevers, Mona Höhler, Abel R. Alcázar-Román, Johannes H. Hegemann and Ursula Fleig

Das Manuskript wurde veröffentlicht in: International Journal of Molecular Sciences
April 2023

DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24087618>

Impact factor: 5.6 (2023)

Geteilte Erstautorenschaft

Beteiligung von Mona Höhler: 42%

1. Erstellung des „Graphical Abstracts“
2. Figur 1: Konzipierung des Experiments; Durchführung des Experiments; Auswertung der Daten; Erstellung der Figuren und Figurenlegende.
3. Figur 6B, C: Konzipierung des Experiments; Durchführung des Experiments; Auswertung der Daten; Erstellung der Figuren und Figurenlegende.
4. Figur 8: Konzipierung des Experiments; Durchführung des Experiments; Auswertung der Daten; Erstellung der Figuren und Figurenlegende.
5. Tabelle S2: Konzipierung des Experiments; Durchführung des Experiments; Auswertung der Daten; Erstellung der Figuren und Figurenlegende.
6. Figur S1: Konzipierung des Experiments; Durchführung des Experiments; Auswertung der Daten; Erstellung der Figuren und Figurenlegende.
7. Figur S2: Konzipierung des Experiments; Durchführung des Experiments; Auswertung der Daten; Erstellung der Figuren und Figurenlegende.

8. Figur S5: Recherche und Auswertung von existierenden Transkriptom-Analysen; Erstellung von Figur und Figurenlegende.

9. Schriftliche Verfassung von: Methodenteil (anteilig 35%); Resultate-Teil (anteilig 35%) sowie Informationsrecherche zur Verfassung der Einleitung und Diskussion.

Ich bestätige hiermit die Korrektheit der Angaben.

Düsseldorf, den 20.02.2025

Mona Iris Höhler

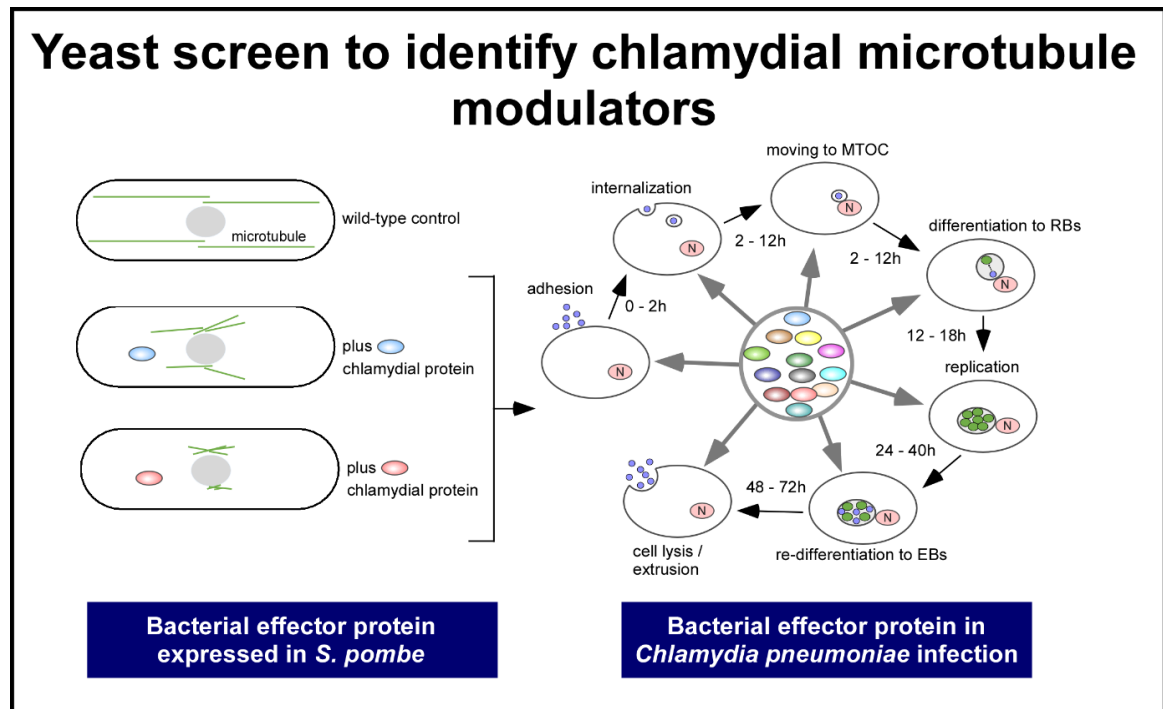
3.1 Zusammenfassung

Durch Sekretion spezifischer Effektorproteine manipulieren die Gram-negativen fakultativ intrazellulären Chlamydien während der Infektion eine Vielzahl an Wirtszellprozessen. Während die Manipulation des Aktin-Zytoskeletts durch Chlamydien bereits sehr gut verstanden ist, ist das Wissen über die Rolle die das Mikrotubuli (MT)-Zytoskelett in der Infektion spielt sehr begrenzt.

Ich habe deshalb untersucht, ob Interphasen MTs für die frühe Infektion benötigt werden. Dies ist der Fall, da die Abwesenheit eines wildtypischen MT-Zytoskeletts in humanen Epithelzellen während der frühen *Cpn* Infektion die Infektionseffizienz signifikant reduziert.

Zur Identifikation MT-modulierender *Cpn* Proteine wurde ein umfangreicher genetischer Screen mit Hilfe der Modellhefe *S. pombe* durchgeführt. Von 116 *Cpn* Gene, die in *S. pombe* exprimiert wurden, führten 13 (<10%) zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber MT-destabilisierenden Chemikalien. Weiterführende fluoreszenz-mikroskopische Analysen zeigten, dass die Expression der *Cpn* Gene in *S. pombe* eine vielfältige Veränderung der Organisation des Interphasen-MT-Zytoskeletts und der MT-Dynamik auslöst. Bei der Expression eines dieser Gene, *cpn0443*, in humanen Epithelzellen wurde festgestellt, dass es mit dem MT-Zytoskelett und dem ER assoziiert und zu MT-Modulationen in Form von verdickten MT führt. *In vitro* bindet die C-terminale Variante von CPn0443 zudem direkt mit MT-Filamenten. Eine vorherige Expression von *cpn0443* in humanen Epithelzellen führt außerdem zu einer signifikanten Reduktion einer nachfolgenden *Cpn* Infektion in Vergleich zu Kontrollzellen. Zusammenfassend wurde gezeigt, dass MTs eine wichtige Rolle bei der *Cpn* Infektion spielen.

Graphical Abstract





Article

A Functional Yeast-Based Screen Identifies the Host Microtubule Cytoskeleton as a Target of Numerous *Chlamydia pneumoniae* Proteins

Carolyn Wevers ^{1,†}, Mona Höhler ^{1,†} , Abel R. Alcázar-Román ¹, Johannes H. Hegemann ^{2,‡} and Ursula Fleig ^{1,*,‡} ¹ Eukaryotic Microbiology, Institute of Functional Microbial Genomics, Heinrich-Heine-University, 40225 Düsseldorf, Germany² Institute of Functional Microbial Genomics, Heinrich-Heine-University, 40225 Düsseldorf, Germany

* Correspondence: fleigu@hhu.de

† These authors contributed equally to this work.

‡ These authors also contributed equally to this work.



Citation: Wevers, C.; Höhler, M.; Alcázar-Román, A.R.; Hegemann, J.H.; Fleig, U. A Functional Yeast-Based Screen Identifies the Host Microtubule Cytoskeleton as a Target of Numerous *Chlamydia pneumoniae* Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 7618. <https://doi.org/10.3390/ijms24087618>

Academic Editors: Nicoletta Guaragnella, Tiziana Cervelli and Belém Sampaio-Marques

Received: 30 March 2023

Revised: 13 April 2023

Accepted: 14 April 2023

Published: 20 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Bacterial pathogens have evolved intricate ways to manipulate the host to support infection. Here, we systematically assessed the importance of the microtubule cytoskeleton for infection by *Chlamydiae*, which are obligate intracellular bacteria that are of great importance for human health. The elimination of microtubules in human HEP-2 cells prior to *C. pneumoniae* infection profoundly attenuated the infection efficiency, demonstrating the need for microtubules for the early infection processes. To identify microtubule-modulating *C. pneumoniae* proteins, a screen in the model yeast *Schizosaccharomyces pombe* was performed. Unexpectedly, among 116 selected chlamydial proteins, more than 10%, namely, 13 proteins, massively altered the yeast interphase microtubule cytoskeleton. With two exceptions, these proteins were predicted to be inclusion membrane proteins. As proof of principle, we selected the conserved CPn0443 protein, which caused massive microtubule instability in yeast, for further analysis. CPn0443 bound and bundled microtubules in vitro and co-localized partially with microtubules in vivo in yeast and human cells. Furthermore, CPn0443-transfected U2OS cells had a significantly reduced infection rate by *C. pneumoniae* EBs. Thus, our yeast screen identified numerous proteins encoded using the highly reduced *C. pneumoniae* genome that modulated microtubule dynamics. Hijacking of the host microtubule cytoskeleton must be a vital part of chlamydial infection.

Keywords: microtubule cytoskeleton; *Schizosaccharomyces pombe*; yeast; effector proteins; screen; *Chlamydia pneumoniae*; MAPs; pathogen; bacteria

1. Introduction

Obligate intracellular pathogens rely on intensive molecular crosstalk with their eukaryotic host cells. The compartmentalization of the host cell requires an elaborate cytoskeletal network that consists of the F-actin and microtubule (MT) cytoskeleton, intermediate filaments and septins. These structures feed into numerous cellular processes, including the maintenance of the cell shape and mobility, vesicle transport via motor proteins, endo- and exocytosis, organization, subcellular positioning and interconnection of organelles [1–5]. Thus, for obligate intracellular pathogens with an intracellular developmental cycle within a membrane-bound compartment, the rearrangement and repurposing of host cellular structures, such as the dynamic host cytoskeleton is required. While the modulation of the host actin cytoskeleton by bacterial pathogens is well studied (for reviews, see [6–8]), our knowledge of how the MT cytoskeleton is used and altered by pathogenic bacteria is scarce (for a review, see [9]). A few bacterial effector proteins were identified that alter MT dynamics, such as VirA from *Shigella* and EspG from *E. coli* (for a review, see [9]). However, their MT-modulating function during the infection process is unclear.

The obligate intracellular Gram-negative *Chlamydiae* are responsible for several serious diseases in humans worldwide. *Chlamydia pneumoniae* (*Cpn*) infects the respiratory tract and its infection is associated with chronic diseases, including Alzheimer's, atherosclerosis, asthma and lung cancer (for reviews, see [10–12]). In contrast, *Chlamydia trachomatis* (*Ctr*) causes serovar-dependent sexually transmitted infections of the urogenital tract and severe eye infections (for reviews, see [13,14]). All *Chlamydiae* have a unique biphasic developmental cycle in a parasitophorous membrane-bound vesicle called inclusion. An infection starts with the extracellular infectious elementary body (EB) attaching to and activating receptors on target cells. In parallel, effector proteins are secreted via the type III secretion system (T3SS) targeting host cell processes and structures for EB uptake [15]. After internalization, EBs differentiate into non-infectious, metabolically active reticulate bodies (RB), followed by rounds of replication via binary fission, before RBs re-differentiate back to EBs and are released by host cell lysis or extrusion [15,16]. For a successful chlamydial infection, the manipulation of and interaction with host cytoskeletal elements is essential. The analysis to date has almost exclusively focused on the *Ctr* infection process, where global disruption of F-actin structures prior to the infection strongly reduced the entry of *Ctr* serovar L2 EBs into mammalian cells [17–19]. In contrast, the role of the MT cytoskeleton for *Ctr* host cell entry is less clear. Disruption of MT structures via vinca alkaloids prior to and during incubation with *Ctr* L2 EBs attenuated the subsequent infection [20], while MT depolymerization via nocodazole did not reduce *Ctr* serovars L2 and E host cell entry [18]. Later during infection, MTs are used as tracks for *Ctr* inclusions to move to the MT-organizing center (MTOC), where the inclusion resides and inclusion fusion occurs [18,21,22]. During the replicative phase, the growing *Ctr* inclusion is encaged by F-actin, intermediate filaments and septins [23,24]. At the mid and late stages of development, stabilized MTs are present at the periphery of the inclusion and their disruption reduces the formation of infectious progeny [25].

To date, many of the chlamydial effector proteins interacting with and modulating cytoskeletal structures during the infection cycle remain elusive. The actin cytoskeleton is targeted via the secreted *Ctr* effectors TarP (and its *Cpn* homolog CPn0572) and TmeA during EB entry [26–29]. Transport of the early *Ctr* inclusion to the MTOC is mediated by binding of the inclusion membrane protein (Inc protein) Ct850 to the dynein light chain DYNLT1 [30]. Ct850 also interacts with the inclusion membrane protein Ct222, but its role in transport to the MTOC is not known [31]. Interestingly, during a *C. psittaci* infection, the inclusion membrane protein IncB binds to the dynein-interacting human protein Snapin, thus establishing a second connection between MTs and a chlamydial inclusion [32]. MT assembly around the *Ctr* inclusion requires the inclusion membrane protein Ct223/IPAM and the host centrosomal protein CEP170 [33]. Moreover, inclusion integrity involves the inclusion membrane protein InaC, which controls infection via activation of the host cell GTPases ARF1 and RhoA formation and dynamics of both the actin and MT scaffolds surrounding the *Ctr* inclusion [34,35]. Finally, the Inc protein CT192 is necessary for dynactin recruitment to the inclusion membrane [36]. In general, chlamydial effector proteins targeting the cytoskeleton require secretion into the host cytosol, where they target host cell proteins of interest, or localization at the chlamydia–host cell interface, in the inclusion membrane. Translocation of effector proteins into the host cytosol and the inclusion membrane is probably mediated by the type 3 secretion system (T3SS), which is a form of macromolecular machinery that transports proteins from the bacterial cytosol directly through the inner and outer bacterial membranes and through the inclusion membrane. Inc proteins are embedded in the inclusion membrane and are unique to *Chlamydiaceae*. The incorporation of Inc proteins into the inclusion membrane, which was derived from the plasma membrane due to the EB internalization process, leads to an extensive modification of the inclusion membrane. Inc proteins are characterized by one or more hydrophobic regions and possess a uni-directional hairpin-like topology in the inclusion membrane, thus decorating the cytosolic face of the inclusion membrane with their N- and C-termini and, in this way, drive the interaction of the chlamydial organelle

with the host cell [37]. Several Incs show some moderate conservation between different *Chlamydiaceae* species, but each chlamydial species also has several unique Incs [38]. Using Inc-specific criteria, for *Cpn*, a total of 107 Inc proteins were predicted, almost all of which are functionally unexplored [39].

In *Cpn*, only a single protein was identified that modulates MTs. The evolutionarily conserved T33S effector protein CopN is an MT destabilizer in vitro but its role during infection is unknown [40,41]. Thus, we employed *Cpn* to assess (i) the impact of the host MT cytoskeleton on the early processes of chlamydial infection and (ii) the importance of the MT cytoskeleton during *Cpn* infection. As the obligate intracellular bacteria are very difficult to manipulate genetically, we used the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* as a screening tool. Determination of alterations of yeast interphase MT upon the expression of chlamydial genes uncovered the existence of numerous chlamydial proteins involved in host MT manipulation. Thus, the importance of the host MT cytoskeleton in chlamydial infection was found to be vastly underestimated.

2. Results

2.1. Early Steps in *Cpn* Infection Required an Intact MT Cytoskeleton

The role of the host cell MT cytoskeleton in the *Cpn* infection cycle had not yet been studied. Therefore, we first used an assay to determine whether an intact MT cytoskeleton was required in the early steps of the infection. We reasoned that destabilizing MTs at a later time point in the infection process would have severe consequences for host cell functions, and thus, we only assayed infection in cells with no MTs prior to the infection. Human epithelial HEP-2 cells were treated with the MT-destabilizing drug nocodazole prior to a *Cpn* infection. As determined using microscopy, MTs were fully depolymerized before infection (Figures 1A and S1). The washout of nocodazole with the simultaneous addition of *Cpn* EBs resulted in a scenario where EBs infected the human cells in the absence of the MT network. The MT network repolymerized within the next 5 h (Figure S1). Epithelial cells treated in this way showed a 46% reduction in *Cpn*-infected cells in comparison to mock-treated control cells (Figure 1B,C). Furthermore, the number of inclusions per cell decreased in the nocodazole-treated cells in comparison to the mock-treated cells (Figure 1D). Thus, an intact interphase MT cytoskeleton was required for the early processes of *Cpn* infection.

2.2. Identification of *Cpn* MT-Modulating Proteins via the *S. pombe* Test System

To identify chlamydial proteins that modulate the MT cytoskeleton, we decided to use the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, as fundamental features of the MT cytoskeleton are conserved and this yeast is an excellent model organism for the identification of MT-modulating proteins: it features an extensive interphase MT cytoskeleton organized in MT bundles whose dynamic behavior can be imaged and measured easily via life-cell imaging of α -tubulin-GFP [42–44].

Our screen to identify *Cpn* MT-modulating proteins encompassed the (i) selection of chlamydial genes to be assessed; (ii) cloning of these genes into an *S. pombe* expression vector and (iii) transformation of yeast with these plasmids and identification of transformants sensitive to MT poisons. In total, 116 genes from the evolutionarily streamlined *Cpn* (GiD) proteome of 1074 protein-coding ORFs were selected for the analysis (Figure 2A). These include 78 genes encoding putative inclusion membrane (Inc) proteins [39,45]. A total of 21 genes encoded proteins that led to a growth defect when expressed in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* [46,47] and 17 genes coded for highly expressed proteins [48]. A list of all proteins tested is found in Table S1B. Chlamydial genes encoding these proteins were cloned into an *S. pombe* expression vector behind the repressible *S. pombe nmt1⁺* promoter. Low-level expression from this promoter is in the presence of thiamine, while high-level expression is in the absence of thiamine [49]. Transformants of a wild-type *S. pombe* strain expressing a chlamydial gene were then tested for reduced growth and increased sensitivity to the MT-destabilizing drug thiabendazole (TBZ) (Figure 2B).

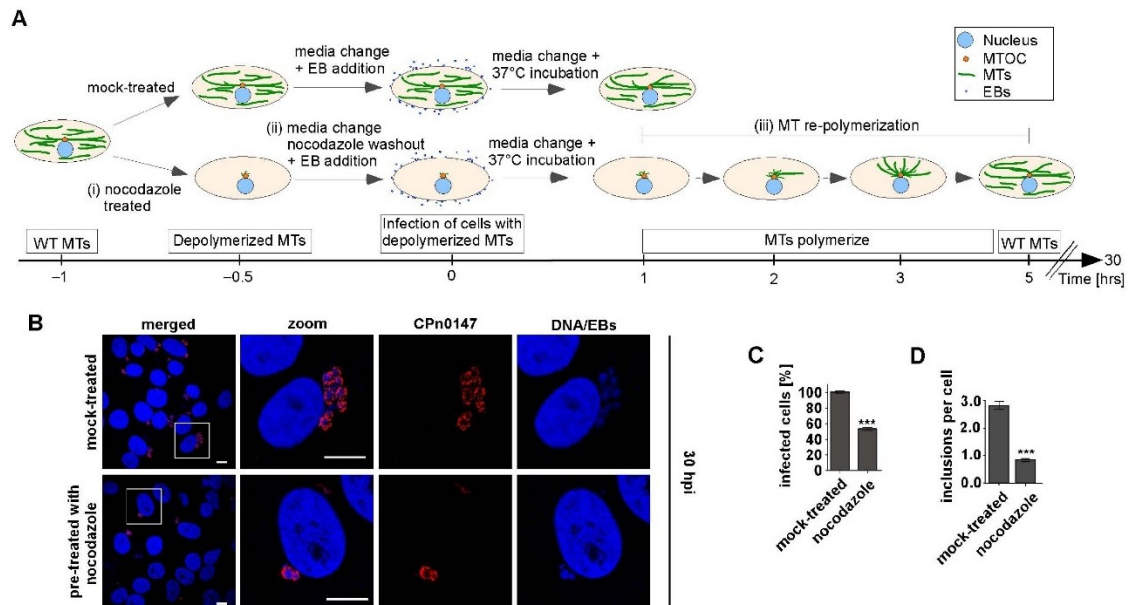


Figure 1. The host MT cytoskeleton was required for chlamydial infection. **(A)** Schematic representation of the experimental setup used: mammalian HEp-2 cells were mock-treated (DMSO-treated, top panels) or treated with the MT-depolymerizing drug nocodazole (bottom panels) prior to infection with purified *Cpn* EBs (MOI = 5) for 30 h. Nocodazole treatment (bottom panels) was as follows: (i) cells were incubated with nocodazole for 30 min at 37 °C and MT depolymerization was monitored microscopically. (ii) Nocodazole washout via a media change was followed by infection with *Cpn* EBs. (iii) Repolymerization of MTs was monitored (Figure S1) and was complete after 5 h. **(B)** Representative confocal images of mock-treated or nocodazole-treated HEp-2 cells infected with purified EBs. Chlamydial inclusions (red) were visualized with an anti-CPn0147 antibody (chlamydial inclusion membrane protein) and DNA (blue) with DAPI. White boxes show enlargements (zoom). Scale bars: 10 µm. **(C)** Quantification of the number of infected HEp-2 cells. Treatment of cells with/without nocodazole prior to the infection depicted in **(A)**. **(D)** Quantification of the number of chlamydial inclusions per infected HEp-2 cell that were treated with/without nocodazole prior to infection. **(C,D)** three independent experiments/per condition as described in **(A)**, each with 100 cells; error bars represent $\pm$ SEM; *t*-test: $p < 0.001$ (***).

A total of 67 chlamydial genes that were expressed either under low- or high-level conditions had no discernible effect on yeast growth (Figure 2C,D, category 1a), while the expression of a further 18 chlamydial genes resulted in a moderate growth defect but no increased TBZ sensitivity (Figure 2C,D, category 1b). The 18 chlamydial genes in category 2 were lethal to yeast cells under high gene expression and showed no increased sensitivity to TBZ under low expression (Figure 2C,D). Thus, genes in categories 1a, 1b and 2 had no measurable effect on the yeast MT cytoskeleton and were not analyzed further. A list of which protein was put into which category is shown in Table S1B.

The remaining 13 chlamydial genes all caused an increased sensitivity to TBZ when expressed in yeast. Depending on the severity of the phenotypes of the transformants, chlamydial genes were grouped into categories 3a, 3b and 4. Four genes caused reduced growth of the transformants on TBZ under high expression conditions (category 3a), while the expression of a further three resulted in lethality on TBZ-containing media (category 3b). Lastly, the expression of six chlamydial genes resulted in reduced growth on media without TBZ and lethality on media with TBZ (category 4) (Figure 2C,D). Thus, 13/116 chlamydial

genes tested in our *S. pombe* assay gave rise to increased sensitivity to an MT poison, suggesting that they encoded chlamydial proteins that modulated the MT cytoskeleton of the host cell.

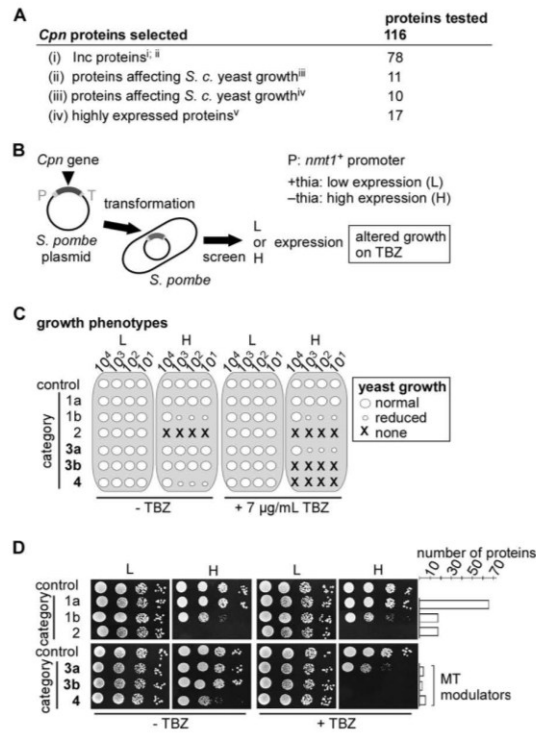


Figure 2. Identification of *Cpn* MT-modulating proteins via fission yeast. (A) The 116 *Cpn* proteins chosen for the analysis were selected from Inc proteins (i, [39]; ii, [45]), proteins that affect *S. cerevisiae* yeast growth (iii, [46]; iv, [47]) or those that are highly expressed in a transcriptome analysis (v, [48]). (B) Schematic representation of the screen setup. Each *Cpn* gene (dark grey) was cloned into an *S. pombe* plasmid flanked by the thiamine-repressible *S. pombe nmt1+* promoter (P) and *nmt1+* terminator (T). *S. pombe* wild-type cells transformed with such a plasmid were tested for growth defects in the presence of 7 µg/mL of the MT-destabilizing drug thiabendazole (TBZ). The presence of thiamine (+thia) resulted in low expression (L) from the *nmt1+* promoter, while no thiamine (-thia) resulted in high expression (H) from *nmt1+*. (C) Schematic representation of a serial dilution patch assay (10^4 – 10^1 cells) that showed all possible phenotypes scored by the expression of a chlamydial gene in *S. pombe*. Growth of transformants was compared with a transformant expressing a control plasmid (no chlamydial gene). Normal growth (similar to control transformant growth) (big circle), reduced growth (small circle) and no growth (X). (D) Examples of serial dilution patch tests of a control transformant and categories 1 to 4 shown in (C). Overall, 67/116 *Cpn* genes tested gave rise to yeast growth phenotype 1a, 18/116 to 1b, 18/116 to 2, 4/116 to 3a, 3/116 to 3b and 6/116 to category 4 phenotype. Sensitivity to TBZ was scored after 6 days at 25 °C. Chlamydial proteins that when expressed in yeast gave rise to category 3a, 3b or 4 phenotypes were chosen for further analysis.

Of the 13 chlamydial proteins identified in our yeast screen, 12 had initially been predicted to be Inc proteins [39]. However, the Phobius prediction program showed that CPn0045 did not fit the criteria for Inc proteins (Figure S2), thus 11/13 proteins were likely to be Inc proteins. As shown in Figure S2, the 11 candidates shared the typical Inc structure with the N- and C-termini of each protein facing the host cytosol. CPn0821 had no

transmembrane (TM) domain and was likely to be a soluble protein (Table S2). None of the 13 identified *Cpn* proteins has been characterized to date in relation to chlamydial infection. As shown in Table S2, 5/13 proteins, namely, CPn0065, CPn0312, CPn0443, CPn0565 and CPn0821, had a putative homolog in *Ctr* and other chlamydia, while 1/13, namely, CPn0186, had a homolog in *Ctr* only. The identity between homologs is limited (24% to 35% for full-length proteins). A total of 2/13 proteins, namely, CPn0357 and CPn0365, had homologs in other chlamydia but not in *Ctr*. The remaining five proteins, namely, CPn0045, CPn0216, CPn0284, CPn0372 and CPn1027, were unique to *Cpn* (Table S2).

2.3. *S. pombe* Tubulin Mutants Became Synthetically Lethal upon the Expression of Chlamydial Genes

To further characterize the modulation of MTs by the 13 chlamydial proteins, we tested (i) whether yeast transformants expressing one of these genes were also sensitive to the MT inhibitor methyl benzimidazol-2-yl-carbamate (MBC) and (ii) whether the expression of these genes in conditional-lethal tubulin mutant strains led to synthetic lethality. In all cases, growth on the MBC-containing medium was similar to that observed for the TBZ-containing medium (summarized in Figures 3A and S3A). Furthermore, and in contrast to the expression in wild-type cells, low-level expression of these chlamydial genes in the cold-sensitive α -tubulin *nda2-KM52* or β -tubulin *nda3-KM311* mutant strains [50] led to massive growth reduction at the semi-permissive temperature of 22 °C (Figures 3A,B and S3B,C). High-level expression of all 13 chlamydial genes in these tubulin mutant strains was lethal under all conditions.

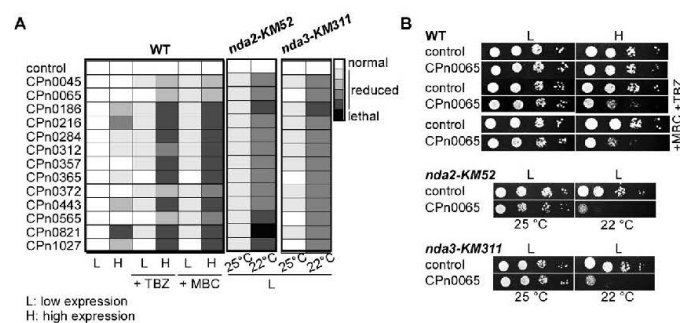


Figure 3. Expression of all 13 *Cpn* proteins in yeast resulted in MT hypersensitivity and synthetic lethality with tubulin mutants. **(A)** Growth phenotypes of *S. pombe* transformants that expressed one of the indicated 13 *Cpn* genes (systematic names on the left). The severity of the growth defect is indicated by the shades of the box (the darker, the more severe). The strains analyzed were the wild-type (WT) and the cold-sensitive *nda2-KM52* and *nda3-KM311* mutant strains. Media was with TBZ or MBC if indicated. Growth of WT was undertaken for 5 days at 25 °C. The tubulin mutant strains grew for six days at the indicated temperatures. Top panel in **(B)**: *S. pombe* serial dilution patch tests (10^4 – 10^1 cells) of *cpn0065*-expressing WT cells grown under plasmid-selective conditions at 25 °C for 6 days without or with either 7 μ g/mL TBZ or 2.5 μ g/mL MBC; L: low expression, H: high expression. Middle and bottom panels: serial dilution patch tests of cold-sensitive *nda2-KM52* and *nda3-KM311* transformants that expressed *cpn0065* incubated at 25 °C or 22 °C for 6 days; L: low expression.

2.4. The *S. pombe* Interphase MT Cytoskeleton Became Highly Aberrant upon the Expression of Chlamydial Genes

To determine whether and how the 13 identified chlamydial proteins altered the *S. pombe* MT cytoskeleton, we used a GFP- α -tubulin strain to visualize MTs via life-cell imaging. This strain endogenously expresses the minor α -tubulin (*S. pombe* has two α -tubulin genes) fused to GFP via the weak *nmt81* promoter, which leads to slightly altered MT properties compared with a wild-type strain [51,52].

Expression of all 13 *Cpn* genes in this strain led to TBZ sensitivity (Figure S3D) and altered interphase MT organization (Figure 4A). In wild-type cells, the three to four polarized MT bundles present in the cytoplasm orientated along the long axis of the cell, extending with their MT-plus ends toward the cell end and their MT-minus ends overlapping at the cell center (control in Figure 4A, shown diagrammatically in Figure 4B). MT-plus ends reaching a cell tip will pause before depolymerizing back to the cell center [53,54].

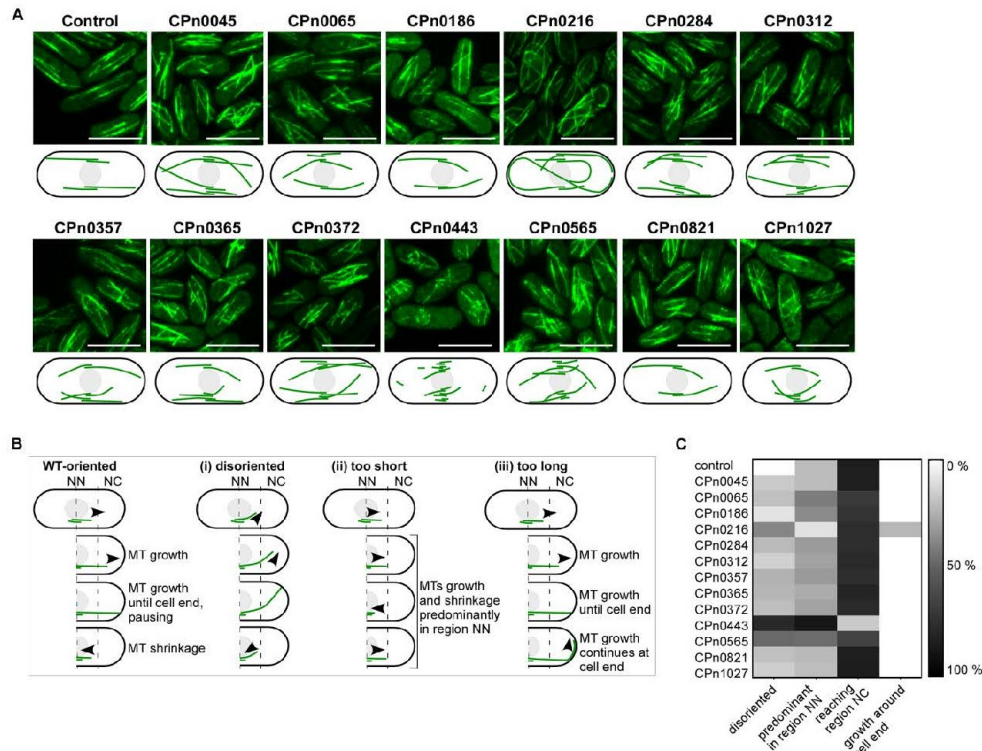


Figure 4. *Cpn* proteins cause massive alterations in the *S. pombe* interphase MT cytoskeleton. *S. pombe* cells that expressed *gfp- α -tubulin* (*nmt81::GFP- α tb2⁺*) were transformed with a control plasmid or plasmids carrying one of the 13 *Cpn* genes highly expressed from the *nmt1⁺* promoter. (A) Photomicrographs (MTs in green) and the corresponding schematic representations. Scale bars: 10 μ m. (B) Schematic illustration of WT interphase MT dynamics and the alterations observed for *Cpn* gene expressing cells. (i) Disoriented MTs, (ii) aberrantly short MTs or (iii) aberrantly long MTs. Black arrowheads show the directions moved for growing/depolymerizing MT. Cells were divided into 3 parts: the middle region was defined as being close to the nucleus (NN) and the other two regions as NC (regions close to either cell end). (C) Heatmap of the aberrant interphase MT phenotypes caused by *Cpn* proteins as described in (B). A total of 100 MTs/transformant strains were counted for disoriented MTs, MTs predominant in region NN only, MTs reaching the cell end (region NC) and MTs that continued to grow when the cell end had been reached (growth around cell end).

All yeast transformants expressing one of the 13 chlamydial genes showed alterations of the MT cytoskeleton; some of them were severe (Figure 4A–C). The most prominent were MT bundles that were not aligned with the long axis of the cell, such as those seen for CPn0565 transformants, which were much shorter than wild-type MTs, as seen in transformants expressing CPn0443, or MT bundles that were much longer than those of the wild-type and curled around the cell tip, as observed for CPn0216 transformants

(Figure 4A–C). To better define the MT phenotypes observed, we divided a cell into three parts and quantitatively determined via live-cell imaging the number of MTs in the middle part close to the nucleus, MT bundles that were not oriented along the long-axis of the cell and MT bundles that curled around the cell tip (Figure 4B). All transformants expressing a chlamydial gene featured misorientated MT bundles, but with the exception of CPn0443 transformants, such MT bundles were still able to reach the cell tip (Figure 4C). Transformants that expressed CPn0065, CPn0443 or CPn0565 all had abnormally short MTs. The CPn0443 phenotype was the most severe, with the vast majority of MTs never reaching the cell end (Figure 4A,C). Such short MTs are reminiscent of strains with a deletion of the *mal3*⁺ gene [55]. Mal3 is a member of the plus-end-binding protein 1 (EB1) family that tracks MT-plus ends and is central to the regulation of MT dynamics [56]. In contrast, the expression of CPn0216 resulted in MTs that were aberrantly long, as MT plus-ends continued to grow upon reaching the cell tip (Figure 4C). Such a phenotype was observed in various mutants of MT-modulating proteins, such as components of the yeast MTOC or kinesin-8 motor proteins [57,58].

We concluded that all 13 chlamydial proteins altered the yeast MT interphase cytoskeleton, albeit in different ways, demonstrating that modulation of the host MT during a chlamydial infection must be manifold and diverse.

2.5. CPn0216 and CPn0443 Altered the MT Dynamics

We chose transformants that expressed either CPn0216 or CPn0443 for further analysis, as these cells showed the most aberrant MT cytoskeleton: *cpn0216* expression led to abnormally long MTs that continued to grow once the cell tip was reached, while *cpn0443* expression resulted in aberrantly short MTs (Movies S1–S3). Using live-cell imaging of GFP- α -tubulin transformants, MTs of the control cells polymerized from the vicinity of the nucleus in an oriented manner along the long cell axis to the cell end, followed by pausing and depolymerizing back to the nucleus (diagrammatically shown in Figure 5A and Movie S1). This type of MT dynamic pattern occurred many times during the interphase. Individual dynamics of MT bundles of control transformants are shown in Figure 5B. In contrast, MTs of transformants expressing CPn0216 showed an aberrant and much more diverse phenotype, with the most severe being MT bundles that polymerized faster than in the wild-type and did not pause upon reaching the cell end. Instead, these MT-plus ends continued to grow, resulting in curved MTs before catastrophe (Figure 5C and comparison with the control in Figure 5E; Movie S2). In contrast, CPn0443-affected MTs did not reach the cell tip but showed multiple rounds of polymerization and depolymerization events resulting in aberrantly short MTs (Figure 5D and comparison with the control in Figure 5E; Movie S3).

2.6. CPn0443 Associated with MTs in Different Cell Systems

Next, we determined whether the phenotype observed upon CPn0443 expression was caused by CPn0443 binding to MTs. CPn0443 has a moderate overall protein identity of 35% for *Ctr* CT005/IncV. IncV is located in the inclusion membrane and tethers this to the endoplasmic reticulum (ER) to form membrane contact sites (MCS), which are crucial for nonvesicular trafficking-based interorganelle communication [59]. To determine the subcellular localization of CPn0443, we expressed plasmid-encoded tagged variants in yeast and human cells. Microscopic analysis of CPn0443-mCherry-expressing yeast cells showed aberrantly short interphase MTs, as seen when the untagged CPn0443 was expressed, confirming that the tagged protein was functional (Figure 6A). The predominant localization of this chlamydial protein in *S. pombe* was ER-like, with 68.7% of cells analyzed showing this localization [60] (Figure 6A, second row). As short MTs were present close to the nucleus, we also observed some co-staining with MT structures. A subpopulation of CPn0443-mCherry-expressing yeast cells (31.3% of all analyzed cells) showed a clear MT colocalization (Figure 6A, rows three and four). We concluded that in *S. pombe*, CPn0443 can associate with a subpopulation of MTs.

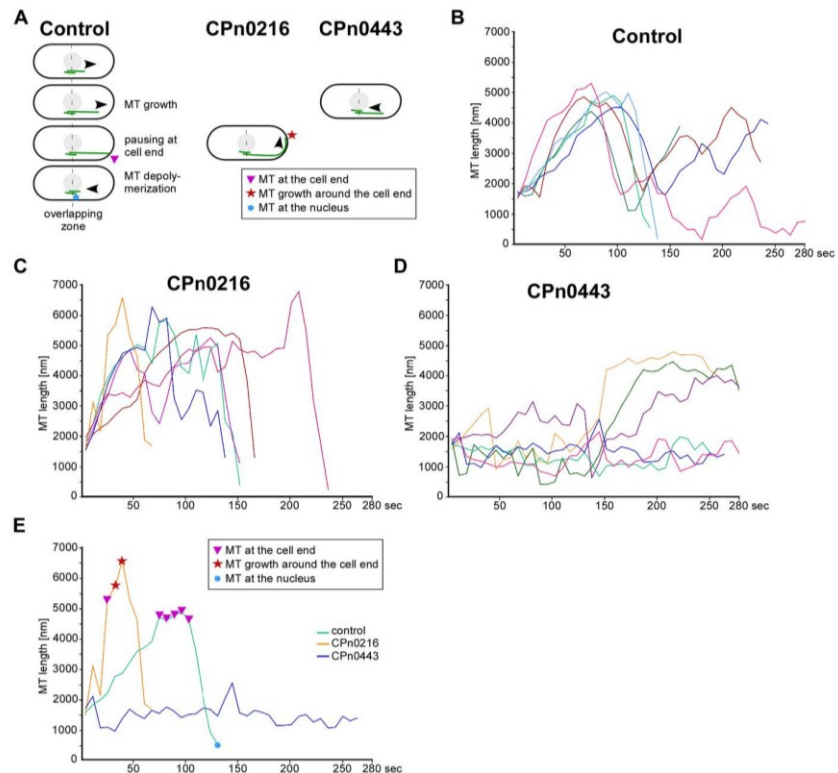


Figure 5. Expression of chlamydial CPn0216 or CPn0443 proteins altered the MT dynamics in yeast. (A) Diagrammatic representation of wild-type MT dynamics of an *S. pombe* interphase cell (control cells) and the main differences observed in yeast transformants that expressed CPn0216 or CPn0443. Interphase MTs from control cells polymerized from the vicinity of the nucleus in an oriented manner along the long cell axis to the cell end, then paused (pink triangle) and depolymerized back to the nucleus (blue dot). MTs of CPn0216 expressing cells did not stop polymerization once the cell end was reached but continued to grow around the cell end, resulting in a “curling” phenotype (red star), while the MTs of CPn0443 expressing cells depolymerize before reaching the cell end. (B–D) Examples of the dynamic behavior of individual interphase MTs from the control, CPn0216- or CPn0443-expressing cells that demonstrated consistently aberrant MT dynamics caused by the expression of a chlamydial protein. Each color represents MT dynamics for individual MTs from cells transformed with the indicated plasmid. (E) Representative examples of the dynamic behavior of a single MT from either a control, CPn0216- or CPn0443-expressing cell. The MT dynamics of MTs that were 1.5–2 μm in length (from the middle of the MT overlap zone at the nucleus) were measured via live-cell imaging of GFP- α -tubulin-expressing transformants.

Next, we determined the CPn0443 localization in human epithelial U2OS cells. For this analysis, U2OS cells were transfected for 18 h with a plasmid containing *gfp*-tagged *cpn0443*. Interestingly, we found results similar to ours for the fission yeast, namely, that 75% of CPn0443-expressing cells showed co-localization of the chlamydial protein with the ER (visualized via calnexin staining) (Figure 6B, top panels). In the remaining 25% of CPn0443-expressing cells, the chlamydial protein was associated with the MT network (Figure 6B, bottom panels). MTs with CPn0443-GFP association showed different degrees of an aberrant MT cytoskeleton, including thick, cable-like MTs that were probably due to varying CPn0443-GFP expression levels. Surprisingly, 33% of cells with CPn0443-GFP

that co-localized with MTs also showed calnexin co-localization with MT (Figure 6C). In such cases, MTs were cable-like, which was reminiscent of the overexpression of known microtubule regulators [61–63].

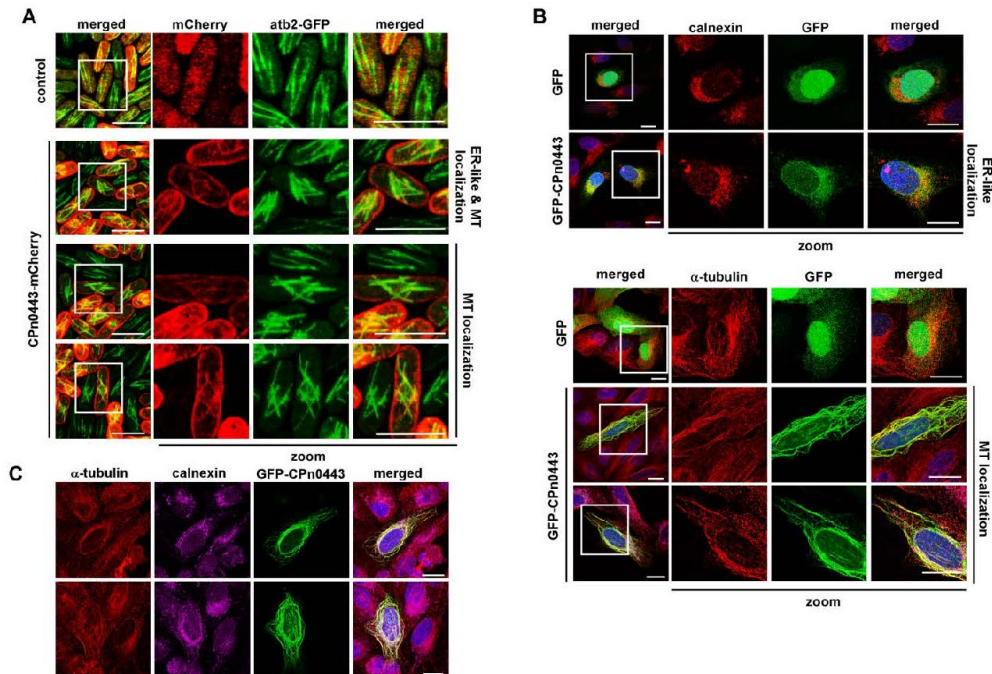


Figure 6. Ectopically expressed CPn0443 localized with the MT cytoskeleton and the ER. **(A)** Photomicrographs of GFP-α-tubulin-expressing (green) *S. pombe* cells (*nmt81::GFP-atb2⁺*). Cells were transformed with plasmids expressing mCherry (control) or CPn0443-mCherry. CPn0443-mCherry (red) co-localized with ER-like structures and partially with MTs (green). White boxes show the areas of enlargement; scale bar: 10 μm. Examples shown are representative cells from 3 independent experiments analyzing 50 cells/experiment. **(B)** Confocal images of fixed human U2OS cells that expressed either *gfp* or *gfp-cpn0443*. *gfp-cpn0443*-expressing cells that showed an ER or MT co-localization. ER was visualized with the anti-calnexin antibody (red), MTs with the anti-α-tubulin antibody (red), and DNA with DAPI (blue). White boxes show enlargement (zoom). The examples shown are representative of two independent experiments that analyzed 50 transfected cells/experiment. **(C)** Fluorescent microscopy images of fixed U2OS cells that expressed *gfp-cpn0443* showing co-localization with altered MTs and an altered ER. MTs were visualized with the anti-α-tubulin antibody (red), ER with the anti-calnexin antibody (magenta) and DNA with DAPI (blue). **(B,C)** scale bars: 10 μm.

2.7. CPn0443 Had Microtubule-Binding Activity

We then explored the possibility that the observed MT defects in CPn0443-expressing cells were a result of direct MT binding by this chlamydial effector protein. Considering that the expression of full-length CPn0443 or CPn0443¹⁶⁴⁻⁴¹⁷ resulted in comparable microtubule defects in *S. pombe* (Figure 7A,B), the MT regulatory domain was likely to be present in the smaller CPn0443¹⁶⁴⁻⁴¹⁷ variant. As we were unable to purify the full-length GST-tagged protein, we purified GST-CPn0443¹⁶⁴⁻⁴¹⁷ and performed MT co-sedimentation assays with Taxol-stabilized MTs [64]. After incubation at RT, MTs and purified proteins were ultracentrifuged at 100,000× *g* under conditions that are sufficient for the sedimentation of large proteinaceous structures, such as MTs. Under these conditions, the vast majority of a GST control protein remained in the soluble fraction (Figure 7C-i) and only a small

percentage co-sedimented with MTs in the pellet fraction (Figure 7C-ii). However, GST-CPn0443¹⁶⁴⁻⁴¹⁷ was almost entirely found in the pellet fraction (Figure 7C-iv) together with MTs, demonstrating that GST-CPn0443¹⁶⁴⁻⁴¹⁷ binds MTs directly (Figures 7C and S4B).

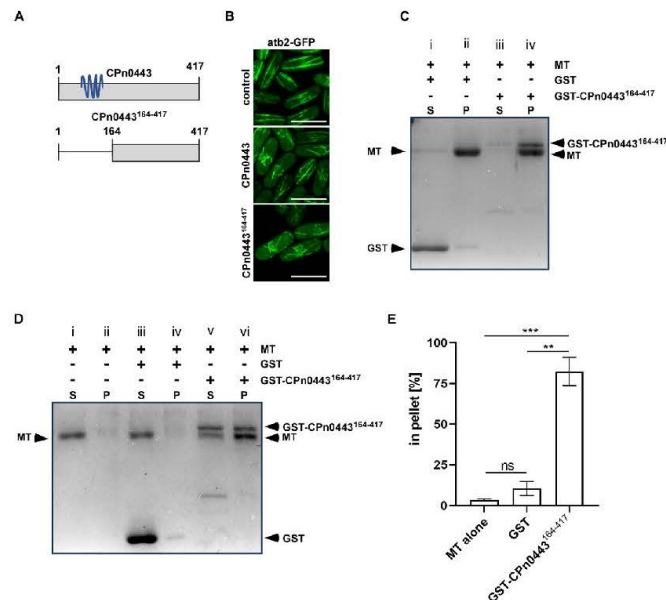


Figure 7. CPn0443 bound MTs. (A) Schematic illustration of the CPn0443 full-length protein and CPn0443¹⁶⁴⁻⁴¹⁷ variant with deletion of the N-terminus. Transmembrane domains are shown in blue. (B) Photomicrographs of GFP- α -tubulin-expressing (green) *S. pombe* cells (*hmt81::GFP-atb2⁺*) expressing either CPn0443 or the variant CPn0443¹⁶⁴⁻⁴¹⁷. Expressions of both CPn0443 and CPn0443¹⁶⁴⁻⁴¹⁷ gave rise to abnormally short MTs compared with the control cells. (C) A representative MT co-sedimentation assay showing a direct interaction between GST-CPn0443¹⁶⁴⁻⁴¹⁷ and MTs. Bacterially expressed recombinant GST or GST-CPn0443¹⁶⁴⁻⁴¹⁷ and porcine-derived Taxol-stabilized MTs were incubated at RT followed via high-speed centrifugation (100,000 $\times$ g). Supernatant (S) and pellet (P) fractions were separated via a 15% SDS-PAGE followed by Coomassie staining. Matching control samples without MTs are found in Supplementary Figure S4B. (D) SDS gel analysis of the formation of higher-order MT structures was performed in the presence of GST or GST-CPn0443¹⁶⁴⁻⁴¹⁷ and Taxol-stabilized MTs. After low-speed centrifugation (4000 $\times$ g), equivalent amounts of pellet and supernatant were processed as in (C). (E) Quantification of the MTs found in pellet fractions shown in (D); ns, not significant; $p < 0.0018$ (**), $p < 0.0008$ (***). Results represent typical examples from three independent experiments. Error bars denote $\pm$ SEM. Two-tailed unpaired Student's *t*-test was used to determine statistical significance.

We next investigated whether GST-CPn0443¹⁶⁴⁻⁴¹⁷ was able to modify or aggregate MTs. We took advantage of differential centrifugation and its ability to separate regular MT cylinders from larger macromolecular structures produced via MT bundling. Following a 4000 $\times$ g centrifugation, MTs were found in the soluble fraction when incubated with a buffer (Figure 7D-i) or a GST control (Figure 7D-iii). However, incubation with GST-CPn0443¹⁶⁴⁻⁴¹⁷ generated larger MT structures that were predominantly found in the pellet fraction (Figure 7D-vi). Additionally, GST-CPn0443¹⁶⁴⁻⁴¹⁷ was also able to generate large MT structures that were even pelleted at 100 $\times$ g (Figure S4A), similar to known MT-binding proteins that were proposed to bundle MTs [65].

2.8. Ectopically Expressed CPn0443 Attenuated *Cpn* Infection

To determine whether ectopically expressed CPn0443 affected the *C. pneumoniae* infection efficiency, we infected *gfp* (control) or *cpn0443-gfp*-expressing U2OS cells with *Cpn* EBs for 30 h (Figure 8A). We observed a 26% reduction in *Cpn*-infected *cpn0443-gfp*-expressing cells in comparison to the control (Figure 8B). Furthermore, the number of inclusions per cell was significantly decreased compared with the control cells (Figure 7C). This demonstrated that *cpn0443*-expression had a negative impact on *Cpn* infection in mammalian cells.

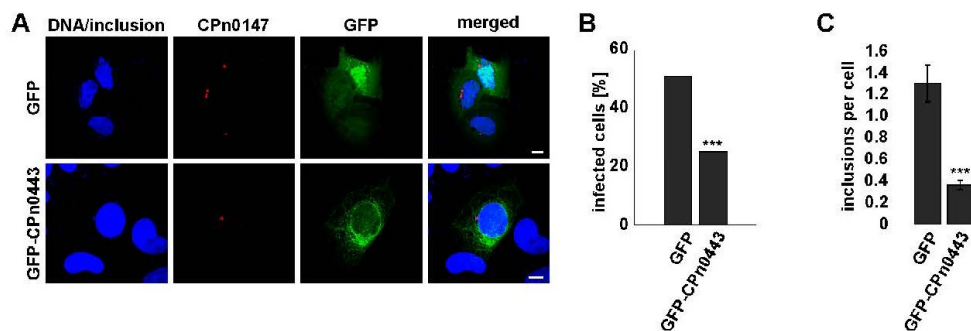


Figure 8. Ectopically expressed CPn0443 resulted in reduced *Cpn* infection. **(A)** Confocal fluorescence images of GFP or GFP-CPn0443-expressing (green) U2OS cells followed by *Cpn* infection (MOI 1) for 30 h. The chlamydial inclusion membrane was visualized with the anti-CPn0147 antibody (red) and DNA/inclusions with DAPI (blue). Scale bars: 5 µm. **(B,C)** Quantification of the number of infected cells **(B)** and chlamydial inclusions **(C)** per cell. U2OS cells transfected with GFP or GFP-CPn0443 and infected with EBs were analyzed. Error bars denote $\pm$ SEM. Two-tailed unpaired Student's *t*-test; $p < 0.001$ (***). $n = 2$; 50 cells per experiment and plasmid.

3. Discussion

3.1. The MT Cytoskeleton Played a Vital Role in *C. pneumoniae* Infection

The fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* is one of two model yeasts that were instrumental in discovering fundamental eukaryotic processes, such as the cell cycle, and were used as models of major human diseases [66–68]. As *S. pombe* has a very distinct interphase MT cytoskeleton, we used this yeast to identify *C. pneumoniae* proteins that manipulate the host cytoskeleton. *C. pneumoniae* is an obligate intracellular human pathogen that is very difficult to manipulate genetically, and thus, the *S. pombe* system has been an excellent tool to identify chlamydial MT modulators. The role of the MT cytoskeleton in bacterial infection processes had not yet been studied systematically, and thus, our analysis uncovered the important role of this cytoskeleton for a bacterial pathogen. Unexpectedly, of the 116 chlamydial proteins tested, which comprised more than 10% of the reduced *C. pneumoniae* genome, we found that 13 massively changed the yeast interphase cytoskeleton. It was possible that the 18 chlamydial proteins found in the yeast screen in category 2 also contributed to the manipulation of the host MT cytoskeleton, but this could not be assayed as the expression in yeast was lethal. Furthermore, although the basic principles between the yeast and the human MT cytoskeleton were conserved, *S. pombe* tubulin does not have all the modifications found in higher eukaryotes. For example, tubulin detyrosination does not appear to exist in *S. pombe*, while *C. trachomatis* stabilizes the MTs surrounding the inclusion via tubulin modifications [25,34,69,70]. This suggests that our screen was highly valuable in identifying MT-modulating proteins, but probably underestimated the number of *Cpn* proteins involved in MT modulation. We concluded that the contribution of the MT cytoskeleton in bacterial pathogenesis was vastly underrated.

3.2. The Identified MT-Modulating Proteins Were Expressed at Different Stages of the Chlamydial Developmental Cycle

None of the 13 candidates identified had been analyzed to date, and thus, the mechanisms by which *Cpn* targets aspects of MT biology during infection were unknown. However, transcriptome analysis data exist for all 13 candidates pinpointing to MT manipulation during the entire chlamydial life cycle [48,71,72]. Their expression profiles can be clustered into three classes: “early”, “mid” and “late” (adapted from [48]) (Figure S5). The six early genes, namely, *cpn0284*, *cpn0372*, *cpn0443*, *cpn0565*, *cpn0821* and *cpn1027*, are expressed at high levels already at 6 h post-infection (p.i.), implying that the corresponding proteins are functional at the early stage of infection. Thus, they might be required for establishing the infectious niche, localizing the inclusion in proximity to the nucleus and/or differentiating EBs from RBs. The four mid genes, namely, *cpn0045*, *cpn0186*, *cpn0312* and *cpn0367*, are expressed constitutively between 24 h and 48 h p.i., and thus, these proteins might play a role in RB cell division, immunity evasion or anti-apoptosis. The three late genes, namely *cpn0065*, *cpn0216* and *cpn0365*, have increased expression from 36 h p.i. (Figure S5) and their function could be linked to RB to EB re-differentiation, host cell exit or as EB effector proteins for the new infection.

3.3. Eleven of the Identified Proteins Were Inc Proteins

Effector proteins interacting with the host cell MT system need to be associated with the inclusion membrane or secreted into the host cell cytosol. Although our initial selection of chlamydial proteins included several predicted Inc proteins, and thus, was not random, it is noteworthy that 11/13 proteins were putative Inc proteins. To date, eight of these proteins have been analyzed for a functional N-terminal type-3-secretion signal (T3SS) and all of them were able to allow for the secretion of a reporter in the heterologous *Shigella* test system, which would allow for the secretion of these proteins during infection ([39] and references in there). For four of our T3SS-carrying proteins, a subcellular localization during infection was determined: CPn0186 and CPn1027 are associated with the inclusion membrane, while CPn0284 and CPn0357 are bacteria-associated [39,73,74]. It is possible that the two bacteria-associated proteins are secreted at low levels and that the microscopy only detected the bacterial cytosolic protein pool, but not the final subcellular localization.

3.4. Inc Proteins and Modulation of the MT Cytoskeleton

How then could the inclusion membrane proteins modulate the host MT cytoskeleton? Analysis of *Ctr* inclusion membrane points to the existence of inclusion membrane microdomains that interact with the MT network/MT-associated proteins [30,31]. Thus, it is possible that the identified Inc proteins interact with different components of the MT cytoskeleton in time and space during the infection cycle. How they crosstalk with the host MT, whether they act in concert and the outcome of the specific MT modulation for infection is at present unclear. However, the MT phenotype observed in yeast cells expressing such proteins might help in defining their function. *cpn0216* belongs to the late expressed genes (Figure S5) and the CPn0216 protein might therefore be required for the early steps in *Cpn* infection, which we showed required an intact MT cytoskeleton (Figure 1). CPn0216-expressing yeast cells showed abnormally long MTs that continued to grow although they have reached the cell end (Figure 5). Thus, the normal MT length control, which is required for numerous cellular functions, was altered by CPn0216. In *S. pombe*, the switch from MT polymerization to depolymerization once MT bundles reach the cell end is accomplished by two spatially distant competitor complexes: the stabilizing Mal3 (EB1 family)-containing complex and the destabilizing Kinesin-8-containing complex [75]. As CPn0216 can also exert its function in yeast cells without the stabilizing complex, we propose that CPn0572 antagonizes an MT destabilizer motor protein to modulate the MT cytoskeleton.

The second protein that we analyzed in more detail, as far as the MT-modulating function is concerned, was CPn0443. CPn0443 is an early expressed protein. This chlamydial protein can bind directly to Taxol-stabilized MTs in vitro and bundle them. In vivo, we

found the protein to be associated with the ER and part of the MT cytoskeleton in both yeast and human cells. Interestingly, the shape of the ER, which is MT-associated and contacts numerous organelles, was altered in CPn0443-expressing cells, as demonstrated by calnexin staining (Figure 6C, transfected versus non-transfected cells). The putative *Ctr* homolog of CPn0443, namely, IncV, was shown to link the chlamydial inclusion with the ER [76]. As ER proteins, such as p180, kinectin and CLIMP63, associate with specific MT populations and regulate ER positioning and organelle reallocation [77], we speculate that CPn0443 might mimic such a function.

In summary, our screen in *S. pombe* was the first systematic analysis to evaluate the importance of the host MT cytoskeleton for infection by a bacterial pathogen. We identified 13 uncharacterized *C. pneumoniae* proteins that were expressed at different stages of the chlamydial infection cycle and these all significantly altered the MT cytoskeleton. As this obligate intracellular pathogen has a highly reduced genome, this work uncovered a hitherto vastly underestimated role for this dynamic cytoskeleton in bacterial pathogenesis.

4. Material and Methods

4.1. Yeast Strains, Media and Growth Conditions

S. pombe strains used:

h[−] his3-D1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 (wild-type strain); h⁺ kan^R::nmt81::GFP-atb2⁺ ade6-M210 his3D1 leu1-32 ura4-D18; h⁺ mal3-pk-GFP::ura4⁺ ade6-M216 ura4-D18 leu1-32 his3-D1; h⁺ nda2-KM52 his3-D1 ade6-M21 leu1-32 ura4-D18; h[−] nda3-KM311 ade6-M210 leu1-32 ura4[−].

S. pombe strains were transformed with control plasmids pJR2-3XU or pJR2-3XL [49] or derivatives with a specific *Cpn* gene cloned behind the *nmt1*⁺ promoter. Generation of these plasmids was achieved via homologous recombination in *S. cerevisiae* CEN.PK2 [78]. For patch test assays, *S. pombe* transformants were grown in liquid selective minimal medium in the presence or absence of thiamine for 24 h at 25 °C, diluted, and plated on plasmid-selective minimal medium with/without 5 µg/mL thiamine and with/without 3–9 µg/mL TBZ (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) or with/without 0.5–4.5 µg/mL of MBC (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). At least two independent transformants per plasmid were assayed.

4.2. Generation of the *Cpn* Expression Library for Screening in *S. pombe*

A total of 116 *Cpn* genes [48,79] were selected for the *Cpn* expression library in *S. pombe*. Genes (lengths between 291–4614 bp) were amplified via PCR using *Cpn* GiD DNA as a template [80] and primers with 20-nucleotide homology to the respective gene and 40-nucleotide homology to the *S. pombe* expression vector pJR2-3XU. Genes were cloned downstream of the *nmt1*⁺ promoter using homologous recombination in *S. cerevisiae* CEN.PK2 and grown under plasmid-selective conditions [78]. Plasmids were isolated from *S. cerevisiae* and amplified in *E. coli* XL1-blue. Correct insert integration was verified via DNA sequencing. Genes with sequence deviation (nucleotide exchanges or insertions) were *cpn0045*, *cpn0132*, *cpn0150* and *cpn0132*. Cloning of these genes was repeated but subsequent sequence analysis revealed the existence of the sequence deviation in the *Cpn* GiD strain (Supplementary Table S1A) [81].

4.3. Yeast Protein Extracts and Western Blot Analysis

Whole yeast protein extracts were obtained as described [82]. Actin and tubulin were visualized on an 8% SDS-PAGE with the anti-actin antibody (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) or anti-α-tubulin antibody (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). The densitometry of the bands was determined using Image Lab 6.1 (BioRad, Hercules, CA, USA) and quantification using GraphPad Prism8 (Graph-Pad Software, Inc., Boston, MA, USA).

4.4. Mammalian Cell Lines and Production of Infectious *Cpn* EBs

HEp-2 (ATCC: CCL-23) and U2OS (ATCC: HTB-96) cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% FCS, MEM vitamins and nonessential amino acids (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). *Cpn* GiD was propagated in HEp-2 cells and EBs were purified in a 30% gastrographin solution (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Germany) and stored at -80°C in an SPG buffer (220 mM sucrose, 3.8 mM KH_2PO_4 , 10.8 mM Na_2HPO_4 , 4.9 mM L-glutamine).

4.5. Drug-Induced MT-Depolymerization and Chlamydia Infection

HEp-2 cells were treated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nocodazole (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) in supplemented DMEM medium for 30 min at 37°C , followed by nocodazole washout via replacement of the medium with fresh DMEM medium containing purified EBs (MOI 5), followed by centrifugation at 2980 rpm at 37°C for 20 min. The supernatant medium was then replaced with fresh DMEM medium containing 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cycloheximide. Cells were incubated at 37°C for 30 h. Samples were fixed at specific time points (0–30 h) with 3% paraformaldehyde in 37°C warm PBS for 10 min, permeabilized with 2% Saponin in PBS and immunostained for microscopy. MTs were visualized with the anti- α -tubulin antibody (OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD, USA), the inclusion membrane with an anti-CPn0147 antibody [83] and DNA with DAPI (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

4.6. Transfection and Staining of Mammalian Cells

The transfection of U2OS cells was achieved according to the manufacturer's instructions (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Transfected samples were fixed 18 h p.i. with fresh, pre-warmed 3% paraformaldehyde in 37°C warm PBS for 10 min and processed. MTs were visualized with the anti- α -tubulin antibody (OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD, USA), endoplasmatic reticulum (ER) with the anti-calnexin antibody (Santa Cruz Biotechnology) and DNA with DAPI (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). For a following *Cpn* infection, transfected cells were treated as described above.

4.7. Microscopy and Image Processing

Fixed mammalian cells: images were acquired using an inverse Nikon TiE Live Cell Confocal C2plus with a 100-x TIRF objective and a C2 SH C2 Scanner (Nikon Corporation, Tokyo, Japan). All images are displayed as maximum intensity projections, except when noted. Analysis of images and measurements were generated with Nikon Element software and ImageJ 1.47v (National Institutes of Health, Bethesda MD, USA).

Live-cell imaging of *S. pombe* cells: Yeast cells were grown in plasmid-selective minimal media (MM) with supplements [84]. Prior to microscopy, cells were grown at 25°C for 24 h in liquid MM without thiamine to the early/mid-log phase. Microscopy slides were prepared by mounting cells on agarose pads [85]. Live-cell images were acquired at RT using a Zeiss LSM 880 inverted confocal microscope (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Germany) equipped with an Airyscan detector and a Plan-Apochromat 63x/1.4 oil immersion objective lens. Raw Airyscan images were processed using the ZEN Black software's Airyscan Processing function. For the observation of MT dynamics, Z-stacks were collected at 7 s intervals and maximum intensity projections were used for analysis using ZEN 3.0 blue edition (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Germany).

For the quantification of MT dynamics, *nmt81::GFP-atb2⁺* cells of 9 to 12 μm in length were assayed. The antiparallel MT overlapping zones at the nucleus were chosen as the starting point for the measurement and MTs with a length of 1.5–2 μm were chosen for MT dynamic measurements.

4.8. MT Binding and Bundling Assays

Recombinant GST and GST-CPn0443^{164–417} were expressed in *E. coli* Rosetta (DE3) cells (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and purified using glutathione agarose beads (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) according to manufacturer's instructions and dialyzed o/n

at 4 °C in buffer A1 (50 mM Hepes-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 20% glycerol *w/v*). The purity of GST-CPn0443¹⁶⁴⁻⁴¹⁷ was analyzed using SDS-PAGE and Coomassie blue staining. Taxol-stabilized MTs were generated in vitro according to the manufacturer's instructions (Cytoskeleton Inc., Denver, CO, USA). MT binding assays were carried out as follows: 25 µL of Taxol-stabilized MTs (equivalent to 4 µM tubulin dimer) in 80 mM PIPES pH 7.0, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 72 µM GTP, 0.4% glycerol (*w/v*) and 18 µM Taxol were incubated with 25 µL of 4.6 µM GST-CPn0443¹⁶⁴⁻⁴¹⁷ or a GST control in buffer A1 for 30 min at RT. Mixtures were then layered on top of a 100 µL glycerol cushion (80 mM PIPES pH 7.0, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 60% glycerol, 20 µM Taxol) and centrifuged at 100,000× *g* at RT for 45 min. The supernatant was carefully collected before the removal of the glycerol cushion. Pellets were resuspended and loaded next to their corresponding supernatant fraction on a 15% SDS gel, followed by Coomassie staining. Identification of the formation of larger MT assemblies was achieved following the same procedure, except that the protein mixture was centrifuged at 4000× *g* at RT for 45 min. The densitometry of the bands in soluble and pellet fractions was carried out using Image Lab (BioRad, Hercules, CA, USA), and the values of MTs in pellet fractions were graphed as percentages of total MTs found in soluble and pellet fractions together.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24087618/s1>. References [86–89] are cited in the Supplementary Materials.

Author Contributions: C.W.: formal analysis, investigation, data curation. M.H.: formal analysis, investigation, data curation, writing—review and editing. A.R.A.-R.: investigation, writing—review and editing. J.H.H.: conceptualization, writing—review and editing, supervision, funding acquisition. U.F.: conceptualization, methodology, writing—original draft, writing—review and editing, supervision, project administration, funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by U.F.: DFG reference number FL 168/5-1, J.H.H.: DFG reference number HE 1383/13-1, M.H.: Jürgen Manchot Stiftung and C.W.: DFG FL168/5-1.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article or Supplementary Material.

Acknowledgments: We would like the Center for Advanced Imaging (CAi) at Heinrich-Heine University for their support in all live cell-imaging experiments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Hohmann, T.; Dehghani, F. The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork. *Cells* **2019**, *8*, 362. [CrossRef] [PubMed]
2. Goodson, H.V.; Jonasson, E.M. Microtubules and Microtubule-Associated Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2018**, *10*, a022608. [CrossRef] [PubMed]
3. Svitkina, T. The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2018**, *10*, a018267. [CrossRef]
4. Herrmann, H.; Aebi, U. Intermediate Filaments: Structure and Assembly. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2016**, *8*, a018242. [CrossRef] [PubMed]
5. Woods, B.L.; Gladfelter, A.S. The state of the septin cytoskeleton from assembly to function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2021**, *68*, 105–112. [CrossRef]
6. Aktories, K. Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 487–498. [CrossRef]
7. Stradal, T.E.B.; Schelhaas, M. Actin dynamics in host-pathogen interaction. *FEBS Lett.* **2018**, *592*, 3658–3669. [CrossRef]
8. Alqassim, S.S. Functional Mimicry of Eukaryotic Actin Assembly by Pathogen Effector Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 11606. [CrossRef]
9. Radhakrishnan, G.K.; Splitter, G.A. Modulation of host microtubule dynamics by pathogenic bacteria. *Biomol. Concepts* **2012**, *3*, 571–580. [CrossRef]
10. Blasi, F.; Tarsia, P.; Arosio, C.; Fagetti, L.; Allegra, L. Epidemiology of Chlamydia pneumoniae. *Clin. Microbiol. Infect.* **1998**, *4* (Suppl. S4), S1–S6. [CrossRef]

11. Porritt, R.A.; Crother, T.R. Chlamydia pneumoniae Infection and Inflammatory Diseases. *Forum Immunopathol. Dis. Ther.* **2016**, *7*, 237–254. [\[CrossRef\]](#)
12. Campbell, L.A.; Hahn, D.L. Chlamydia pneumoniae Infections. In *Chlamydia Biology: From Genome to Disease*; Tran, M., Hegemann, J.H., Sütterlin, C., Eds.; Caister Academic Press: Wymondham, UK, 2020; pp. 31–58.
13. Schachter, J. Infection and Disease Epidemiology. In *Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity*; Stephens, R.S., Ed.; ASM Press: Washington, DC, USA, 1999; pp. 139–169.
14. Jordan, S.; Nelson, D.; Geisler, W.M. Chlamydia trachomatis Infections. In *Chlamydia Biology: From Genome to Disease*; Tran, M., Hegemann, J.H., Sütterlin, C., Eds.; Caister Academic Press: Wymondham, UK, 2020; pp. 1–30.
15. Elwell, C.; Mirrashidi, K.; Engel, J. Chlamydia cell biology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14*, 385–400. [\[CrossRef\]](#)
16. Hybiske, K.; Stephens, R.S. Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium Chlamydia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 11430–11435. [\[CrossRef\]](#)
17. Murray, A.; Ward, M.E. Control mechanisms governing the infectivity of Chlamydia trachomatis for HeLa cells: The role of calmodulin. *J. Gen. Microbiol.* **1984**, *130*, 193–201. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Schramm, N.; Wyrick, P.B. Cytoskeletal requirements in Chlamydia trachomatis infection of host cells. *Infect. Immun.* **1995**, *63*, 324–332. [\[CrossRef\]](#)
19. Majeed, M.; Kihlstrom, E. Mobilization of F-actin and clathrin during redistribution of Chlamydia trachomatis to an intracellular site in eucaryotic cells. *Infect. Immun.* **1991**, *59*, 4465–4472. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Ward, M.E.; Murray, A. Control mechanisms governing the infectivity of Chlamydia trachomatis for HeLa cells: Mechanisms of endocytosis. *J. Gen. Microbiol.* **1984**, *130*, 1765–1780. [\[CrossRef\]](#)
21. Grieshaber, S.S.; Grieshaber, N.A.; Hackstadt, T. Chlamydia trachomatis uses host cell dynein to traffic to the microtubule-organizing center in a p50 dynamitin-independent process. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 3793–3802. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Clausen, J.D.; Christiansen, G.; Holst, H.U.; Birkelund, S. Chlamydia trachomatis utilizes the host cell microtubule network during early events of infection. *Mol. Microbiol.* **1997**, *25*, 441–449. [\[CrossRef\]](#)
23. Kumar, Y.; Valdivia, R.H. Actin and intermediate filaments stabilize the Chlamydia trachomatis vacuole by forming dynamic structural scaffolds. *Cell Host Microbe* **2008**, *4*, 159–169. [\[CrossRef\]](#)
24. Volceanov, L.; Herbst, K.; Biniossek, M.; Schilling, O.; Haller, D.; Nolke, T.; Subbarayal, P.; Rudel, T.; Zieger, B.; Hacker, G. Septins arrange F-actin-containing fibers on the Chlamydia trachomatis inclusion and are required for normal release of the inclusion by extrusion. *mBio* **2014**, *5*, e01802–e01814. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Al-Zeer, M.A.; Al-Younes, H.M.; Kerr, M.; Abu-Lubad, M.; Gonzalez, E.; Brinkmann, V.; Meyer, T.F. Chlamydia trachomatis remodels stable microtubules to coordinate Golgi stack recruitment to the chlamydial inclusion surface. *Mol. Microbiol.* **2014**, *94*, 1285–1297. [\[CrossRef\]](#)
26. Clifton, D.R.; Fields, K.A.; Grieshaber, S.S.; Dooley, C.A.; Fischer, E.R.; Mead, D.J.; Carabeo, R.A.; Hackstadt, T. A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 10166–10171. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Hower, S.; Wolf, K.; Fields, K.A. Evidence that CT694 is a novel Chlamydia trachomatis T3S substrate capable of functioning during invasion or early cycle development. *Mol. Microbiol.* **2009**, *72*, 1423–1437. [\[CrossRef\]](#)
28. Ziegl, R.; Braun, C.; Hegemann, J.H. The Chlamydia pneumoniae Tarp Ortholog CPn0572 Stabilizes Host F-Actin by Displacement of Cofilin. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 511. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Romero, M.D.; Carabeo, R.A. Distinct roles of the Chlamydia trachomatis effectors TarP and TmeA in the regulation of formin and Arp2/3 during entry. *J. Cell Sci.* **2022**, *135*, jcs260185. [\[CrossRef\]](#)
30. Mital, J.; Lutter, E.I.; Barger, A.C.; Dooley, C.A.; Hackstadt, T. Chlamydia trachomatis inclusion membrane protein CT850 interacts with the dynein light chain DYNLT1 (Tetex1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *462*, 165–170. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Mital, J.; Miller, N.J.; Fischer, E.R.; Hackstadt, T. Specific chlamydial inclusion membrane proteins associate with active Src family kinases in microdomains that interact with the host microtubule network. *Cell. Microbiol.* **2010**, *12*, 1235–1249. [\[CrossRef\]](#)
32. Böcker, S.; Heurich, A.; Franke, C.; Monajembashi, S.; Sachse, K.; Saluz, H.P.; Hanel, F. Chlamydia psittaci inclusion membrane protein IncB associates with host protein Snapin. *Int. J. Med. Microbiol.* **2014**, *304*, 542–553. [\[CrossRef\]](#)
33. Dumoux, M.; Menny, A.; Delacour, D.; Hayward, R.D. A Chlamydia effector recruits CEP170 to reprogram host microtubule organization. *J. Cell Sci.* **2015**, *128*, 3420–3434. [\[CrossRef\]](#)
34. Wesolowski, J.; Paumet, F. Taking control: Reorganization of the host cytoskeleton by Chlamydia. *F1000Res* **2017**, *6*, 2058. [\[CrossRef\]](#)
35. Haines, A.; Wesolowski, J.; Ryan, N.M.; Monteiro-Bras, T.; Paumet, F. Cross Talk between ARF1 and RhoA Coordinates the Formation of Cytoskeletal Scaffolds during Chlamydia Infection. *mBio* **2021**, *12*, e0239721. [\[CrossRef\]](#)
36. Sherry, J.; Dolat, L.; McMahon, E.; Swaney, D.L.; Bastidas, R.J.; Johnson, J.R.; Valdivia, R.H.; Krogan, N.J.; Elwell, C.A.; Engel, J.N. Chlamydia trachomatis effector Dre1 interacts with dynactin to reposition host organelles during infection. *bioRxiv* **2022**, 2022.2004.2015.488217. [\[CrossRef\]](#)
37. Sutterlin, C.; Derre, I. Interactions of the Chlamydial Inclusion with the Host Cell. In *Chlamydia Biology: From Genome to Disease*; Tran, M., Hegemann, J.H., Sütterlin, C., Eds.; Caister Academic Press: Wymondham, UK, 2020; pp. 111–134.

38. Delevoye, C.; Nilges, M.; Dautry-Varsat, A.; Subtil, A. Conservation of the biochemical properties of IncA from *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia caviae*: Oligomerization of IncA mediates interaction between facing membranes. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 46896–46906. [\[CrossRef\]](#)
39. Dehoux, P.; Flores, R.; Dauga, C.; Zhong, G.; Subtil, A. Multi-genome identification and characterization of chlamydiae-specific type III secretion substrates: The Inc proteins. *BMC Genom.* **2011**, *12*, 109. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Archuleta, T.L.; Du, Y.; English, C.A.; Lory, S.; Lesser, C.; Ohl, M.D.; Ohl, R.; Spiller, B.W. The *Chlamydia* effector chlamydial outer protein N (CopN) sequesters tubulin and prevents microtubule assembly. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 33992–33998. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Nawrotek, A.; Guimaraes, B.G.; Velours, C.; Subtil, A.; Knossow, M.; Gigant, B. Biochemical and Structural Insights into Microtubule Perturbation by CopN from *Chlamydia pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 25199–25210. [\[CrossRef\]](#)
42. Hoog, J.L.; Schwartz, C.; Noon, A.T.; O'Toole, E.T.; Mastronarde, D.N.; McIntosh, J.R.; Antony, C. Organization of interphase microtubules in fission yeast analyzed by electron tomography. *Dev. Cell* **2007**, *12*, 349–361. [\[CrossRef\]](#)
43. Liodice, I.; Janson, M.E.; Tavormina, P.; Schaub, S.; Bhatt, D.; Cochran, R.; Czupryna, J.; Fu, C.; Tran, P.T. Quantifying Tubulin Concentration and Microtubule Number Throughout the Fission Yeast Cell Cycle. *Biomolecules* **2019**, *9*, 86. [\[CrossRef\]](#)
44. Sawin, K.E.; Tran, P.T. Cytoplasmic microtubule organization in fission yeast. *Yeast* **2006**, *23*, 1001–1014. [\[CrossRef\]](#)
45. Lutter, E.I.; Martens, C.; Hackstadt, T. Evolution and conservation of predicted inclusion membrane proteins in chlamydiae. *Comp. Funct. Genom.* **2012**, *2012*, 362104. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Sisko, J.L.; Spaeth, K.; Kumar, Y.; Valdivia, R.H. Multifunctional analysis of *Chlamydia*-specific genes in a yeast expression system. *Mol. Microbiol.* **2006**, *60*, 51–66. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Herbst, F. *Identifizierung und Charakterisierung Potentieller Neuer Effektorproteine aus Chlamydia pneumoniae*; Heinrich-Heine-Universität: Düsseldorf, Germany, 2011.
48. Maurer, A.P.; Mehlitz, A.; Mollenkopf, H.J.; Meyer, T.F. Gene expression profiles of *Chlamydomonas reinhardtii* during the developmental cycle and iron depletion-mediated persistence. *PLoS Pathog.* **2007**, *3*, e83. [\[CrossRef\]](#)
49. Moreno, M.B.; Duran, A.; Ribas, J.C. A family of multifunctional thiamine-repressible expression vectors for fission yeast. *Yeast* **2000**, *16*, 861–872. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Toda, T.; Umesono, K.; Hirata, A.; Yanagida, M. Cold-sensitive nuclear division arrest mutants of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Mol. Biol.* **1983**, *168*, 251–270. [\[CrossRef\]](#)
51. Garcia, M.A.; Vardy, L.; Koonrugs, N.; Toda, T. Fission yeast ch-TOG/XMAP215 homologue Alp14 connects mitotic spindles with the kinetochore and is a component of the Mad2-dependent spindle checkpoint. *EMBO J.* **2001**, *20*, 3389–3401. [\[CrossRef\]](#)
52. Kerres, A.; Jakopc, V.; Fleig, U. The conserved Spc7 protein is required for spindle integrity and links kinetochore complexes in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **2007**, *18*, 2441–2454. [\[CrossRef\]](#)
53. Hagan, I.M.; Hyams, J.S. The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* **1988**, *89 Pt 3*, 343–357. [\[CrossRef\]](#)
54. Hayles, J.; Nurse, P. A journey into space. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 647–656. [\[CrossRef\]](#)
55. Beinhauer, J.D.; Hagan, I.M.; Hegemann, J.H.; Fleig, U. Mal3, the fission yeast homologue of the human APC-interacting protein EB-1 is required for microtubule integrity and the maintenance of cell form. *J. Cell Biol.* **1997**, *139*, 717–728. [\[CrossRef\]](#)
56. Nehlig, A.; Molina, A.; Rodrigues-Ferreira, S.; Honore, S.; Nahmias, C. Regulation of end-binding protein EB1 in the control of microtubule dynamics. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74*, 2381–2393. [\[CrossRef\]](#)
57. Erent, M.; Drummond, D.R.; Cross, R.A.S. *pombe* kinesins-8 promote both nucleation and catastrophe of microtubules. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e30738. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Fujita, A.; Vardy, L.; Garcia, M.A.; Toda, T. A fourth component of the fission yeast gamma-tubulin complex, Alp16, is required for cytoplasmic microtubule integrity and becomes indispensable when gamma-tubulin function is compromised. *Mol. Biol. Cell* **2002**, *13*, 2360–2373. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Ende, R.J.; Murray, R.L.; D'Spain, S.K.; Coppens, I.; Derre, I. Phosphoregulation accommodates Type III secretion and assembly of a tether of ER-*Chlamydia* inclusion membrane contact sites. *eLife* **2022**, *11*, e74535. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
60. Flor-Parra, I.; Sabido-Bozo, S.; Ikeda, A.; Hanaoka, K.; Aguilera-Romero, A.; Funato, K.; Muniz, M.; Lucena, R. The Ceramide Synthase Subunit Lac1 Regulates Cell Growth and Size in Fission Yeast. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *23*, 303. [\[CrossRef\]](#)
61. Watanabe, K.; Takao, D.; Ito, K.K.; Takahashi, M.; Kitagawa, D. The Cep57-pericentrin module organizes PCM expansion and centriole engagement. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 931. [\[CrossRef\]](#)
62. Mang, J.; Korzeniewski, N.; Dietrich, D.; Sailer, V.; Tolstov, Y.; Searcy, S.; von Hardenberg, J.; Perner, S.; Kristiansen, G.; Marx, A.; et al. Prognostic Significance and Functional Role of CEP57 in Prostate Cancer. *Transl. Oncol.* **2015**, *8*, 487–496. [\[CrossRef\]](#)
63. Zhou, H.; Zheng, T.; Wang, T.; Li, Q.; Wang, F.; Liang, X.; Chen, J.; Teng, J. CCDC74A/B are K-fiber crosslinkers required for chromosomal alignment. *BMC Biol.* **2019**, *17*, 73. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Alberico, E.O.; Duan, A.R.; Goodson, H.V. Measuring Tau-microtubule affinity through cosedimentation assays. *Methods Cell Biol.* **2017**, *141*, 115–134. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Mollinari, C.; Kleman, J.P.; Jiang, W.; Schoehn, G.; Hunter, T.; Margolis, R.L. PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *J. Cell Biol.* **2002**, *157*, 1175–1186. [\[CrossRef\]](#)
66. Zhao, Y.; Lieberman, H.B. *Schizosaccharomyces pombe*: A model for molecular studies of eukaryotic genes. *DNA Cell Biol.* **1995**, *14*, 359–371. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

67. Nurse, P. A Journey in Science: Cell-Cycle Control. *Mol. Med.* **2017**, *22*, 112–119. [[CrossRef](#)]
68. Tuite, M.F. Yeast models of neurodegenerative diseases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2019**, *168*, 351–379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Alfa, C.E.; Hyams, J.S. Microtubules in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* contain only the tyrosinated form of alpha-tubulin. *Cell Motil. Cytoskelet.* **1991**, *18*, 86–93. [[CrossRef](#)]
70. Wesolowski, J.; Weber, M.M.; Nawrotek, A.; Dooley, C.A.; Calderon, M.; St Croix, C.M.; Hackstadt, T.; Cherfils, J.; Paumet, F. Chlamydia Hijacks ARF GTPases To Coordinate Microtubule Posttranslational Modifications and Golgi Complex Positioning. *mBio* **2017**, *8*, e02280-16. [[CrossRef](#)]
71. Albrecht, M.; Sharma, C.M.; Dittich, M.T.; Muller, T.; Reinhardt, R.; Vogel, J.; Rudel, T. The transcriptional landscape of *Chlamydia pneumoniae*. *Genome Biol.* **2011**, *12*, R98. [[CrossRef](#)]
72. Murra, G. *Identifizierung und Charakterisierung von Adhäsionsproteinen des Humanpathogenen Erregers Chlamydia pneumoniae*; Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Düsseldorf, Germany, 2009.
73. Luo, J.; Liu, G.; Zhong, Y.; Jia, T.; Liu, K.; Chen, D.; Zhong, G. Characterization of hypothetical proteins Cpn0146, 0147, 0284 & 0285 that are predicted to be in the *Chlamydia pneumoniae* inclusion membrane. *BMC Microbiol.* **2007**, *7*, 38. [[CrossRef](#)]
74. Flores, R.; Luo, J.; Chen, D.; Sturgeon, G.; Shivshankar, P.; Zhong, Y.; Zhong, G. Characterization of the hypothetical protein Cpn1027, a newly identified inclusion membrane protein unique to *Chlamydia pneumoniae*. *Microbiology* **2007**, *153*, 777–786. [[CrossRef](#)]
75. Meadows, J.C.; Messin, L.J.; Kamnev, A.; Lancaster, T.C.; Balasubramanian, M.K.; Cross, R.A.; Millar, J.B. Opposing kinesin complexes queue at plus tips to ensure microtubule catastrophe at cell ends. *EMBO Rep.* **2018**, *19*, e46196. [[CrossRef](#)]
76. Stanhope, R.; Flora, E.; Bayne, C.; Derre, I. IncV, a FFAT motif-containing *Chlamydia* protein, tethers the endoplasmic reticulum to the pathogen-containing vacuole. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 12039–12044. [[CrossRef](#)]
77. Zheng, P.; Obara, C.J.; Szczesna, E.; Nixon-Abell, J.; Mahalingan, K.K.; Roll-Mecak, A.; Lippincott-Schwartz, J.; Blackstone, C. ER proteins decipher the tubulin code to regulate organelle distribution. *Nature* **2022**, *601*, 132–138. [[CrossRef](#)]
78. Jakopc, V.; Walla, E.; Fleig, U. Versatile use of *Schizosaccharomyces pombe* plasmids in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **2011**, *11*, 653–655. [[CrossRef](#)]
79. Subtil, A.; Blocker, A.; Dautry-Varsat, A. Type III secretion system in *Chlamydia* species: Identified members and candidates [letter]. *Microbes Infect.* **2000**, *2*, 367–369. [[CrossRef](#)]
80. Jantos, C.A.; Heck, S.; Roggendorf, R.; Sen-Gupta, M.; Hegemann, J.H. Antigenic and molecular analyses of different *Chlamydia pneumoniae* strains. *J. Clin. Microbiol.* **1997**, *35*, 620–623. [[CrossRef](#)]
81. Weinmaier, T.; Hoser, J.; Eck, S.; Kaufhold, I.; Shima, K.; Strom, T.M.; Rattei, T.; Rupp, J. Genomic factors related to tissue tropism in *Chlamydia pneumoniae* infection. *BMC Genom.* **2015**, *16*, 268. [[CrossRef](#)]
82. Masumoto, H.; Matsuyama, S. The combination of NAD⁺-dependent deacetylase gene deletion and the interruption of gluconeogenesis causes increased glucose metabolism in budding yeast. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0194942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Molleken, K.; Hegemann, J.H. Acquisition of Rab11 and Rab11-Fip2-A novel strategy for *Chlamydia pneumoniae* early survival. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, e1006556. [[CrossRef](#)]
84. Moreno, S.; Klar, A.; Nurse, P. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* **1991**, *194*, 795–823. [[PubMed](#)]
85. Tran, P.T.; Paoletti, A.; Chang, F. Imaging green fluorescent protein fusions in living fission yeast cells. *Methods* **2004**, *33*, 220–225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Subtil, A.; Parsot, C.; Dautry-Varsat, A. Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery. *Mol. Microbiol.* **2001**, *39*, 792–800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Bannantine, J.P.; Griffiths, R.S.; Viratyosin, W.; Brown, W.J.; Rockey, D.D. A secondary structure motif predictive of protein localization to the chlamydial inclusion membrane. *Cell. Microbiol.* **2000**, *2*, 35–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Subtil, A.; Delevoye, C.; Balana, M.E.; Tastevin, L.; Perrinet, S.; Dautry-Varsat, A. A directed screen for chlamydial proteins secreted by a type III mechanism identifies a translocated protein and numerous other new candidates. *Mol. Microbiol.* **2005**, *56*, 1636–1647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Luo, J.; Jia, T.; Flores, R.; Chen, D.; Zhong, G. Hypothetical Protein Cpn0308 Is Localized in the *Chlamydia pneumoniae* Inclusion Membrane. *Infect. Immun.* **2007**, *75*, 497–503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

A functional yeast-based screen identifies the host microtubule cytoskeleton as a target of numerous *Chlamydia pneumoniae* proteins

Carolin Wevers ^{1*}, Mona Höhler ^{1*}, Abel R. Alcázar-Román ¹, Johannes H. Hegemann ^{2#}, Ursula Fleig ^{1#§}

¹Eukaryotic Microbiology, Institute of Functional Microbial Genomics, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany.

²Institute of Functional Microbial Genomics, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany.

* joint first authors

joint senior authors

§ Correspondence may be addressed to:
Ursula Fleig; Email: fleigu@hhu.de

Supplementary Tables, Figures and Legends

Table S1. Alterations in DNA sequence of some *Cpn* genes and summary of growth phenotypes of *S. pombe* transformants expressing one of the 116 *Cpn* proteins. A Genes with sequence deviation leading to altered amino acids. Green: wildtype *Cpn* GiD amino acid sequence; red: aa sequence deviation verified by sequencing. B The 116 *Cpn* proteins chosen for analysis were selected as indicated: Inc proteins (i, [1]; ii, [2]), proteins affecting *S. cerevisiae* yeast growth (iii, [3]; iv, [4]) or being highly expressed (v, [5]). Growth phenotypes of transformants expressing one of the 116 *Cpn* genes were grouped into one of the 4 categories defined in Figure. 2C.

A

<i>Cpn</i> gene	Difference to <i>Cpn</i> GiD genome	Position in DNA sequence (nt)	<i>Cpn</i> GiD aa sequence	Sequenced plasmid DNA sequence (aa)
<i>cpn0045</i>	Insert of 10 nt leads to changed aa sequence	1708	Tyr-Lys-Ser-Gly-Phe-Arg-Val-Stop (TGA)	Tyr-Arg-Arg-Asn-Lys-GluArg-Phe-Gln-Ser-Leu
<i>cpn0132</i>	nt exchange leads to aa exchange	748	Leu-Ser-Glu	Leu-Ala-Glu
<i>cpn0150</i>	nt exchange leads to aa exchange	3973	Asp-Cys-Asp	Asp-Ser-Asp
<i>cpn0912</i>	Insert of 27 nt	133	Ala-Glu	Ala-Asp-Glu-Ile-Gln-Leu-Pro-Ser-Pro-Glu

B

<i>Cpn</i> protein	Category	Ref.	<i>Cpn</i> protein	Category	Ref.
CPn0007	1a	i, ii	CPn0474	2	i, ii
CPn0026	1b	i, ii	CPn0480	2	i, ii
CPn0041	1b	i, ii	CPn0481	2	i
CPn0045*	3a	i, ii	CPn0488	1a	iii
CPn0061	1a	v	CPn0491	1a	iii
CPn0065	3a	i, ii	CPn0512	1a	v
CPn0066	2	i	CPn0517	1a	i, ii
CPn0067	1b	i, ii	CPn0518	1a	v
CPn0107	1b	v	CPn0523	1a	i, ii
CPn0124	1a	i, ii	CPn0524	1a	i, ii
CPn0126	1a	i, ii	CPn0525	1a	iii
CPn0129	2	ii	CPn0537	1a	i
CPn0131	1a	i, ii	CPn0544	1a	iii
CPn0132*	1a	i, ii	CPn0554	1a	i, ii
CPn0147	1a	i, ii	CPn0556	1a	i, ii
CPn0150*	1a	i, ii	CPn0565	3a	i, ii
CPn0157	1a	i	CPn0585	1a	i, ii
CPn0164	1a	i, ii	CPn0592	1a	iii
CPn0166	1a	i, ii	CPn0601	1a	i, ii
CPn0169	1a	i, ii	CPn0602	1a	i, ii
CPn0173	1b	i, ii	CPn0648	2	iii
CPn0186	4	i, ii	CPn0658	1a	v
CPn0203	1b	i	CPn0671	1b	v
CPn0212	1b	i, ii	CPn0729	1a	iii
CPn0214	1a	i, ii	CPn0746	1a	v
CPn0215	1a	i, ii	CPn0753	2	i, ii
CPn0216	4	i, ii	CPn0755	1b	i, ii
CPn0218	1a	ii	CPn0770	2	i, ii
CPn0241	2	ii	CPn0813	1a	iv
CPn0242	1a	i, ii	CPn0815	1a	iv
CPn0255	1a	iii	CPn0821	4	iii
CPn0262	1a	v	CPn0829	1b	i
CPn0284	3b	i, ii	CPn0830	2	i
CPn0285	2	i, ii	CPn0834	2	i
CPn0288	1a	i, ii	CPn0844	1a	v
CPn0291	1b	i, ii	CPn0850	1b	iv
CPn0292	1a	i, ii	CPn0852	1a	v
CPn0308	2	i, ii	CPn0869	1a	ii
CPn0312	3b	i, ii	CPn0879	1a	v
CPn0350	2	iii	CPn0906	1a	v
CPn0357	3b	i, ii	CPn0909	1a	v
CPn0365	4	i, ii	CPn0912*	1a	v
CPn0366	1a	i, ii	CPn0930	1a	i, ii
CPn0370	2	i, ii	CPn0938	2	i, ii
CPn0371	1b	i, ii	CPn0966	1a	iv
CPn0372	3a	i, ii	CPn0994	1a	i
CPn0381	1a	i	CPn0998	2	v
CPn0404	1a	i	CPn1003	1a	ii
CPn0409	1a	v	CPn1008	1a	i, ii
CPn0431	1a	i, ii	CPn1027	4	i
CPn0432	1b	i, ii	CPn1029	1b	i, ii
CPn0440	1a	i, ii	CPn1046	1a	v
CPn0441	1b	iii	CPn1051	1a	i, ii
CPn0442	2	i, ii	CPn1054	1a	i, ii
CPn0443	4	i, ii	CPn1055	1a	i, ii
CPn0456	1a	iv	CPn1060	1a	iv
CPn0465	1b	v	CPn1062	1a	iv
CPn0467	1b	iv	CPn1070	1a	iv

Table S2. Overview of the 13 *Cpn* proteins identified to modulate MTs. Characteristics of the 13 *Cpn* proteins identified in the screen include: aa length, localization of transmembrane domains (TM), predicted function and validated localization. Putative *Ctr* homologs are shown as are homologs from other chlamydia species. Inc: inclusion membrane protein; X: no homologue identified. i, [1]; ii, [6]; iii, [7]; iv, [8]; v, [9]; vi, [10]. For transmembrane domain prediction “Polyphobius prediction” was used and for protein identities PRALINE sequence alignment was used.

Protein name	<i>Chlamydia pneumoniae</i>				Literature	<i>Chlamydia trachomatis</i>		Identity [%] between <i>Cpn</i> and <i>Ctr</i> proteins				Conserved in other Chlamydia
	length (aa)	TMs (aa)	Localization Predicted	Validated		Predicted Homologue	length (aa)	Whole protein ¹	C-Term behind TMs ²	Protein without TMs ²		
CPh0045	574	(29-47)	Inc	X			X	X	X	X		X
CPh0065	576	(32-55); (61-86); (243-263); (269-291)	Inc	X		CT288 ³	563	24	24	26		C. muridarum
CPh0186	390	(38-62); (68-88)	Inc	Inclusion	i, ii	CT119 / IncA	273	28	28	29		X
CPh0216	145	(25-51); (57-81)	Inc	X			X	X	X	X		X
CPh0294	165	(33-56); (58-82)	Inc	bacteria	i, v		X	X	X	X		X
CPh0312	151	(7-26); (38-56); (95-112); (118-137)	Inc	X		CT101 ³	153	33	33	9		C. abortus (CAB456)
CPh0357	283	(27-52); (57-76)	Inc	bacteria			X	X	X	X		DUF1389 in C. pecorum, C. psittaci, C. abortus
CPh0365	339	(33-54); (60-79)	Inc	X			X	X	X	X		C. pecorum
CPh0372	105	(36-62); (68-90)	Inc	X			X	X	X	X		X
CPh0443	417	(53-74); (80-102); (114-138); (144-165)	Inc	X		CT005 / IncV ³	365	35	25	29		C. muridarum, C. caviae, C. psittaci, C. abortus, C. pecorum
CPh0565	366	(39-58); (64-85)	Inc	X		CT449 ³	110	34	X	X		C. abortus, C. pecorum, C. psittaci, C. caviae
CPh0821	334	X	unknown	X		CT566 ³	330	52	X	X		C. caviae, C. psittaci, C. abortus
CPh1027	527	(34-58); (64-89)	Inc	Inclusion	i, ii		X	X	X	X		X

X = no data

¹ Polyphobius Prediction

² PRALINE sequence alignment

* Alignment with the first 110 aa
i Deloux et al. 2011 doi: 10.1186/1471-2164-12-109
ii Subtil et al. 2001 https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02272.x
iii Flores et al. 2007 https://doi.org/10.1099/mic.0.2006.002956-0
iv Bannantine et al. 2000 DOI: 10.1046/j.1462-5822.2000.00029.x
v Subtil et al 2005 doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04647.x
vi Luo et al. 2007 doi: 10.1186/1471-2180-7-38

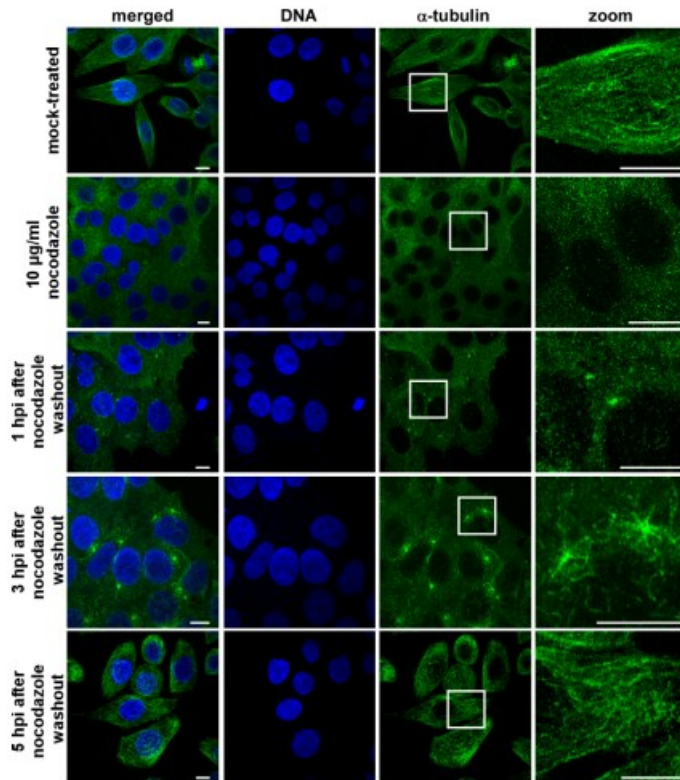


Figure S1. MT de-polymerization followed by re-polymerization after nocodazole removal. Confocal images of mock-treated (upper panels) or nocodazole-treated HEP-2 cells. Cells were incubated with 10 µg/ml nocodazole for 30 min at 37°C leading to a disassembled MT cytoskeleton (2nd lane from top). Nocodazole washout was performed via media exchange. Re-formation of the MT cytoskeleton was monitored after nocodazole washout and was complete after 5 hrs. MTs were visualized with anti- α -tubulin antibody (green) in fixed cells and DNA with DAPI (blue). White boxes show enlargements. Scale bars, 10 µm.

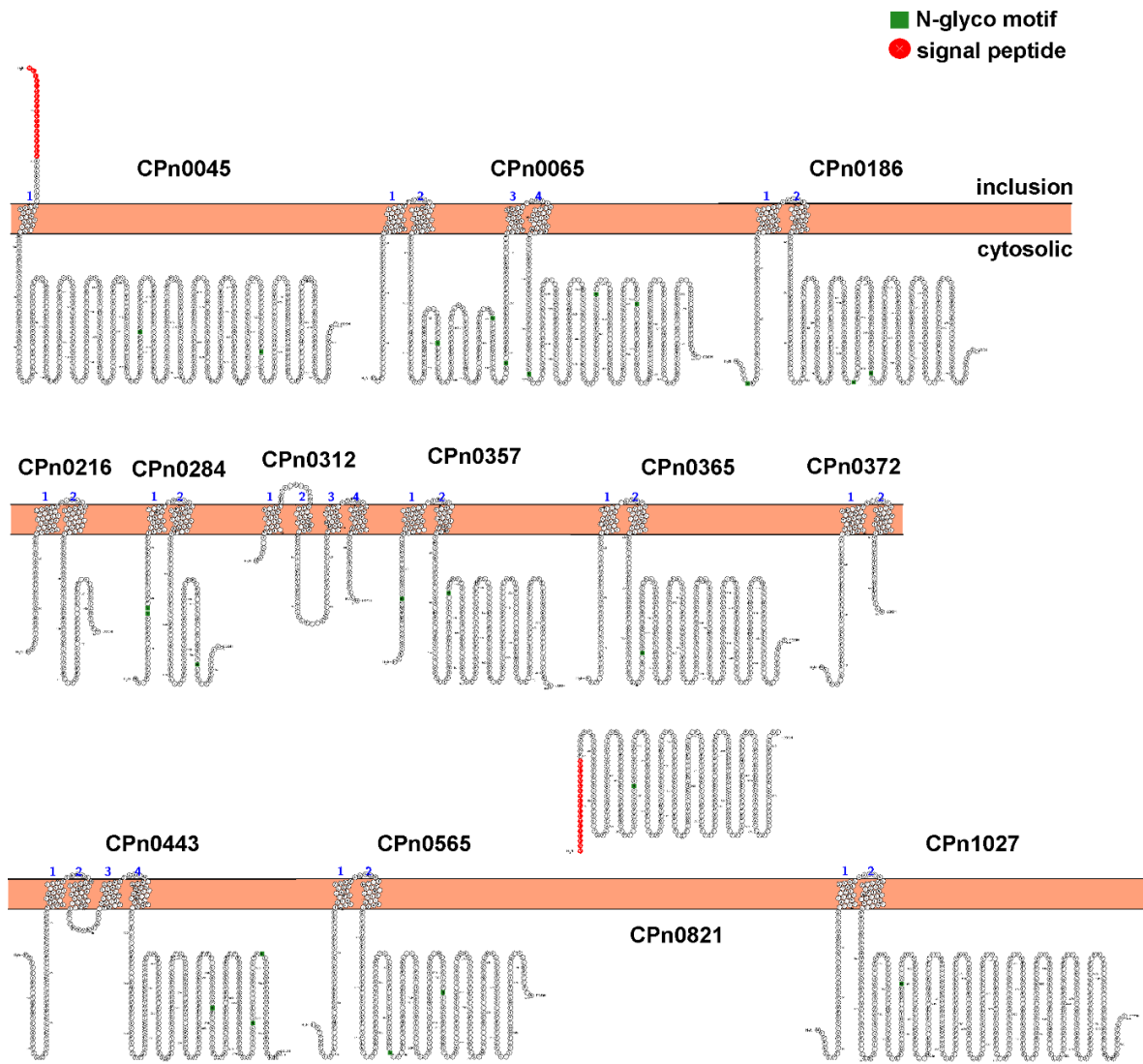


Figure S2. Schematic illustration of the 13 *CPn* proteins and the localization of the transmembrane domains. Single illustrations were created using Protter. Signal sequences are in red; N-glyco motifs in green.

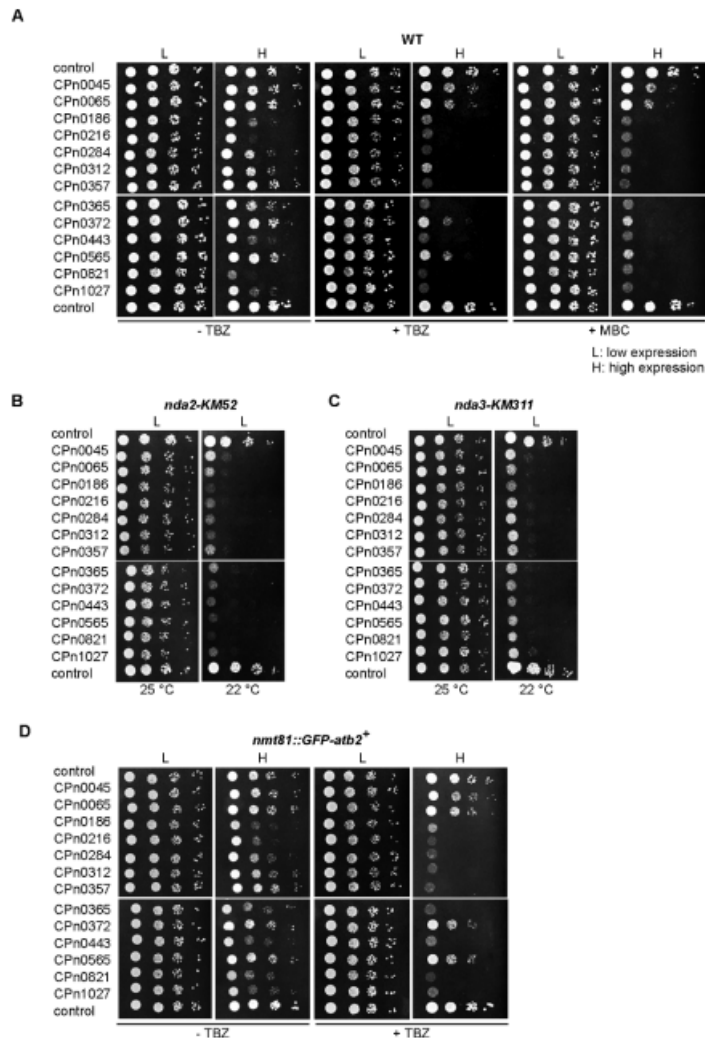


Figure S3. Yeast growth phenotypes caused by expression of *Cpn* proteins. A Serial dilution patch tests (10^4 - 10^1 cells) of a wildtype (WT) yeast strain expressing either a control plasmid or one of 13 plasmids with the indicated *Cpn* gene (systematic names on the left). *S. pombe* transformants were grown for 5 days at 25°C on plasmid-selective media without (-TBZ and -MBC) or with (+TBZ and +MBC). Concentrations used: 7 µg/ml TBZ or 2.5 µg/ml MBC; L and H: low or high expression of relevant *Cpn* gene. B and C Serial dilution patch tests of cold-sensitive *nda2*-KM52 and *nda3*-KM311 strains transformed with a control plasmid or expressing the indicated *Cpn* genes. Cells were incubated at 25 °C or 22 °C for 6 days. The non-permissive temperature for the tubulin mutant strains is 20 °C. L; low expression. D Serial dilution patch tests of *nmt81::GFP-atb2⁺* (GFP- α -tubulin) transformants. Cells were incubated at 25 °C for 6 days without or with 6 µg/ml TBZ, L; low expression, H; high expression.

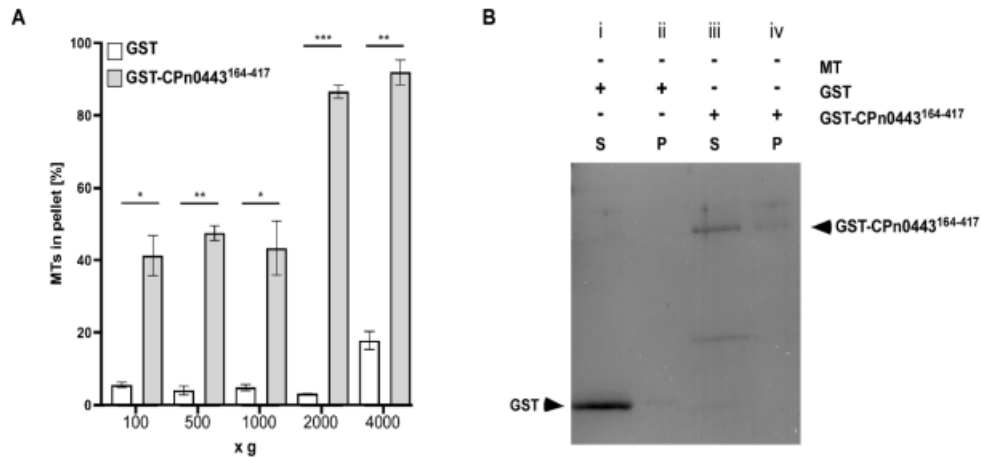


Figure S4. GST-CPn0443¹⁶⁴⁻⁴¹⁷ forms macromolecular MT structures

A SDS gel analysis of GST-CPn0443¹⁶⁴⁻⁴¹⁷-derived higher-order MT structures was performed as in Figure 7C at different centrifugal speeds. Quantification of the pellet fractions are shown. Error bars denote $\pm$ SEM, n=2 experiments. Two-tailed student's t-test was used to determine statistical significance: 100 xg: $p < 0.0239$ (*), 500 xg: $p < 0.0021$ (**), 1000 xg: $p < 0.0345$ (*), 2000 xg: $p < 0.005$ (***), 4000 xg: $p < 0.0019$ (**). B Representative co-sedimentation assay of GST and GST-CPn0443¹⁶⁴⁻⁴¹⁷ showing that both proteins predominantly stay in the supernatant fraction in the absence of MTs, while in the presence of MTs (Figure 7C) they are found in the pellet fraction.

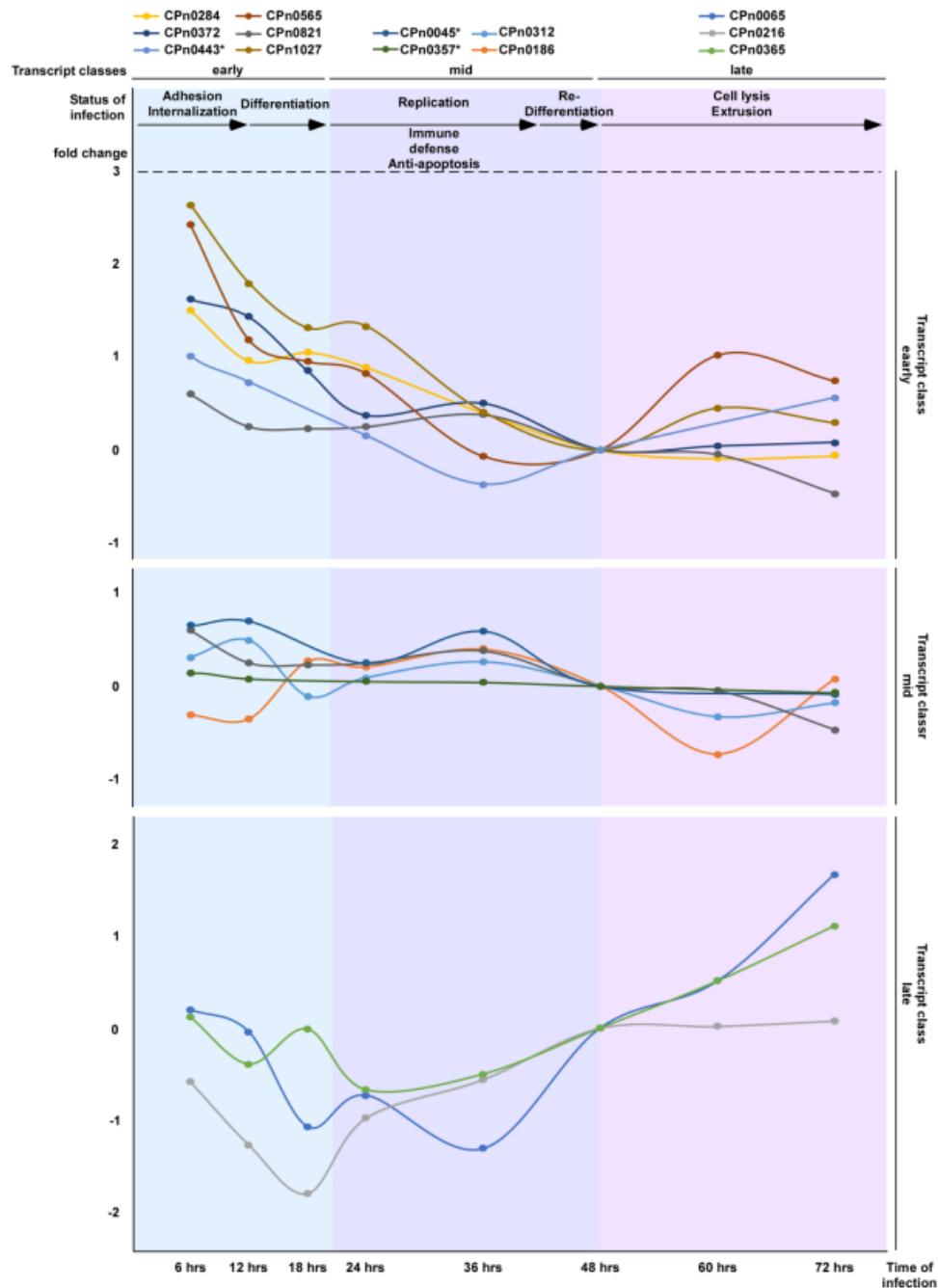


Figure S5. Graphical visualization of the transcriptomes of the 13 *Cpn* proteins. The transcriptome data were taken from [5] except for the proteins marked with *. These come from an unpublished transcriptome analysis from the Hegemann lab [11]. Transcripts were categorized as early, mid or late.

Supplementary Movie Legends

Movie 1 Live cell images of *nmt81::GFP-atb2⁺* cells transformed with a control plasmid. 7 seconds intervals, total 280 seconds. Scale bar, 5 μ m.

Movie 2 Live cell images of cpn0216-expressing nmt81::GFP-atb2⁺ cells 7 seconds intervals, total 280 seconds.

Movie 3 Live cell images of cpn0443-expressing nmt81::GFP-atb2⁺ cells 7 seconds intervals, total 280 seconds.

Supplementary References

1. Dehoux, P.; Flores, R.; Dauga, C.; Zhong, G.; Subtil, A. Multi-genome identification and characterization of chlamydiae-specific type III secretion substrates: the Inc proteins. *BMC Genomics* **2011**, *12*, 109, doi:10.1186/1471-2164-12-109.
2. Lutter, E.I.; Martens, C.; Hackstadt, T. Evolution and conservation of predicted inclusion membrane proteins in chlamydiae. *Comp Funct Genomics* **2012**, *2012*, 362104, doi:10.1155/2012/362104.
3. Sisko, J.L.; Spaeth, K.; Kumar, Y.; Valdivia, R.H. Multifunctional analysis of Chlamydia-specific genes in a yeast expression system. *Mol Microbiol* **2006**, *60*, 51-66.
4. Herbst, F. Identifizierung und Charakterisierung potentieller neuer Effektorproteine aus Chlamydia pneumoniae. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, 2011.
5. Maurer, A.P.; Mehltz, A.; Mollenkopf, H.J.; Meyer, T.F. Gene expression profiles of Chlamydomonas pneumoniae during the developmental cycle and iron depletion-mediated persistence. *PLoS Pathog* **2007**, *3*, e83.
6. Subtil, A.; Parsot, C.; Dautry-Varsat, A. Secretion of predicted Inc proteins of Chlamydia pneumoniae by a heterologous type III machinery. *Mol Microbiol* **2001**, *39*, 792-800.
7. Flores, R.; Luo, J.; Chen, D.; Sturgeon, G.; Shivshankar, P.; Zhong, Y.; Zhong, G. Characterization of the hypothetical protein Cpn1027, a newly identified inclusion membrane protein unique to Chlamydia pneumoniae. *Microbiology (Reading)* **2007**, *153*, 777-786, doi:10.1099/mic.0.2006/002956-0.
8. Bannantine, J.P.; Griffiths, R.S.; Viratyosin, W.; Brown, W.J.; Rockey, D.D. A secondary structure motif predictive of protein localization to the chlamydial inclusion membrane. *Cell Microbiol* **2000**, *2*, 35-47, doi:10.1046/j.1462-5822.2000.00029.x.
9. Subtil, A.; Delevoye, C.; Balana, M.E.; Tastevin, L.; Perrinet, S.; Dautry-Varsat, A. A directed screen for chlamydial proteins secreted by a type III mechanism identifies a translocated protein and numerous other new candidates. *Mol Microbiol* **2005**, *56*, 1636-1647.
10. Luo, J.; Jia, T.; Flores, R.; Chen, D.; Zhong, G. Hypothetical protein Cpn0308 is localized in the Chlamydia pneumoniae inclusion membrane. *Infect Immun* **2007**, *75*, 497-503, doi:10.1093/infdis/jni066 [pii]
- 10.1128/IAI.00935-06.
11. Murra, G. Identifizierung und Charakterisierung von Adhäsionsproteinen des humanpathogenen Erregers Chlamydia pneumoniae
. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Germany, 2009.

4 Manuskript II

Direct targeting of host microtubule and actin cytoskeletons by a chlamydial pathogenic effector protein

Mona Höhler, Abel R. Alcázar-Román, Katharina Schenk, Mac Pholo Aguirre-Huamani, Corinna Braun, Rafat Zrieq, Katja Mölleken, Johannes H. Hegemann and Ursula Fleig

Das Manuskript wurde veröffentlicht in: Journal of Cell Science – September 2024,

DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.263450>

Impact Factor: 3.3 (2023)

Geteilte Erstautorenschaft

Beteiligung von Mona Höhler: 54%

1. Erstellung der Aufnahme für das „Cover-Bild“.
2. Figur 1A: Erstellung der Figur und Figurenlegende.
3. Figur 1B, C, D, E, F, H, I und J: Konzipierung der Experimente; Durchführung der Experimente; Auswertung der Daten; Erstellung der Figuren und Figurenlegende.
4. Figur 1G: Generierung der Proteinvarianten CPn0572⁶¹⁵⁻⁷⁵⁵, CPn0572⁶³⁵⁻⁷⁵⁵ und CPn0572⁶⁵⁵⁻⁷⁵⁵; Konzipierung und Durchführung Experiments für diese Varianten; Auswertung der Daten für diese Varianten; Erstellung der Figur und Figurenlegende.
5. Figur 2C: Erstellung der Aufnahmen von *C. pneumoniae* GiD GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ und *C. pneumoniae* LPCoLN GFP-CPn0572⁸⁰⁶⁻⁹⁹⁰; Auswertung der Daten; Erstellung der Figur und der Figurenlegende.
6. Figur 3: Konzipierung der Experimente; Durchführung der Experimente; Auswertung der Daten; Erstellung der Figuren und der Figurenlegende.
7. Figur 3B: Durchführung des Experiments.
8. Figur 4: Konzipierung der Experimente; Durchführung der Experimente; Auswertung der Daten; Erstellung der Figuren und Figurenlegende.

9. Figur 5C, D, F und G: Konzipierung der Experimente; Durchführung der Experimente; Auswertung der Daten; Erstellung der Figuren und Figurenlegende.
10. Figur 7 A und B: Konzipierung der Experimente; Durchführung der Experimente; Auswertung der Daten; Erstellung der Figuren und Figurenlegende.
11. Figur S1: Konzipierung der Experimente; Durchführung der Experimente; Auswertung der Daten; Erstellung der Figuren und Figurenlegende.
12. Figur S2: Konzipierung der Experimente; Durchführung der Experimente; Auswertung der Daten; Erstellung der Figuren und Figurenlegende.
13. Figur S3C: Konzipierung der Experimente; Durchführung der Experimente; Auswertung der Daten; Erstellung der Figuren und Figurenlegende.
14. Figur S5: Konzipierung der Experimente; Durchführung der Experimente; Auswertung der Daten; Erstellung der Figuren und Figurenlegende.
15. Erstellung der Aufnahmen für das Movie 1.
16. Schriftliche Verfassung von: Methodenteil (anteilig 35%), Resultate-Teil (anteilig 35%) sowie Informationsrecherche zur Verfassung der Einleitung und Diskussion.

Ich bestätige hiermit die Korrektheit der Angaben.

Düsseldorf, den 20.02.2025

Mona Iris Höhler

4.1 Zusammenfassung

Zu ihrer Vervielfältigung sind obligat intrazellulären Chlamydien Meister in der Manipulation von Wirtszellprozessen. Die früh in der Infektion T3SS-sekretierte in Chlamydien konservierte TarP-Effektorproteinfamilie ist bekannt dafür, dass sie an der EB-Eintrittsstelle zu einer Remodulierung des Aktin-Zytoskeletts der Wirtszelle führt.

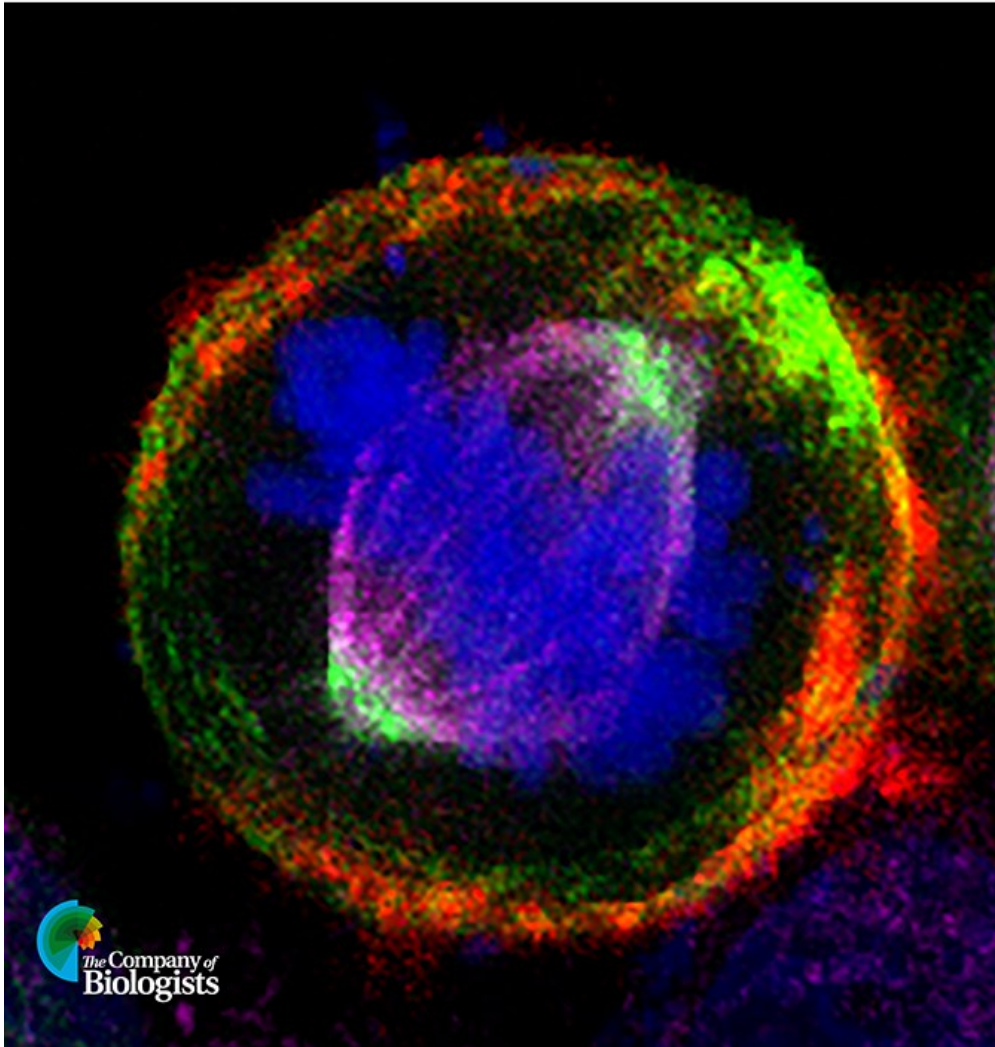
Für das *Cpn* TarP-Ortholog, CPn0572, konnte in dieser Arbeit eine weitere, neue Funktion identifiziert werden; die Modulation des Wirts-Mikrotubuli (MT)-Zytoskeletts. CPn0572 bindet *in vitro* an stabilisierte MT und *in vivo* in humanen Epithelzellen an MT-Filamente. Die Expression der von mir kartierten C-terminalen MT-Binderegion, CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵, führt außerdem zu einer massiven Änderung der MT-Dynamik, welche MT gegenüber chemischer- und Kälte-induzierter MT-Depolymerisation schützt. Des Weiteren können CPn0572 und die verkürzte C-terminale Variante auch mit Spindel-MT von mitotischen Humanzellen assoziieren. Dies hat Auswirkung auf die Formation und Funktion der Spindel: die Expression von CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ führt zu einem massiven Anstieg an mitotischen Spindel-Defekten, die einen Einfluss auf die korrekte Verteilung der Chromosomen haben.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die durch ektopische Expression von CPn0572 induzierte Hyperstabilisation von Interphasen-MT zu einer signifikanten Reduktion einer folgenden *Cpn* Infektion und damit zu einer Beeinträchtigung der Infektionseffizienz führt. Bei Infektion von Epithelzellen mit CPn0572-exprimierenden *Ctr* EBs wurde beobachtet, dass sekretiertes CPn0572 zu MT-Assoziation und -Modulation im Bereich der Inklusion führt. Die Daten zeigen, dass CPn0572 das erste bakterielle Protein ist, welches sowohl das Aktin- als auch das MT-Zytoskelett humaner Epithelzellen binden und modulieren kann. Somit werden Funktionen vom Aktin und MT-Zytoskelett durch CPn0572 miteinander verknüpft, was auch bei einer Infektion relevant sein kann.

Die Fähigkeit zur MT-Assoziation wurde auch für weitere C-terminale Varianten von TarP-Orthologen aus *Ctr* L2, *C. psittaci* und dem Koala-infizierenden *Cpn* Stamm analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass lediglich die *Cpn* TarP-Orthologe mit MT kolokalisieren können. Daher scheint die Fähigkeit der MT-Assoziation spezifisch für *Cpn* zu sein.

Volume 137 (17) September 2024

Journal of Cell Science



RESEARCH ARTICLE

Direct targeting of host microtubule and actin cytoskeletons by a chlamydial pathogenic effector protein

Mona Höhler^{1,*}, Abel R. Alcázar-Román^{1,*}, Katharina Schenk¹, Mac Pholo Aguirre-Huamani¹, Corinna Braun², Rafat Zrieq^{3,4}, Katja Mölleken², Johannes H. Hegemann^{2,‡} and Ursula Fleig^{1,‡}

ABSTRACT

To propagate within a eukaryotic cell, pathogenic bacteria hijack and remodulate host cell functions. The Gram-negative obligate intracellular Chlamydiaceae, which pose a serious threat to human and animal health, attach to host cells and inject effector proteins that reprogram host cell machineries. Members of the conserved chlamydial TarP family have been characterized as major early effectors that bind to and remodel the host actin cytoskeleton. We now describe a new function for the *Chlamydia pneumoniae* TarP member CPn0572, namely the ability to bind and alter the microtubule cytoskeleton. Thus, CPn0572 is unique in being the only prokaryotic protein that directly modulates both dynamic cytoskeletons of a eukaryotic cell. Ectopically expressed GFP-CPn0572 associates in a dose-independent manner with either cytoskeleton singly or simultaneously. *In vitro*, CPn0572 binds directly to microtubules. Expression of a microtubule-only CPn0572 variant resulted in the formation of an aberrantly thick, stabilized microtubule network. Intriguingly, during infection, secreted CPn0572 also colocalized with altered microtubules, suggesting that this protein also affects microtubule dynamics during infection. Our analysis points to a crosstalk between actin and microtubule cytoskeletons via chlamydial CPn0572.

KEY WORDS: Cytoskeleton, Microtubules, Pathogenic bacteria, Chlamydia

INTRODUCTION

Chlamydia pneumoniae (*Cpn*) is an important obligate intracellular bacterial pathogen, which infects lung epithelial cells, causing human respiratory diseases. It is responsible for 10% of community-acquired pneumoniae and 5% of bronchitis, pharyngitis and sinusitis cases (Grayston et al., 1995). Moreover, *Cpn* is associated with chronic obstructive pulmonary disease, asthma, atherosclerotic cardiovascular diseases and lung cancer (Campbell and Hahn, 2020). All chlamydial and chlamydia-related species

undergo a very specific, biphasic infection cycle initiated by the infectious, extracellular and non-dividing elementary bodies (EBs), which invade host cells, and the intracellular metabolically active reticulate bodies (RBs), which replicate inside membrane vacuoles termed inclusions (Stelzner et al., 2023; Bayramova et al., 2018).

For obligate intracellular pathogens, host cell entry is of utmost importance. To ensure internalization Chlamydiae use a complex repertoire of bacterial adhesin – host cell receptor interactions as well as effector proteins translocated by the type-III secretion system (T3SS) (Nans et al., 2015). *Cpn* adhesins on the EB cell surface, such as OmcB, Pmp proteins and LipP, interact with host cell plasma membrane surface structures and these interactions are essential for chlamydial internalization (Wuppermann et al., 2008; Mölleken et al., 2013; Galle et al., 2019; Becker and Hegemann, 2014). Equally important for EB entry are the *Cpn* T3SS-mediated effector proteins such as SemC and SemD, which upon secretion into the host cell cytosol, bind and reshape the host cell plasma membrane underneath the adhered EB and recruit endocytotic proteins to support EB uptake (Hänsch et al., 2020; Spona et al., 2023).

A major target for soluble secreted effector proteins, such as the conserved TarP family, is the host cell cytoskeleton, which is composed of F-actin, microtubules (MTs), intermediate filaments and septins (Hohmann and Dehghani, 2019; Goodson and Jonasson, 2018; Svitkina, 2018; Herrmann and Aebi, 2016; Woods and Gladfelter, 2021). MTs are the most dynamic feature of the cytoskeleton of the cell, consisting of highly dynamic polar filaments that switch between phases of polymerization and depolymerization. These alterations of MT dynamics are controlled by the availability of α/β -tubulin dimers and by the association of a vast array of MT-associated proteins (MAPs) that modulate MT dynamics, especially from the MT plus-end (Meier et al., 2024). Additionally, the composition of a MT filament in terms of its different tubulin isoforms alters its dynamic parameter as does the presence of an array of post-translational modifications (McKenna et al., 2023).

Thus, the MTs even within one cell can have very different orientations and dynamics from each other (Stone et al., 2008; Tanenbaum et al., 2014; Feng et al., 2019), which can be altered quickly in time and space depending on need.

All cytoskeletal structures form a complex interacting meshwork involved in processes such as endocytosis, cell division, intracellular transport, motility, force transmission, reaction to external forces, adhesion and preservation, and adaptation of cell shape. The actin–MT crosstalk is particularly important for many of these processes (Dogterom and Koenderink, 2019). Importantly, the continued extensive crosstalk between these two cytoskeletons for basic biological functions has come into focus. An array of common regulators has been identified that co-modulate these cytoskeletons in time and space, pointing to an integrated system instead of the two separate actin and MT components of the cytoskeleton (Dogterom

¹Eukaryotic Microbiology, Heinrich-Heine-University, 40225 Düsseldorf, Germany.

²Institute of Functional Microbial Genomics, Heinrich-Heine-University, 40225 Düsseldorf, Germany.

³Department of Public Health, College of Public Health and Health Informatics, University of Ha'il, Ha'il City 2440, Saudi Arabia. ⁴Applied Science Research Centre, Applied Science Private University, Amman 11931, Jordan.

*These authors contributed equally to this work

[‡]Authors for correspondence (hegemmann@hhu.de; fleigu@hhu.de)

© M.H., 0000-0002-3573-953X; M.P.A.-R., 0000-0003-4769-6597; J.H.H., 0000-0003-4733-2435; U.F., 0000-0002-0270-0970

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

Handling Editor: Michael Way

Received 23 July 2024; Accepted 25 July 2024

and Koenderink, 2019). This fact is not usually taken into consideration when the modulation of the actin cytoskeleton by bacterial pathogens is studied. In fact, typical protocols used for synchronous early chlamydia infection utilize spinning and 4°C incubation, which destroy the MT cytoskeleton. Thus, although the modulation of the host actin cytoskeleton by bacterial pathogens is well studied, the connection to the MT cytoskeleton is missing as is a thorough analysis of the MT impact on bacterial infection (Stevens et al., 2006; Colonne et al., 2016; Haglund and Welch, 2011).

All four cytoskeletal structures have been found to be associated with a *C. trachomatis* (*Ctr*) infection (Clifton et al., 2004; Volceanov et al., 2014; Al-Zeer et al., 2014; Kumar and Valdivia, 2008), but an understanding of their molecular function and role during infection is fragmentary, although the properties of specific chlamydial proteins in modulating MT dynamics have been analyzed extensively (Campanacci et al., 2019). It is known that early during infection, *Ctr* traffics along MTs to the MT-organizing center (MTOC; which is close to the nucleus) of the host cell to establish its intracellular niche, the inclusion (Grieshaber et al., 2003; Mital et al., 2015). Here the inclusion initiates and maintains a close association with the MTOC (also known as the centrosome) (Luis et al., 2023). A *Ctr* infection leads to MT dependent mitotic alterations (Grieshaber et al., 2006; Knowlton et al., 2011). Recently, it was shown that the *Ctr*-specific T3-secreted soluble effector protein CteG interacts with a key structural component of centrosomes and the absence of CteG impairs chlamydia's ability to replicate efficiently in primary cervical cells and in a murine model of *Ctr* infection (Steiert et al., 2023).

The important role of the MT cytoskeleton during *Cpn* infection is just beginning to emerge. Recently, we carried out a functional screen of 116 *Cpn* proteins and identified 13 *Cpn* effector proteins that modulate MT dynamics in different manners (Wevers et al., 2023). Six of the 13 proteins have a putative homolog in *Ctr*; seven have homologs in other Chlamydia and five proteins are unique to *Cpn*. Interestingly, one of the identified *Cpn* modulators altering the MT cytoskeleton is CPn0065, which has a *Ctr* homolog named IncM. A recent publication uncovers the role of IncM in MT modulation, suggesting that the hijacking of the MT cytoskeleton during a chlamydial infection might be a common trait (Luis et al., 2023).

The earliest known chlamydial effector, *Ctr* TarP is T3SS-translocated into the host cell cytosol within the first 5 min post infection, where it is directly involved in actin polymerization. Its proline-rich domain allows TarP oligomerization, which results in high G-actin concentrations mediated by the TarP actin-binding domain (ABD), facilitating direct F-actin polymerization (Jewett et al., 2010). This is indirectly supported by TarP binding to the actin adaptor protein vinculin, which also promotes F-actin recruitment (Thwaites et al., 2015). TarP homologs can be found in all species within the family Chlamydiaceae (Lutter et al., 2010). The *Cpn* TarP family member CPn0572 and *Ctr* TarP share the same actin nucleation activity *in vitro* and show a similar actin-recruiting activity early in infection *in vivo* (Jewett et al., 2010; Zrieq et al., 2017). In fact, both *Ctr* TarP and CPn0572 bind F-actin *in vitro* and *in vivo* (Jiwani et al., 2013; Zrieq et al., 2017). In addition, from previous publications on CPn0572, it is known that CPn0572 is present in EBs as mRNA (Mäurer et al., 2007) and as protein in EB lysates (Jewett et al., 2010; Zrieq et al., 2017), and is detected via antibody 15 min after infection colocalizing with actin and EBs (Zrieq et al., 2017). Moreover, CPn0572 also exhibits actin-related activities unknown for TarP. The CPn0572 C-terminal part stabilizes host F-actin by displacing members of the F-actin-severing factor cofilin family (Zrieq et al., 2017) and the N-terminal

part of CPn0572 appears to contain a domain that inhibits the ability of the ABD to colocalize with actin (Braun et al., 2019).

These differences probably reflect the dissimilar requirements for the infection of the diverging anatomical sites: pulmonary epithelia versus eye and genital tract epithelia.

However, the most surprising difference between both proteins became apparent in their localization profile upon ectopic expression in human epithelial cells – a TarP–GFP fusion protein exclusively localized to distinct actin-containing aggregates, whereas a GFP–CPn0572 fusion protein colocalized with smaller actin aggregates and with filamentous structures emanating from them showing a continuous colocalization with distinct actin fibers. Remarkably, CPn0572 also localized to filamentous structures that were devoid of actin (Zrieq et al., 2017). The nature of these CPn0572-positive fibers and their relationship to other cellular structures remained obscure (Zrieq et al., 2017; Braun et al., 2019).

In this paper, we identified a new and unique function for *Cpn* TarP members. We found that CPn0572 can directly bind to MTs *in vitro* and *in vivo* and modulate MTs upon ectopic expression and during infection. The finding that CPn0572 can bind to either the MT and/or the actin cytoskeleton, and that the loss of the MT cytoskeleton alters its actin modulating properties suggests that CPn0572 might be able to alter the MT–actin crosstalk during early infection.

RESULTS

The actin modulator CPn0572 also colocalizes with the MT cytoskeleton

Previously, we have shown that ectopically expressed GFP–CPn0572 colocalized predominantly with the actin cytoskeleton of HEK293T cells as has been demonstrated for other members of the chlamydial TarP family (Braun et al., 2019; Zrieq et al., 2017; Clifton et al., 2004) (Fig. 1A). However, we found that in some cells CPn0572 also localized to non-actin microfilaments (Zrieq et al., 2017). To determine whether the non-actin localization might in fact be association with the MT cytoskeleton, HEp-2 cells were transfected with a plasmid expressing full-length GFP–CPn0572 (Fig. 1A) and fixed cells were stained with Rhodamine–phalloidin (actin) and an anti- α -tubulin antibody. Indeed, in 11% of cells, the chlamydial protein colocalized with both the MT and actin cytoskeleton (Fig. 1B and merged images in Fig. 1C; quantification in Fig. 1F). GFP–CPn0572 exclusive colocalization with the actin cytoskeleton (Fig. 1D) was observed in 81% cells, whereas exclusive colocalization with the MT cytoskeleton was scored for ~8% of HEp-2 cells. (Fig. 1E; quantification in Fig. 1F). We conclude that CPn0572 can associate with both dynamic cytoskeletons of an interphase mammalian cell, although it is unclear what determines the preferred association with both or an individual cytoskeletal structure.

To identify the CPn0572 MT-binding region, we generated a number of GFP-tagged CPn0572 truncated variants and assayed their ability to associate with the actin and/or MT cytoskeleton in HEp-2 cells. The N-terminal variant CPn0572^{1–536} showed exclusive actin colocalization, indicating that the MT-binding region must be present in the C-terminal part of the protein (Fig. 1G). C-terminal variants of this region showed that the absence of the G-actin- and F-actin-binding domains increased the number of cells where the variant protein showed exclusive colocalization with MTs (Fig. 1A,G). In particular, in 86% of cells, the variant GFP–CPn0572^{595–755} localized with the MT cytoskeleton. The remaining transfected cells showed a non-specific cytoplasmic staining but no actin staining. Other C-terminal CPn0572 variants

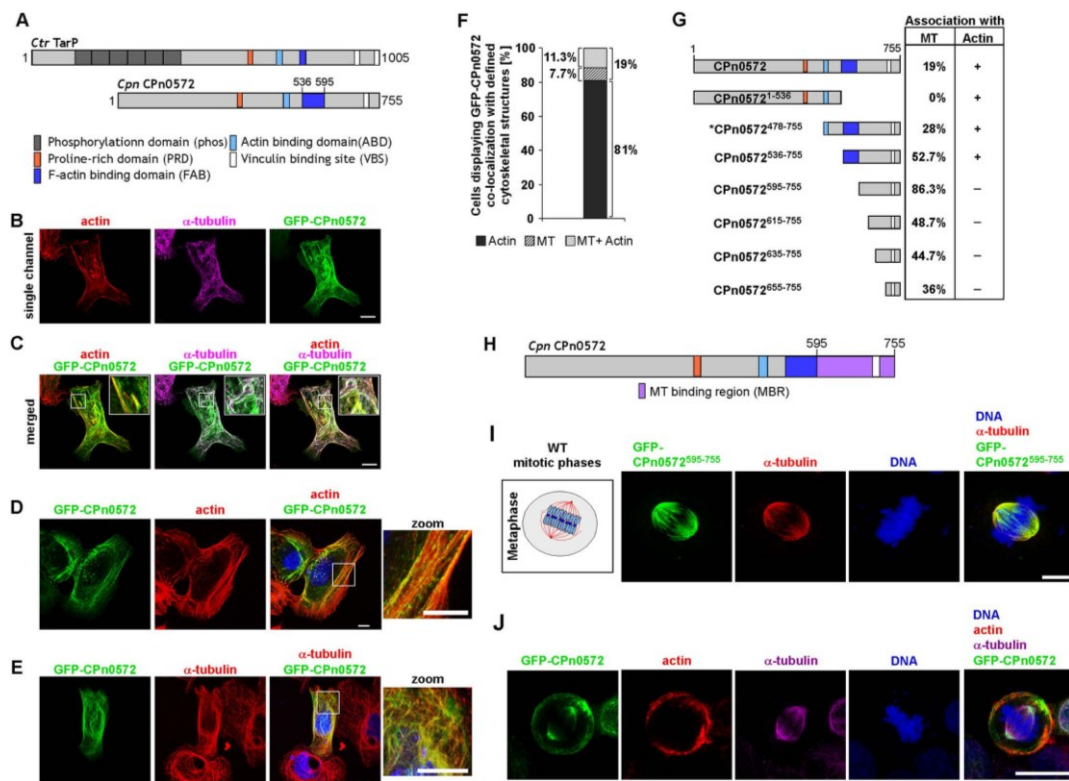


Fig. 1. CPn0572 associates with the interphase and mitotic MT cytoskeleton. (A) Schematic representation of the *Ctr* TarP protein and full-length *Cpn* CPn0572 protein. Previously identified domains are shown: phosphorylation domain (phos), dark gray boxes; proline-rich domain (PRD), orange box; G-actin binding domain (ABD), light blue box; F-actin-binding domain (FAB), dark blue box; and vinculin-binding site (VBS), white box (Zrieq et al., 2017; Braun et al., 2019). (B) Representative confocal images of Hep-2 cells expressing GFP-CPn0572 (green) for 24 h prior to fixation. Actin was visualized with Rhodamine-phalloidin staining (red) and MTs with anti- α -tubulin antibody. As secondary antibody anti-mouse-IgG conjugated to Alexa Fluor 647 was used (magenta). (C) Merged images of indicated single channels shown in (B). White boxes show enlargements. (D) Representative confocal images of Hep-2 cells transfected with plasmid expressing GFP-CPn0572 (green) for 24 h, prior to fixation. Shown is an exclusive predominant association of GFP-CPn0572 with actin. Actin was visualized with Rhodamine-phalloidin staining (red). (E) Shown is a predominant association of GFP-CPn0572 with interphase MTs visualized with anti- α -tubulin antibody (red). DAPI was used to visualize DNA (blue). (F) Quantification of Hep-2 cells transfected with a GFP-CPn0572 plasmid 24 h prior to fixation. Exclusive colocalization of GFP-CPn0572 with actin was scored in 81% (black) cells, whereas in 11% cells analyzed GFP-CPn0572 localized to both MTs and actin structures (dotted). In 7.7% cells, an exclusive GFP-CPn0572 localization to MT structures was observed (striped). Data represent a mean of three experiments, $n=100$ cells/experiment. (G) Diagrammatic representation of CPn0572 variants. Quantification of cells expressing GFP-CPn0572 variants and association with the MT cytoskeleton as a percentage (%) of cells counted. Association with the actin cytoskeleton is depicted as + (actin association) or - (no actin association). When no actin association was observed (four bottom CPn0572 variants), CPn0572 was either associated with MT structures (percentage given) or showed a non-specific cytoplasmic staining. * marks deletion variant with MT and actin phenotypes differing from the other protein variants (visualized in Fig. S1, dot-like and curved-fiber phenotypes concentrated in proximity to the nucleus). (H) Schematic representation of full-length CPn0572 including the newly defined MT-binding region from aa 595–755 (purple box). (I) Confocal images of U2OS cells transfected with GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ plasmid for 18 h. Mitotic metaphase is shown diagrammatically on the left. MTs were visualized by anti- α -tubulin antibody staining (red) and DNA with DAPI (blue). (J) Representative confocal image of mitotic U2OS cell expressing full length GFP-CPn0572 (green) full length for 18 h. MTs were visualized by using anti- α -tubulin antibody (magenta), actin with rhodamine-phalloidin staining (red) and DNA with DAPI. In A and G, the numbers indicate amino acid positions. For B–E, I and J images shown are representative of three or more repeats. Scale bars: 10 μ m.

also showed no actin colocalization but a reduced MT colocalization frequency in comparison to CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ although they were expressed in higher amounts (Fig. 1G; Fig. S1A,B). Thus, the MT-binding region (MBR) of CPn0572 is confined to the C-terminal 595–755 amino acids (Fig. 1H).

To determine whether the chlamydial protein associated exclusively with interphase MTs or was also able to colocalize with other MT structures, such as a mitotic spindle, human

osteosarcoma U2OS cells were transfected with a plasmid-encoding GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ for 18 h. U2OS cells are frequently used for mitotic analysis and the chosen CPn0572 variant was used as it showed a predominant association with interphase MTs. Indeed GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ colocalized with spindles during all stages of mitosis (Fig. 1I; Fig. S2). To determine whether full length GFP-CPn0572 was also able to associate with the spindle, we expressed this protein in U2OS mitotic cells and also found that the protein

associated with spindle MTs but was also able to localize to the cortical actin network adjacent to the plasma membrane (Fig. 1J).

Association with the MT cytoskeleton is restricted to *Cpn* TarP members

We next determined whether association with the MT cytoskeleton is a conserved feature of other CPn0572/TarP family members. A comparison of 23 CPn0572 amino acid sequences from different *Cpn* isolates (Table S1) revealed that 20 out of 23 were identical to the CPn0572 sequence found in the GiD strain used in this study (Fig. S3A). The animal-derived *Cpn* isolate DC9 had a number of amino acid alterations, whereas the animal-derived isolates B21 and LPCoLN showed extensive differences. These include single amino acid (aa) changes, a large insertion of 211 amino acids, and a 24-amino-acid insertion in the region from aa 595 to aa 755, which we identified as the CPn0572 MBR from *Cpn* GiD (Fig. 2B; Fig. S3A). Thus, it was interesting to determine whether the insertion affected MT binding of this region. Furthermore, we selected *Ctr* (L2) TarP and *C. psittaci* (6BC) TarP family members for analysis, as these belong to different clades to *Cpn* (Fig. 2A). The selected CPn0572/TarP members were aligned to identify amino acid regions with homology to CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ from strain GiD. A region of high similarity identified in GiD, LPCoLN and 6BC (red letters in Fig. S3B) was utilized to design N-terminal GFP fusions of these C-terminal domains (Fig. 2B, marked in blue). In the case of *Ctr* L2, no clear homology was found. Nevertheless, we tested a GFP–TarP⁸⁶⁸⁻¹⁰⁰⁵ fusion protein for its ability to bind MTs (Fig. 2B). Expression of these four variants in HEp-2 cells and subsequent microscopy analysis showed that the *Cpn* LPCoLN

variant was also able to colocalize with MTs (Fig. 2C), whereas the C-terminal constructs derived from *Ctr* and *C. psittaci* family members did not (Fig. 2C). The latter two constructs instead colocalized with vinculin (Fig. S3C). Thus, the ability of TarP members to associate with the host MT cytoskeleton is a feature conserved in *Cpn* members.

CPn0572 expression in epithelial cells leads to an altered MT cytoskeleton

In the above analysis, we noticed that the MT cytoskeleton in CPn0572-expressing cells was often aberrant, for example, showing abnormally thick interphase MT bundle structures, which were not observed in control cells expressing only GFP. To better characterize this phenotype, we analyzed interphase MTs in HEp-2 cells transfected with GFP–CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ for various times prior to fixation (Fig. 3A). Interestingly, MT staining revealed a correlation between the amount of GFP–CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ present and the number of abnormal, thicker MTs (Fig. 3A–C). The diameter of the MT bundles increased from ~0.26 µm (control) to ~0.51 µm 18 h after transfection (Fig. 3D). Thus, expression of GFP–CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ results in abnormally thick interphase MTs, as has been observed upon overexpression of a MAP (Fong et al., 2013).

Next, we assayed whether the mitotic spindle was also altered upon expression of CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ by transfecting U2OS cells with a plasmid encoding this CPn0572 variant for 18 h. We found that, in contrast to U2OS control cells expressing only GFP, 83% of the spindles were abnormal (Fig. 3F, quantified in Fig. 3E). A number of abnormal spindle phenotypes was scored, the most

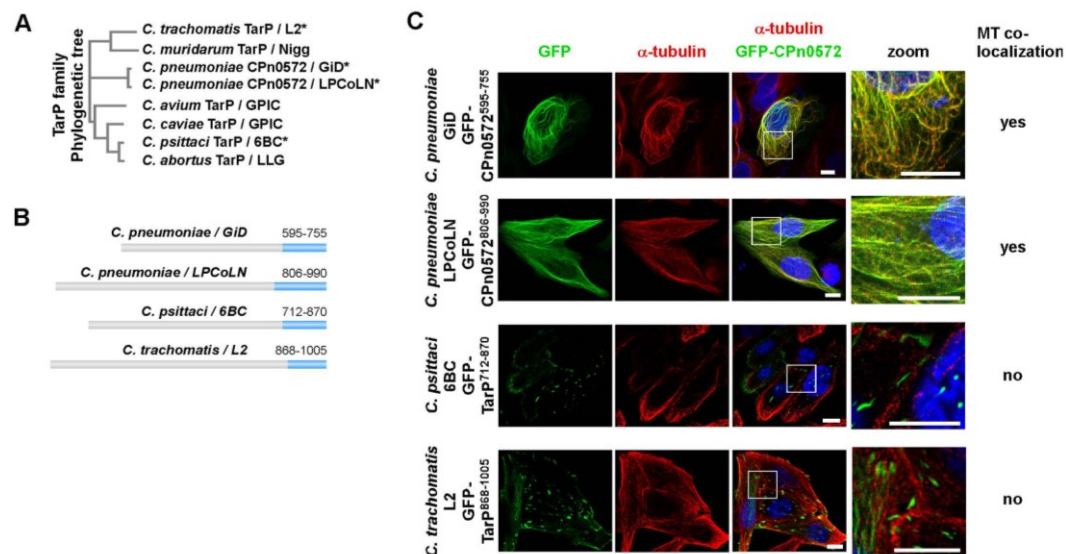


Fig. 2. *Cpn* TarP proteins from human and animal isolates can associate with the MT cytoskeleton. (A) Phylogenetic tree of members of the TarP protein family from different chlamydial species with the corresponding isolate indicated. Asterisks mark the TarP members selected for transfection experiment shown in C. Phylogenetics were undertaken with Clustal Omega. (B) Schematic illustration of TarP family members and the C-terminus (blue) used for generation of GFP-fusion variants. (C) Representative confocal fluorescence images of HEp-2 cells expressing GFP-tagged versions of C-terminal fragments of the indicated TarP family members. Determination of colocalization with MTs is shown on the right. Cells were transfected with indicated plasmids for 18 h. MTs were visualized using anti- α -tubulin antibody (red) and DNA with DAPI (blue). White boxes show enlargements. Images shown are representative of three repeats. Scale bars: 10 µm.

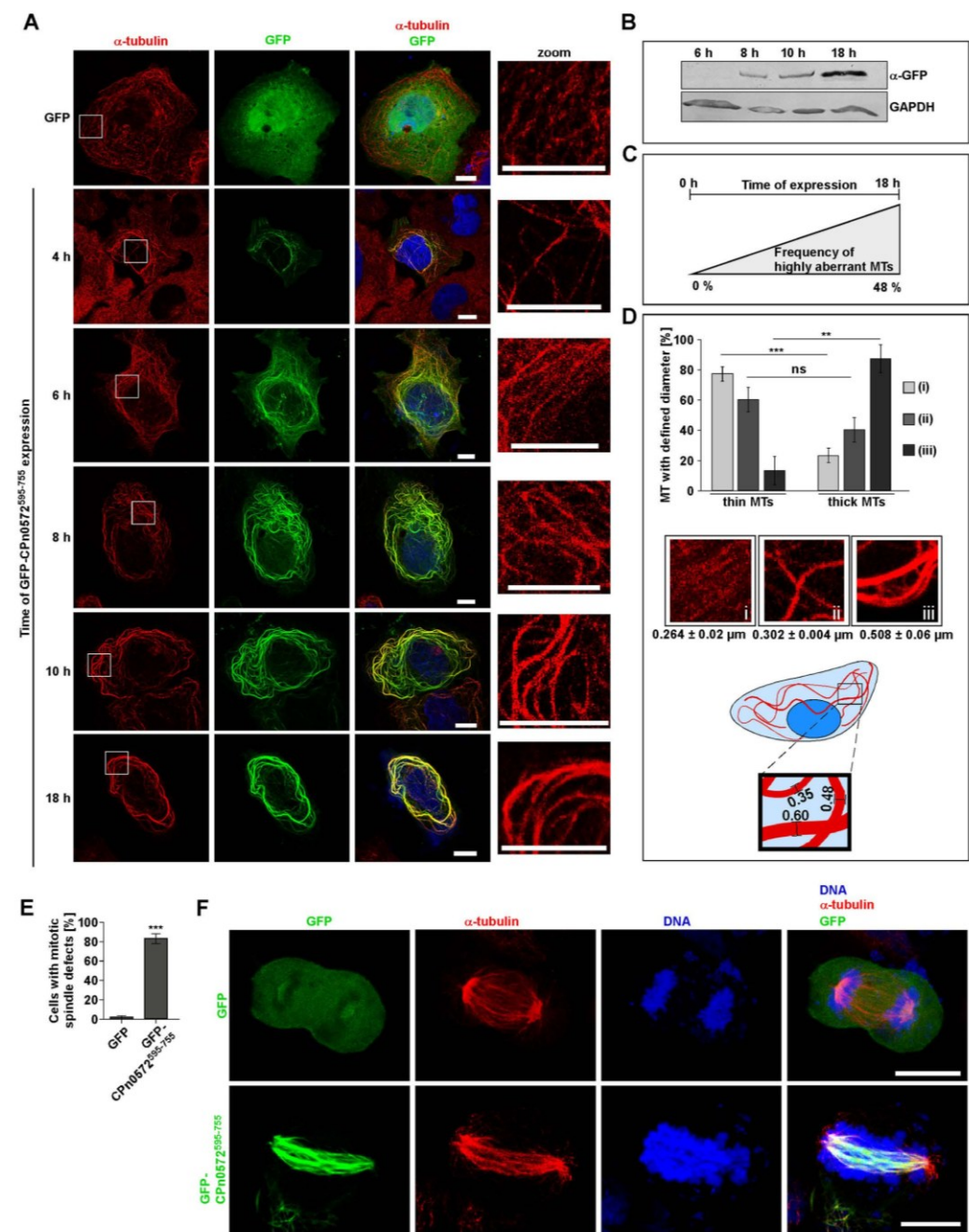


Fig. 3. See next page for legend.

Fig. 3. Severity of alteration of MT structure correlates with time of CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ expression. (A) Representative confocal fluorescence images of HEp-2 cells transfected with a plasmid encoding GFP for 18 h (top panels) or GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ for the indicated times prior to fixation. MTs were visualized with anti- α -tubulin antibody (red) and DNA with DAPI (blue). Scale bars: 10 μ m. (B) Western blot analysis of HEp-2 cells expressing GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ for the indicated time points. Protein extracts were separated on a 10% SDS-PAGE followed by Western blot analysis. Western blot was probed with anti-GFP or anti-GAPDH antibodies. Blot shown is representative of two repeats. (C) Explanatory cartoon to show co-dependency of GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ expression levels and the increase of aberrant MTs (only the 0 h and 18 h time points represent actual measurements). (D) Quantification (mean $\pm$ s.e.m.) of MT phenotypes shown in A. Typical examples of MTs phenotypes are shown for (i) GFP-expressing control cells (18 h), (ii) GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵-expressing cells (6 h) and (iii) GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵-expressing cells (18 h). MT thickness was determined by calculating the average diameter measured at three different positions of a single MT bundle using ImageJ. Thin MTs were defined as MTs with <0.302 μ m in diameter; thick MTs were defined as MTs with $\geq$ 0.302 μ m in diameter. $n=3$ cells (30 MTs measured per condition). *** $P<0.001$; ** $P<0.005$; ns, not significant (two-tailed unpaired Student's t -test). (E) Quantification (mean $\pm$ s.e.m.) of the percentage of GFP- or GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵-expressing mitotic U2OS cells with spindle defects. $n=3$ independent experiments each representing 50 cells. *** $P<0.001$ (two-tailed unpaired Student's t -test). (F) Confocal images of U2OS cells transfected with a plasmid encoding GFP or GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ for 18 h. Top images show a GFP-expressing mitotic cell in anaphase. Bottom images show a representative example of the main spindle defect observed in GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵-expressing cells. MTs were visualized by using an α -tubulin antibody (red) and DNA was stained with DAPI (blue). Images shown are representative of three repeats. Scale bars: 10 μ m.

prominent, had nearly 40% of mitotic cells with elongated, irregular anaphase spindle structures with misaligned chromosomes, indicating a defect in bipolar chromosome-spindle attachment (Fig. 3F).

Thus, CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ associates with interphase and mitotic MT structures, which leads to aberrant MTs with an altered function.

Ectopic expression of CPn0572 variants in human cells implies that the MT function of the protein plays a role in chlamydial early infection

TarP family members have been classified as important chlamydial effector proteins that modulate the host actin cytoskeleton. With our discovery that *Cpn* members also colocalize with and modulate the MT cytoskeleton, it was of interest to determine whether this property affected chlamydial infection. Furthermore, we wanted to analyze the importance of the actin versus the MT-modulating effect by assessing the impact on infections of full-length CPn0572, which mainly associates with cellular actin structures but can also colocalize with MTs, and CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵, which associates with MTs only. We also expressed the N-terminal variant CPn0572¹⁻⁵³⁶ that only binds actin.

GFP-tagged full-length CPn0572, the N-terminal variant CPn0572¹⁻⁵³⁶ and the C-terminal variant CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ were expressed in HEp-2 cells for 18 h prior to *Cpn* infection and the number of internalized EBs was scored after 2 h and the number of inclusions was scored after 30 h. Fig. 4A is a diagrammatic representation of the experimental set-up; Fig. 4B shows the CPn0572 variants used. Although expression of CPn0572 or CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ had no visible effect on HEp-2 cells, the expression of CPn0572¹⁻⁵³⁶ in HEp-2 led to cells with typical apoptotic features after 48 h, demonstrating that CPn0572¹⁻⁵³⁶ expression was toxic. Thus, for this variant, we could only determine the number of internalized EBs 2 h post infection.

The number of internalized EBs in either CPn0572 and CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ expressing cells was similar but significantly lower than those in control cells or CPn0572¹⁻⁵³⁶ expressing cells (Fig. 4C). Thus, the modulation of the MT cytoskeleton by ectopic expression of this protein affects invasion efficiency of the pathogen. In addition, the number of infected GFP-, GFP-CPn0572- or GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵-expressing HEp-2 cells was comparable (Fig. 4E), but the number of chlamydial inclusions per cell was reduced in the presence of GFP-CPn0572 or GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ (Fig. 4D,F).

CPn0572 expressed in and secreted by *Ctr* modulates MT structures during infection

As ectopic expression of CPn0572 in epithelial cells affects MT structures and *Cpn* internalization, we next tested whether chlamydial expression of CPn0572 during infection would also modulate MT structures. As generation of a CPn0572 antibody useable for advanced immunofluorescence analysis was unsuccessful, we chose plasmid-borne expression of a tagged CPn0572 version in *Ctr* for the analysis. In contrast to *Cpn*, the plasmid expression system in *Ctr* is well established. A plasmid carrying full-length CPn0572 with a C-terminal FLAG tag under control of the constitutive *IncD* promoter (Agaisse and Derré, 2013; Belland et al., 2003) was transformed in *Ctr* L2 (Fig. 5A). In general, the developmental cycle was slower when CPn0572 was present. Thus, HEp-2 cells infected with CPn0572-FLAG-expressing *Ctr* transformants expressed CPn0572-FLAG for 48 h post infection (hpi) (Fig. 5B). To determine whether the protein is translocated into the host-cell cytoplasm early in infection, infected HEp-2 cells were fixed at 15 min post infection and analyzed by immunofluorescence microscopy. DNA-stained *Ctr* EBs were found to lie close to, or to partially overlap with, CPn0572-FLAG signals indicative of CPn0572 secretion (Fig. 5C). At 24 hpi, development of the CPn0572-expressing inclusion was affected, with the inclusion size reduced by more than 50% compared to untransformed control inclusions (Fig. 5D). Analysis of the subcellular localization of the CPn0572-FLAG fusion protein by immunofluorescence confocal microscopy at 48 hpi revealed a dense cytosolic localization exhibiting numerous filamentous structures, whereas the untransformed control cells only showed background cytosolic signals (Fig. 5E). Interestingly, a detailed look at focal planes lying between the inclusion membrane and the plasma membrane identified filamentous-like CPn0572 structures that were not associated with actin (Fig. S4) but rather with MT structures (Fig. 5E; Fig. S4), a phenotype not seen in *Ctr* control cells (Fig. 5E, see zoom and details of the areas denoted by the white boxes for FLAG and α -tubulin signals). Observing focal planes located between the inclusion membrane and the plasma membrane allowed us to detect clear individual MTs adjacent to the inclusion and to test colocalization; however, because these focal planes do not transverse the inclusion lumen, the clear ring-shaped MT cage observed during chlamydial infection (Al-Zeer et al., 2014; Meier et al., 2023; Haines et al., 2021; Dumoux et al., 2015) is not clearly detected here. Moreover, MT structures associated with CPn0572-FLAG signals were often aberrant compared to control MT structures. Specifically, the diameter of MT filaments in the vicinity of the inclusion in control cells was 0.21 μ m, whereas MT structures in cells infected with CPn0572-expressing *Ctr* were thicker with 0.278 μ m distal of the inclusions and 0.416 μ m in proximity to the inclusion (Fig. 5F). When we infected the colon-derived epithelial Caco-2 cells with CPn0572-expressing *Ctr* cells, at 48 hpi CPn0572 filaments and MT filaments were associated and

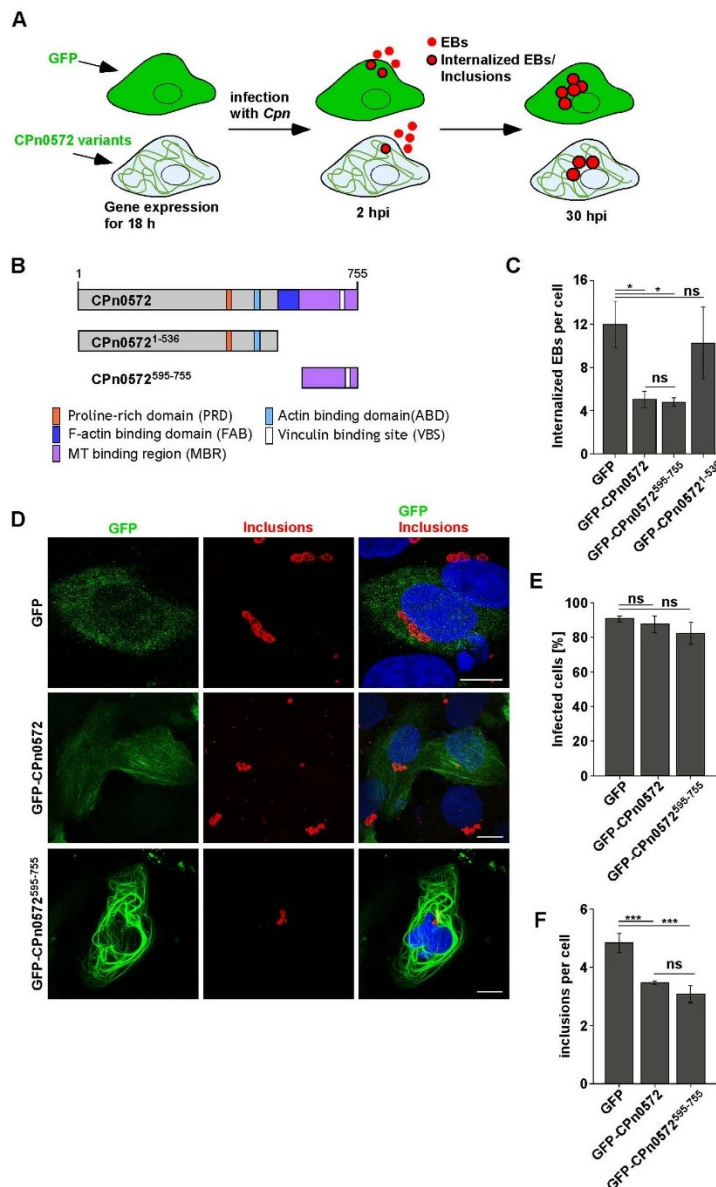


Fig. 4. CPn0572-induced MT modulation attenuates *Cpn* infection. (A) Schematic representation of the experimental setup. (B) Schematic representation of the used CPn0572 protein variants. (C) Quantification of the number of internalized *Cpn* EBs 2 h post infection (MOI=15). Prior to infection, cells were transfected with the GFP or GFP-tagged CPn0572 variants for 18 h. After paraformaldehyde fixation, cells were not permeabilized to stain EBs that were not internalized. $n=3$, each representing up to 130 EBs. * $P<0.05$; ns, not significant (two-tailed unpaired Student's *t*-test). (D) Visualization of *Cpn* inclusions by confocal fluorescence analysis of HEp-2 cells transfected with plasmids encoding GFP or GFP-tagged CPn0572 variants for 18 h, followed by infection with *Cpn* EBs (MOI=5) for 30 h. Inclusions were visualized with the *Cpn* inclusion membrane protein antibody anti-CPn0147 (red) and DNA with DAPI (blue). Scale bars: 10 μ m. (E) Quantification of the number of infected HEp-2 cells (≥ 1 inclusion) transfected and infected as described in D. (F) Quantification of *Cpn* inclusions per cell in HEp-2 populations transfected with indicated plasmids for 18 h prior to *Cpn* infection (MOI=5). For E and F; $n=4-6$ samples each representing 100 GFP-positive cells. *** $P<0.001$; ns, not significant (two-tailed unpaired Student's *t*-test). All error bars denote $\pm$ s.e.m.

often overlapping, whereas the inclusion lumen was not stained (Fig. 5G), supporting the data obtained for infected HEp-2 cells.

These data show that CPn0572 can be expressed and secreted by *Ctr* and that this strain has a delayed inclusion development. The protein associates with invading EBs and, at 48 hpi, with MT structures, which are thickest near inclusions in comparison to MT structures proximal to inclusions in control cells.

CPn0572 variants bind MTs directly *in vitro* and stabilize MTs *in vivo*

CPn0572 can associate with and lead to the formation of thicker MTs when expressed ectopically in human cells and during an infection by *Ctr* expressing CPn0572. In addition, the exclusively MT-binding variant CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ modulates MTs in a dose-dependent manner. Thus, it was of interest to determine whether

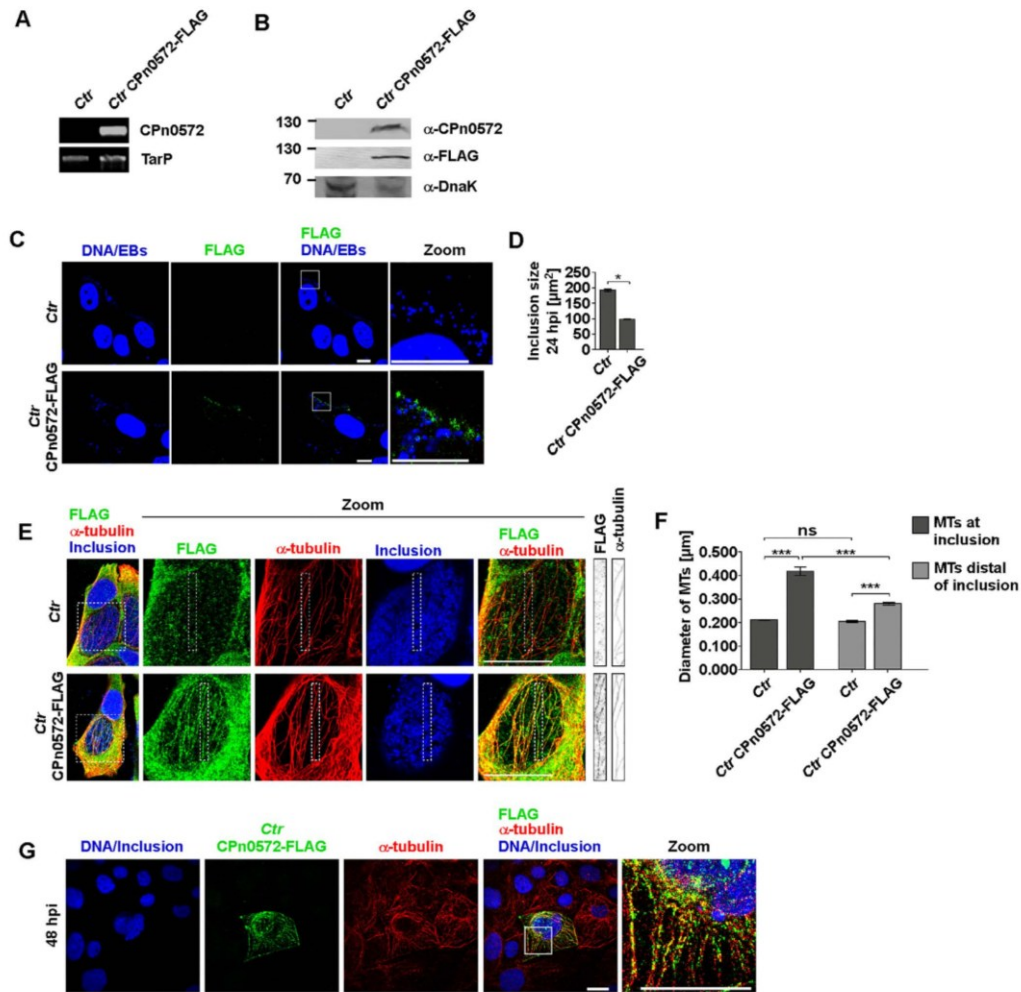


Fig. 5. CPn0572 associated with MTs during chlamydial infection impacts infection efficiency. (A) PCR and (B) western blot verification of *Ctr* expressing CPn0572-FLAG. For B cells infected with *Ctr* or *Ctr* transformed with plasmid encoding CPn0572-FLAG (pMH16) for 48 h were lysed and proteins were separated on 10% SDS-PAGE. For following western blot analysis anti-CPn0572 (generated in our lab), anti-FLAG and anti-DnaK antibodies were used. Images shown are representative of one (A) or two (B) repeats. (C) Confocal images of HEp-2 cells infected with *Ctr* or *Ctr* transformed with plasmid encoding CPn0572-FLAG for 15 min. CPn0572-FLAG was visualized with anti-FLAG antibody (green) and DNA with DAPI (blue). (D) Quantification (mean±s.e.m.) of inclusion size (μm²) 24 hpi of *Ctr* or *Ctr* transformed with plasmid encoding CPn0572-FLAG. *n*=2, each representing 30 cells. **P*<0.05 (two-tailed unpaired Student's *t*-test). (E) Representative images from three independent experiments showing single focal planes of HEp-2 cells infected with *Ctr* or *Ctr* transformed with plasmid encoding CPn0572-FLAG (MOI=0.5, 48 hpi). Cells were treated with 0.5% Triton X-100 for 30 s and fixed with 0.5% glutaraldehyde. Images show a focal plane between the inclusion and the plasma membrane. (F) Quantification (mean±s.e.m.) of the diameter of MTs measured at the inclusion or distal of the inclusion in cells infected with *Ctr*- or CPn0572-expressing *Ctr*. MT diameter was measured by measuring the diameter at three different positions of one MT fiber using ImageJ. Data represent measurements of MT diameter for 10 MTs (*n*=4 cells). ****P*<0.001; ns, not significant (two-tailed unpaired Student's *t*-test). (G) Representative images from three repeats of Caco-2 cells infected with *Ctr* transformed with plasmid encoding CPn0572-FLAG for 48 h. For E and G, CPn0572-FLAG was visualized with anti-FLAG (green), MTs with anti-α-tubulin antibody (red) and eukaryotic and chlamydial DNA with DAPI (blue). For C, E and G, white boxes show enlargements (zoom). Scale bars: 10 μm.

CPn0572 could bind MTs directly and to analyze the nature of the MT modulation. To this aim, we purified recombinant bacterially expressed GST and GST-CPn0572 and either incubated it with

Taxol-stabilized MTs or with buffer alone. After high-speed centrifugation GST and GST-CPn0572 were found to be predominantly in the supernatant in the absence of MTs (Fig. 6A,

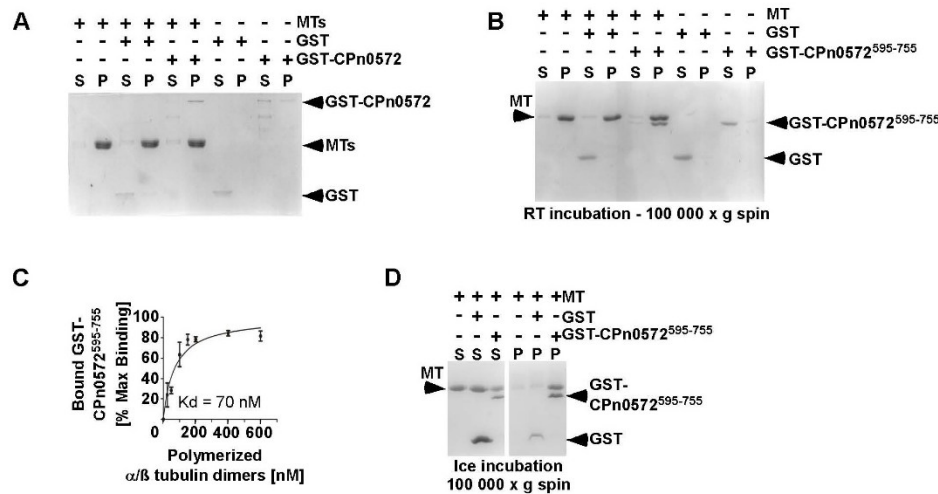


Fig. 6. CPn0572 binds directly to stabilized MTs. (A) Representative co-sedimentation assay of bacterially expressed GST or GST-CPn0572 incubated with Taxol-stabilized MTs or buffer alone for 30 min at RT. After high-speed centrifugation, matching supernatant (S) and pellet (P) fractions were separated via a 12% SDS-PAGE followed by Coomassie staining. +, present; -, absent. (B) Representative co-sedimentation assay of bacterially expressed GST or GST-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵. Experiment was performed as described in A. (C) Equilibrium binding of 100 nM of GST-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ with increasing amounts of Taxol-stabilized MTs in co-sedimentation assays used for the determination of the dissociation constant (K_d) of GST-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ for MTs. Results are mean $\pm$ s.e.m., $n=3$. (D) SDS gel analysis to determine the resistance of non-stabilized MTs to cold-induced MT depolymerization in the presence of GST or GST-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵. All Coomassie-stained gels shown are representative of three repeats.

four rightmost lanes). In contrast, in the presence of MTs, GST-CPn0572 was exclusively present in the pellet fraction, whereas GST and a faint contaminant band in the GST-CPn0572 preparation remained in the supernatant (Fig. 6A, left and central lanes). We next tested whether purified CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ was also able to interact with MTs directly. After high-speed centrifugation CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ was found predominantly in the pellet fraction only in the presence of MTs (Fig. 6B). We next tested the strength of the CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵-MT interaction by determining their apparent equilibrium dissociation constant (K_d). We found that CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ bound MTs with an apparent K_d of 70 nM (95% confidence interval: 26.8 to 113.2 nM) (Fig. 6C). Thus, we conclude that CPn0572 directly binds to MTs.

We next tested the effect of CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ on MT stability by incubating GST or GST-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ with Taxol-stabilized MTs on ice. Following a 10 min ice incubation and high-speed centrifugation, depolymerized tubulin subunits were recovered preferentially in the supernatant of MTs alone or MTs incubated with GST (Fig. 6D, three left most lanes). However, MTs incubated with GST-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ were partially protected from ice depolymerization, as evident by their efficient recovery in the pellet fraction (Fig. 6D, three right most lanes).

To determine the impact of CPn0572 on MT characteristics *in vivo*, we expressed either GFP or GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ in HEp-2 cells and incubated them on ice to induce MT depolymerization (Delphin et al., 2012) prior to immunostaining. In control GFP-expressing cells, the MT fibers present prior to ice incubation were barely detectable after 15 min and undetectable after 60 min on ice (Fig. 7A). In contrast, in GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵-expressing cells, short MT filament-like structures were still detectable even after 60 min on ice (Fig. 7B). In the latter case the MTs appeared fractured and displayed a punctate

pattern that colocalized partially with GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ signals (Fig. 7B, enlargements at the right).

Similarly, in a drug treatment experiment, MTs in GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵-expressing HEp-2 cells displayed strongly increased resistance to the MT-depolymerization drug nocodazole (Movie 1). Thus, CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ has the capacity to stabilize MTs in human cells *in vivo*.

MTs are diversified through a number of posttranslational modifications, which regulate MT properties and are read by cellular effectors, such as molecular motors and MAPs, to provide spatial and temporal specificity to MTs in cells (McKenna et al., 2023). Thus, we wondered whether the stabilization of MTs caused by CPn0572 would be reflected in its acetylation pattern, which has been described as making MTs more resistant to mechanical deformation (Portran et al., 2017). Indeed, in epithelial cells expressing GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ almost all MTs associated with CPn0572 signals, which were thick and abnormally shaped, were acetylated, whereas in GFP-expressing control cells, acetylated MTs are less thick and fewer in numbers (Fig. 7C). Band intensity comparison revealed that in CPn0572-expressing human cells the amount of acetylated α -tubulin was increased 3-fold compared to that seen in control cells (Fig. 7D, E). These data imply that the binding of CPn0572 to MT results in their stabilization and in turn in an increased acetylation.

Although colocalization of full-length GFP-CPn0572 with MTs was only found in a minority of cells, we still wanted to test whether this association was sufficient for MT cold protection. Unlike GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵, full-length GFP-CPn0572 was unable to protect MTs after 60 min ice exposure (Fig. S5A). Surprisingly however, we noted a new actin phenotype which was the appearance of actin aggregates that colocalized with GFP-CPn0572 (Fig. S5A-D). We assume that the cells showing actin aggregation are those cells that

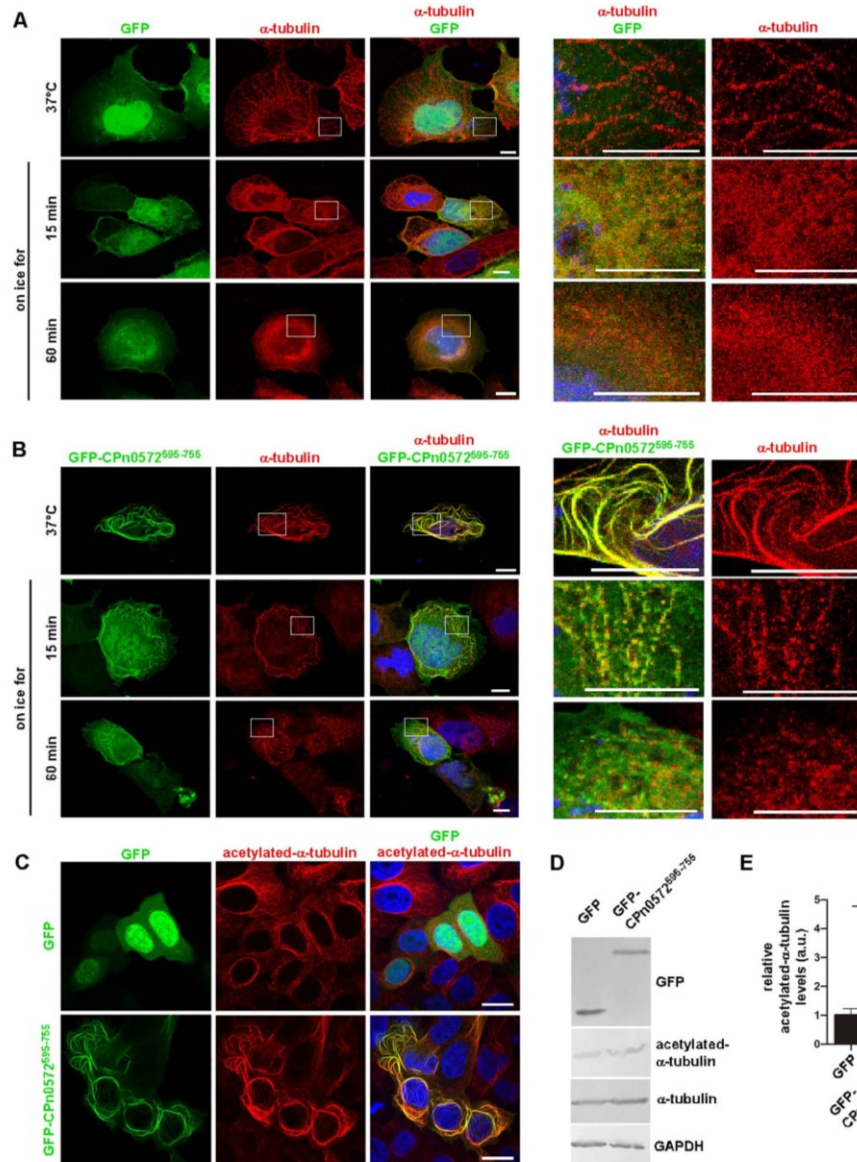


Fig. 7. CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ protects MTs against cold-induced MT depolymerization. (A,B) Representative confocal images of HEP-2 cells transfected with plasmids encoding GFP (A) or GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ (B) for 18 h. MTs were wild-type (after incubation at 37°C) or depolymerized through incubation on ice for 15 or 60 min and then visualized by anti-α-tubulin antibody (red) and DAPI to stain DNA (blue). Boxed regions correspond to the enlarged images shown on the right. Scale bars: 10 μm. (C) Confocal images of HEP-2 cells transfected with a plasmid encoding GFP or GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ for 18 h. MTs were visualized with an anti-acetylated-α-tubulin antibody (red) and DNA with DAPI (blue). Images shown in A–C are representative of three or more repeats. Scale bars: 10 μm. (D) A typical example of a Western blot analysis of HEP-2 cells expressing GFP or GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ for 18 h. Protein extracts were separated on a 10% SDS-PAGE followed by western blot analysis. Western blot was probed with anti-GFP, anti-acetylated-α-tubulin, anti-α-tubulin or anti-GAPDH antibodies. (E) Quantification of relative acetylated-α-tubulin levels shown in D. Band intensities from Western blots of acetylated-α-tubulin in cells expressing GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ were determined and compared relative to control cells (GFP alone=1). ImageJ 1.47v was used for band intensity quantification. Error bars denote ±s.e.m., n=3 independent experiments. *P<0.05 (two-tailed unpaired Student's t-test).

before ice treatment had CPn0572 on MTs. Considering that depleting cells of MTs has an impact on the actin cytoskeleton of CPn0572-expressing cells, we conclude MTs have the capacity to play an important role in the regulation of CPn0572-mediated actin modulation.

DISCUSSION

The cytoskeleton of animal cells is a highly complex, adaptable structure required for a wide variety of distinct cellular processes. These range from cargo transport, endocytosis, force transmission and cell division to the processing and subsequent adaptation to extrinsic signals. To carry out these multiple tasks, the actin, MT and intermediate filament networks need to be highly adaptable and communicate with each other. Given the multiple roles of the eukaryotic cytoskeleton, it is unsurprising that the subversion of the infected cells cytoskeleton has evolved in many pathogens and is used for different tasks during the pathogen life cycle (Li et al., 2023; Hartland et al., 2022). For example, *Listeria* and *Shigella* use the host actin cytoskeleton for their uptake at the beginning of the infection cycle but also at the end of the cycle to spread from cell to cell (Hartland et al., 2022; Dowd et al., 2021).

The hijacking of the dynamic actin scaffold of the host is also crucial for the pathogenicity of the obligate intracellular bacteria *Ctr* and *Cpn*, both of which represent a worldwide major public health burden (Jordan et al., 2020; Campbell and Hahn, 2020). Here, members of the chlamydial TarP family are known early secreted effector proteins, which nucleate and regulate actin dynamics (Jewett et al., 2006; Caven and Carabeo, 2019). Moreover, TarP signaling activates host signaling proteins such as Rac1, phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and the WAVE2 complex, in addition to recruiting the actin effectors formin and Arp2/3 (Romero et al., 2020; Romero and Carabeo, 2022).

In this work, we define an additional and unique role for *Cpn* TarP member CPn0572, beyond its well-established role as an actin nucleator, namely the association with and modulation of the MT cytoskeleton. Several eukaryotic proteins have been identified with the ability to physically crosslink F-actin and MT filaments, among them tau and MAP2 (Cabrales Fontela et al., 2017). However, only formins and adenomatous-polyposis-coli (APC) not only bind MTs and actin, but also have the intrinsic ability to polymerize actin filaments (Juanes et al., 2017; Henty-Ridilla et al., 2016). For instance, the formin mDia1 has the ability to polymerize actin from MT ends. Given that CPn0572 is able to polymerize actin (Jewett et al., 2010) and binds MTs, it is conceivable that this chlamydial effector protein functions in a similar way. Moreover, as these properties are not only found in the human *Cpn* isolate GiD but also in the CPn0572 homolog from the koala isolate LPCoLN, which is phylogenetically basal to the human isolates (Myers et al., 2009), we propose that the dual function of these proteins points to an evolutionarily conserved mechanism.

CPn0572 colocalizes to MTs in human interphase and mitotic cells and binds directly to MTs *in vitro*. Thus, CPn0572 fulfills the characteristics of a MAP. The apparent dissociation constant of CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ to MTs of 70 nM is similar to that of tau (Goode et al., 1997; Gigant et al., 2014) and EB1 (Berrueta et al., 1998; Tirnauer et al., 2002).

MTs are highly dynamic structures with the ability to change the MT polymerization-depolymerization cycle according to the needs of the cell. As ectopic expression of CPn0572 in human cells protects MTs from cold- and drug-induced depolymerization *in vivo* and the presence of the C-terminal variant CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ leads to increased resistance to cold-induced MT depolymerization *in vitro*,

we propose that CPn0572 has a MT stabilization function. How this is achieved on a molecular level still needs to be determined; however, the finding that the presence of CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ increases the amount of acetylated MTs in the cell might suggest that changing MT properties could involve tubulin post-translational modification (Janke and Montagnac, 2017).

To our knowledge, CPn0572 is the only bacterial protein identified that directly binds to and regulates both the actin and MT cytoskeletal systems, suggesting that this chlamydial protein might provide a functional crosstalk between the two cytoskeletal systems to modulate specific cellular process(es) (Dogterom and Koenderink, 2019).

What then is the role of CPn0572 in chlamydial infection? CPn0572 is expressed late in the *Cpn* infection cycle so to be present in the infectious *Cpn* EBs, and is detected 15 min post infection on actin and EBs (Jewett et al., 2010; Zrieq et al., 2017; Hänsch et al., 2020). Plasmid-borne expression of CPn0572 in *Ctr* shows that the secreted protein can associate with and modulate MTs in the vicinity of the chlamydial inclusion. The *Ctr* system used is artificial but is a very valuable tool to assay the connection between secreted CPn0572 and MTs. We do not at present know whether the actin-modulating and MT-modulating functions of CPn0572 occur in concert during early infection. However, the two functions appear to be intertwined as shown by the appearance of actin aggregates in cells expressing CPn0572 and a depolymerized MT cytoskeleton.

MATERIALS AND METHODS

Construction of plasmids

DNA sequences encoding CPn0572, CPn0572 deletion variants, or other members of the TarP family were amplified by PCR from genomic DNA [*Cpn* GiD, *Cpn* LPCoLN, *Ctr* L2 or *C. psittaci* 6BC; Jantos et al., 1997; Jan Rupp (Department of Infectious Diseases and Microbiology, University of Lübeck, Lübeck, Germany); ATCC no. VR-902B; and Li et al., 2022, respectively] or a pre-existing plasmid (full-length CPn0572, Braun et al., 2019) using custom-synthesized oligonucleotide primers (40-nucleotide homology to expression vector and 20-nucleotide homology to the respective gene) (Merck KGaA, Germany). Amplified DNA sequences were cloned into appropriate plasmids (pEGFP_2x_FYVE; #140047 Addgene) with deletion of 2x_FYVE and addition of CEN6-ARSH4-TRP1 cassette from pYD1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), resulting in pAE67; or modified pGEX-5X-1 (GE Healthcare, Chicago, IL) harboring a CEN6-ARSH4-TRP1 where the factor Xa has been replaced with a TEV protease recognition site) using *in vivo* homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2 (as described previously; Moellken and Hegemann, 2008), amplified in *Escherichia coli* XL-1 blue (Stratagene) and the insertion verified by sequencing (Microsynth SeqLab GmbH, Germany). For CPn0572 expression in *Ctr*, plasmid p2TK2-SW2 IncDProm-RSGFP-IncDTerm (Agaisse and Derré, 2013) harboring an IncD promoter-RSGFP-IncD terminator expression cassette was used as backbone. For cloning by homologous recombination in *S. cerevisiae*, the CEN6-ARSH4-TRP1 cassette from pYD1 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) was added upstream to the IncD promoter (yielding pKM209) and RSGFP was replaced by a 3x FLAG tag (resulting in pKM255). Finally, the DNA sequence encoding *cpn0572* was cloned N-terminally to the 3x FLAG tag (pMH16).

Final constructs used were: CPn0572: bp 1–2265 (Braun et al., 2019); CPn0572¹⁻⁵³⁶: bp 1–1608 (Braun et al., 2019); CPn0572⁴⁷⁸⁻⁷⁵⁵: bp 1432–2265 (Braun et al., 2019); CPn0572⁵³⁶⁻⁷⁵⁵: bp 1606–2265 (Braun et al., 2019); CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵: bp 1783–2265; CPn0572⁶¹⁵⁻⁷⁵⁵: bp 1843–2265; CPn0572⁶³⁵⁻⁷⁵⁵: bp 1903–2265; CPn0572⁶⁵⁵⁻⁷⁵⁵: bp 1963–2265; CPn0572⁸⁰⁶⁻⁹⁹⁰ (*Cpn* LPCoLN): bp 2416–2970; TarP⁷¹²⁻⁸⁷⁰ (*C. psittaci*): bp 2134–2610; TarP⁸⁶⁸⁻¹⁰⁰⁵ (*Ctr*): bp 2602–3015.

Cell culture and plasmid transfection of mammalian cells

Human epithelial HEP-2 (ATCC; CCL-23, contamination free) and U2OS (ATCC; HTB-96, contamination free) cells were cultured in Dulbecco's

modified Eagle's medium (DMEM; Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), non-essential amino-acids (Thermo Fisher Scientific) and MEM vitamins (Thermo Fisher Scientific) at 37°C and 6% CO₂. For transfection, a 70% confluent monolayer was grown in 24-well plates (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany) on coverslips following medium exchange with fresh medium without FCS. After 18 h of transfection using TurboFect (Thermo Fisher Scientific), cells were fixed with 3% paraformaldehyde (Fisher Chemicals) in HBSS for 10 min at room temperature (RT) and washed three times with HBSS (Thermo Fisher Scientific). For permeabilization, 2% saponin (Merck KGaA, Germany) in PBS was used for 20 min at RT. Staining of MTs was performed with anti- α -tubulin antibody (Origene Technologies, Inc., Rockville, MD, USA; #BM753S; 1:150), acetylated MTs with anti-acetylated- α -tubulin antibody (Thermo Fisher Scientific; #32-2700; 1:100), vinculin with anti-vinculin antibody (Merck KGaA; #V9264; 1:100) and actin with Rhodamine-phalloidin as recommended by manufacturer (Thermo Fisher Scientific; #R415; 0.5 μ l of 400 $\times$ stock solution in 200 μ l of PBS-Saponin solution for each coverslip), all detected with fluorescently conjugated secondary antibodies (Thermo Fisher Scientific). To visualize DNA DAPI (Merck KGaA; 1:500) was used. For western blot analysis, proteins were verified by using anti-GFP antibody (Thermo Fisher Scientific; #MA5-15256; 1:2500), anti- α -tubulin antibody (Merck KGaA; #T6199; 1:1000), anti-acetylated-tubulin antibody (Merck KGaA; #T7451; 1:20,000), anti-GAPDH antibody (Thermo Fisher Scientific; #MA5-15738; 1:1000).

Microscopy of mammalian cells and image processing

Images were acquired using an inverse Nikon TIE Live Cell Confocal C2plus with 100 $\times$ TIRF objective and a C2 SH C2 scanner. All images are displayed as maximum intensity projections, except when noted. Analysis of images and measurements were generated with Nikon Element software and ImageJ 1.47v (National Institute of Health, Bethesda MD, USA).

Protein purification

GST and GST-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ were expressed in *E. coli* Rosetta (DE3) cells (Merck KGaA) and purified using glutathione agarose beads (Merck KGaA) according to manufacturer's instructions and dialyzed overnight in buffer A1 (50 mM Hepes-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl and 20% glycerol; w/v). The purity and integrity of fusion proteins were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie Blue staining.

MT binding and stabilization assays

MT polymerization was undertaken according to the manufacturer's instruction (Cytoskeleton Inc.). MT binding assays were carried out as follows: 25 μ M of Taxol-stabilized MTs (equivalent to 4 μ M tubulin dimers) in 80 mM PIPES pH 7.0, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 72 μ M GTP, 0.4% glycerol (w/v) and 18 μ M Taxol were incubated with 25 μ l of 4.6 μ M GST or GST-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ in Buffer A1 for 30 min at RT. Mixtures were then layered on top of a 100 μ l glycerol cushion (80 mM PIPES pH 7.0, 1 mM EGTA, 60% glycerol and 20 μ M Taxol) and centrifuged at 100,000 *g* at RT for 45 min. The supernatant was carefully collected before the extraction of the glycerol cushion. Pellets were resuspended and loaded next to their corresponding supernatant fraction in a 12% SDS gel, followed by Coomassie Blue staining. For MT stabilization assays, MT polymerization according to manufacturer's instruction was carried out followed by addition of 4.4 μ M GST or GST-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ in a final volume of 32 μ l. Mixtures were incubated for 25 min at 35°C and then incubated on ice for 10 min. Surviving MTs were stabilized by addition of 28 μ l ice-cold taxol-stabilization buffer (80 mM PIPES pH 7.0, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA and 20 μ M Taxol), layered on top of a 100 μ l-glycerol cushion, centrifuged at 100,000 *g* at RT for 45 min and processed as described above.

Cold- or drug-induced MT-depolymerization

For cold-induced MT-depolymerization, HEP-2 cells were incubated on ice for 0, 15 or 60 min after transfection. MTs were stained with anti- α -tubulin antibody (Origene Technologies, Inc.; #BM753S; 1:150) and DNA was

visualized with DAPI (Merck KGaA, Darmstadt, Germany; 1:500). For nocodazole treatment of HEP-2 cells, a 70% confluent monolayer of HEP-2 cells was grown in a μ -Dish with a glass bottom (ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany) for life cell imaging. After 18 h of transfection, cells were washed twice with imaging buffer containing glucose following addition of SiR-tubulin (Spirochrome, Switzerland; #SC002; 1 μ M) for MT visualization. Cells were incubated for 30 min at 37°C. DNA was visualized by using Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific; 1:500). For MT de-polymerization, stained cells were treated with nocodazole (Merck KGaA; 10 μ g/ml).

Infection with Cpn

Cpn GiD cells (Jantos et al., 1997) was propagated in HEP-2 cells. EBs were purified in a 30% gastrographin solution (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Germany) and stored in SPG buffer (220 mM sucrose, 3.8 mM KH₂PO₄, 10.8 mM Na₂HPO₄, 4.9 mM L-glutamine) at -80°C. Transfected HEP-2 cells were infected at a given multiplicity of infection (MOI) with Cpn GiD by adding purified EBs suspended in DMEM followed by centrifugation at 950 *g* at 30°C for 1 h. The medium was replaced by fresh medium containing 12 μ g/ml cycloheximide and cells were incubated at 37°C for 30 h. Paraformaldehyde- and methanol-fixed samples were used for microscopy. Inclusions were visualized with the Cpn inclusion membrane protein antibody anti-CPn0147 (generated in our lab; 1:50). For determination of internalized EBs, infected cells were fixed with 3% paraformaldehyde after 120 min post infection and uninternalized EBs were stained with a rabbit anti-Cpn GiD antibody (generated in our lab; 1:40) prior to cell permeabilization and DNA was stained with DAPI (Merck KGaA; 1:500).

Plasmid transformation of Ctr

A crude stock of Ctr L2 was centrifuged for 20 min at 21,885 *g* at 4°C. Resuspension of the pellet in CaCl₂ buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM CaCl₂) was followed by addition of 5 μ g plasmid DNA and incubation for 30 min at RT. The suspension was placed on confluent HEP-2 cells and filled up with fresh medium. After spinning for 60 min at 950 *g* at 37°C the medium was replaced fresh medium containing 12 μ g/ml cycloheximide (Merck KGaA; #C4859) and incubated overnight at 37°C. The next day the medium was replaced by medium with cycloheximide and 1 μ l/ml penicillin G (Merck KGaA; #13752) for selection. After incubation for 24 h at 37°C, wells were scraped, sonicated for 30 s and centrifuged for 15 min at 870 *g* at 37°C. The supernatant was split up to flasks with confluent HEP-2 cells and centrifuged for 60 min at 950 *g* at 37°C. After spinning, the medium was changed with fresh medium with cycloheximide and penicillin G and incubated for 48 h at 37°C. Cells were scraped, sonicated and centrifuged (15 min, 870 *g*, 37°C). The supernatant was centrifuged for 20 min at 21,885 *g* at 4°C. Then the pellet was resuspended in SPG buffer (220 mM sucrose, 3.8 mM KH₂PO₄, 10.8 mM Na₂HPO₄ and 4.9 mM L-glutamine) in an ultrasonic bath and frozen at -80°C. For protein verification via western blot an anti-CPn0572 antibody (generated in our lab; 1:50), anti-FLAG antibody (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; PA1-984B; 1:150) or anti-DnaK antibody (from Dr Svend Birkelund, Department of Health Science and Technology, Medical Microbiology and Immunology, Aalborg University, 9220 Aalborg, Denmark; 1:50) was used.

Infection with transformed Ctr

HEP-2 cells were infected by addition of control or plasmid transformed Ctr L2 and centrifugation for 60 min at 950 *g* at 37°C. The medium was replaced with fresh medium containing 12 μ g/ml cycloheximide and cells incubated at 37°C for 15 min. Cells were fixed with methanol, washed two times with HBSS (Thermo Fisher Scientific) and blocked at RT for 10 min with PBS containing 0.1% Triton X-100 and 2% BSA. Cells infected for 48 h were pre-extracted with 80 mM PIPES pH 6.8, 1 mM MgCl₂, 5 mM EGTA and 0.5% Triton X-100 for 30 s, fixed by addition of 0.5% glutaraldehyde for 10 min and quenched with 0.1% NaBH₄ for 7 min. Cells were washed with PBS, and blocked as described above. Anti-FLAG (mouse) antibody (Merck KGaA; #F1804; 1:500) or anti-FLAG (rabbit) antibody (Thermo Fisher Scientific; PA1-984B; 1:500) was incubated

RESEARCH ARTICLE

Journal of Cell Science (2024) 137, jcs263450. doi:10.1242/jcs.263450

overnight at 4°C in blocking solution. Anti- α -tubulin antibody (Origene Technologies, Inc., Rockville, MD, USA; #BM753S; 1:150) was used for MT visualization. DAPI (Merck KGaA, Darmstadt, Germany; 1:500) was used to visualize DNA.

Phylogenetic analysis

The multiple protein sequence alignment and phylogenetic tree of TarP homologues were generated using the Clustal Omega Multiple Sequence Alignment program (EMBL-EBI) selecting the MBED-LIKE CLUSTERING GUIDE-TREE and MBED-LIKE CLUSTERIN ITERATION.

Data analysis

For data analysis and statistical significance, Excel (Microsoft Corporation, USA) or Prism (GraphPad Software Inc., USA) was used. A two-tailed unpaired Student's *t*-test was used to determine statistical significance. Sample sizes in experiments were enough to ensure adequate detection of effect size. For figure creation Canvas™ 15 Software (ACD Systems of America, Inc.) was used. No AI tools were used.

Acknowledgements

We thank Alexandra Laska for initial work on CPn0572 variants, Roland Piekorz for the U2OS cell line and Sebastian Hänsch at the Center for Advanced Imaging for his help with microscopy (all at Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany). We also thank Dr Svend Birkelund (Department of Health Science and Technology, Medical Microbiology and Immunology, Aalborg University, 9220 Aalborg, Denmark) for the anti-DnaK antibody.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Conceptualization: J.H.H., U.F.; Methodology: J.H.H., U.F.; Formal analysis: M.H., A.R.A.-R., K.S., M.P.A.-H., C.B., R.Z., K.M.; Investigation: M.H., A.R.A.-R., K.S., M.P.A.-H., C.B., R.Z.; Data Curation: M.H., A.R.A.-R., K.S., M.P.A.-H., C.B.; Writing – original draft preparation: M.H., A.R.A.-R., J.H.H., U.F.; Visualization: M.H., A.R.A.-R., K.S., M.P.A.-H., C.B.; Supervision: J.H.H., U.F.; Project administration: J.H.H., U.F.; Funding acquisition: J.H.H., U.F.

Funding

This study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft research grant FL 168/5-1 (U.F.) and HE 1383/13-1 (J.H.H.) and the Jürgen Manchot Stiftung to M.H. and K.S. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Open access funding provided by Heinrich-Heine-University Düsseldorf. Deposited in PMC for immediate release.

Data availability

All relevant data can be found within the article and its [supplementary information](#).

References

- Agaisse, H. and Derré, I. (2013). A C. trachomatis cloning vector and the generation of C. trachomatis strains expressing fluorescent proteins under the control of a C. trachomatis promoter. *PLoS ONE* **8**, e57090. doi:10.1371/journal.pone.0057090
- Al-Zeer, M. A., Al-Younes, H. M., Kerr, M., Abu-Lubad, M., Gonzalez, E., Brinkmann, V. and Meyer, T. F. (2014). Chlamydia trachomatis remodels stable microtubules to coordinate Golgi stack recruitment to the chlamydial inclusion surface. *Mol. Microbiol.* **94**, 1285-1297. doi:10.1111/mmi.12829
- Bayramova, F., Jacquier, N. and Greub, G. (2018). Insight in the biology of Chlamydia-related bacteria. *Microbes Infect.* **20**, 432-440. doi:10.1016/j.micinf.2017.11.008
- Becker, E. and Hegemann, J. H. (2014). All subtypes of the Pmp adhesin family are implicated in chlamydial virulence and show species-specific function. *Microbiologyopen* **3**, 544-556. doi:10.1002/mbo3.186
- Belland, R. J., Zhong, G., Crane, D. D., Hogan, D., Sturdevant, D., Sharma, J., Beatty, W. L. and Caldwell, H. D. (2003). Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of Chlamydia trachomatis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 8478-8483. doi:10.1073/pnas.1331135100
- Berrueta, L., Kraeft, S.-K., Tirnauer, J. S., Schuyler, S. C., Chen, L. B., Hill, D. E., Pellman, D. and Bierer, B. E. (1998). The adenomatous polyposis coli-binding protein EB1 is associated with cytoplasmic and spindle microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 10596-10601. doi:10.1073/pnas.95.18.10596
- Braun, C., Alcázar-Román, A. R., Laska, A., Mölleken, K., Fleig, U. and Hegemann, J. H. (2019). CPn0572, the C. pneumoniae ortholog of TarP, reorganizes the actin cytoskeleton via a newly identified F-actin binding domain and recruitment of vinculin. *PLoS ONE* **14**, e0210403. doi:10.1371/journal.pone.0210403
- Cabrera Fontela, Y., Kadavath, H., Biernat, J., Riedel, D., Mandelkow, E. and Zweckstetter, M. (2017). Multivalent cross-linking of actin filaments and microtubules through the microtubule-associated protein Tau. *Nat. Commun.* **8**, 1981. doi:10.1038/s41467-017-02230-8
- Campanacci, V., Urvoas, A., Cantos-Fernandes, S., Aumont-Nicaise, M., Arteni, A.-A., Velours, C., Valerio-Lepiniec, M., Dreier, B., Plückthun, A., Pilon, A. et al. (2019). Insight into microtubule nucleation from tubulin-capping proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **116**, 9859-9864. doi:10.1073/pnas.1813559116
- Campbell, L. A. and Hahn, D. (2020). Chlamydia pneumoniae infections. In *Chlamydia Biology: From Genome to Disease* (ed. M. Tan, J. H. Hegemann and C. Sütterlin), pp. 31-58. Caister Academic Press.
- Caven, L. and Carabeo, R. A. (2019). Pathogenic puppetry: manipulation of the host actin cytoskeleton by Chlamydia trachomatis. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 90. doi:10.3390/jms21010090
- Clifton, D. R., Fields, K. A., Grieshaber, S. S., Dooley, C. A., Fischer, E. R., Mead, D. J., Carabeo, R. A. and Hackstadt, T. (2004). A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 10166-10171. doi:10.1073/pnas.0402829101
- Colonne, P. M., Winchell, C. G. and Voith, D. E. (2016). Hijacking host cell highways: manipulation of the host actin cytoskeleton by obligate intracellular bacterial pathogens. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **6**, 107. doi:10.3389/fcimb.2016.00107
- Delphin, C., Bouvier, D., Seggio, M., Couriol, E., Saoudi, Y., Denarier, E., Bosc, C., Valiron, O., Bisbal, M., Arnal, I. et al. (2012). MAP6-F is a temperature sensor that directly binds to and protects microtubules from cold-induced depolymerization. *J. Biol. Chem.* **287**, 35127-35138. doi:10.1074/jbc.M112.398339
- Dogterom, M. and Koenderink, G. H. (2019). Actin-microtubule crosstalk in cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 38-54. doi:10.1038/s41580-018-0067-1
- Dowd, G. C., Mortuza, R. and Ireton, K. (2021). Molecular mechanisms of intercellular dissemination of bacterial pathogens. *Trends Microbiol.* **29**, 127-141. doi:10.1016/j.tim.2020.06.008
- Dumoux, M., Menny, A., Delacour, D. and Hayward, R. D. (2015). A Chlamydia effector recruits CEP170 to reprogram host microtubule organization. *J. Cell Sci.* **128**, 3420-3434. doi:10.1242/jcs.169318
- Feng, C., Thyagarajan, P., Shorey, M., Seebold, D. Y., Weiner, A. T., Albertson, R. M., Rao, K. S., Sagasti, A., Goetschius, D. J. and Rolls, M. M. (2019). Patronin-mediated minus end growth is required for dendritic microtubule polarity. *J. Cell Biol.* **218**, 2309-2328. doi:10.1083/jcb.201810155
- Fong, K.-W., Leung, J. W., Li, Y., Wang, W., Feng, L., Ma, W., Liu, D., Songyang, Z. and Chen, J. (2013). MTR120/KIAA1383, a novel microtubule-associated protein, promotes microtubule stability and ensures cytokinesis. *J. Cell Sci.* **126**, 825-837. doi:10.1242/jcs.116137
- Galle, J. N., Fechtner, T., Eierhoff, T., Römer, W. and Hegemann, J. H. (2019). A Chlamydia pneumoniae adhesin induces phosphatidylserine exposure on host cells. *Nat. Commun.* **10**, 4644. doi:10.1038/s41467-019-12419-8
- Gigant, B., Landrieu, I., Fauquant, C., Barbier, P., Huvent, I., Wieruszkeski, J.-M., Knossow, M. and Lippens, G. (2014). Mechanism of Tau-promoted microtubule assembly as probed by NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 12615-12623. doi:10.1021/ja504864m
- Goode, B. L., Denis, P. E., Panda, D., Radeke, M. J., Miller, H. P., Wilson, L. and Feinstein, S. C. (1997). Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol. Biol. Cell* **8**, 353-365. doi:10.1091/mbc.8.2.353
- Goodson, H. V. and Jonasson, E. M. (2018). Microtubules and microtubule-associated proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, a022608. doi:10.1101/cshperspect.a022608
- Grayston, J. T., Kuo, C.-C., Coulson, A. S., Campbell, L. A., Lawrence, R. D., Lee, M. J., Strandness, E. D. and Wang, S.-P. (1995). Chlamydia pneumoniae (TWAR) in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation* **92**, 3397-3400. doi:10.1161/01.CIR.92.12.3397
- Grieshaber, S. S., Grieshaber, N. A. and Hackstadt, T. (2003). Chlamydia trachomatis uses host cell dynein to traffic to the microtubule-organizing center in a p50 dynamitin-independent process. *J. Cell Sci.* **116**, 3793-3802. doi:10.1242/jcs.00695
- Grieshaber, S. S., Grieshaber, N. A., Miller, N. and Hackstadt, T. (2006). Chlamydia trachomatis causes centrosomal defects resulting in chromosomal segregation abnormalities. *Traffic* **7**, 940-949. doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00439.x
- Haglund, C. M. and Welch, M. D. (2011). Pathogens and polymers: microbe-host interactions illuminate the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **195**, 7-17. doi:10.1083/jcb.201103148
- Haines, A., Wesolowski, J., Ryan, N. M., Monteiro-Brás, T. and Paumet, F. (2021). Cross talk between ARF1 and RhoA coordinates the formation of

- cytoskeletal scaffolds during chlamydia infection. *mBio* **12**, e0239721. doi:10.1128/mBio.02397-21
- Hänsch, S., Spona, D., Murra, G., Köhrer, K., Subtil, A., Furtado, A. R., Lichtenthaler, S. F., Dislich, B., Mölleken, K. and Hegemann, J. H. (2020). Chlamydia-induced curvature of the host-cell plasma membrane is required for infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **117**, 2634-2644. doi:10.1073/pnas.1911528117
- Hartland, E. L., Ghosal, D. and Giogha, C. (2022). Manipulation of epithelial cell architecture by the bacterial pathogens *Listeria* and *Shigella*. *Curr. Opin. Cell Biol.* **79**, 102131. doi:10.1016/j.cob.2022.102131
- Henty-Ridilla, J. L., Rankova, A., Eskin, J. A., Kenny, K. and Goode, B. L. (2016). Accelerated actin filament polymerization from microtubule plus ends. *Science* **352**, 1004-1009. doi:10.1126/science.124709
- Herrmann, H. and Aebi, U. (2016). Intermediate filaments: structure and assembly. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, a018242. doi:10.1101/cshperspect.a018242
- Hohmann, T. and Dehghani, F. (2019). The cytoskeleton-A complex interacting meshwork. *Cells* **8**, 362. doi:10.3390/cells8040362
- Janke, C. and Montagnac, G. (2017). Causes and consequences of microtubule acetylation. *Curr. Biol.* **27**, R1287-R1292. doi:10.1016/j.cub.2017.10.044
- Jantos, C. A., Heck, S., Roggendorf, R., Sen-Gupta, M. and Hegemann, J. H. (1997). Antigenic and molecular analyses of different *Chlamydia pneumoniae* strains. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 620-623. doi:10.1128/jcm.35.3.620-623.1997
- Jewett, T. J., Fischer, E. R., Mead, D. J. and Hackstadt, T. (2006). Chlamydial TARP is a bacterial nucleator of actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 15599-15604. doi:10.1073/pnas.0603044103
- Jewett, T. J., Miller, N. J., Dooley, C. A. and Hackstadt, T. (2010). The conserved Tarp actin binding domain is important for chlamydial invasion. *PLoS Pathog.* **6**, e1000997. doi:10.1371/journal.ppat.1000997
- Jiwani, S., Alvarado, S., Ohr, R. J., Romero, A., Nguyen, B. and Jewett, T. J. (2013). Chlamydia trachomatis Tarp harbors distinct G and F actin binding domains that bundle actin filaments. *J. Bacteriol.* **195**, 708-716. doi:10.1128/JB.01768-12
- Jordan, S., Nelson, D. and Geisler, W. (2020). *Chlamydia trachomatis* infections. In *Chlamydia Biology: From Genome to Disease* (ed. M. Tan, J. H. Hegemann and C. Sütterlin), pp. 1-30. Caister Academic Press.
- Juanes, M. A., Bouguenina, H., Eskin, J. A., Jaiswal, R., Badache, A. and Goode, B. L. (2017). Adenomatous polyposis coli nucleates actin assembly to drive cell migration and microtubule-induced focal adhesion turnover. *J. Cell Biol.* **216**, 2859-2875. doi:10.1083/jcb.201702007
- Knowlton, A. E., Brown, H. M., Richards, T. S., Andreolas, L. A., Patel, R. K. and Grishaber, S. S. (2011). Chlamydia trachomatis infection causes mitotic spindle pole defects independently from its effects on centrosome amplification. *Traffic* **12**, 854-866. doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01204.x
- Kumar, Y. and Valdivia, R. H. (2008). Actin and intermediate filaments stabilize the Chlamydia trachomatis vacuole by forming dynamic structural scaffolds. *Cell Host Microbe* **4**, 159-169. doi:10.1016/j.chom.2008.05.018
- Li, X., Zuo, Z., Wang, Y., Hegemann, J. H. and He, C. (2022). Polymorphic membrane protein 17G of *Chlamydia psittaci* mediated the binding and invasion of bacteria to host cells by interacting and activating EGFR of the host. *Front. Immunol.* **12**, 818487. doi:10.3389/fimmu.2021.818487
- Li, M., Peng, D., Cao, H., Yang, X., Li, S., Qiu, H.-J. and Li, L.-F. (2023). The host cytoskeleton functions as a pleiotropic scaffold: orchestrating regulation of the viral life cycle and mediating host antiviral innate immune responses. *Viruses* **15**, 1354. doi:10.3390/v15061354
- Luis, M. P., Pereira, I. S., Bugalhao, J. N., Simoes, C. N., Mota, C., Romão, M. J. and Mota, L. J. (2023). The Chlamydia trachomatis IncM protein interferes with host cell cytokinesis, centrosome positioning, and Golgi distribution and contributes to the stability of the pathogen-containing vacuole. *Infect. Immun.* **91**, e0040522. doi:10.1128/iai.00405-22
- Lutter, E. I., Bonner, C., Holland, M. J., Suchland, R. J., Stamm, W. E., Jewett, T. J., McClarty, G. and Hackstadt, T. (2010). Phylogenetic analysis of Chlamydia trachomatis Tarp and correlation with clinical phenotype. *Infect. Immun.* **78**, 3678-3688. doi:10.1128/IAI.00515-10
- Mäurer, A. P., Mehlitz, A., Mollenkopf, H. J. and Meyer, T. F. (2007). Gene expression profiles of Chlamydia pneumoniae during the developmental cycle and iron depletion-mediated persistence. *PLoS Pathog.* **3**, e83. doi:10.1371/journal.ppat.0030083
- McKenna, E. D., Sarbanes, S. L., Cummings, S. W. and Roll-Mecak, A. (2023). The tubulin code, from molecules to health and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **39**, 331-361. doi:10.1146/annurev-cellbio-030123-032748
- Meier, K., Jachmann, L. H., Türköz, G., Babu Sait, M. R., Perez, L., Kepp, O., Valdivia, R. H., Kroemer, G. and Sixt, B. S. (2023). The Chlamydia effector CpoS modulates the inclusion microenvironment and restricts the interferon response by acting on Rab35. *mBio* **14**, e0319022. doi:10.1128/mbio.03190-22
- Meier, S. M., Steinmetz, M. O. and Barral, Y. (2024). Microtubule specialization by +TIP networks: from mechanisms to functional implications. *Trends Biochem. Sci.* **49**, 318-332. doi:10.1016/j.tbs.2024.01.005
- Mital, J., Lutter, E. I., Barger, A. C., Dooley, C. A. and Hackstadt, T. (2015). Chlamydia trachomatis inclusion membrane protein CT850 interacts with the dynein light chain DYNLT1 (Tctex1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **462**, 165-170. doi:10.1016/j.bbrc.2015.04.116
- Moelleken, K. and Hegemann, J. H. (2008). The Chlamydia outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding. *Mol. Microbiol.* **67**, 403-419. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.06050.x
- Mölleken, K., Becker, E. and Hegemann, J. H. (2013). The Chlamydia pneumoniae invasion protein Pmp21 recruits the EGF receptor for host cell entry. *PLoS Pathog.* **9**, e1003325. doi:10.1371/journal.ppat.1003325
- Myers, G. S. A., Mathews, S. A., Eppinger, M., Mitchell, C., O'Brien, K. K., White, O. R., Benahmed, F., Brunham, R. C., Read, T. D., Ravel, J. et al. (2009). Evidence that human Chlamydia pneumoniae was zoonotically acquired. *J. Bacteriol.* **191**, 7225-7233. doi:10.1128/JB.00746-09
- Nans, A., Kudryashev, M., Salbil, H. R. and Hayward, R. D. (2015). Structure of a bacterial type III secretion system in contact with a host membrane in situ. *Nat. Commun.* **6**, 10114. doi:10.1038/ncomms10114
- Portran, D., Schaedel, L., Xu, Z., Théry, M. and Nachury, M. V. (2017). Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing. *Nat. Cell Biol.* **19**, 391-398. doi:10.1038/ncb3481
- Romero, M. D. and Carabeo, R. A. (2022). Distinct roles of the Chlamydia trachomatis effectors Tarp and TmeA in the regulation of formin and Arp2/3 during entry. *J. Cell Sci.* **135**, jcs260185. doi:10.1242/jcs.260185
- Romero, M. D., Mölleken, K., Hegemann, J. H. and Carabeo, R. A. (2020). Chlamydia adhesion and invasion. In *Chlamydia Biology - From Genome to Disease* (ed. M. Tan, J. H. Hegemann and C. Sütterlin), pp. 59-84. Caister Academic Press.
- Spona, D., Hanisch, P. T., Hegemann, J. H. and Mölleken, K. (2023). A single chlamydial protein reshapes the plasma membrane and serves as recruiting platform for central endocytic effector proteins. *Commun. Biol.* **6**, 520. doi:10.1038/s42003-023-04913-z
- Steiert, B., Icardi, C. M., Faris, R., Mccaslin, P. N., Smith, P., Klingelutz, A. J., Yau, P. M. and Weber, M. M. (2023). The Chlamydia trachomatis type III-secreted effector protein CieG induces centrosome amplification through interactions with centrin-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **120**, e2303487120. doi:10.1073/pnas.2303487120
- Stelzner, K., Vollmuth, N. and Rudel, T. (2023). Intracellular lifestyle of Chlamydia trachomatis and host-pathogen interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **21**, 448-462. doi:10.1038/s41579-023-00880-y
- Stevens, J. M., Galyov, E. E. and Stevens, M. P. (2006). Actin-dependent movement of bacterial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 91-101. doi:10.1038/nrmicro1320
- Stone, M. C., Roegiers, F. and Rolls, M. M. (2008). Microtubules have opposite orientation in axons and dendrites of *Drosophila* neurons. *Mol. Biol. Cell* **19**, 4122-4129. doi:10.1091/mbc.e07-10-1079
- Svitkina, T. (2018). The actin cytoskeleton and actin-based motility. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, a018267. doi:10.1101/cshperspect.a018267
- Tanenbaum, M. E., Gilbert, L. A., Qi, L. S., Weissman, J. S. and Vale, R. D. (2014). A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell* **159**, 635-646. doi:10.1016/j.cell.2014.09.039
- Thwaites, T. R., Pedrosa, A. T., Peacock, T. P. and Carabeo, R. A. (2015). Vinculin interacts with the chlamydia effector tarp via a tripartite vinculin binding domain to mediate actin recruitment and assembly at the plasma membrane. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **5**, 88. doi:10.3389/fcimb.2015.00088
- Tirnauer, J. S., Canman, J. C., Salmon, E. D. and Mitchison, T. J. (2002). EB1 targets to kinetochores with attached, polymerizing microtubules. *Mol. Biol. Cell* **13**, 4308-4316. doi:10.1091/mbc.e02-04-0236
- Volceanov, L., Herbst, K., Biniössek, M., Schilling, O., Haller, D., Nölke, T., Subbarayal, P., Rudel, T., Zieger, B. and Häcker, G. (2014). Septins arrange F-actin-containing fibers on the Chlamydia trachomatis inclusion and are required for normal release of the inclusion by extrusion. *mBio* **5**, e01802-14. doi:10.1128/mBio.01802-14
- Wevers, C., Höhler, M., Alcázar-Román, A. R., Hegemann, J. H. and Fleig, U. (2023). A functional yeast-based screen identifies the host microtubule cytoskeleton as a target of numerous Chlamydia pneumoniae proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 7618. doi:10.3390/ijms24087618
- Woods, B. L. and Gladfelter, A. S. (2021). The state of the septin cytoskeleton from assembly to function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **68**, 105-112. doi:10.1016/j.cob.2020.10.007
- Wuppermann, F. N., Mölleken, K., Julien, M., Jantos, C. A. and Hegemann, J. H. (2008). Chlamydia pneumoniae GroEL1 protein is cell surface associated and required for infection of HEp-2 cells. *J. Bacteriol.* **190**, 3757-3767. doi:10.1128/JB.01638-07
- Zrieg, R., Braun, C. and Hegemann, J. H. (2017). The Chlamydia pneumoniae tarp ortholog CPn0572 stabilizes host F-actin by displacement of cofilin. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **7**, 511. doi:10.3389/fcimb.2017.00511

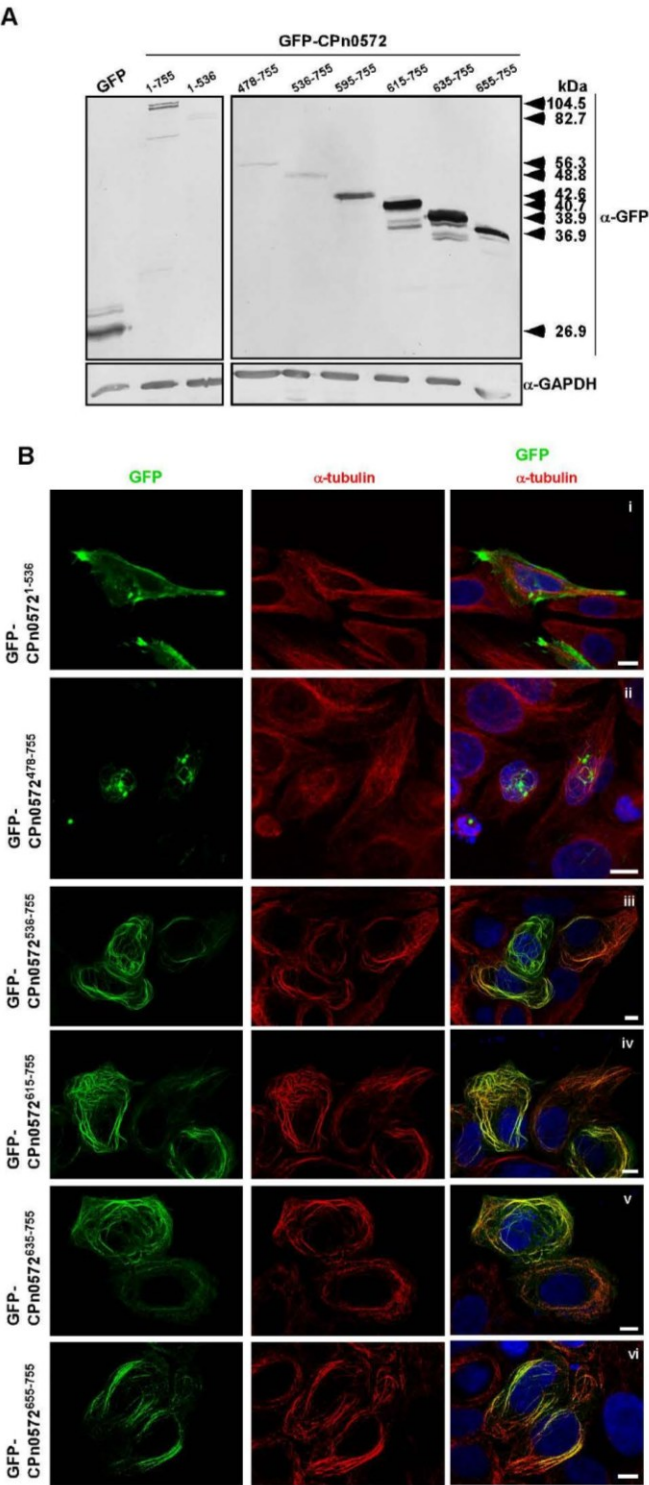


Fig. S1. Expression and co-localization of CPn0572 and variants

(A) Western blot analysis of HEp-2 cells expressing GFP or the indicated GFP-CPn0572 protein variants. Numbers indicate amino acids. Proteins were detected on immunoblots probed with anti-GFP or anti-GAPDH antibody. (B) Representative confocal fluorescence images of HEp-2 cells expressing a plasmid encoding the indicated GFP-CPn0572 protein variants. For visualization of MTs an anti- α -tubulin antibody (red) and for DNA DAPI (blue) was used. Scale bars, 10 μ m.

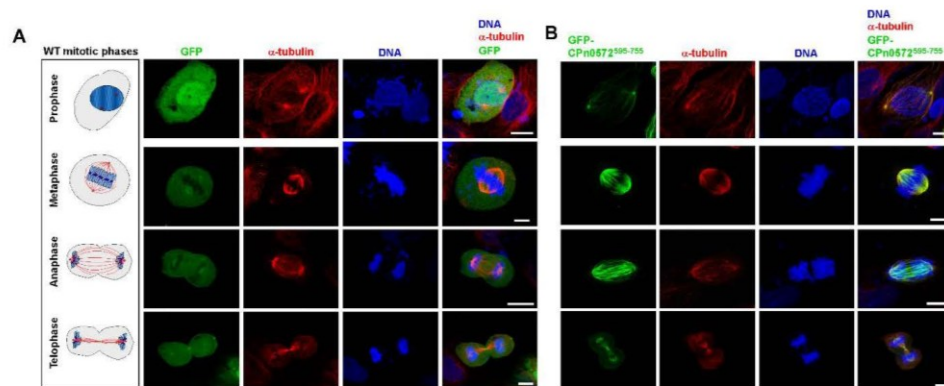


Fig. S2. CPn0572 associates with MTs in mitosis.

(A) and (B) Confocal images of U2OS cells transfected with either a GFP- control plasmid (A) or GFP-CPn0572^{S95-755} plasmid (B) for 18 hrs. Mitotic stages are shown diagrammatically on the left. MTs were visualized by anti- α -tubulin antibody staining (red) and DNA with DAPI (blue). Scale bars, 10 μ m.

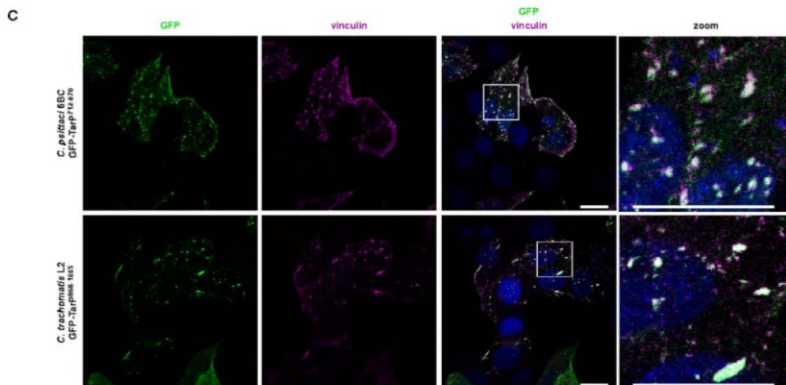


Fig. S3. Amino acid sequence and localization analysis of CPn0572 and its homologues from different chlamydial species.

(A) Among 23 CPn0572 homologs from different *Cpn* isolates (Table S1) 20 were identical to the CPn0572 sequence found in the GiD strain. This diagram depicts the amino acid differences of the CPn0572 sequences from the four strains GiD, DC9, B21 and LPCoLN. Black areas indicate identical amino acids, gray lines indicate single amino acid differences, shaded areas denote two blocks of amino acid insertions with dotted lines indicating their position. Blue lines indicate the region utilized for N-terminal GFP-tagged constructs shown in Fig. 2. Numbers at the bottom of the figure indicate amino acid numbers. (B) Amino acid sequence alignment of TarP family proteins from selected *Chlamydia* species (*Cpn* GiD, *Cpn* LPCoLN, *C. psittaci* 6BC and *Ctr* L2) was done utilizing Clustal Omega. Amino acids shown in red depict conserved amino acids in the CPn0572 C-terminus (aa 595 –aa 755) and the C-termini of the other three CPn0572 homologs. The high sequence identity between GiD and LPCoLN CPn0572 sequences allowed a clear identification of a homologous region (highlighted in blue). The amino acid sequences of the C-termini of the CPn0572 homologs from 6BC and L2 have a medium and to low similarity, respectively, and thus larger C-terminal regions were tested to maximize the chances for identification of a potential MT binding domain (highlighted in blue). The selected blue C-terminal sequences of the four species were used in Fig. 2. (C) Representative confocal fluorescence images of HEp-2 cells expressing plasmid encoding *Ctr* L2 GFP-TarP⁸⁶⁸⁻¹⁰⁰⁵ or *C. psittaci* 6BC GFP-TarP⁷¹²⁻⁸⁷⁰. For visualization of vinculin an anti-vinculin antibody (magenta) and for DNA DAPI (blue) was used. Scale bars, 10 µm. White boxes show enlargements.

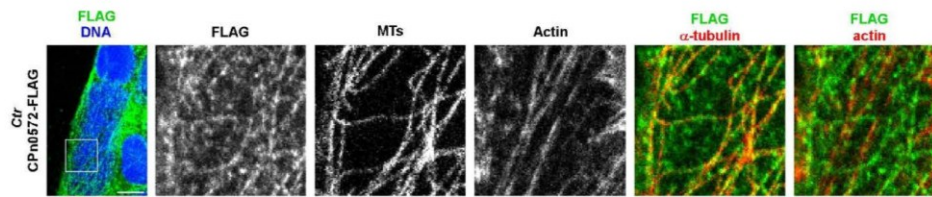


Fig. S4. CPn0572-FLAG expressed in *Ctr* associates exclusively with MTs.

Representative image from 2 independent experiments showing focal planes of HEP-2 cells infected with *Ctr* L2 transformed with a plasmid harboring CPn0572-FLAG (MOI=0.5, 48 hpi). Cells were pre-extracted with Triton for 30 sec and fixed with glutaraldehyde. CPn0572-FLAG was visualized by using an anti-FLAG antibody (green), MTs with anti- α -tubulin antibody, actin with rhodamine phalloidin and DNA of human cells and chlamydial inclusions with DAPI (blue). Images show a focal plane between the inclusion and the plasma membrane. Box shows enlargement. Scale bar, 5 μ m.

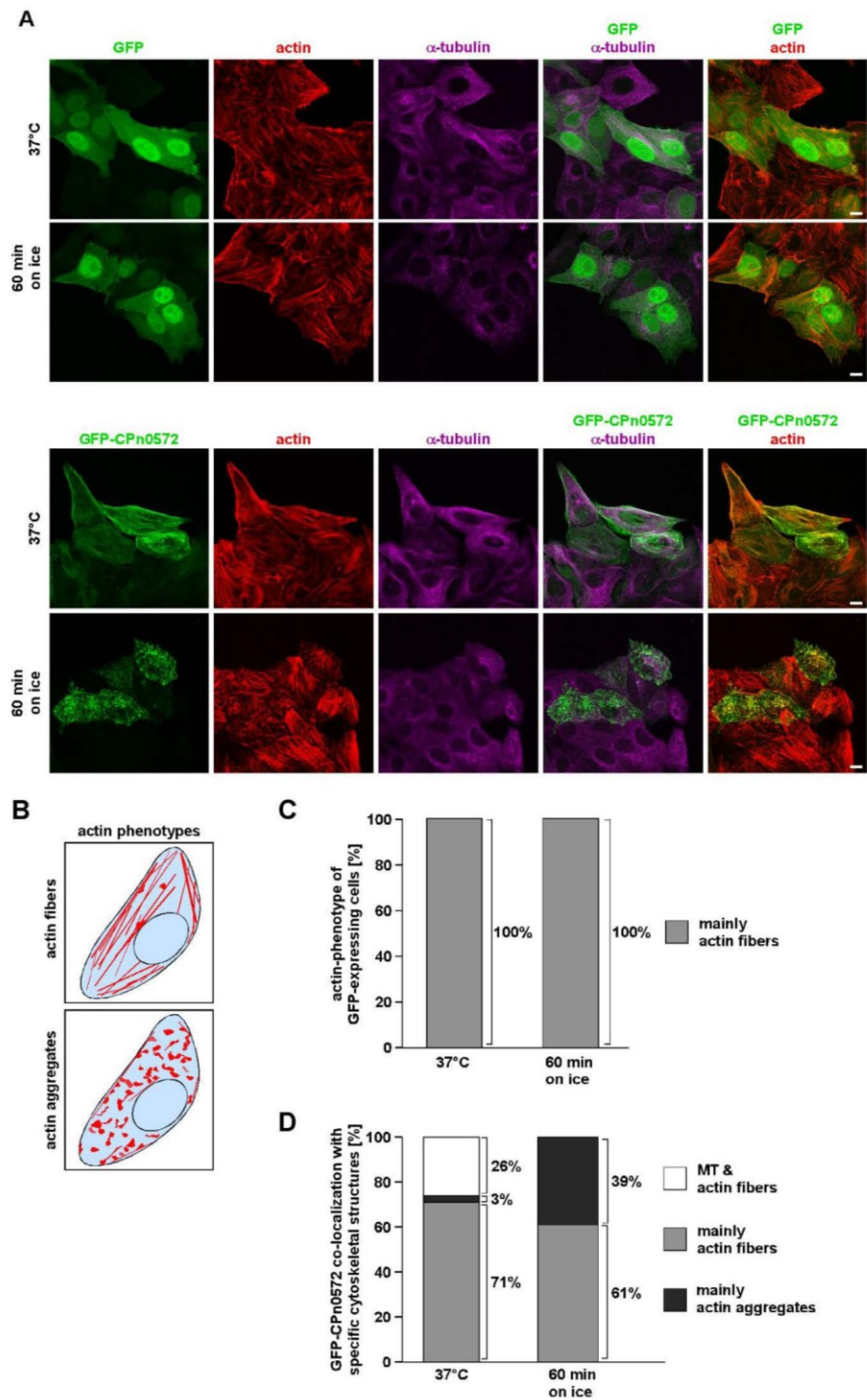


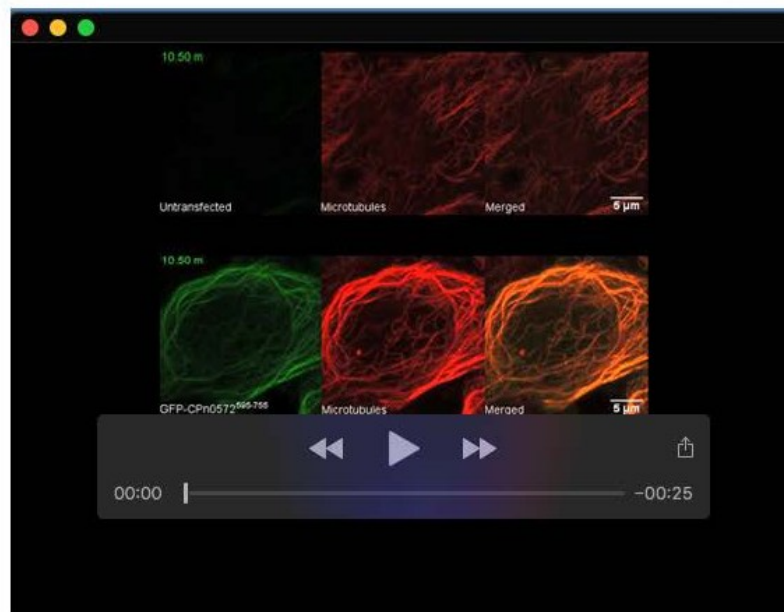
Fig. S5. Destabilization of MTs by ice treatment in cells expressing GFP-CPn0572 results in altered actin structures.

(A) Representative confocal images of HEp-2 cells expressing GFP or GFP-CPn0572 (24 hrs) incubated for 60 min at either 37°C or on ice. Actin was visualized with rhodamine-phalloidin (red), MTs with anti α -tubulin antibody (magenta). Scale bars, 10 μ m. (B) Schematic representation of the observed actin phenotypes: actin fibers or actin aggregates. (C) Quantification of the actin phenotypes observed in GFP expressing cells kept at 37°C or after incubation on ice for 60 min as described in (A). light grey box, cells showing mainly actin fibers (>60% of the actin structures showing this phenotype). n=1 representing 25 GFP expressing cells. (D) Quantification of the percentage of GFP-CPn0572 expressing cells co-localizing with the indicated cytoskeletal structure at 37°C incubation or after incubation on ice for 60 min. White box; cells showing GFP-CPn0572 co-localization with MTs without/with simultaneous actin fiber co-localization, light grey box; cells showing GFP-CPn0572 co-localization mainly with actin fibers, dark grey box; cells showing GFP-CPn0572 co-localization mainly with actin aggregates. n=2, each representing 50 GFP-CPn0572 expressing cells.

Table S1. CPn0572 gene sequences of 23 *Cpn* isolates.

<i>Chlamydia pneumoniae</i> isolate	GeneBank Reference #	Genomic locus of <i>cpn0572</i> [bp]
CWL029	NC_000922.1	662352-664619
AR39	NC_002179.2	176966-179233
J138	NC_002491.1	661673-663940
TW-183	NC_005043.1	659674-661941
Wien1	NZ_LN846980.1	661898-664165
CM1	NZ_LN846995.1	661993-664260
CV14	NZ_LN846996.1	661897-664164
CWL011	NZ_LN847000.1	662350-664617
K7	NZ_LN847221.1	662297-664564
PB2	NZ_LN847241.1	661900-664167
Wien3	NZ_LN847257.1	662347-664614
CV15	LN846999.1	38037-40304
GiD	LN847008.1	661957-664224
MUL2216	LN847227.1	133618-135885
Panola	LN847235.1	46-2313
U1271	LN847244.1	454687-456954
UZG1	LN847245.1	659676-661943
Wien2	LN847254.1	251883-254150
YK41	LN849043.1	14219-16486
H12	LN847189.1	3-2267
B21	AZNB01000021.1	3628-6600
LPCoLN	CP001713.1	176812-179784
DC9	LN847051.1	15607-17874

GeneBank: National Center for Biotechnology Information (NCBI)



Movie 1. CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ expression stabilizes MTs during nocodazole treatment.

Life cell analysis of untransfected HEp-2 cells (top) and HEp-2 cells expressing GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ for 18 hrs (bottom). After staining MTs with SiR-tubulin (red), cells were treated with 10 μ g/ml nocodazole to induce MT-depolymerization. Scale bar 5 μ m.

5 CPn0572 expression results in mitotic defects

5.1 Objective of this analysis

Previously, it was shown that the *Cpn* TarP family member CPn0572 expressed in mammalian cells associates with the host actin cytoskeleton and with the microtubule (MT) cytoskeleton [78] (chapter 4 of this thesis). During my analysis, I showed that full length CPn0572 and the C-terminal variant CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ expressed in human epithelial cells associate with interphase MTs and also with spindle MTs of mitotic cells [78]. Furthermore, CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ is able to associate with the spindle in all mitotic phases [78]. Interestingly, the expression of CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ variant in U2OS cells leads to altered spindle MTs in approximately 83% of transfected cells compared to GFP-expressing control cells [78]. Only 17% of CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵-expressing cells showed wildtype-like mitotic cells. Next, I wanted to analyze what causes abnormal spindles in mitosis induced by CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵-expression and whether this results in genome instability such as aneuploidy. This means the gain or loss of whole chromosomes, which is a hallmark of cancer cells. Additionally, since *Cpn* is associated with a higher risk of lung cancer [39, 40], it was of interest if *Cpn* infections also can lead to mitotic defects.

5.2 Results

5.2.1 CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ association with spindle MTs results in aberrant mitosis

To determine why and how CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵-expression affects spindle MTs, the GFP-tagged MT binding region (MBR) of CPn0572, CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ (Fig. 1A), was expressed for 18 hours in U2OS cells. Various phenotypes of mitotic defects were observed. Approximately 38% of GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ expressing cells showed elongated anaphase spindles with aberrant pole-pole MTs and chromosomes distributed along the entire spindle (Fig 1B, C; panel i). 14% of mitotic cells showed curved spindles with misaligned chromosomes (iii). Furthermore, approximately 15% of mitotic cells had monopolar-like spindles which possibly contain only one centrosome instead of two (panel ii) or collapsing spindles resulting in spindle breakdown as shown in life cell analysis with a GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵-expressing U2OS cell (movie 1). 7.8% of GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ expressing cells showed apparently normal-looking spindles with mis-aligned chromosomes distributed along the entire spindle (iv) and 4.7% showed a chromosome-bridge (v). Multipolar spindles which have likely more

than two centrosomes were found in 3.5% of GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ expressing mitotic U2OS cells (Fig. 1B, C).

Alterations of spindle formation affect spindle function and the correct association of spindle MTs with the attachment points on chromosomes, the kinetochores. Thus, expression of CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ variant might affect the fidelity of chromosome transmission.

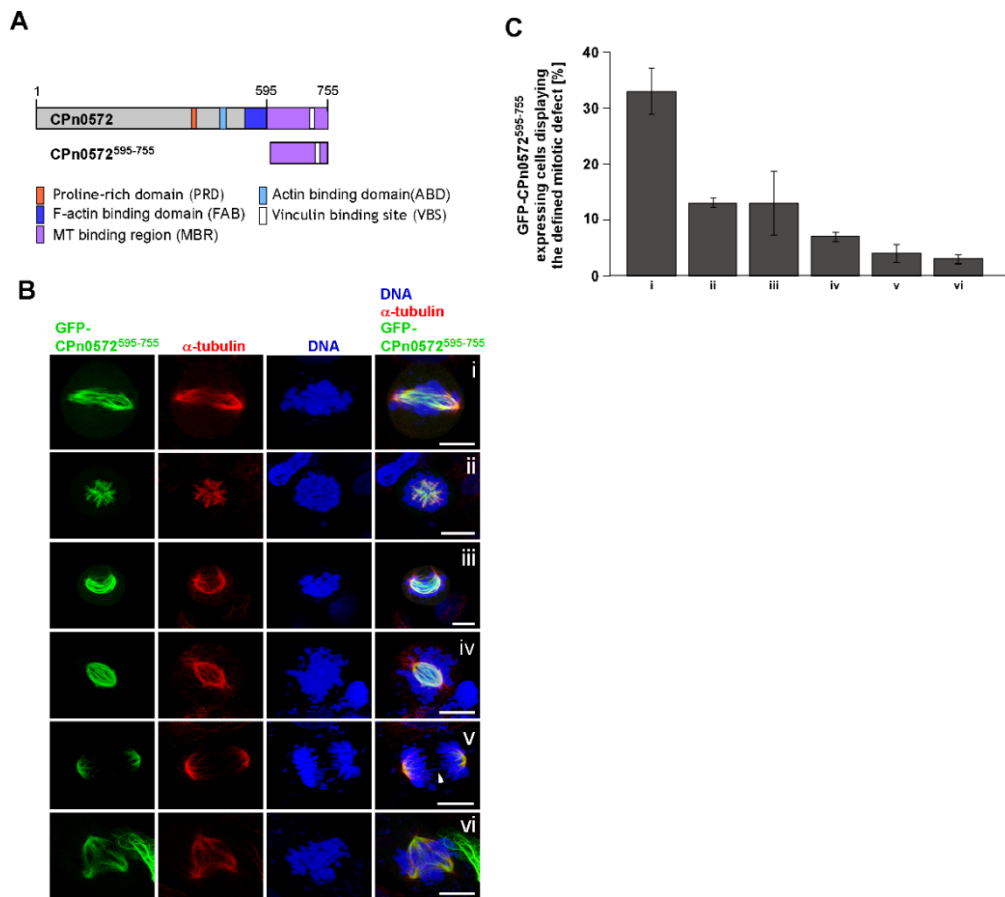


Figure 7. CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ association with spindle MTs results in severe mitotic defects.

A Schematic representation of CPn0572 full length protein (AS 1-755) and C-terminal protein variant previously defined as MT binding region (AS 595-755). PRD, proline-rich domain (orange box); ABD, actin binding domain (light blue box); FAB, F-actin binding domain (dark blue box); VBS, vinculin binding site (white box); MBR, MT binding region (purple box); [74, 78, 115]. **B** Confocal images of U2OS cells transfected with a plasmid encoding GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ for 18 hours. Images show phenotypes of aberrant spindle formations and/or chromosome mis-alignment as described in main text. The arrow head in iv points to chromosome bridge and non-properly segregated chromatin. MTs were visualized by using an anti- α -tubulin antibody (red) and DNA was stained with DAPI (blue). Scale bars, 10 μ m. **C** Quantification of the different types of spindle defects and chromosome mis-alignments shown in **B**. From approximately 83% of transfected cells the following phenotype-related percentages were measured: i: 37.8%; ii: 14.6%; iii: 14%; iv: 7.8%; v: 4.7%; vi: 3.5%. The remaining

17% have optically wildtype spindles with regular chromosome alignment. n=3, a total of 100 mitotic cells each were analyzed; Error bars denote $\pm$ SEM.

5.2.2 CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ expression leads to genome instability in yeast and mammalian cells

As defects in spindle formation and chromosome misalignment can result in chromosome mis-segregation leading to aneuploidy, I next tested if the observed mitotic defects induced by CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵-expression had an effect on genome stability. Interestingly, after 18 hours of GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ expression, U2OS cells that had exited mitosis show twice as many multinucleation phenotypes (which means more than one nucleus) compared to GFP-expressing control cells (Fig 2A, B).

Thus, to determine chromosome transmission fidelity in a quantitative manner, the *Schizosaccharomyces pombe* yeast system was chosen. First, Dr. A. Alcázar-Román in our lab checked if mCherry-tagged CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ associates with the mitotic spindle in yeast cells. Therefore, he transformed a GFP-atb2⁺-expressing *S. pombe* strain that shows green fluorescent α -tubulin and observed mCherry-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ located with the mitotic spindle (Fig 2C; Dr. A. Alcázar-Román). Next, we used again a *S. pombe* system where chromosome loss can be measured by an easily analyzable color assay [192] (Fig 2D). For this, a strain with an additional non-essential mini-chromosome (Ch16 mini-chromosome) with centromere-distal markers of chromosome III was used. Loss of the mini-chromosome results in adenine auxotrophy, characterized by the appearance of red sector colonies on adenine-limited medium. Colonies where the mini-chromosome is present are white. In our lab, E. Walla analyzed loss of the mini-chromosome in the appropriate strain transformed with control plasmid or plasmid expressing CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ via the thiamine regulatable *S. pombe nmt1*⁺ promoter (Fig 2E). In the absence of thiamine, CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ is expressed. We found, that 0.23% of control transformants showed loss of the non-essential chromosome. In contrast, this number increased 6-fold for transformants expressing CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ (Fig 2F; E. Walla). Thus, these data demonstrate that the spindle defects induced by CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ expression increase genome instability in mammalian and yeast cells.

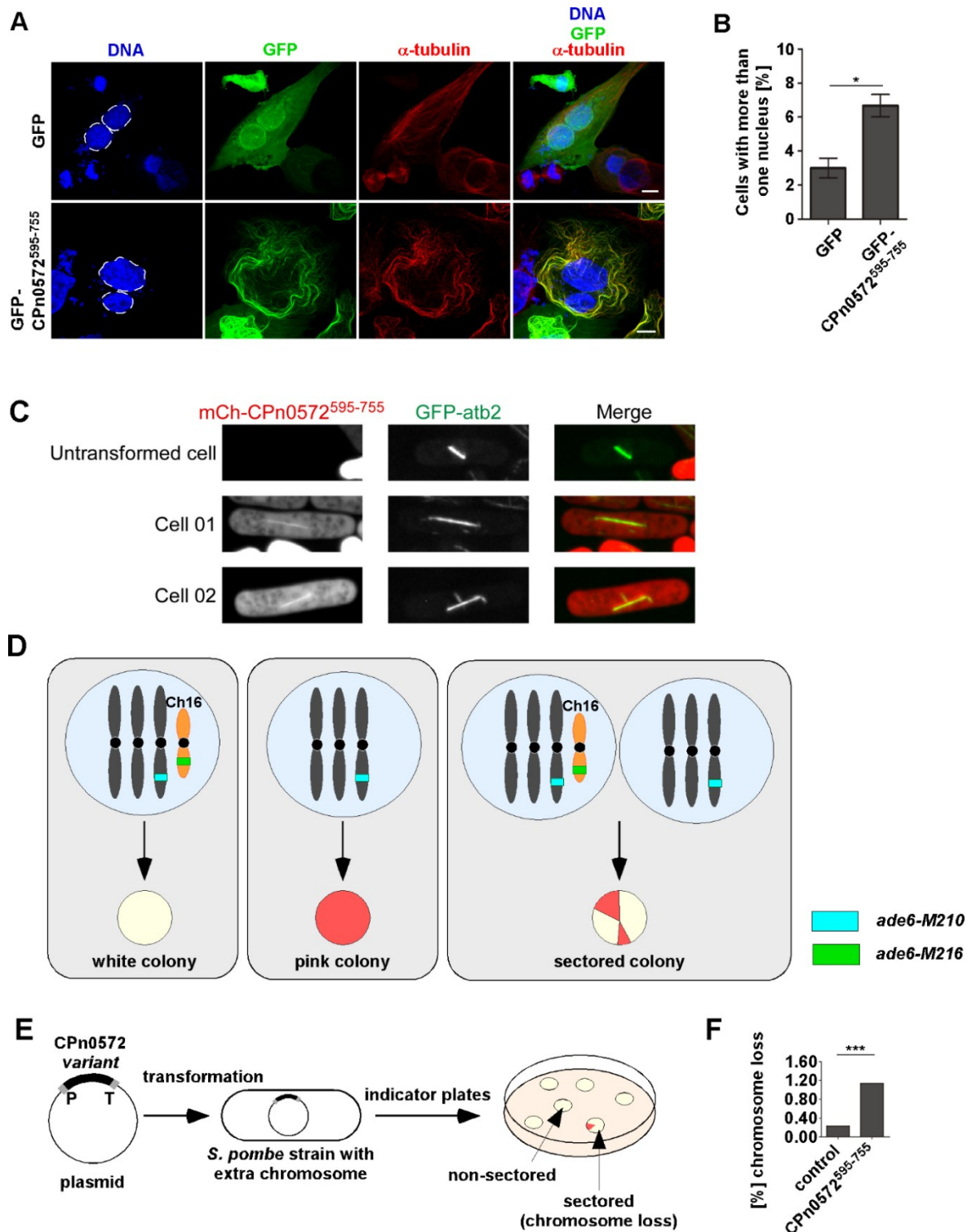


Figure 8. Expression of CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ leads to genome instability.

A Representative confocal images of GFP or GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ expressing HEP-2 cells transfected for 18 h prior fixation. MTs were visualized with anti- α -tubulin antibody (red) and DNA with DAPI. Scale bars, 10 μ m. White dotted lines were put around nuclei. **B** Quantification of multinucleated (more than one nucleus) HEP-2 cells expressing either GFP or GFP-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ for 18 h. $n=3$ samples each representing 100 cells. Two tailed student's t-test was used to determine

statistical significance, $p < 0.05$ (*). Error bars denote $\pm$ SEM. **C** Confocal photomicrographs of mitotic *S. pombe* cells expressing green fluorescent α -tubulin under simian virus 40 (sv40) promoter (*sv40::gfp- α tb2⁺*) transformed with plasmid encoding mCherry-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ showing mCherry-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ (red) is associated with spindle MTs (green). First lane, untransformed cell; second and third lane, cells expressing mCherry-CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵. (Experiment was done by Dr. A. Alcázar-Román, our lab). **D** Diagrammatic illustration of the chromosome loss assay. Presence of the Ch16 mini-chromosome will result in adenine prototrophy and thus white colonies on adenine-limited medium, loss of Ch16 will result in adenine auxotrophy and thus red colonies. When the Ch16 is lost in some cells in a colony, the colony will show a sectorized phenotype. **E** Schematic representation of the *S. pombe* chromosome-loss assay. CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ was cloned behind the thiamine repressible *nmt1⁺* promoter (P) in a *S. pombe* plasmid. The *S. pombe* strain harboring the extra chromosome was transformed with a control plasmid or the CPn0572 variant expressing plasmid. Loss of the non-essential chromosome was assayed on indicator plates showing chromosome loss via the appearance of sectorized colonies. **F** Quantification of the number of sectorized versus non-sectorized colonies for the indicated transformants (Experiment was done by E. Walla, our lab). Fisher's exact test was used to determine statistical significance, $n = 10,000$ colonies per transformant, $p < 0.001$ (***).

5.2.3 Infection with *Cpn* results in mitotic defects of the host cell

In the previous chapter, it was shown that ectopic expression of a CPn0572 variant affects spindle morphology and genome instability. In a natural system, cells will be infected by *Cpn* EBs. In this scenario, secreted effector proteins such as CPn0572 may come into contact with the spindle of mitotic cells and induce the effects shown for the expressed CPn0572 variant. Thus, U2OS cells were infected with *Cpn* EBs (MOI = 10) and (i) the localization of *Cpn* inclusions in mitotic cells and (ii) defects in spindle formation and chromosome alignment was determined 30 hrs after infection.

First, it was observed that the majority of analyzed inclusions were located at only one side of the spindle (Fig 3A, B). This phenotype was scored for 56% of mitotic cells (Fig 3C). In the remaining 44% of mitotic cells, inclusions were distributed on both spindle sides, but one spindle side showed more inclusions than the other (Fig 3A, B). Co-staining of *Cpn* inclusions and pericentrin, a protein that is a component of the centrosome, showed that 14% of *Cpn* inclusions (big green dot) visually colocalized to centrosomes (small green dots at both spindle sides) (Fig. 3D, E). 86% of inclusions were located in the vicinity of the centrosomes (Fig 3D, E). Interestingly, while 20% of non-infected U2OS cells in mitosis showed spindle defects or mistakes in chromosome segregation this number increased to 48% when mitotic cells were infected with *Cpn* (30 hours post infection) (Fig 3F). Various phenotypes of aberrant mitotic cells were observed in non-infected and infected cells. In

both cases, (i) mis-aligned chromosomes with optically wildtype metaphase spindle (55% non-infected, 60% infected), (iii) mis-aligned chromosomes with abnormal spindle (18% non-infected, 12% infected), (iv) multipolar spindle (9% non-infected, 4% infected) or (v) abnormal spindle in combination with optically wildtype chromosome distribution (18% non-infected, 4% infected) were observed. Interestingly, *Cpn* infected mitotic U2OS cells showed phenotypes which were not present in non-infected cells. For example, (ii) a chromosome bridge in ana- or telophase (20% of infected cells) or (vi) one-sided chromosome de-condensation in telophase (4% of infected cells) were observed only in *Cpn* infected cells. Based on this I conclude that *Cpn* infected interphase cells that go into mitosis result in mitotic cells harboring inclusions which increase the risk of mitotic defects and thus genome instability.

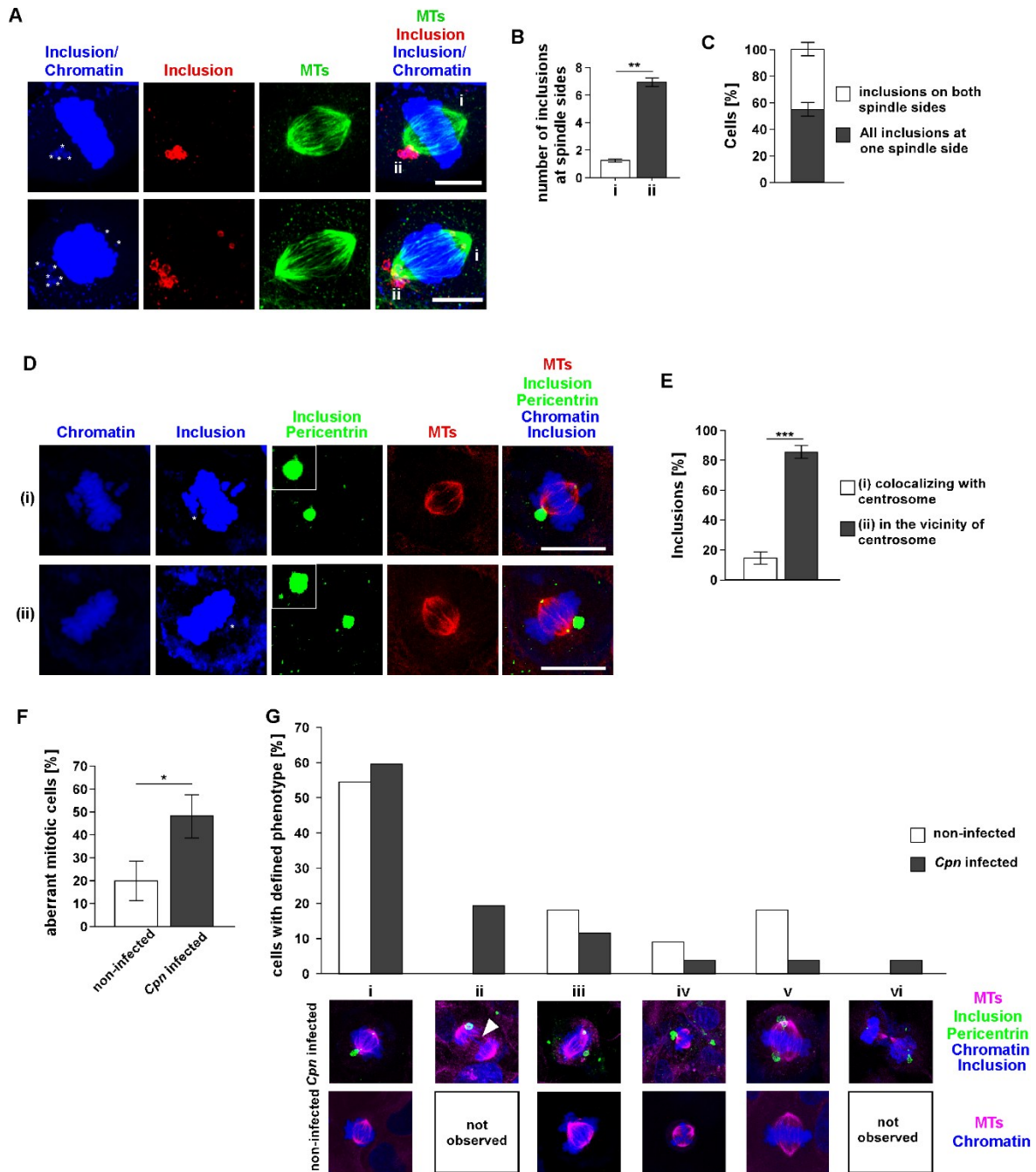


Figure 9. *Cpn* infection leads to mitotic defects.

A Confocal fluorescence images of mitotic U2OS cells infected with *Cpn* for 30 hrs (MOI = 10). Inclusion membrane was visualized via anti-CPn0147 (Inc protein) antibody (red), MTs with anti- α -tubulin antibody (green) and chromatin/Inclusions with DAPI (blue). Scale bar: 10 μ m; white asterisks show inclusions. i, ii indicate spindle sides; i, spindle side with less inclusions, ii, spindle side with most inclusions. **B** Quantification of infected mitotic cells with inclusions at only one spindle side (dark grey) or distributed to both spindle sides (white) showed in **A**. **C** Average number of inclusions at defined spindle sides in infected cells showed in **A**. **B** and **C** $n=3$, each representing up to 181 inclusions in 25 mitotic cells (metaphase and anaphase), Error bars denote $\pm$ SEM, $p<0.005$ (**). **D** and **E** Confocal fluorescence images and quantification of *Cpn* inclusions in mitotic U2OS cells (i) and (ii) in the vicinity of centrosome.

colocalizing with centrosome (white) or (ii) in the vicinity to centrosome (dark grey). MOI 5, 30 hpi; For better visualization images with only one inclusion are showed. Inclusion membrane was visualized via anti-CpN0147 antibody (green), centrosomes with anti-pericentrin antibody (green), MTs with anti- α -tubulin antibody (red) and chromatin/inclusions with DAPI (blue); for better visualization of inclusions the fluorescence signal of DAPI was increased (second column); white box shows enlargement; white asterisks show inclusions; scale bar, 10 μ m. n=3, each represent a total of 30 inclusions, error bars denote $\pm$ SEM, Student's t-test; $p < 0.001$ (***). **F** Quantification of aberrant mitotic cells in non-infected or *Cpn* infected U2OS cells (MOI 5, 30 hpi). Aberrant mitotic cells are defined as cells in prophase, metaphase, anaphase or telophase with aberrant mitotic spindles or mistakes in chromosome attachment or chromosome segregation. n=3, each represent up to 19 mitotic cells, error bars denote $\pm$ SEM; student's t-test, $p < 0.05$ (*). **G** Quantification and confocal images of the aberrant mitotic cell phenotypes measured in **F**. Of the aberrant mitotic non-infected or *Cpn* infected cells, 55%/60% showed misaligned chromosomes or chromosomes not aligned on metaphase plate with optical wildtype spindle (i); 0%/20%, chromosome bridges or single lagging chromosomes (ii); 18%/12%, irregular chromosome distribution with abnormal spindle (iii); 9%/4%, multipolar spindles (iv); 18%/4%, abnormal spindle with optical wildtype chromosome distribution (v); 0%/4%, one-sides chromosome decondensation in telophase (vi). Images show infected mitotic cells with defined phenotypes. Inclusions, chromatin and pericentrin were visualized as described in **A** and **D**. MTs were visualized via anti- α -tubulin antibody (magenta). White arrow head points to chromosome bridge.

5.3 Materials

5.3.1 Equipment

Tabelle 1: Equipment

Equipment	Manufacture
-80 °C freezer	New Brunswick Scientific
-80 °C freezer twin cool	Haier Biomedical
Analytical balance cubis H110	Satorius
Cell culture flasks (75 cm ²)	Thermo Scientific
Cell culture plates (24-Well)	Thermo Scientific
Cell culture – centrifuge tubes (12 mL)	Greiner
Cover slips Ø 12 mm	Roth
Cuvettes, polystyrene	Sarstedt
Erlenmeyer flask 350 mL	Duran
Falcon 15 ml and 50 mL	Sarstedt
Incubator forma steri-cycler CO ₂	Thermo Scientific
Magnetic stirrer KMO 2 basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG
Micropipette Pipetman (2 – 20 µL)	Gilson
Micropipette Pipetman (20 – 200 µL)	Gilson
Micropipette Pipetman (100 – 1000 µL)	Gilson
Microscope Axiovert 25C	Zeiss
Microscope Eclipse Ti-E with A1R confocal laser	Nikon
Nitrile gloves	VWR
Object slides	Diagonal
Lab balance TE3102S	Satorius
Petri dishes	Sarstedt
Photometer DU-800 spectrophotometer	Beckmann
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Pipette tips (1-20 µL, 2-200 µL, 100-1000 µL)	Sarstedt
Precision balance	Scaltec
Reaction tubes 1.5 mL and 2.0 mL	Sarstedt
Safety workbench Herasafe	Heraeus
Shaker Unitron	Infors
Test tubes	Duran/Schott
Vortex-Genie 2	Scientific Industries

Centrifuge Heraeus Pico 17	Thermo Scientific
Centrifuge Heraeus Multifuge X3R	Thermo Scientific
Centrifuge Rotanta 460R	Hettich

5.3.2 Chemicals

Tabelle 2: Chemicals

Chemical	Manufacture
4', 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Merck
Adenine	Roth
Biotin	Merck
Boric acid (H_3BO_3)	Merck
Calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Grüssing
Citric acid	AppliChem
Copper sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$)	Merck
Cycloheximide	Merck
Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	AppliChem
Dorfmanite ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Roth
Gibco amphotericin B 250 µg/mL	Thermo Fisher Scientific
Gibco DMEM (1x) + GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific
Gibco Fetal bovine serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific
Gibco gentamicin (50 µg/mL)	Thermo Fisher Scientific
Gibco HBSS (1x)	Thermo Fisher Scientific
Gibco MEM not-essential amino acids (100x)	Thermo Fisher Scientific
Gibco MEM vitamin solution (100x)	Thermo Fisher Scientific
Histidine	Merck
Inositol	Merck
Iron (III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$)	Merck
Leucine	AppliChem
Lithium acetate (LiAc)	Roth
Lysine	Merck
Magnesium chloride hexahydrate ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)	Roth
Mangan sulphate (MnSO_4)	Merck
Molybdenum oxide (MoO_3)	Merck

Nail polish	Essence cosmetics
Nicotinic acid	Merck
Paraformaldehyde (PFA)	Fluka
Polyethylene glycol (PEG)	Merck
Potassium chloride (KCl)	Roth
Potassium dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)	Fisher Chemical
Potassium iodide (KI)	Merck
Potassium phthalate monobasic	Merck
Saponin	Merck
Sodium chloride (NaCl)	Thermo Fisher Scientific
Sodium hydroxide (NaOH)	AppliChem
Sodium pantothenic acid	Merck
Sodium sulfate (Na ₂ SO ₄)	Merck
Uracil	Merck
Thiamine (5 µg/mL)	Merck
TurboFect™	Thermo Scientific
Vectashield (anti-fade, mounting fluid)	Linaris
Yeast extract	BD
Zinc sulfate heptahydrate (ZnSO ₄ x 7H ₂ O)	Merck

5.3.2 Solutions and buffer

Tabelle 3: Solutions and buffer

Solution or buffer	Manufacture
Lithium acetate	1 M Lithium acetate pH 4.9 In ddH ₂ O
Mineral stock solution 10,000x	10.0 g Citric acid 5.0 g H ₃ BO ₃ 4.0 g CuSO ₄ x 5H ₂ O 4.0 g MoO ₃ 4.0 g MnSO ₄ 4.0 g ZnSO ₄ x 7H ₂ O 2.0 g FeCl ₃ x 6H ₂ O 1.0 g KI 1 L dH ₂ O
PEG (Polyethylenglykol)	50 % (w/v) PEG In ddH ₂ O

5.3 Materials

PFA Stock solution	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
Salt stock solution (50x)	42.8 g MgCl ₂ x 6H ₂ O 40.0 g KCl 1.6 g Na ₂ SO ₄ 0.58 g CaCl ₂ x 2H ₂ O 800.0 mL dH ₂ O
Saponin solution (10%)	5.0 g Saponin 50.0 mL PBS (1x)
Vitamin stock solution 1000x	10.0 g Nicotinic acid 10.0 g Inositol 1.0 g Sodium pantothenic acid 10.0 mg Biotin 1 L dH ₂ O

5.3.3 Enzymes

Tabelle 4: Enzymes

Enzyme	Manufacture
Trypsin/EDTA	Thermo Fisher Scientific

5.3.4 Dye

Tabelle 5. Dyes

Dye	Dilution	Manufacture
DAPI	1:500	Sigma

5.3.5 Antibodies

5.3.5.1 Primary Antibodies

Tabelle 6. Primary antibodies

Antibody	Specificity	Origin	Dilution IF	Source
Anti- α -Tubulin	α -Tubulin	Mouse	1:150	Origene
Anti-Pericentrin	Pericentrin	Rabbit	4 μ g/mL	Thermo Fisher Scientific
Anti-CPn0147	CPn0147	Rabbit	1:50	J. Hegemann

IF = Immunofluorescence microscopy

5.3.5.2 Secondary Antibodies

Tabelle 7. Secondary antibodies

Antibody	Specificity	Origin	Dilution IF	Source
Alexa Fluor [®] 594	Mouse	Goat	1:200	Thermo Fisher Scientific
Alexa Fluor [®] 594	Rabbit	Goat	1:200	Thermo Fisher Scientific
Alexa Fluor [®] 488	Mouse	Goat	1:200	Thermo Fisher Scientific
Alexa Fluor [®] 488	Rabbit	Goat	1:200	Thermo Fisher Scientific
Alexa Fluor [®] 647	Mouse	Goat	1:200	Thermo Fisher Scientific

IF = Immunofluorescence microscopy

5.3.6 Used plasmids

Tabelle 8. Used plasmids

Internal number	Plasmid name	Backbone Plasmid	Construct
#2571	pAL8	pAE67	GFP-CPn0572 ⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵
#2301	pKM55	pEYFP-EGFR	Human transfection plasmid with C-terminal EYFP (K. Mölleken)
#282	p282	p282	pJR2-3XU <i>ura4</i> ⁺ , <i>Amp</i> ^R , pREP3X, <i>nmt1</i> ⁺ promotor
#1363	mCherry-CPn0572 ⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵	p282	<i>nmt1</i> ⁺ :: <i>cpn0572-g4-mcherry ura4</i> ⁺
#1362	CPn0572 ⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵	p282	<i>nmt1</i> ⁺ :: <i>cpn0572-g4 ura4</i> ⁺

5.3.3 Cells and cell lines

5.3.3.1 Eukaryotic cells

Tabelle 9. *S. pombe* strains

Internal number	Name, genes, markers	Origin
#2333 #103	<i>leu1-32::SV40::atb2⁺-GFP[LEU2], ura4-D18, h⁻ h⁻ nmt1⁺ his2 ade6-M210 Ch16 mini-chromosome</i>	U. Fleig Niwa et al. 1989

Tabelle 10. Mammalian cell lines

Strain name	Characteristic	Origin
U2OS	Epithelial adherent bone osteosarcoma cells of human origin	ATCC Nr.: HTB-96
HEp-2	Epithelial laryngeal carcinoma cell line of human origin, HeLa morphology, 46 chromosomes	ATCC Nr.: CCL-23

5.3.3.2 Procaryotic cells

Tabelle 11. Procaryotic cells

Strain name	Characteristic	Origin
<i>Chlamydia pneumoniae</i> GiD	Isolate of a patient infected with acute bronchitis, from Giessen	Jantos et al. 1997

5.3.4 Media and cultivation

5.3.4.1 Media for *S. pombe* cultivationTabelle 12: Media for yeast (*S. pombe*)

Medium	Zusammensetzung
Rich medium (Y5ES)	10 g Yeast extract 150 mL Adenine (2.7 mg/mL adenine hemi sulfate) 75 mL Uracil (2.0 mg/mL) 20 mL Histidine (7.5 mg/mL) 20 mL Leucine (7.5 mg/mL) 20 mL Lysine (7.5 mg/mL) 1515 mL dH ₂ O
Minimal medium (MM)	6.0 g Potassium phthalate monobasic 5.5 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 40 mL 50x Salt stock solution

	2 mL	1000x Vitamin stock solution
	0.2 mL	10,000x Mineral stock solution
	1760 mL	dH ₂ O

5.3.4.1 Cell culture medium

Tabelle 13. Cell culture medium

Bestandteil	Menge
DMEM GlutaMAX™	500 mL
FBS (10% final concentration)	50 mL
MEM not-essential amino acids (100x)	5 mL
MEM vitamins (100x)	5 mL
Amphotericin (200 mM)	5 mL
Gentamicin (50 mg/mL)	500 µL

Components of cell culture medium were mixed and stored at 4°C. 25 µg/mL plasmocin was added to the medium to prevent contamination with mycoplasma. To prepare cell culture medium for chlamydial infections 1.2 µg/mL cycloheximide was added 1 hour before infection.

5.4 Methods

5.4.1 Cultivation and transformation of *S. pombe* cells

- *S. pombe* cells were grown in 100 mL rich medium (YE5S) at strain optimal temperature conditions overnight.
- 1×10^8 cells per transformation were centrifuged at 3,500 rpm for 3 min.
- The cell pellet was washed one time with 2 mL 0.1 M LiAc pH 4.9, resuspended in 70 μ L 0.1 M LiAc pH 4.9 per transformation and then incubated for 1 hour at 30°C.
- 100 μ L LiAc-treated cells were mixed with 500 ng plasmid-DNA and 290 μ L 50% PEG 4000 and incubated for 1 hour at 30°C.
- After a heat-shock at 43°C for 15 min, the cell-mixture was centrifuged at 3,500 rpm for 5 min.
- Then the cell pellet was resuspended in YE5S medium and incubated for 1 hour at strain optimal temperature.
- After washing the cells with dH₂O twice, the cells were resuspended in 1 mL dH₂O and plated on minimal medium (MM) under plasmid selective conditions.

5.4.1.1 Preparation of *S. pombe* cells for live-cell microscopy

- Transformed *S. pombe* cells were pre-grown in 5 mL minimal medium (MM) under plasmid selective conditions with or without 5 μ g/mL thiamine at 25°C overnight.
- Cells were then diluted to 10^5 cells/mL and incubated at 25°C without thiamine for 24 hrs.
- 2 μ L of cells were prepared for microscopy by patching on agarose pads on object slide.
- The Olympus spinning-disk confocal microscope from the Center of Advanced imaging (CAi) at Heinrich-Heine University Düsseldorf was used for analysis.

5.4.1.2 Ch16 chromosome loss assay

- The Ch16-containing strain was pre-cultured on minimal medium (MM) without adenine to select for the presence of the Ch16 mini chromosome.
- The strain was transformed with plasmid and grown under plasmid and Ch16 selective conditions in the absence of thiamine for 24 hrs at 30°C prior plating.
- $\geq 10,000$ cells per transformant were plated on plasmid-selective, thiamine-free plates with a limiting amount of adenine (5 $\mu\text{g/mL}$) for 7 days at 30°C to allow the loss of the Ch16 mini chromosome.
- Grown colonies were then scored for loss of Ch16 mini chromosome by the appearance of pink sector(s) in a white colony.

5.4.2 Cultivation, transfection and infection of mammalian cells

Mammalian cells (U2OS) were cultivated in 75 cm² cell culture flasks containing 15 mL cell culture medium at 37°C and 6% CO₂.

5.4.2.1 Trypsination and passaging of mammalian cells

For passaging, mammalian cells were detached from the surface of the cell culture flask by treatment with the sequence-unspecific protease trypsin.

- Cell culture medium was removed from confluent grown cells.
- After washing the cells one time with 10 mL HBSS, cells were overlaid with 5 mL 0.5x Trypsin/EDTA-solution and incubated at 37°C for 5 – 10 min.
- Gently tapping and swirling results in detachment of cells from the cell culture flask.
- Trypsin reaction was stopped by adding 5 mL cell culture medium.
- The suspension was transferred to a 12 mL centrifugation tube and centrifuged for 10 min at 500 rpm at RT.
- Cell pellet was then resuspended in 5 mL cell culture medium.
- For passaging in 75 cm² cell culture flask, 500 μL trypsinized mammalian cells were added to 15 mL cell culture medium, transferred to flask and incubated for 2 – 4 days at 37°C and 6% CO₂.

- For passaging in 24-Well plates, cover slips were placed in each well before adding trypsinized mammalian cells. Cells were diluted with cell culture medium to reach 50 – 70 % confluence (transfections-analysis) or 80 – 90% confluence (infection-analysis) within 24 hrs of incubation at 37°C and 6% CO₂.

5.4.2.2 Plasmid transfection of mammalian cells

During transient transfection, plasmid-DNA is transformed into human epithelial cells. Genes located on the plasmid are constitutively expressed via a viral promotor. As transfection reagent TurboFect™ was used.

- Epithelial cells were pre-grown in a 24-Well plate on cover slips with 1 mL antibiotic-free cell culture medium (without amphotericin or gentamicin) at 37°C and 6% CO₂ overnight to create a 50 – 70% cell confluence.
- Cell culture medium was removed and replaced with 500 µL fresh antibiotic-free medium and cells were then incubated for 1 hr at 37°C and 6% CO₂.
- In a separate 2.0 mL reaction tube, 100 µL cell culture medium without FBS and antibiotics was mixed with 500 ng plasmid-DNA and 2 µL TurboFect™ reagent and incubated for 20 min at RT.
- The mixture was then dropped onto the epithelial cells and incubated at 37°C and 6% CO₂ for 18 hrs.

5.4.2.3 Infection of mammalian cells with Cpn

- Epithelial cells were pre-cultured in a 24-well plate on cover slips in cell culture medium at 37°C and 6% CO₂ overnight until a cell confluence of 80 – 90% was achieved.
- An Aliquote with *Cpn* EBs were thawed at 37°C and added to 500 µL fresh cell culture medium. The amount of EBs was MOI-dependent.
- Medium was removed from epithelial cells and replaced with EB-containing medium.
- The cells were then centrifuged with 2,980 rpm at 37°C for 60 min.
- After centrifugation, the medium was replaced with 1 mL fresh cell culture medium with 1.2 µg/mL cycloheximide.
- Infected cells were incubated at 37°C and 6% CO₂ for 30 hrs.

5.4.3 Fixation, permeabilization and staining of transfected or infected mammalian cells

5.4.3.1 Fixation of transfected or infected mammalian cells

After transfection or infection, mammalian cells were prepared for microscopic analysis by fixation, permeabilization, and immunostaining. For detailed visualization of the MT cytoskeleton, cells were fixed with pre-heated (37°C) PFA-solution.

- Cell culture medium was removed and cells were washed two times with 1 mL HBSS.
- 250 µL pre-warmed 3% PFA-solution was added to the cells and incubated for 10 min at RT.
- PFA-solution was removed and cells were washed three times with 1 mL HBSS.
- Fixed cells were stored in HBSS at 4°C or stained for microscopy.
- The inverse Nikon TiE Live Cell confocal C2plus with 100x TIRF objective was used for analysis.

5.4.3.2 Permeabilization and immunostaining of transfected or infected mammalian cells

To stain intracellular proteins or structures with antibodies or dye-solutions, the plasma membrane of PFA-fixed mammalian cells needs to be permeabilized. Unconjugated primary antibodies are directed against the intracellular protein of interest. Secondary antibodies bind to the used primary antibody and are coupled to a fluorochrome for fluorescence microscopic analysis.

- HBSS was removed from PFA-fixed mammalian cells and 100 µL of 2% saponin-solution was added to the cells and incubated for 20 min at RT.
- Primary antibody was diluted according to manufacturer's instructions in 30 µL 0.5% saponin-solution.
- 2% saponin-solution was removed from cells and replaced with primary antibody solution.
- After incubation at 30°C for 30 min, cells were washed three times with 1 mL 0.5% saponin-solution.
- Secondary antibody was diluted according to manufacturer's instructions in 30 µL 0.5% saponin-solution, added to the cells and incubated at 30°C for 30 min.

- Cells were then washed three times with 1 mL 0.5% saponin-solution.
- For DNA-staining, 1mg/mL DAPI-stock solution was diluted 1:500 in 0.5% saponin-solution.
- 100 μ L of DAPI-solution was added to the cells and incubated at RT for 10 min in darkness.
- Cells were washed three times with 1 mL PBS.
- The coverslip was removed from the well plate, dried under airflow and the side of cells was placed on 3 μ L Vectashield mounting solution on top of an object slide.
- The edges of the coverslip were then sealed with nail polish and the slides were stored at 4°C or used for microscopic analysis.

6 Abschließende Diskussion

6.1. Der Einfluss des MT-Zytoskeletts der Wirtszelle bei der frühen *Cpn* Infektion

Ich habe mich in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich mit der Rolle des Wirtszell-MT-Zytoskeletts bei der chlamydialen Infektion befasst. Dabei habe ich generelle Prinzipien um die Bedeutung von MT während der frühen Infektion des Humanpathogens *Cpn* untersucht.

Das Wissen über die Bedeutung der MT-Modulation durch früh sekretierte Effektorproteine während der frühen chlamydialen Infektion ist bis heute nahezu ungeklärt. Ein Grund könnte darin liegen, dass bei der Chlamydienforschung in der Regel die Synchronisation der Infektion von Epithelzellen unter Bedingungen stattfindet, bei denen kein funktionales MT-Zytoskelett existiert. Infektiöse Chlamydien werden für Analysen der frühen Infektion bei etwa 4°C auf die Wirtszellen gegeben bzw. zentrifugiert. Dabei wird das MT-Zytoskelett allerdings vollständig depolymerisiert. Im Kontrast dazu bleibt das Aktin-Zytoskelett bei niedrigen Temperaturen erhalten [193-196]. Möglicherweise hat sich aufgrund dieser Analysemethoden die Forschung auf die Rolle des Aktin-Zytoskeletts während der frühen Infektion konzentriert und die Bedeutung des MT-Zytoskeletts und damit auch chlamydiale MT-modulierende Effektorproteine wurden bisher übersehen.

Innerhalb dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass die chemisch-induzierte Abwesenheit des Interphasen-MT-Zytoskeletts zu einer signifikanten Reduktion von infizierten Zellen führt [76]. Diese erstmals für *Cpn* durchgeführte Analyse zeigt, dass die Effizienz der frühen *Cpn* Infektion in hohem Maße von der Anwesenheit eines wildtypischen Interphasen MT-Zytoskelett abhängt. Bei dieser Analyse wurde das MT-Zytoskelett von Epithelzellen vor der Infektion chemisch vollständig depolymerisiert, sodass *Cpn* EBs auf Wirtszellen mit einem abwesenden Interphasen-MT-Zytoskelett trafen. Die anschließende Entfernung der MT-inhibierenden Reagenz bewirkte, dass sich das MT-Zytoskelett nach der frühen Phase der Infektion (Adhäsion, Internalisierung und Transport zum Haupt-MTOC) wieder vollständig aufbaute und spätere Infektionsstadien wahrscheinlich unbeeinflusst blieben.

Zwei bisher für *Ctr* L2 durchgeführte Untersuchungen liegen schon längere Zeit zurück und wurden in dauerhafter Anwesenheit von chemischen MT-Inhibitoren über den gesamten analysierten Infektionsverlauf hinweg oder Herauswaschen von MT-Inhibitoren zu späteren Infektions-Zeitpunkten durchgeführt [197, 198]. Trotz der Beobachtung, dass die Chlamydien-Aufnahme ebenfalls reduziert ist [198], können durch die permanente

Abwesenheit von MT auch weitere zelluläre Prozesse beeinflusst worden sein und diese Analysen sind daher mit der von mir durchgeführten Analyse mit *Cpn* nicht vergleichbar.

Somit existieren außer unseren Daten keine weiteren, die spezifisch analysieren, ob ein intaktes Interphasen-MT-Zytoskelett bei der frühen chlamydialen Infektion benötigt wird. Unsere Daten zeigen klar, dass die Anwesenheit eines Interphasen-MT-Zytoskeletts die Effizienz der frühen *Cpn* Infektion signifikant erhöht.

In dem Bezug stellt sich die Frage, ob vergleichbare Analysen in anderen intrazellulären pathogenen Bakterien durchgeführt wurden, die zeigen, dass die Effizienz einer Infektion von der Anwesenheit eines intakten MT-Zytoskeletts abhängig ist. Wie bei Chlamydien ist das Wissen darüber, ob auch andere intrazelluläre bakterielle Pathogene das MT-Zytoskelett zur Internalisierung benötigen sehr begrenzt. Es konnten jedoch ebenfalls Hinweise bei *Listeria*, und *Yersinia* gefunden werden.

Während des Eintritts in die Wirtszelle soll bei dem fakultativ intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes* das MT-Zytoskelett eine wichtige Rolle spielen. Um dies zu zeigen, wurde das MT-Zytoskelett in Wirtszellen vor der Infektion mittels MT-Inhibitoren aufgelöst. Dabei wurde beobachtet, dass die Vorbehandlung mit MT-Inhibitoren zu einer signifikanten Inhibition der bakteriellen Invasion führt [199]. Eine ähnliche Beobachtung konnte auch für das Gram-negative Pathogen *Yersinia pseudotuberculosis* gemacht werden. So führt auch hier der chemisch-induzierte Verlust des Interphasen-MT-Zytoskeletts der Wirtszelle zu einer Inhibition der Internalisierung, wobei die Stärke der Inhibition von der Höhe der Inhibitor-Konzentration und damit von dem Grad der MT-Depolymerisation abhängt. Es wurde darauf geschlossen, dass für eine effiziente Internalisierung ein funktionales und organisiertes MT-Zytoskelett erforderlich ist [200]. Im Gegensatz zu den Analysen mit *Ctr* sind die beiden Analysen mit *Listeria* und *Yersinia* eher mit der von mir durchgeführten *Cpn*-Analyse vergleichbar. Zwar wurden die MT-Inhibitoren, wie bei *Ctr*, nicht herausgewaschen, allerdings belief sich die Analysezeit nur über den frühen Infektions-Zeitraum und nicht über eine vollständige Infektion. Entsprechend hatte die Depolymerisation des MT-Zytoskeletts durch den Einsatz von MT-Inhibitoren, wie bei der *Cpn*-Analyse, wahrscheinlich nur einen Einfluss auf die frühe Infektion und nicht auch auf spätere Infektionsstadien.

Es stellt sich nun die Frage, ob neben der Destabilisierung bzw. Abwesenheit des MT-Zytoskeletts auch die Stabilisation von MT einen Einfluss auf die Effizienz der frühen Chlamydien-Infektion hat. Eine Analyse mit *Ctr* hat gezeigt, dass eine Behandlung von infizierten Wirtszellen mit der MT-stabilisierenden Reagenz Taxol die Infektiosität signifikant verbessert [184]. Zusätzlich hat eine in unserem Labor durchgeführte bisher

unveröffentlichte Analyse gezeigt, dass die Anzahl an internalisierten *Cpn* EBs in Taxol-vorbehandelten Epithelzellen ebenfalls erhöht ist (Katharina Schenk). Im Hinblick darauf, dass Taxol-stabilisierte MT vermehrt acetyliert werden und dadurch flexibler und langlebiger sind kann die Vermutung aufgestellt werden, dass stabilere MT für eine effiziente Chlamydien-Infektion benötigt werden [154, 156]. Außerdem kann postuliert werden, dass möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der Endozytose von Chlamydien und der umgebenen post-translational modifizierten und stabilisierten MT existiert.

Es ist bekannt, dass der EGF (*epidermal growth factor*) durch Bindung an den EGFR (*epidermal growth factor receptor*) mittels Endozytose internalisiert wird und dadurch intrazelluläre Signalwege ausgelöst werden, die unter anderem den Transport von endozytischen Kompartimenten zum Lysosom regulieren [201]. Eine Analyse zeigt zudem, dass nach der Stimulation von EGF im Bereich der Endozytose vermehrt acetylierte MT auftreten [201, 202]. Dies soll den anschließenden endozytischen Transport durch Interaktionen der stabilisierten MT mit Motorproteinen unterstützen. Gleichzeitig inaktiviert der EGFR die HDAC6 (*histone deacetylase 6*) was zu einer weiteren Erhöhung der Anwesenheit von acetylierten MT führt [201, 202]. Diese Analysen unterstützen die von uns durchgeführte *Cpn*-Analyse und damit die Vermutung, dass eine Endozytose von chlamydialen Partikeln in Zusammenhang mit einer erhöhten Anzahl an post-translational modifizierten bzw. acetylierten und damit stabileren MT steht, was anschließend den folgenden Transport der internalisierten Chlamydien unterstützen könnte.

Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen, dass die Anwesenheit eines intakten Interphasen-MT-Zytoskelett während der frühen chlamydialen Infektion wichtig ist. Unterstützt werden die Daten von den Erkenntnissen, dass für eine effiziente Endozytose post-translational modifizierte bzw. stabilisierte MT benötigt werden. Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit bei einem Screen eine, im Vergleich zur reduzierten Genomgröße von Chlamydien, hohe Anzahl an MT-beeinflussenden *Cpn* Proteine identifiziert werden, wovon sechs Proteine früh sekretiert werden [76]. All diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass das Interphasen-MT-Zytoskelett der Wirtszelle für die frühe chlamydiale Infektion von hoher Relevanz ist.

6.2. Das *Cpn* Protein CPn0572 ist das erste bakterielle Protein, was beide dynamischen Zytoskelette der humanen Wirtszelle moduliert

6.2.1 Die Aktin-Assoziations-Fähigkeiten von *Ctr* L2 TarP und CPn0572

Die chlamydiale TarP Effektorproteinfamilie ist bekannt für ihre Assoziations- und Modulationsfähigkeit bezüglich des Wirtszell-Aktin-Zytoskeletts während der frühen Infektion. Das bisher am besten untersuchte TarP Familienmitglied ist das *Ctr* L2 TarP. Für dieses TarP konnte gezeigt werden, dass es nach der Sekretion in die Wirtszelle in der Nähe der chlamydialen Eintrittsstelle lokalisiert, mit Aktin assoziiert und dort, unter anderem durch die Aktivierung des Arp2/3 Komplexes, eine lokale Rekrutierung von F-Aktin induziert [167, 173, 174]. *Ctr* L2 TarP und das *Cpn* TarP Ortholog CPn0572 zeigen teilweise homologe Proteindomänen. Während die N- und C-terminalen Proteinbereiche zwischen dem *Ctr* L2 TarP und CPn0572 kaum Homologien aufweisen, befinden sich die homologen Aminosäure-Sequenzen (etwa 26% Identität) hauptsächlich in dem Bereich der Prolin-reichen Domäne (PRD) und der Aktin bindenden Domänen (Abb. 10). Durch die Anwesenheit der konservierten Aktin-Bindedomänen sind sowohl *Ctr* L2 TarP als auch CPn0572 in der Lage *in vitro* und *in vivo* an G- und F-Aktin zu binden [74, 115, 167, 176].

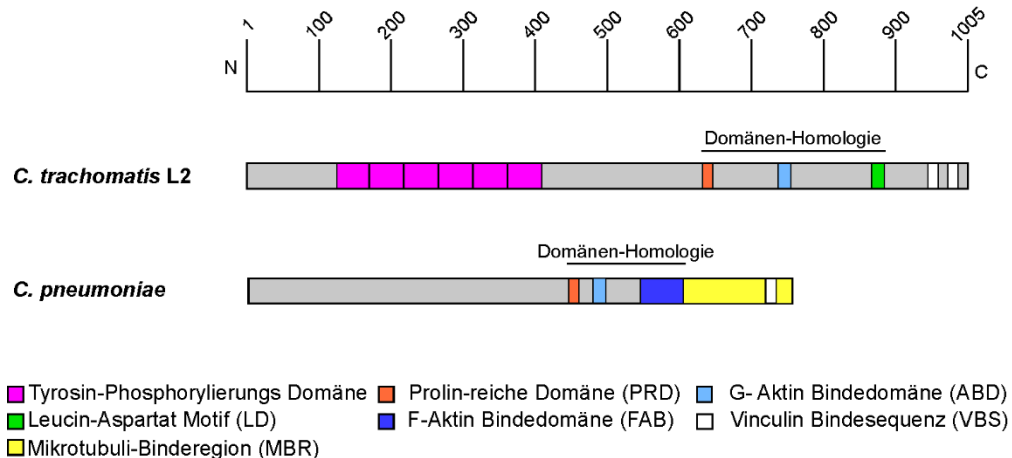


Abbildung 10: Domänenvergleich der *Ctr* und *Cpn* TarP Orthologe

Schematische Darstellung der TarP Orthologe von *Ctr* L2 und *Cpn* (CPn0572). Die Domänen-Homologie, welche die PRD und Aktin-bindenden Domänen enthalten (*Ctr*: 625-882 aa; *Cpn*: 454-595 aa) ist jeweils eingezeichnet. Die Zahlen geben die Nummer der Aminosäuren an. Die prozentuale Identität zwischen den Domänen-Homologien zwischen *Ctr* L2 TarP und CPn0572 beträgt 25,62% (Aminosäuresequenz-Vergleich durch Uniprot). [74, 78, 111, 115, 167, 176].

Trotz der konservierten Aktin-Bindedomänen, lassen sich *in vivo* erhebliche phänotypische Unterschiede bei der Modulation von F-Aktin durch die beiden TarP Orthologe beobachten.

Während *Ctr* L2 TarP, exprimiert in humanen Epithelzellen, assoziiert mit F-Aktin vorwiegend als punktförmige Akkumulation vorliegt, zeichnet sich die Assoziation von CPn0572 mit F-Aktin hauptsächlich durch einen filamentartigen Aktin-Phänotyp aus [74, 177]. Die Gründe für diese phänotypischen Unterschiede sind ungeklärt. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass in der frühen Infektion sekretiertes CPn0572 nicht mit filamentartigen, sondern mit punktförmigen Aktin-Akkumulationen kolokalisiert [115]. Bei diesem Experiment wurden die infektiösen EBs allerdings bei 4°C auf die Wirtszellen zur Synchronisation zentrifugiert, sodass kein funktionales MT-Zytoskelett existiert. Eine Analyse in der eindeutig gezeigt wird, wie in der Infektion früh sekretiertes *Ctr* L2 TarP direkt mit Aktin kolokalisiert existiert nicht. Daher können hier keine Vergleiche gezogen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte außerdem festgestellt werden, dass eine durch Kälte-Behandlung vollständige Depolymerisation des MT-Zytoskeletts bei CPn0572-exprimierenden Epithelzellen zu einer Veränderung des durch CPn0572-ausgelösten Aktin-Phänotyps führt. Bei der Abwesenheit des MT-Zytoskeletts kommt es zu einer Änderung des filamentartigen Aktin-Phänotyps zu punktförmigen Aktin-Aggregaten [78]. Dieser Aktin-Phänotyp ähnelt eher der durch Expression von *Ctr* L2 TarP ausgelösten Aktin-Modulation und dem Aktin-Phänotyp der bei sekretiertem CPn0572 in der frühen Infektion beobachtet wurde.

Mittlerweile gibt es Hinweise darauf, dass die beiden dynamischen Zytoskelette als einheitliches System betrachtet werden können. Der vollständige Verlust des MT-Zytoskeletts hat daher möglicherweise auch einen Einfluss auf die Funktion des Aktin-Zytoskeletts [203, 204]. Möglicherweise könnte die experimentelle Methodik und die An- bzw. Abwesenheit des MT-Zytoskeletts die Unterschiede zwischen den Aktin-Phänotypen von ektopisch exprimierten CPn0572 und *Ctr* L2 TarP, sowie in der Infektion sekretiertem CPn0572 erklären.

6.2.2 CPn0572 moduliert massiv die Interphasen-Mikrotubuli in humanen Epithelzellen

Interessanterweise konnte innerhalb dieser Arbeit für CPn0572, eine bisher für die TarP Familie neue Funktion identifiziert werden. CPn0572 ist, neben der Bindung an G- und F-Aktin, in der Lage *in vitro* und *in vivo* an MT zu binden und diese bei Expression in humanen Epithelzellen massiv zu modulieren. Damit ist CPn0572 das erste bakterielle Protein, welches sowohl das humane Aktin- als auch das MT-Zytoskelett binden und verändern kann.

Durch Herstellung von Proteinvarianten wurde innerhalb dieser Arbeit im C-Terminus von CPn0572 eine MT-Binderegion (MBR) identifiziert (Abb. 10) [78]. Die Expression dieser Proteinvariante, CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵, in Epithelzellen führt zu einer Hyperstabilisation von MT-Filamenten, wodurch die CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵-assoziierten MT resistenter gegenüber chemischer- und Kälte-induzierter Depolymerisation sind. Damit zeigt diese CPn0572-Variante ein ähnliches Verhalten gegenüber MT wie ektopisch überexprimierte MAPs. Beispielsweise schützt das MAP6, überexprimiert in Epithelzellen, MT ebenfalls durch Stabilisation gegen chemischer- und Kälte-induzierter Depolymerisation [205].

Im Vergleich zu den in Kapitel 6.1 beschriebenen Analysen mit Taxol führt die vorherige ektopische Expression von CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ und damit die Anwesenheit von hyperstabilisierten MT-Filamenten nicht zu einer verbesserten Infektion, sondern zu einer signifikanten Reduktion. Die Frage, wie es zu diesem Unterschied kommt ist bisher noch offen. Die Taxol-Daten lassen vermuten, dass eine frühe Infektion stabilisierte bzw. acetylierte MT im Bereich des chlamydialen Eintritts benötigt. Die Daten mit der CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵-Expression zeigen jedoch, wie auch bei der Expression von CPn0572 in *Ctr* EBs, dass die CPn0572-bedingte MT-Modulation vermehrt in der perinuklearen bzw. Inklusionsnahen Region und weniger distal vom Zellkern bzw. der Inklusion auftritt. Möglicherweise führt lediglich die Modifikation von MT im Bereich der chlamydialen Endozytose zu einer verbesserten Infektion. Eine starke Expression von CPn0572 löst hingegen eine Hyperstabilisation von MT in Inklusionsnähe aus und zeigt möglicherweise daher keine Verbesserung, sondern eine Verschlechterung der Infektion.

Es ist jedoch bekannt, dass es sich bei CPn0572 um ein früh in der Infektion sekretiertes Protein handelt [101, 115]. Eine Analyse innerhalb meiner Arbeit zeigt, dass durch transformierte *Ctr* EBs sekretiertes CPn0572 früh in der Infektion an der Zelloberfläche lokalisiert [78]. Die nicht-wildtypische hohe Expression von CPn0572 in Epithelzellen könnte zu einer abweichenden Lokalisation innerhalb der Wirtszelle führen. In manchen Subpopulationen von Epithelzellen, welche CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ exprimieren, konnte ich beobachten, dass diese Proteinvariante beinahe vollständig entlang von MT-Filamenten lokalisiert und zu verdickten und daher möglicherweise zu gebündelten MT führt.

Für das MAP EB1, welches bei wildtypischer Expression typischerweise am Plus-Ende von MT lokalisiert ist, konnte in dem Bezug beispielsweise gezeigt werden, dass eine ektopische Überexpression zu einer artifiziellen Lokalisation entlang des gesamten MT Filaments und zur Bündelung von MT führt [206]. Möglicherweise zeigt auch CPn0572 durch die nicht-wildtypische starke Expression eine Fehllokalisation innerhalb der Epithelzellen.

Eventuell führt eine regulierte Expression von CPn0572, durch den Einsatz eines induzierbaren Promotors, zu einer wildtypischeren Lokalisation an der chlamydialen Eintrittsstelle, was zu einer lokalen Stabilisation von MT und damit zu einer verbesserten Internalisierung führen kann.

Des Weiteren wurden die Analysen mit CPn0572 in nicht-polarisierten humanen Epithelzellen gemacht. Bei dem Lungenepithel, welches *Cpn* infiziert, handelt es sich jedoch vorwiegend um polarisierte Epithelzellen [207]. Der Aufbau des Zytoskeletts zwischen nicht-polarisierten und polarisierten Zellen unterscheidet sich jedoch stark. In polarisierten Zellen polymerisieren MT beispielsweise ausgehend von der apikalen Membran in Richtung der basalen Zellregion [208]. Im Gegensatz dazu polymerisieren MT in nicht-polarisierten Zellen ausgehend vom Haupt-MTOC in der Nähe des Zellkerns. Die MT bilden so ein Netzwerk durch die gesamte Zelle und die MT Plus-Enden zeigen zu verschiedenen Regionen der Zell-umgebenen Membran [208]. Möglicherweise unterscheidet sich die Lokalisation von CPn0572 aufgrund der unterschiedlichen Organisation des MT-Zytoskeletts zwischen den beiden Zelltypen und die Analysen mit exprimierten CPn0572 und sekretierten CPn0572 aus der *Ctr* Infektion heraus müssten mit polarisierten Zellen wiederholt werden.

6.2.3 Die Modulation des MT-Zytoskeletts der Wirtszelle durch TarP ist spezifisch für *C. pneumoniae*

Durch die Beobachtung, dass CPn0572 mit MT assoziiert stellt sich die Frage, ob auch andere TarP Orthologe diese Fähigkeit besitzen. Eine MT-Assoziation konnte innerhalb dieser Arbeit jedoch nur für die volllängen und die C-terminale Variante des *Cpn* TarP-Orthologs des humaninfizierenden *Cpn*-Stamms (CPn0572) und für die C-terminale TarP-Ortholog-Variante des Koala-infizierenden *Cpn*-Stamms beobachtet werden. Beide weisen im C-Terminus zueinander homologe Aminosäure-Sequenzen auf. Weitere getestete TarP-Orthologe (C-terminale Proteinvarianten) aus *C. psittaci* und *C. trachomatis* L2, welche C-terminal wenige bis kaum homologe Aminosäure-Sequenzen zu CPn0572 besitzen, zeigten im Vergleich dazu *in vivo* keine Assoziationen mit dem MT-Zytoskelett der Wirtszelle [78]. Innerhalb unseres Labors konnte auch für das Volllängen *Ctr* L2 TarP *in vitro* keine direkte Bindung an MT festgestellt werden (Bachelor Arbeit von Anna R. Teschke). Es kann derzeit nur spekuliert werden, warum die Fähigkeit zur MT-Bindung der *Cpn* TarP-Orthologe einzigartig für die gesamte TarP-Proteinfamilie ist. Möglicherweise liegt der Grund in der Gewebespezifität der verschiedenen Chlamydien-Spezies. Während *Ctr* L2 spezifisch

Epithelzellen von Urogenital-Gewebe infiziert, ist *Cpn* auf Epithelzellen des Respirationstraktes spezialisiert. Epithelzellen können je nach Gewebe in ihrem Aufbau und Funktion sehr vielfältig sein. Beispielsweise besteht das Epithel im humanen Respirationstrakt aus einem pseudostratifiziertem Zylinderepithel und weist Cilien auf. Dieses Epithel dient hauptsächlich als Barriere gegen Pathogene und schützt so vor Infektionen [209]. Im Vergleich zu anderen Epithelgeweben ist das Lungenepithel durch aktives ein- und ausatmen permanent der in der Atemluft enthaltenen Pathogenen ausgesetzt. Bis heute ist allerdings kaum etwas über die Art und Weise der initialen Infektion des Lungenepithels durch *Cpn* bekannt [210]. Einer der ersten Kontaktpunkte für eingeatmete Pathogene sind die hauptsächlich aus MT aufgebauten Cilien der obersten Schicht des Lungenepithels [211]. In der Regel sorgt die Kombination aus der beweglichen Cilienschicht in Verbindung mit Atemwegsschleim, dass angeheftete Pathogene aus den Atemwegen wieder ausgeschieden werden. Es ist allerdings bekannt, dass einige lungeninfizierende Bakterien gezielt mit den Cilien interagieren, deren Funktion beeinträchtigen und das Lungenepithel so anfälliger für Infektionen wird. Beispielsweise löst das Gram-negative Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* durch Infektion des Respirationstraktes Schäden am epithelialen Gewebe aus, was zu einer erhöhten Infektion und schließlich zu einer Verschlechterung der Lungenfunktion führt [211, 212]. Dazu sekretiert *P. aeruginosa* bestimmte Virulenzfaktoren, die auf die Cilien abzielen und deren MT-basierte Ultrastruktur verändern, sodass es zu einer Inhibition der Cilien-Funktion kommt [211, 213]. Diese Cilien-Inhibition führt unter anderem zu einer Ciliostase des Respirationstraktes und es wird davon ausgegangen, dass dies der Grund dafür ist, dass derart beschädigtes Epithelgewebe der Lunge leichter durch *P. aeruginosa* und anderen Pathogenen zu infizieren ist [211]. Möglicherweise könnte sich auch *Cpn* durch die Fähigkeit zur Bindung und Modulation des MT-Zytoskeletts auf seine biologische Nische des Lungenepithels spezialisiert haben.

6.2.4 CPn0572 Expression führt zu genomischer Instabilität

Interessanterweise konnte ich innerhalb dieser Arbeit zeigen, dass CPn0572 und die C-terminale MT-Binderegion CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ neben dem Interphasen MT-Zytoskelett auch mit den Spindel-MT in mitotischen Hefe- und epithelialen Humanzellen assoziieren. Darüber hinaus, kommt es bei der Expression von CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ zu einer massiven Erhöhung von Spindeldefekten in Epithelzellen und zu genomischer Instabilität in Hefe- und Epithelzellen im Vergleich zu Kontrollzellen.

Für *Cpn* konnte bisher nur ein Effektorprotein identifiziert werden, welches ebenfalls Auswirkungen auf mitotische Zellen hat. Für das MT-bindende *Cpn* Protein CopN konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es exprimiert in Hefe- und Humanzellen durch seine MT-destabilisierenden Eigenschaften einen Einfluss auf den Zellzyklus der Wirtszelle hat. CopN führt dabei in Hefe- und Humanzellen zu einem Verlust des mitotischen Spindelapparats, was zu einem Arrest in der G2/M-Phase führt [214].

Im Gegensatz zu CopN führt die Expression von CPn0572 nicht zu einer Destabilisation und damit zum Verlust von Spindel-MT, sondern zu einer Hyperstabilisation von MT [78, 214]. Ich konnte zeigen, dass die Expression von CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ in Humanzellen zu massiven Modulationen der Spindel-MT führt was in abnormale Chromosomenverteilungen und Aneuploidie resultieren kann. Dahingehend konnten wir bestätigen, dass die Expression von CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ in der Hefe *S. pombe* zu Chromosomenverlust und die Expression in humanen Epithelzellen zu Multinukleation führt. Es stellt sich nun die Frage, in wie weit die CPn0572⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵-abhängige Modulation der Spindel-MT zu Chromosomenfehlsegregation und zu einer möglichen Aneuploidie führt.

Für das *Ctr* sekretierte Effektorprotein CteG (*chlamydia trachomatis* effector associated with the golgi) konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es an Centrin-2, ein zentrosomales Protein, welches die Zentriol-Duplikation kontrolliert, bindet. Die Bindung und Modulation von Centrin-2 durch CteG unterstützt dabei die *Ctr*-induzierte Zentrosomenamplifikation [215]. Auch wurden weitere *Ctr* Proteine wie die Inc Proteine IPAM oder CPAF identifiziert, die an Zentrosomen lokalisieren und einen Einfluss auf deren Amplifikation und die Bildung multinuklearer Zellen haben [216]. Sekretiertes CPAF verhält sich wie ein Anaphase-induzierender Komplex und führt dazu, dass Zellen die Mitose frühzeitig mit möglichen Fehlern in der Organisation von Chromosomen, beispielsweise durch falsche MT-Chromosomen-Verbindungen, beenden. Dadurch kann es zu Chromosomen-Fehlsegregationen kommen, die die Zytokinese inhibieren [217].

6.2.5 *Cpn* Infektionen führen in Wirtszellen zu Mitosedefekten

Da es sich bei der ektopischen Expression um eine artifizielle Methodik handelt, wurde anschließend die *Cpn* Infektion als wildtypischeres Analyse-System gewählt und untersucht, ob eine *Cpn* Infektion einen Einfluss auf mitotische Wirtszellen hat.

Innerhalb dieser Arbeit wurde festgestellt, dass *Cpn* Inklusionen in infizierten humanen Mitosezellen in der Nähe der Zentrosome lokalisieren. Zusätzlich führt die Anwesenheit der

Inklusionen zu aberranten mitotischen Zellen mit Defekten in der Formation von Spindel-MT und/oder der Chromosomenanordnung.

Wie für *Cpn*, konnte zuvor auch für *Ctr* gezeigt werden, dass Inklusionen in infizierten epithelialen Mitosezellen nah an den Zentrosomen assoziieren [30, 218]. Darüber hinaus wurde für *Ctr* beobachtet, dass eine Infektion zu einer abnormal hohen Anzahl an Zentrosomen, Bildung von multipolaren Spindeln und Fehlern bei der Chromosomensegregation in mitotischen Zellen führt [30]. Interessanterweise sind sowohl *Ctr* als auch *C. muridarum* in der Lage auch unabhängig von einer abnormalen Zentrosomen-Anzahl, Defekte der Spindel-MT zu induzieren [218].

Auch für das pathogene Bakterium *Listeria monocytogenes* wurde gezeigt, dass, im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen, eine Infektion zu einer signifikanten Steigerung der Bildung von fehlorientierten Chromosomen während der Metaphase von mitotischen Wirtszellen kommt [219]. Hierbei sind einzelne Chromosomen nicht an der typischen Metaphasen-Platte lokalisiert. Dieser Zustand kann dazu führen, dass es zu nachteilenden Chromosomen (*lagging chromosomes*) oder Chromosomenbrücken kommt, was zu Chromosomen-Fehlsegregationen und Bildung von multinuklearen Zellen oder Aneuploidie führen kann [219-221].

Möglicherweise haben *Cpn* Inklusionen durch ihre Zentrosomen-nahe Lokalisierung einen Einfluss auf die Amplifikation von Zentrosomen, wodurch es zu Fehlern bei der Ausbildung einer korrekten Spindel und damit zu Chromosomen-Fehlorientierung, -Fehlsegregationen und genomischer Instabilität kommen kann, was wiederum die Bildung von karzinogenen Zellen begünstigt. Im Hinblick darauf, dass *Cpn* in Verbindung mit Lungenkrebs gebracht wird [39, 40], ist es von Interesse die durch *Cpn* ausgelösten Fehler in der Mitose und die daraus resultierenden Konsequenzen für die Zelle weiter zu analysieren.

6.2.6 Die Aktin- und MT-modulierenden Funktionen von CPn0572 unterliegen möglicherweise komplexen Regulationsmechanismen

CPn0572 assoziiert mit dem MT- und Aktin-Zytoskelett und die innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigen, dass CPn0572 beide Zytoskelett-Strukturen auch gleichzeitig binden kann. Als Protein mit derartigen Eigenschaften stellt sich die Frage, ob es sich dabei um kompetitive und/oder abhängige Assoziationen und Modulationen handelt.

In vitro Analysen aus unserem Labor zeigen, dass CPn0572 in der Lage ist unabhängig voneinander MT- oder Aktin-Filamente zu binden (Dr. Abel Alcázar-Román) [74, 78]. Dies

deutet darauf hin, dass die beiden Funktionen von CPn0572 *in vitro* entkoppelt voneinander ausgeführt werden können. Im Kontrast dazu zeigt *in vivo* ektopisch exprimiertes CPn0572 in Epithelzellen eine deutliche Präferenz für die Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett. Die Analysen zeigen, dass CPn0572 nur bei einer kleinen Subpopulation von Epithelzellen mit MT alleine oder gleichzeitig mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert. *In vivo* Infektions-Analysen mit CPn0572-exprimierendem *Ctr* zeigen im Gegensatz dazu eine eindeutige Assoziations-Präferenz für das MT-Zytoskelett in Inklusionsnähe [78].

Diese gegensätzlichen Analyse-Ergebnisse lassen sich möglicherweise zum einen anhand der artifiziellen Methodik erklären, bei der CPn0572 *in vivo* durch Transformation in Wirtszellen bzw. in *Ctr* stark exprimiert wird und es dadurch möglicherweise zu Lokalisations- und/oder Funktionsabweichungen im Vergleich zu wildtypischen Bedingungen kommen kann. Des Weiteren sind bei der Infektion mit CPn0572-exprimierendem *Ctr* noch weitere chlamydiale Proteine anwesend, unter anderem das wildtypische *Ctr* TarP, welche möglicherweise einen Einfluss auf die Infektion und die Funktion von CPn0572 haben können. Es könnte auch sein, dass CPn0572 weitere Wirtszell-Proteine oder *Cpn*-spezifische Proteine benötigt, um mit beiden Zytoskelett-Strukturen gleichzeitig zu interagieren.

Nichtsdestotrotz zeigen die in dieser Arbeit generierten Daten Hinweise auf eine Abhängigkeit oder Regulation zwischen den MT- und Aktin-bindenden Funktionen von CPn0572 in Raum und/oder Zeit. Möglicherweise existiert eine intra- oder intermolekulare Regulierung der Proteinfunktionen von CPn0572. Alle identifizierten Aktin- und MT-Binderegionen existieren im C-terminalen Bereich des Proteins (siehe Abb. 10). Die Funktion des N-Terminus konnte noch nicht aufgeklärt werden und dieser Region wurde bisher keine bekannte Domäne oder Funktion zugeordnet. Es gibt aber einen Hinweis darauf, dass CPn0572 mit dem N-Terminus die Rekrutierung von Aktin reguliert [74]. Möglicherweise ist CPn0572 in der Lage durch den N-Terminus die Bindefähigkeit der Zytoskelett-Strukturen zu bestimmten Zeiten im Infektionszyklus zu regulieren.

Eine weitere Hypothese bezüglich der unterschiedlichen Assoziations- und Lokalisationspräferenzen von CPn0572 könnte die Heterogenität des Zytoskeletts von humanen Wirtszellen darstellen. Im Vergleich zum Aktin-Zytoskelett ist das MT-Zytoskelett dynamischer und deutlich mehr Modifikationen ausgesetzt. Durch den Tubulin-Code sind MT sehr komplex aufgebaut und können in ihrer Struktur und Funktionalität stark variieren. So ist bereits bekannt, dass aufgrund von einer Vielzahl von MAPs und PTMs innerhalb einer Zelle co-existierende Subpopulationen verschiedener MT vorkommen, welche sich in ihrer chemischen Zusammensetzung und Stabilität unterscheiden [147, 148, 222, 223]. So

können in einer Zelle dynamische MT existieren, die schnelle Zyklen von Polymerisation und De-polymerisation aufweisen und sensibel gegenüber Kälte-Behandlung und chemischer MT-Depolymerisation sind. Zum anderen können in dieser Zelle gleichzeitig durch PTMs stabilisierte, langlebige MT vorkommen [222]. Die unterschiedlichen MT-Subpopulationen weisen dabei in einigen Zelllinien bestimmte Lokalisationen auf. So kommen stabilisierte, langlebige MT in HeLa, COS-7 oder U2OS Zellen vorwiegend an der peri-nuklearen Region vor. Im Gegensatz dazu weisen dynamische MT in diesen Zelllinien eine homogenere Verteilung innerhalb der Zelle auf [222, 224, 225]. Möglicherweise ist die Assoziations-Präferenz von CPn0572 bezüglich der beiden dynamischen Zytoskelett-Strukturen abhängig von der jeweiligen infizierten Wirtszelle und der darin vorkommenden MT-Subpopulationen.

Zusammenfassend zeigt CPn0572, durch seine Aktin- und MT-bindenden und modulierenden Fähigkeiten und der Beobachtung, dass die Expression der MBR von CPn0572 in Epithelzellen zu acetylierten und gegen Kälte- und chemisch-induzierter MT-Depolymerisation stabilisierte MT führt, Merkmale von überexprimierten MAPs. Ungeklärt ist bisher allerdings noch, wie genau CPn0572 die verschiedenen Zytoskelett-Strukturen moduliert, welche Regulationen dabei eine Rolle spielen und welche spezifische Funktion es in der Infektion hat. Möglicherweise ist die MT-Bindung viel bedeutsamer als bisher durch die durchgeführten Analysen angenommen. Beispielsweise konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass *in vitro* die Anwesenheit von MT-Filamenten zu einer signifikanten Verbesserung der Aktin-Polymerisation durch CPn0572 führt (Bachelorarbeit von Anna R. Teschke, 2025) (Abb.11).

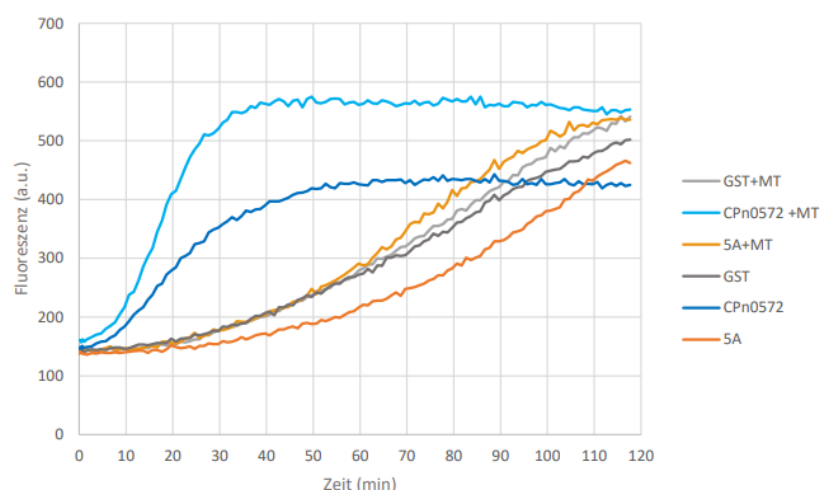


Abbildung 11: Die Anwesenheit von MT verbessert die Fähigkeit zur Aktin-Polymerisation von CPn0572.

1 μ M 100% Pyrene-Aktin wurde mit 50 nM GST (Kontrolle, Grau), CPn0572 (Blau) oder der 5A-Variante von CPn0572, welche Mutationen in der ABD trägt und kein Aktin bindet (Orange) inkubiert

und die Aktin-Polymerisation über die Zeit (min) mittels Fluoreszenz bei 407 nm ermittelt. Eine Inkubation erfolgte ohne oder mit 425 mM MT (GST; Hell-Grau, CPn0572; Hell-Blau, 5A; Hell-Orange). Die Abbildung stammt aus der Bachelorarbeit von Anna R. Teschke (2025).

Anhand der Analysen, die innerhalb dieser Arbeit durchgeführt wurden könnte für CPn0572 postuliert werden, dass es möglicherweise nach der Sekretion in die Wirtszelle oligomerisiert und MT bindet und stabilisiert. Ebenfalls an CPn0572 gebundenes G-Aktin könnte so in Nähe der chlamydialen Endozytose gebracht werden, wo eine vermehrte Aktin-Polymerisation ausgelöst wird um die Aufnahme des EBs zu unterstützen (Abb. 12). Die Bestätigung einer derartigen Theorie für CPn0572 bedingt allerdings noch weitere Analysen.

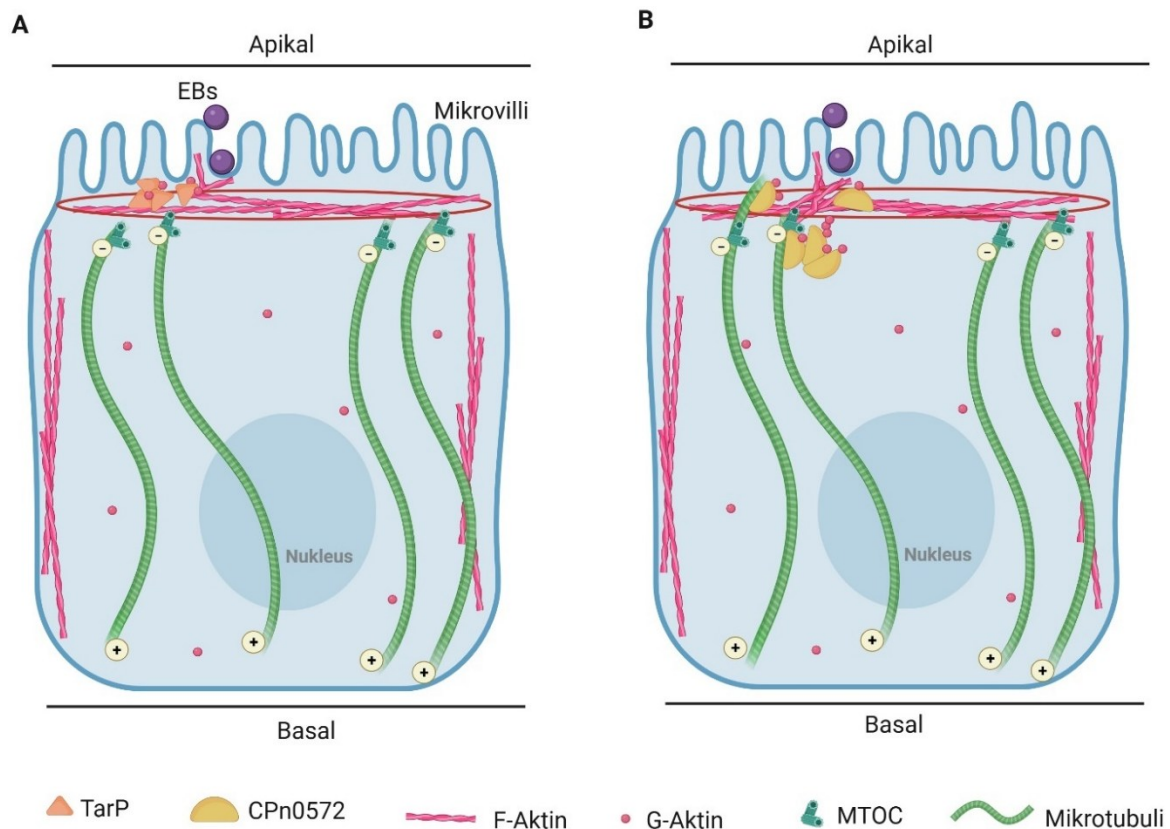


Abbildung 12: Arbeitshypothese: Früh sekretiertes CPn0572 bindet und stabilisiert MT um G-Aktin apikal anzureichern, was zu einer verbesserten Aktin-Polymerisation führt.

Schematische Darstellung von polarisierten *Ctr* und *Cpn* infizierten Wirtszellen. **A** Durch *Ctr* EBs sekretiertes TarP kann oligomerisieren und führt durch Bindung von G-Aktin zu einer vermehrten Polymerisation von F-Aktin an der chlamydialen Eintrittsstelle. **B** Durch *Cpn* EBs sekretiertes CPn0572 könnte oligomerisieren und direkt an apikal polymerisierende Interphasen-MT binden. Dies führt zu MT-Stabilisation. Durch seine G-Aktin-Bindefähigkeit holt MT-gebundenes CPn0572 verstärkt G-Aktin-Moleküle in räumliche Nähe des chlamydialen Eintritts, wodurch eine verbesserte

F-Aktin Polymerisation ausgelöst wird, was die Internalisierung unterstützt. CPn0572 kann auch unabhängig von einer MT-Bindung Aktin an der Eintrittsstelle polymerisieren. Das jeweilige MT-Ende ist mit „-“ und „+“ gekennzeichnet. Die Abbildung wurde mit BioRender erstellt.

Referenzen

1. Nunes, A. and J.P. Gomes, *Evolution, phylogeny, and molecular epidemiology of Chlamydia*. Infect Genet Evol, 2014. **23**: p. 49-64.
2. Collingro, A., S. Kostlbacher, and M. Horn, *Chlamydiae in the Environment*. Trends Microbiol, 2020. **28**(11): p. 877-888.
3. Clarke, I.N., *Evolution of Chlamydia trachomatis*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1230**: p. E11-8.
4. Taylor-Brown, A., et al., *Twenty years of research into Chlamydia-like organisms: a revolution in our understanding of the biology and pathogenicity of members of the phylum Chlamydiae*. Pathog Dis, 2015. **73**(1): p. 1-15.
5. Everett, K.D., R.M. Bush, and 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*. Int J Syst Bacteriol, 1999. **49 Pt 2**: p. 415-40.
6. Sachse, K., et al., *Emendation of the family Chlamydiaceae: proposal of a single genus, Chlamydia, to include all currently recognized species*. Syst Appl Microbiol, 2015. **38**(2): p. 99-103.
7. Stephens, R.S., et al., *Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: Chlamydia trachomatis*. Science, 1998. **282**(5389): p. 754-9.
8. Beeckman, D.S. and D.C. Vanrompay, *Zoonotic Chlamydophila psittaci infections from a clinical perspective*. Clin Microbiol Infect, 2009. **15**(1): p. 11-7.
9. Meijer, A., et al., *Chlamydophila abortus infection in a pregnant woman associated with indirect contact with infected goats*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2004. **23**(6): p. 487-90.
10. Cheong, H.C., et al., *Chlamydiaceae: Diseases in Primary Hosts and Zoonosis*. Microorganisms, 2019. **7**(5).
11. Ojcius, D.M., T. Darville, and P.M. Bavoil, *Can chlamydia be stopped?* Sci Am, 2005. **292**(5): p. 72-9.
12. Mitchell, C.M., et al., *Chlamydia pneumoniae is genetically diverse in animals and appears to have crossed the host barrier to humans on (at least) two occasions*. PLoS Pathog, 2010. **6**(5): p. e1000903.
13. Read, T.D., et al., *Genome sequences of Chlamydia trachomatis MoPn and Chlamydia pneumoniae AR39*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(6): p. 1397-406.
14. Kalman, S., et al., *Comparative genomes of Chlamydia pneumoniae and C. trachomatis*. Nat Genet, 1999. **21**(4): p. 385-9.
15. Li, C., et al., *Editorial: Chlamydia trachomatis infection: Epidemiology, prevention, clinical, and basic science research*. Front Public Health, 2023. **11**: p. 1167690.
16. Lansingh, V.C., *Trachoma*. BMJ Clin Evid, 2016. **2016**.
17. Lesiak-Markowicz, I., et al., *Chlamydia trachomatis serovars in urogenital and ocular samples collected 2014-2017 from Austrian patients*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 18327.
18. Organization, W.H. *Chlamydia*. 2023; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chlamydia>.
19. Newman, L., et al., *Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0143304.
20. Brunham, R.C., et al., *Chlamydia trachomatis infection in women with ectopic pregnancy*. Obstet Gynecol, 1986. **67**(5): p. 722-6.
21. Grygiel-Gorniak, B. and B.A. Folga, *Chlamydia trachomatis-An Emerging Old Entity?* Microorganisms, 2023. **11**(5).

22. Detels, R., et al., *The incidence and correlates of symptomatic and asymptomatic Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae infections in selected populations in five countries*. Sex Transm Dis, 2011. **38**(6): p. 503-9.
23. Kretzschmar, M., et al., *Comparative model-based analysis of screening programs for Chlamydia trachomatis infections*. Am J Epidemiol, 2001. **153**(1): p. 90-101.
24. Morre, S.A., et al., *Urogenital Chlamydia trachomatis serovars in men and women with a symptomatic or asymptomatic infection: an association with clinical manifestations?* J Clin Microbiol, 2000. **38**(6): p. 2292-6.
25. O'Connell, C.M. and M.E. Ferone, *Chlamydia trachomatis Genital Infections*. Microb Cell, 2016. **3**(9): p. 390-403.
26. Mestrovic, T. and S. Ljubin-Sternak, *Molecular mechanisms of Chlamydia trachomatis resistance to antimicrobial drugs*. Front Biosci (Landmark Ed), 2018. **23**(4): p. 656-670.
27. Mohseni M, S.S., Takov V, *Chlamydia*. 2023: StatPearls Publishing; Treasure Island (FL).
28. Castellsague, X., et al., *Prospective seroepidemiologic study on the role of Human Papillomavirus and other infections in cervical carcinogenesis: evidence from the EPIC cohort*. Int J Cancer, 2014. **135**(2): p. 440-52.
29. Siegl, C., et al., *Tumor suppressor p53 alters host cell metabolism to limit Chlamydia trachomatis infection*. Cell Rep, 2014. **9**(3): p. 918-29.
30. Grieshaber, S.S., et al., *Chlamydia trachomatis causes centrosomal defects resulting in chromosomal segregation abnormalities*. Traffic, 2006. **7**(8): p. 940-9.
31. Blasi, F., et al., *Epidemiology of Chlamydia pneumoniae*. Clin Microbiol Infect, 1998. **4 Suppl 4**: p. S1-S6.
32. Choroszy-Krol, I., et al., *Infections caused by Chlamydophila pneumoniae*. Adv Clin Exp Med, 2014. **23**(1): p. 123-6.
33. Kuo, C.C., et al., *Chlamydia pneumoniae (TWAR)*. Clin Microbiol Rev, 1995. **8**(4): p. 451-61.
34. Grayston, J.T., et al., *A new respiratory tract pathogen: Chlamydia pneumoniae strain TWAR*. J Infect Dis, 1990. **161**(4): p. 618-25.
35. Porritt, R.A. and T.R. Crother, *Chlamydia pneumoniae Infection and Inflammatory Diseases*. For Immunopathol Dis Therap, 2016. **7**(3-4): p. 237-254.
36. Yang, Z.P., C.C. Kuo, and J.T. Grayston, *Systemic dissemination of Chlamydia pneumoniae following intranasal inoculation in mice*. J Infect Dis, 1995. **171**(3): p. 736-8.
37. Hahn, D.L., et al., *Chlamydia pneumoniae as a respiratory pathogen*. Front Biosci, 2002. **7**: p. e66-76.
38. Littman, A.J., L.A. Jackson, and T.L. Vaughan, *Chlamydia pneumoniae and lung cancer: epidemiologic evidence*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(4): p. 773-8.
39. Zhan, P., et al., *Chlamydia pneumoniae infection and lung cancer risk: a meta-analysis*. Eur J Cancer, 2011. **47**(5): p. 742-7.
40. Chu, D.J., et al., *An experimental model for induction of lung cancer in rats by Chlamydia pneumoniae*. Asian Pac J Cancer Prev, 2012. **13**(6): p. 2819-22.
41. Sansregret, L. and C. Swanton, *The Role of Aneuploidy in Cancer Evolution*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2017. **7**(1).
42. Andersen, A.A. and D. Vanrompay, *Avian chlamydiosis*. Rev Sci Tech, 2000. **19**(2): p. 396-404.
43. Balsamo, G., et al., *Compendium of Measures to Control Chlamydia psittaci Infection Among Humans (Psittacosis) and Pet Birds (Avian Chlamydiosis)*, 2017. J Avian Med Surg, 2017. **31**(3): p. 262-282.
44. Longbottom, D. and L.J. Coulter, *Animal chlamydioses and zoonotic implications*. J Comp Pathol, 2003. **128**(4): p. 217-44.
45. Browning, G.F., *Is Chlamydophila felis a significant zoonotic pathogen?* Aust Vet J, 2004. **82**(11): p. 695-6.

46. Emerson, P.M. and R.L. Bailey, *Trachoma and fly control*. Community Eye Health, 1999. **12**(32): p. 57.
47. Brewer, N., et al., *Persistence and Significance of Chlamydia trachomatis in the Housefly, Musca domestica L.* Vector Borne Zoonotic Dis, 2021. **21**(11): p. 854-863.
48. Hyman, C.L., et al., *Asymptomatic respiratory tract infection with Chlamydia pneumoniae TWAR*. J Clin Microbiol, 1991. **29**(9): p. 2082-3.
49. Price MJ, A.A., Soldan K, et al., *The natural history of Chlamydia trachomatis infection in women: a multi-parameter evidence synthesis*. 2016: NIHR Journals Library; Southampton (UK).
50. Borel, N., et al., *Chlamydial Antibiotic Resistance and Treatment Failure in Veterinary and Human Medicine*. Curr Clin Microbiol Rep, 2016. **3**: p. 10-18.
51. Kohlhoff, S.A. and M.R. Hammerschlag, *Treatment of Chlamydial infections: 2014 update*. Expert Opin Pharmacother, 2015. **16**(2): p. 205-12.
52. Wang, S.P. and J.T. Grayston, *Pannus with experimental trachoma and inclusion conjunctivitis agent infection of Taiwan monkeys*. Am J Ophthalmol, 1967. **63**(5): p. Suppl:1133-45.
53. Wormser, C.R.D.G.P., *Clinical Infectious Diseases - Trachoma: A Blinding Scourge from the Bronze Age to the Twenty-First Century*. Hugh Taylor East Melbourne, Australia, 2009. **48**(6): p. 845-847.
54. Roe, S.K., et al., *Structural Assessment of Chlamydia trachomatis Major Outer Membrane Protein (MOMP)-Derived Vaccine Antigens and Immunological Profiling in Mice with Different Genetic Backgrounds*. Vaccines (Basel), 2024. **12**(7).
55. Farris, C.M. and R.P. Morrison, *Vaccination against Chlamydia genital infection utilizing the murine C. muridarum model*. Infect Immun, 2011. **79**(3): p. 986-96.
56. Kari, L., et al., *Chlamydia trachomatis native major outer membrane protein induces partial protection in nonhuman primates: implication for a trachoma transmission-blocking vaccine*. J Immunol, 2009. **182**(12): p. 8063-70.
57. Simpson, S.J., et al., *Efficacy of a synthetic peptide Chlamydia pecorum major outer membrane protein vaccine in a wild koala (Phascolarctos cinereus) population*. Sci Rep, 2023. **13**(1): p. 15087.
58. Pollock, K.M., et al., *An investigation of trachoma vaccine regimens by the chlamydia vaccine CTH522 administered with cationic liposomes in healthy adults (CHLM-02): a phase 1, double-blind trial*. Lancet Infect Dis, 2024. **24**(8): p. 829-844.
59. Armstrong, G.L., Goldstein Susan T., *Hepatitis B: Global Epidemiology, Diagnosis, and Prevention*, in *Immigrant Medicine*, P.P. Frye, Editor. 2007, Elsevier Inc. p. 321-341.
60. de Pinho Favaro, M.T., et al., *Recombinant vaccines in 2022: a perspective from the cell factory*. Microb Cell Fact, 2022. **21**(1): p. 203.
61. Nakken, B., et al., *B-cells and their targeting in rheumatoid arthritis--current concepts and future perspectives*. Autoimmun Rev, 2011. **11**(1): p. 28-34.
62. Sengupta, M. and S. Austin, *Prevalence and significance of plasmid maintenance functions in the virulence plasmids of pathogenic bacteria*. Infect Immun, 2011. **79**(7): p. 2502-9.
63. Rockey, D.D., *Unraveling the basic biology and clinical significance of the chlamydial plasmid*. J Exp Med, 2011. **208**(11): p. 2159-62.
64. Lorenz, M.G. and W. Wackernagel, *Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment*. Microbiol Rev, 1994. **58**(3): p. 563-602.
65. Hasegawa, H., E. Suzuki, and S. Maeda, *Horizontal Plasmid Transfer by Transformation in Escherichia coli: Environmental Factors and Possible Mechanisms*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 2365.
66. Omsland, A., et al., *Chlamydial metabolism revisited: interspecies metabolic variability and developmental stage-specific physiologic activities*. FEMS Microbiol Rev, 2014. **38**(4): p. 779-801.

67. Wan, W., et al., *Advances in genetic manipulation of Chlamydia trachomatis*. Front Immunol, 2023. **14**: p. 1209879.
68. Liu, X., et al., *Identification of Chlamydia trachomatis outer membrane complex proteins by differential proteomics*. J Bacteriol, 2010. **192**(11): p. 2852-60.
69. Olander, M. and B.S. Sixt, *Bringing genetics to heretofore intractable obligate intracellular bacterial pathogens: Chlamydia and beyond*. PLoS Pathog, 2022. **18**(7): p. e1010669.
70. Valdivia, R.H. and R.J. Bastidas, *The Expanding Molecular Genetics Tool Kit in Chlamydia*. J Bacteriol, 2018. **200**(24).
71. Mueller, K.E., K. Wolf, and K.A. Fields, *Gene Deletion by Fluorescence-Reported Allelic Exchange Mutagenesis in Chlamydia trachomatis*. mBio, 2016. **7**(1): p. e01817-15.
72. Shima, K., et al., *The Genetic Transformation of Chlamydia pneumoniae*. mSphere, 2018. **3**(5).
73. Montigiani, S., et al., *Genomic approach for analysis of surface proteins in Chlamydia pneumoniae*. Infect Immun, 2002. **70**(1): p. 368-79.
74. Braun, C., et al., *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, 2019. **14**(1): p. e0210403.
75. Shaw, A.C., et al., *Identification and characterization of a novel Chlamydia trachomatis reticulate body protein*. FEMS Microbiol Lett, 2002. **212**(2): p. 193-202.
76. Wevers, C., et al., *A Functional Yeast-Based Screen Identifies the Host Microtubule Cytoskeleton as a Target of Numerous Chlamydia pneumoniae Proteins*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(8).
77. Sisko, J.L., et al., *Multifunctional analysis of Chlamydia-specific genes in a yeast expression system*. Mol Microbiol, 2006. **60**(1): p. 51-66.
78. Hohler, M., et al., *Direct targeting of host microtubule and actin cytoskeletons by a chlamydial pathogenic effector protein*. J Cell Sci, 2024. **137**(17).
79. Romero, M.D. and R.A. Carabeo, *Distinct roles of the Chlamydia trachomatis effectors TarP and TmeA in the regulation of formin and Arp2/3 during entry*. J Cell Sci, 2022. **135**(19).
80. Chi, E.Y., C.C. Kuo, and J.T. Grayston, *Unique ultrastructure in the elementary body of Chlamydia sp. strain TWAR*. J Bacteriol, 1987. **169**(8): p. 3757-63.
81. Wolf, K., E. Fischer, and T. Hackstadt, *Ultrastructural analysis of developmental events in Chlamydia pneumoniae-infected cells*. Infect Immun, 2000. **68**(4): p. 2379-85.
82. Lewis, M.E., et al., *Morphologic and molecular evaluation of Chlamydia trachomatis growth in human endocervix reveals distinct growth patterns*. Front Cell Infect Microbiol, 2014. **4**: p. 71.
83. Grieshaber, S.S., N.A. Grieshaber, and T. Hackstadt, *Chlamydia trachomatis uses host cell dynein to traffic to the microtubule-organizing center in a p50 dynamitin-independent process*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 18): p. 3793-802.
84. Wesolowski, J. and F. Paumet, *Taking control: reorganization of the host cytoskeleton by Chlamydia*. F1000Res, 2017. **6**: p. 2058.
85. Clausen, J.D., et al., *Chlamydia trachomatis utilizes the host cell microtubule network during early events of infection*. Mol Microbiol, 1997. **25**(3): p. 441-9.
86. Hybiske, K. and R.S. Stephens, *Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium Chlamydia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(27): p. 11430-5.
87. Abdelrahman, Y.M. and R.J. Belland, *The chlamydial developmental cycle*. FEMS Microbiol Rev, 2005. **29**(5): p. 949-59.
88. Zuck, M., et al., *Conservation of extrusion as an exit mechanism for Chlamydia*. Pathog Dis, 2016. **74**(7).
89. Zuck, M., et al., *Extrusions are phagocytosed and promote Chlamydia survival within macrophages*. Cell Microbiol, 2017. **19**(4).

90. Hatch, T.P., *Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in chlamydiae?* J Bacteriol, 1996. **178**(1): p. 1-5.
91. Moelleken, K. and J.H. Hegemann, *The Chlamydia outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding.* Mol Microbiol, 2008. **67**(2): p. 403-19.
92. Fechtner, T., et al., *Characterization of the interaction between the chlamydial adhesin OmcB and the human host cell.* J Bacteriol, 2013. **195**(23): p. 5323-33.
93. Confer, A.W. and S. Ayalew, *The OmpA family of proteins: roles in bacterial pathogenesis and immunity.* Vet Microbiol, 2013. **163**(3-4): p. 207-22.
94. Wuppermann, F.N., et al., *Chlamydia pneumoniae GroEL1 protein is cell surface associated and required for infection of HEp-2 cells.* J Bacteriol, 2008. **190**(10): p. 3757-67.
95. Fechtner, T., J.N. Galle, and J.H. Hegemann, *The novel chlamydial adhesin CPn0473 mediates the lipid raft-dependent uptake of Chlamydia pneumoniae.* Cell Microbiol, 2016. **18**(8): p. 1094-105.
96. Galle, J.N., et al., *A Chlamydia pneumoniae adhesin induces phosphatidylserine exposure on host cells.* Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 4644.
97. Grimwood, J., L. Olinger, and R.S. Stephens, *Expression of Chlamydia pneumoniae polymorphic membrane protein family genes.* Infect Immun, 2001. **69**(4): p. 2383-9.
98. Molleken, K., E. Becker, and J.H. Hegemann, *The Chlamydia pneumoniae invasin protein Pmp21 recruits the EGF receptor for host cell entry.* PLoS Pathog, 2013. **9**(4): p. e1003325.
99. Korhonen, J.T., et al., *Chlamydia pneumoniae entry into epithelial cells by clathrin-independent endocytosis.* Microb Pathog, 2012. **52**(3): p. 157-64.
100. Molleken, K. and J.H. Hegemann, *Acquisition of Rab11 and Rab11-Fip2-A novel strategy for Chlamydia pneumoniae early survival.* PLoS Pathog, 2017. **13**(8): p. e1006556.
101. Hansch, S., et al., *Chlamydia-induced curvature of the host-cell plasma membrane is required for infection.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(5): p. 2634-2644.
102. McClure, E.E., et al., *Engineering of obligate intracellular bacteria: progress, challenges and paradigms.* Nat Rev Microbiol, 2017. **15**(9): p. 544-558.
103. Munoz-Elias, E.J. and J.D. McKinney, *Carbon metabolism of intracellular bacteria.* Cell Microbiol, 2006. **8**(1): p. 10-22.
104. Ray, K., et al., *Life on the inside: the intracellular lifestyle of cytosolic bacteria.* Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(5): p. 333-40.
105. Hess, S., et al., *The reprogrammed host: Chlamydia trachomatis-induced up-regulation of glycoprotein 130 cytokines, transcription factors, and antiapoptotic genes.* Arthritis Rheum, 2001. **44**(10): p. 2392-401.
106. Waguia Kontchou, C., et al., *Chlamydia trachomatis inhibits apoptosis in infected cells by targeting the pro-apoptotic proteins Bax and Bak.* Cell Death Differ, 2022. **29**(10): p. 2046-2059.
107. Subtil, A., C. Parsot, and A. Dautry-Varsat, *Secretion of predicted Inc proteins of Chlamydia pneumoniae by a heterologous type III machinery.* Mol Microbiol, 2001. **39**(3): p. 792-800.
108. Muschiol, S., et al., *Identification of a family of effectors secreted by the type III secretion system that are conserved in pathogenic Chlamydiae.* Infect Immun, 2011. **79**(2): p. 571-80.
109. Bugalhao, J.N. and L.J. Mota, *The multiple functions of the numerous Chlamydia trachomatis secreted proteins: the tip of the iceberg.* Microb Cell, 2019. **6**(9): p. 414-449.
110. Elwell, C., K. Mirrashidi, and J. Engel, *Chlamydia cell biology and pathogenesis.* Nat Rev Microbiol, 2016. **14**(6): p. 385-400.
111. Caven, L. and R.A. Carabeo, *Pathogenic Puppetry: Manipulation of the Host Actin Cytoskeleton by Chlamydia trachomatis.* Int J Mol Sci, 2019. **21**(1).

112. Spona, D., et al., *A single chlamydial protein reshapes the plasma membrane and serves as recruiting platform for central endocytic effector proteins*. Commun Biol, 2023. **6**(1): p. 520.
113. Fletcher, D.A. and R.D. Mullins, *Cell mechanics and the cytoskeleton*. Nature, 2010. **463**(7280): p. 485-92.
114. Woods, B.L. and A.S. Gladfelter, *The state of the septin cytoskeleton from assembly to function*. Curr Opin Cell Biol, 2021. **68**: p. 105-112.
115. Zrieq, R., C. Braun, and J.H. Hegemann, *The Chlamydia pneumoniae Tarp Ortholog CPn0572 Stabilizes Host F-Actin by Displacement of Cofilin*. Front Cell Infect Microbiol, 2017. **7**: p. 511.
116. Svitkina, T., *The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018. **10**(1).
117. Pollard, T.D., *Actin*. Curr Opin Cell Biol, 1990. **2**(1): p. 33-40.
118. Pollard, T.D. and J.A. Cooper, *Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions*. Annu Rev Biochem, 1986. **55**: p. 987-1035.
119. Chen, H., B.W. Bernstein, and J.R. Bamburg, *Regulating actin-filament dynamics in vivo*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(1): p. 19-23.
120. Mullins, R.D., J.A. Heuser, and T.D. Pollard, *The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6181-6.
121. Bhondeley, M. and Z. Liu, *Mitochondrial Biogenesis Is Positively Regulated by Casein Kinase I Hrr25 Through Phosphorylation of Puf3 in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2020. **215**(2): p. 463-482.
122. Gautreau, A.M., et al., *Nucleation, stabilization, and disassembly of branched actin networks*. Trends Cell Biol, 2022. **32**(5): p. 421-432.
123. Goley, E.D. and M.D. Welch, *The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(10): p. 713-26.
124. Chesarone, M.A. and B.L. Goode, *Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay*. Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(1): p. 28-37.
125. Barlan, K. and V.I. Gelfand, *Microtubule-Based Transport and the Distribution, Tethering, and Organization of Organelles*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017. **9**(5).
126. Logan, C.M. and A.S. Menko, *Microtubules: Evolving roles and critical cellular interactions*. Exp Biol Med (Maywood), 2019. **244**(15): p. 1240-1254.
127. Laan, L., et al., *Force-generation and dynamic instability of microtubule bundles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(26): p. 8920-5.
128. Desai, A. and T.J. Mitchison, *Microtubule polymerization dynamics*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1997. **13**: p. 83-117.
129. Simpson, I.R.A.G.M.F.B., *Genetics, Mitosis*. 2024: StatPearls, Treasure Island (FL).
130. Cassimeris, L.U., et al., *Dynamic instability of microtubules*. Bioessays, 1987. **7**(4): p. 149-54.
131. Draber, P., V. Sulimenko, and E. Draberova, *Cytoskeleton in mast cell signaling*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 130.
132. Nogales, E., et al., *Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases*. Nat Struct Biol, 1998. **5**(6): p. 451-8.
133. Gudimchuk, N.B. and J.R. McIntosh, *Regulation of microtubule dynamics, mechanics and function through the growing tip*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021. **22**(12): p. 777-795.
134. Cooper, G., *The Cell: A Molecular Approach - Microtubules*. Vol. 2nd Edition. 2000: Sunderland (MA): Sinauer Associates.
135. Meunier, S. and I. Vernos, *Microtubule assembly during mitosis - from distinct origins to distinct functions?* J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 12): p. 2805-14.
136. Chugh, P. and E.K. Paluch, *The actin cortex at a glance*. J Cell Sci, 2018. **131**(14).

137. Rosa, A., et al., *Ect2/Pbl acts via Rho and polarity proteins to direct the assembly of an isotropic actomyosin cortex upon mitotic entry*. Dev Cell, 2015. **32**(5): p. 604-16.
138. Hoffmann, I., *Centrosomes in mitotic spindle assembly and orientation*. Curr Opin Struct Biol, 2021. **66**: p. 193-198.
139. Wenzel, E.S. and A.T.K. Singh, *Cell-cycle Checkpoints and Aneuploidy on the Path to Cancer*. In Vivo, 2018. **32**(1): p. 1-5.
140. Asbury, C.L., *Anaphase A: Disassembling Microtubules Move Chromosomes toward Spindle Poles*. Biology (Basel), 2017. **6**(1).
141. Lancaster, O.M. and B. Baum, *Shaping up to divide: coordinating actin and microtubule cytoskeletal remodelling during mitosis*. Semin Cell Dev Biol, 2014. **34**: p. 109-15.
142. Cooper, G., *The Cell: A Molecular Approach - The Nucleus during Mitosis*, ed. n. edition. 2000: Sunderland (MA): Sinauer Associates.
143. Dantas, M., J.T. Lima, and J.G. Ferreira, *Nucleus-Cytoskeleton Crosstalk During Mitotic Entry*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 649899.
144. Lu, Y.M. and C. Zheng, *The Expression and Function of Tubulin Isotypes in Caenorhabditis elegans*. Front Cell Dev Biol, 2022. **10**: p. 860065.
145. Nsamba, E.T., et al., *Tubulin isotypes optimize distinct spindle positioning mechanisms during yeast mitosis*. J Cell Biol, 2021. **220**(12).
146. McKenna, E.D., et al., *The Tubulin Code, from Molecules to Health and Disease*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2023. **39**: p. 331-361.
147. Roll-Mecak, A., *The Tubulin Code in Microtubule Dynamics and Information Encoding*. Dev Cell, 2020. **54**(1): p. 7-20.
148. Janke, C. and M.M. Magiera, *The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020. **21**(6): p. 307-326.
149. Ozlem D. Iseri, M.D.K., Ufuk Gunduz, *Drug Resistant MCF-7 Cells have Altered Expression Levels of β -Tubulin Isotypes and Mutations in TUBB Gene*. International Journal of Hematology and Oncology, 2010. **20**.
150. Krause, W., *Resistance to anti-tubulin agents: From vinca alkaloids to epothilones*. Cancer Drug Resist, 2019. **2**(1): p. 82-106.
151. Nogales, E., *Tubulin and Its Isoforms*. Encyclopedia of Biological Chemistry, 2013: p. 450-453.
152. Westermann, S. and K. Weber, *Post-translational modifications regulate microtubule function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(12): p. 938-47.
153. Sanyal, C., et al., *The deetyrosination/re-tyrosination cycle of tubulin and its role and dysfunction in neurons and cardiomyocytes*. Semin Cell Dev Biol, 2023. **137**: p. 46-62.
154. Janke, C. and G. Montagnac, *Causes and Consequences of Microtubule Acetylation*. Curr Biol, 2017. **27**(23): p. R1287-R1292.
155. Andreu-Carbo, M., et al., *Microtubule damage shapes the acetylation gradient*. Nat Commun, 2024. **15**(1): p. 2029.
156. Palazzo, A., B. Ackerman, and G.G. Gundersen, *Cell biology: Tubulin acetylation and cell motility*. Nature, 2003. **421**(6920): p. 230.
157. Nsamba, E.T. and M.L. Gupta, *Tubulin isotypes - functional insights from model organisms*. J Cell Sci, 2022. **135**(9).
158. Barisic, M., et al., *Mitosis. Microtubule deetyrosination guides chromosomes during mitosis*. Science, 2015. **348**(6236): p. 799-803.
159. Ferreira, L.T., et al., *Dissecting the role of the tubulin code in mitosis*. Methods Cell Biol, 2018. **144**: p. 33-74.
160. Bodakuntla, S., et al., *Microtubule-Associated Proteins: Structuring the Cytoskeleton*. Trends Cell Biol, 2019. **29**(10): p. 804-819.
161. McNally, F.J. and A. Roll-Mecak, *Microtubule-severing enzymes: From cellular functions to molecular mechanism*. J Cell Biol, 2018. **217**(12): p. 4057-4069.

162. Akhmanova, A. and M.O. Steinmetz, *Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(4): p. 309-22.
163. Nehlig, A., et al., *Regulation of end-binding protein EB1 in the control of microtubule dynamics*. Cell Mol Life Sci, 2017. **74**(13): p. 2381-2393.
164. Buey, R.M., et al., *Insights into EB1 structure and the role of its C-terminal domain for discriminating microtubule tips from the lattice*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(16): p. 2912-23.
165. Fong, K.W., et al., *Microtubule plus-end tracking of end-binding protein 1 (EB1) is regulated by CDK5 regulatory subunit-associated protein 2*. J Biol Chem, 2017. **292**(18): p. 7675-7687.
166. Chen, Y., P. Wang, and K.C. Slep, *Mapping multivalency in the CLIP-170-EB1 microtubule plus-end complex*. J Biol Chem, 2019. **294**(3): p. 918-931.
167. Jewett, T.J., et al., *Chlamydial TARP is a bacterial nucleator of actin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(42): p. 15599-604.
168. Carabeo, R.A., et al., *Chlamydia trachomatis induces remodeling of the actin cytoskeleton during attachment and entry into HeLa cells*. Infect Immun, 2002. **70**(7): p. 3793-803.
169. Hower, S., K. Wolf, and K.A. Fields, *Evidence that CT694 is a novel Chlamydia trachomatis T3S substrate capable of functioning during invasion or early cycle development*. Mol Microbiol, 2009. **72**(6): p. 1423-37.
170. Benaud, C., et al., *AHNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture*. J Cell Biol, 2004. **164**(1): p. 133-44.
171. Faris, R., et al., *The Chlamydia trachomatis secreted effector TmeA hijacks the N-WASP-ARP2/3 actin remodeling axis to facilitate cellular invasion*. PLoS Pathog, 2020. **16**(9): p. e1008878.
172. Kocher, F., et al., *The Chlamydia pneumoniae effector SemD exploits its host's endocytic machinery by structural and functional mimicry*. Nat Commun, 2024. **15**(1): p. 7294.
173. Clifton, D.R., et al., *A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(27): p. 10166-71.
174. Clifton, D.R., et al., *Tyrosine phosphorylation of the chlamydial effector protein Tarp is species specific and not required for recruitment of actin*. Infect Immun, 2005. **73**(7): p. 3860-8.
175. Thwaites, T., et al., *The Chlamydia effector TarP mimics the mammalian leucine-aspartic acid motif of paxillin to subvert the focal adhesion kinase during invasion*. J Biol Chem, 2014. **289**(44): p. 30426-30442.
176. Jewett, T.J., et al., *The conserved Tarp actin binding domain is important for chlamydial invasion*. PLoS Pathog, 2010. **6**(7): p. e1000997.
177. Jiwani, S., et al., *Chlamydia trachomatis Tarp harbors distinct G and F actin binding domains that bundle actin filaments*. J Bacteriol, 2013. **195**(4): p. 708-16.
178. Jewett, T.J., et al., *Chlamydia trachomatis tarp is phosphorylated by src family tyrosine kinases*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **371**(2): p. 339-44.
179. Mehltitz, A., et al., *Complex kinase requirements for Chlamydia trachomatis Tarp phosphorylation*. FEMS Microbiol Lett, 2008. **289**(2): p. 233-40.
180. Lane, B.J., et al., *Chlamydial entry involves TARP binding of guanine nucleotide exchange factors*. PLoS Pathog, 2008. **4**(3): p. e1000014.
181. Mital, J., et al., *Chlamydia trachomatis inclusion membrane protein CT850 interacts with the dynein light chain DYNLT1 (Tctex1)*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **462**(2): p. 165-70.
182. Dumoux, M., et al., *A Chlamydia effector recruits CEP170 to reprogram host microtubule organization*. J Cell Sci, 2015. **128**(18): p. 3420-34.
183. Al-Younes, H.M., et al., *Autophagy-independent function of MAP-LC3 during intracellular propagation of Chlamydia trachomatis*. Autophagy, 2011. **7**(8): p. 814-28.

184. Al-Zeer, M.A., et al., *Chlamydia trachomatis remodels stable microtubules to coordinate Golgi stack recruitment to the chlamydial inclusion surface*. Mol Microbiol, 2014. **94**(6): p. 1285-97.
185. Moseley, J.B., et al., *Regulated binding of adenomatous polyposis coli protein to actin*. J Biol Chem, 2007. **282**(17): p. 12661-8.
186. Brandt, R. and G. Lee, *The balance between tau protein's microtubule growth and nucleation activities: implications for the formation of axonal microtubules*. J Neurochem, 1993. **61**(3): p. 997-1005.
187. Cabrales Fontela, Y., et al., *Multivalent cross-linking of actin filaments and microtubules through the microtubule-associated protein Tau*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 1981.
188. Elie, A., et al., *Tau co-organizes dynamic microtubule and actin networks*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 9964.
189. Chesarone, M.A., A.G. DuPage, and B.L. Goode, *Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(1): p. 62-74.
190. Palazzo, A.F., et al., *mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(8): p. 723-9.
191. Ishizaki, T., et al., *Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(1): p. 8-14.
192. Niwa, O., et al., *Characterization of Schizosaccharomyces pombe minichromosome deletion derivatives and a functional allocation of their centromere*. EMBO J, 1989. **8**(10): p. 3045-52.
193. Tilney, L.G. and K.R. Porter, *Studies on the microtubules in heliozoa. II. The effect of low temperature on these structures in the formation and maintenance of the axopodia*. J Cell Biol, 1967. **34**(1): p. 327-43.
194. Weisenberg, R.C., *Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations*. Science, 1972. **177**(4054): p. 1104-5.
195. Weber, K., R. Pollack, and T. Bibring, *Antibody against tuberlin: the specific visualization of cytoplasmic microtubules in tissue culture cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(2): p. 459-63.
196. Breton, S. and D. Brown, *Cold-induced microtubule disruption and relocalization of membrane proteins in kidney epithelial cells*. J Am Soc Nephrol, 1998. **9**(2): p. 155-66.
197. Schramm, N. and P.B. Wyrick, *Cytoskeletal requirements in Chlamydia trachomatis infection of host cells*. Infect Immun, 1995. **63**(1): p. 324-32.
198. Ward, M.E. and A. Murray, *Control mechanisms governing the infectivity of Chlamydia trachomatis for HeLa cells: mechanisms of endocytosis*. J Gen Microbiol, 1984. **130**(7): p. 1765-80.
199. Kuhn, M., *The microtubule depolymerizing drugs nocodazole and colchicine inhibit the uptake of Listeria monocytogenes by P388D1 macrophages*. FEMS Microbiol Lett, 1998. **160**(1): p. 87-90.
200. McGee, K., P. Holmfeldt, and M. Fallman, *Microtubule-dependent regulation of Rho GTPases during internalisation of Yersinia pseudotuberculosis*. FEBS Lett, 2003. **533**(1-3): p. 35-41.
201. Walker, D., *Acetylation controls EGF traffic*. Nature reviews molecular cell biology, 2010.
202. Deribe, Y.L., et al., *Regulation of epidermal growth factor receptor trafficking by lysine deacetylase HDAC6*. Sci Signal, 2009. **2**(102): p. ra84.
203. Dogterom, M. and G.H. Koenderink, *Actin-microtubule crosstalk in cell biology*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. **20**(1): p. 38-54.
204. Cisterna, B.A., et al., *Prolonged depletion of profilin 1 or F-actin causes an adaptive response in microtubules*. J Cell Biol, 2024. **223**(7).
205. Lefevre, J., et al., *Structural basis for the association of MAP6 protein with microtubules and its regulation by calmodulin*. J Biol Chem, 2013. **288**(34): p. 24910-22.

206. Ligon, L.A., et al., *The microtubule plus-end proteins EB1 and dynactin have differential effects on microtubule polymerization*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(4): p. 1405-17.
207. Tormakangas, L., et al., *Chlamydia pneumoniae infection in polarized epithelial cell lines*. Infect Immun, 2010. **78**(6): p. 2714-22.
208. Pan, Y.Y., et al., *Structure Composition and Intracellular Transport of Clathrin-Mediated Intestinal Transmembrane Tight Junction Protein*. Inflammation, 2023. **46**(1): p. 18-34.
209. Kia'i N, B.T., *Histology, Respiratory Epithelium*. 2023: StatPearls; Treasure Island (FL).
210. Jahn, H.U., et al., *Infection and activation of airway epithelial cells by Chlamydia pneumoniae*. J Infect Dis, 2000. **182**(6): p. 1678-87.
211. Kuek, L.E. and R.J. Lee, *First contact: the role of respiratory cilia in host-pathogen interactions in the airways*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2020. **319**(4): p. L603-L619.
212. Hauser, A.R., et al., *Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis*. Clin Microbiol Rev, 2011. **24**(1): p. 29-70.
213. Hingley, S.T., et al., *Effect of ciliostatic factors from Pseudomonas aeruginosa on rabbit respiratory cilia*. Infect Immun, 1986. **51**(1): p. 254-62.
214. Huang, J., C.F. Lesser, and S. Lory, *The essential role of the CopN protein in Chlamydia pneumoniae intracellular growth*. Nature, 2008. **456**(7218): p. 112-5.
215. Steiert, B., et al., *The Chlamydia trachomatis type III-secreted effector protein CteG induces centrosome amplification through interactions with centrin-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2023. **120**(20): p. e2303487120.
216. Brown, H.M., et al., *Multinucleation during C. trachomatis infections is caused by the contribution of two effector pathways*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e100763.
217. Brown, H.M., A.E. Knowlton, and S.S. Grieshaber, *Chlamydial infection induces host cytokinesis failure at abscission*. Cell Microbiol, 2012. **14**(10): p. 1554-67.
218. Knowlton, A.E., et al., *Chlamydia trachomatis infection causes mitotic spindle pole defects independently from its effects on centrosome amplification*. Traffic, 2011. **12**(7): p. 854-66.
219. Costa, A.C., et al., *Listeria monocytogenes Interferes with Host Cell Mitosis through Its Virulence Factors InlC and ActA*. Toxins (Basel), 2020. **12**(6).
220. Lara-Gonzalez, P., F.G. Westhorpe, and S.S. Taylor, *The spindle assembly checkpoint*. Curr Biol, 2012. **22**(22): p. R966-80.
221. Moreno-Andres, D., K. Holl, and W. Antonin, *The second half of mitosis and its implications in cancer biology*. Semin Cancer Biol, 2023. **88**: p. 1-17.
222. Jansen, K.I., et al., *A live-cell marker to visualize the dynamics of stable microtubules throughout the cell cycle*. J Cell Biol, 2023. **222**(5).
223. Verhey, K.J. and J. Gaertig, *The tubulin code*. Cell Cycle, 2007. **6**(17): p. 2152-60.
224. Katrukha, E.A., et al., *Quantitative mapping of dense microtubule arrays in mammalian neurons*. Elife, 2021. **10**.
225. Tas, R.P., et al., *Differentiation between Oppositely Oriented Microtubules Controls Polarized Neuronal Transport*. Neuron, 2017. **96**(6): p. 1264-1271 e5.
226. Teschke, Anna R., *Interaktionsanalyse von C. pneumoniae CPn0572 Proteinvarianten mit Komponenten des eukaryotischen Zytoskeletts*. Bachelorarbeit 2025.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Taxonomische Einordnung des Phylums Chlamydiae.....	12
Abbildung 2: Der biphasische chlamydiale Infektionszyklus	21
Abbildung 3: Der Cpn Adhäsionsprozess	23
Abbildung 4: Aufbau und Dynamik von Mikrotubuli.....	28
Abbildung 5: Vergleichende schematische Darstellung von TarP Familienmitgliedern	36
Abbildung 6: Sekretiertes TarP rekrutiert Aktin während der Internalisierung	37
Figure 7. CPn0572 ⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ association with spindle MTs results in severe mitotic defects.....	103
Figure 8. Expression of CPn0572 ⁵⁹⁵⁻⁷⁵⁵ leads to genome instability.	105
Figure 9. Cpn infection leads to mitotic defects.	108
Abbildung 10: Domänenvergleich der Ctr und Cpn TarP Orthologe	125
Abbildung 11: Die Anwesenheit von MT verbessert die Fähigkeit zur Aktin- Polymerisation von CPn0572.....	133
Abbildung 12: Arbeitshypothese: Früh sekretiertes CPn0572 bindet und stabilisiert MT um G-Aktin apikal anzureichern, was zu einer verbesserten Aktin- Polymerisation führt.....	134

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Equipment.....	110
Tabelle 2: Chemicals	111
Tabelle 3: Solutions and buffer	112
Tabelle 4: Enzymes	113
Tabelle 5: Dyes	113
Tabelle 6. Primary antibodies.....	114
Tabelle 7. Secondary antibodies	114
Tabelle 8. Used plasmids	114
Tabelle 9. S. pombe strains	115
Tabelle 10. Mammalian cell lines.....	115
Tabelle 11. Procaryotic cells	115
Tabelle 12: Media for yeast (S. pombe)	115
Tabelle 13. Cell culture medium	116

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen herzlichst bedanken, die mich auf diesen Weg begleitet und unterstützt haben.

Als erstes möchte ich mich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Ursula Fleig bedanken. Sie gab mir die Chance meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen und das Thema meiner Masterarbeit weiter zu führen. Ich möchte mich sehr für die anregenden und interessanten Diskussionen, hilfreichen Ratschläge und Vorschläge für Experimente, Vorträge und vieles mehr über die ganze Zeit hinweg bedanken. Ich habe mich stets gut unterstützt gefühlt und dank konstruktiver Kritik konnte ich stets an mir arbeiten und mich weiterentwickeln.

Des Weiteren möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Johannes Hegemann bedanken. Durch seine hohe Expertise im Bereich der Chlamydien, stand er mir jederzeit für Fragen und Probleme zur Seite. Auch ihm möchte ich mich für die vielen aufschlussreichen und äußerst hilfreichen Diskussionen und die konstruktive Kritik während der ganzen Zeit bedanken.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern und Studenten der Arbeitsgruppen Fleig und Hegemann bedanken. Erst die Zusammenarbeit mit euch machte die Zeit zu einem Erlebnis, dass ich nicht mehr missen möchte. Von einem hilfreichen und interessanten Wissensaustausch im Rahmen von Diskussionen und Seminaren, über unterhaltsame und erheiternde Spieleabende, Grillpartys und Weihnachtsfeiern, sowie Ausflügen zur Teilnahme an nationalen und internationalen Tagungen. Vor allem die Chlamydientagung des CBRs 2023 in Denver (Amerika) mit dem anschließenden Roadtrip durch Arizona, Utah und Nevada war ein wahres Erlebnis und ein großes Abenteuer, was definitiv unvergessen bleibt.

Ein besonderer Dank gilt Vlada, die als langjährige beste Freundin mir stets zu Seite stand und mich gerade in den schwersten und stressreichsten Zeiten eine wahre Stütze war, mich stets ermutigte und mich aus dem Stress auch mal rausholte. Auch Fabienne und Kathi habe ich in der Zeit als Freunde dazu gewonnen und möchte mich auch bei ihnen für die tolle Zeit, schönen Erlebnisse und Unterstützung bedanken.

Der größte Dank geht an meine Familie. Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich oftmals für ihre moralische und liebevolle Unterstützung während der gesamten Zeit. Ihr habt immer an mich geglaubt und ohne euch hätte ich es nie soweit geschafft. Danke, dass ihr immer für mich da ward.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst verfasst wurde und dass ich keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die aus anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn entsprechend übernommen wurden, habe ich mit Quellenangaben kenntlich gemacht.

Düsseldorf, den 20.02.2025

Mona Iris Höhler