

**Identifikation und funktionelle Charakterisierung von
Effektorproteinen des Typ III Sekretionssystems von
*Chlamydophila pneumoniae***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Nicole Müller
aus Northeim

Göttingen 2008

D7

Referent: Prof. Dr. Groß

Korreferent: Prof. Dr. Fritz

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis		Seite
Inhaltsverzeichnis		I
Abkürzungen		VII
1. Einleitung		
1.	Einleitung	1
1.1.	Entdeckung und Taxonomie der Chlamydien	1
1.2.	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	3
1.3.	Entwicklungszyklus	5
1.4.	Typ III Sekretionssystem	7
1.5.	Das Typ III Sekretionssystem von Chlamydien	10
1.6.	Interaktion mit der Wirtszelle	12
1.7.	Ziele der Arbeit	14
2. Material und Methoden		
2.1.	Chemikalien	15
2.2.	Gebrauchswaren	15
2.2.1.	Membranen und Filtern	15
2.2.2.	Molekulargewichtsstandards	15
2.2.3.	Reaktionssets (Kits) und Enzyme	15
2.2.4.	Enzyme	16
2.3.	Sterilisation	17
2.4.	Puffer und Stammlösungen	17
2.5.	Medien, Agarplatten und Antibiotika	20
2.5.1.	Medien für Bakterien	20
2.5.1.2.	Medien für die Zellkultur	20
2.5.2.	Antibiotika	21
2.6.	Verwendete Bakterienstämme, Vektoren, Oligonukleotide	22
2.6.1.	Bakterienstämme	22
2.6.2.	Plasmide	22

2.6.3.	Synthetische Oligonukleotide	22
2.6.4.	Antikörper	24
2.6.5.	Transfektionsreagenzien	25
2.6.6.	Zelllinien	25
2.7.	Standardmethoden und – reaktionen in der Molekularbiologie	26
2.8.	Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren	26
2.8.1.	Minipräparation von Plasmid-DNA	26
2.8.1.2.	Maxipräparation von Plasmid-DNA	27
2.8.2.	Isolierung von RNA	27
2.8.3.	Konzentrationsbestimmungen von DNA und RNA	27
2.9.	Enzymatische Modifikationen von DNA: Klonierungstechniken	28
2.9.1.	Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA	28
2.9.2.	Dephosphorylierung von DNA	29
2.9.3.	Ligation eines DNA-Fragmentes in einen Plasmid-Vektor	29
2.9.4.	Kultivierung von Bakterien	29
2.9.5.	Herstellung chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen	30
2.9.6.	Transformation von Bakterien	30
2.10.	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	30
2.10.1.	Längenstandards	32
2.11.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel	32
2.12.	Methoden der „Polymerase Chain Reaction“ (PCR)	32
2.12.1.	PCR an Plasmid-DNA	33
2.12.3.	Reverse Transcriptase-PCR	34
2.12.4.	Real-Time PCR	35
2.13.	Zellbiologische Methoden	36
2.13.1.	Kultivierung von Säugerzellen	36
2.13.2.	Kultivierung von <i>Chlamydophila pneumoniae</i> AR39	37
2.13.3.	Langzeitlagerung von <i>Chlamydophila pneumoniae</i> AR39	37
2.13.4.	Konzentrationsbestimmung von <i>Chlamydophila pneumoniae</i> AR39	38
2.13.5.	Transfektion eukaryontischer Zellen	38
2.13.5.1.	stabile Transfektion eukaryontischer Zellen	39
2.13.6.	Herstellung von Zellextrakten	39
2.13.7.	β-Galaktosidase-Färbung	39
2.13.8.	Analyse von transfizierten HeLa-Zellen mittels Fluorescence	

	Activated Cell Sorting (FACS)	40
2.13.9.	Caspase-Assay	40
2.14.	Proteinchemische Methoden	40
2.14.1.	Expression und Reinigung eines rekombinaten His ₆ -tag-Fusionsprotein	40
2.14.2.	Enzymatische Lyse von <i>Escherichia coli</i>	41
2.14.3.	Prinzip der Affinitätschromatographie	41
2.14.4.	Aufreinigung des rekombinaten His-tag-Fusionsproteins mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose	42
2.14.5.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
2.14.6.	Coomassie-Färbung	44
2.14.7.	Western Blot	44
2.14.8.	Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran	45
2.14.9.	Immundetektion	45
2.14.10.	Quantitative Proteinbestimmung	46
2.14.11.	Immunfluoreszenztest	46
2.14.12.	Proteinextraktion aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> infizierten HEp-2-Zellen	47
2.14.13.	KLH-Kopplung	47
2.14.14.	Generierung eines polyklonalen Antiserums	48
2.14.15.	Affinitätsreinigung eines polyklonalen Antiserums	48
2.15.	Methode Mikroarray	49
2.15.1.	RNA-Isolierung	49
2.15.2.	Transkription zu Einzelstrang DNA	50
2.15.3.	Doppelstrang-DNA-Synthese	50
2.15.4.	Aminoallylmodifizierung der DNA	50
2.15.5.	Farbstoffmarkierung der DNA	50
2.15.6.	Hybridisierung der farbstoffmarkierten DNA mit komplementären Oligonukleotiden auf Array	51
2.15.7.	Datenerfassung und Auswertung	51

3. Ergebnisse

3.1.	Bioinformatische Untersuchung von putativen Effektorproteinen von <i>Chlamydophila pneumoniae</i>	52
3.2.	Cpn0708, Cpn0712 und Cpn0809 fehlt ein konserviertes TTSS Sekretionssignal	57
3.3.	Transkription von <i>cpn0708</i> und <i>cpn0712</i> während des Infektionszyklus von <i>C. pneumoniae</i> AR39	58
3.4.	Expression von Cpn0708 und Cpn0712	59
3.4.1.	Herstellung des Antiserums gegen Cpn0708	60
3.4.1.1.	Klonierung von <i>cpn0708</i> in pQE30	60
3.4.1.2.	Nachweis der Expression des Cpn0708-His-Fusionsproteins	61
3.4.1.3.	Expression und Aufreinigung des rekombinaten Cpn0708 aus <i>Escherichia coli</i>	62
3.4.1.4.	Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen Cpn0708	63
3.4.1.5.	Sensitivitätsnachweis	63
3.4.1.6.	Präabsorbtion des polyklonalen Kaninchenserums	63
3.4.1.7.	Expression des nativen Cpn0708 während des chlamydialen Entwicklungszyklus	64
3.4.1.8.	Nachweis der Expression und intrazelluläre Lokalisation von Cpn0708	65
3.4.1.9.	Serologischer Test	67
3.4.2.	Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen Cpn0712	67
3.4.2.1.	Sensitivitätsnachweis	67
3.4.2.2.	Expression des nativen Cpn0712	68
3.4.2.3.	Intrazelluläre Lokalisation von Cpn0712	69
3.4.2.4.	Serologischer Test	70
3.5.	Heterologe Sekretion in Salmonellen	71
3.5.1.	Herstellung der Konstrukte	71
3.5.2.	Expression und Sekretion in Salmonellen	73
3.6.	Heterologe Expression von Cpn0712 in HeLa-Zellen	74
3.6.1.	Herstellung des Cpn0712-His-tag-Konstruktes für die Transfektionsexperimente	74

3.6.2.	Bestimmung der Transfektionseffizienz	75
3.6.3.	Herstellung stabiler Transfektanten von HeLa-Zellen zur Expression von Cpn0712	77
3.6.4.	Nachweis der Expression von Cpn0809 und Cpn0712 in HeLa-Zellen	80
3.6.5.	Klonierung von <i>cpn0712</i> und <i>cpn0809</i> in pcDNA4/TO/myc-HisA	81
3.6.6.	Transkription von <i>cpn0712</i> und <i>cpn0809</i> in HeLa-Zellen	83
3.6.7.	Expression von Cpn0712 in HeLa-Zellen	83
3.6.8.	Intrazelluläre Lokalisation von Cpn0712	84
3.6.9.	Lokalisation von Cpn0712 am Cytoskelett der Wirtszelle	86
3.6.10.	Intrazelluläre Lokalisation von Cpn0809	88
3.6.11.	Einfluss von Cpn0712 auf das Phosphorylierungsmuster von HeLa-Zellen	90
3.6.12.	Cpn0712 und Cpn0809 können Apoptose nicht inhibieren	91
3.6.13.	Expression von Cpn0712 und Cpn0809 im Wirtszellcytoplasma beeinflusst die nachfolgende Chlamydieninfektion nicht	93
3.7.	Einfluss von Cpn0712 auf die Genexpression von HeLa-Zellen	97
3.7.1.	Einteilung der durch Cpn0712 verändert transkribierten Gene nach den GeneOntology Kriterien	99
3.7.2.	Sortierung in Genfamilien	102
3.7.3.	Bestätigung der Ergebnisse durch Real Time RT-PCR	103
3.7.4.	Vergleich der Genexpression von infizierten zu transfizierten HeLa-Zellen	104
3.7.5.	Vergleichender Einfluss von <i>C. pneumoniae</i> und Cpn0712 auf die Genexpression von HeLa-Zellen	105
3.7.6.	Bestätigung der Ergebnisse durch Real Time RT-PCR mittels Light Cycler	107
4. Diskussion		
4.	Diskussion	109
4.1.	Charakterisierung von Cpn0708 und Cpn0712 während des Entwicklungszyklus	110
4.2.	Kolokalisation von Cpn0712 und Cpn0809 mit Wirtszellkomponenten	115

4.3.	Einfluss von Cpn0712 und Cpn0809 auf den Einschlusskörper	119
4.4.	Einfluss von Cpn0712 auf das Wirtszelltranskriptom	120
5. Zusammenfassung		126
5.1 Summery		127
6. Literaturverzeichnis		129
7. Anhang		
7.1	Tabellarische Übersicht der durch Cpn0712 und <i>C. pneumoniae</i> beeinflussten Gene	148
7.1.	Abbildungsverzeichnis	155
7.2.	Tabellenverzeichnis	156

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Amoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumine, Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CADD	Chlamydia protein associated with death domains
Cav	Caveolin
cDNA	komplementäre DNA
Chap	Chaperon
Cop	Chlamydia outer protein
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease, Chronisch obstruktive Lungenkrankheit
CPAF	chlamydial protease- or proteasome-like activity factor
<i>C. pneumoniae</i>	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>
<i>C.psittaci</i>	<i>Chlamydomphila psittaci</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
<i>C. trachomatis</i>	<i>Chlamydomphila trachomatis</i>
Cy2	Carbocyanin
Cy3	Indocarbocyanin
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	desoxy-Cytosintriphosphat
dGTP	desoxy-Guanosintriphosphat
dTTP	desoxy-thymidintriphosphat
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DNase	Desoxiribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EB	Elementarkörperchen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
et.al.	et alteres (und andere)
FHA	forkhead associated domain
FKS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (9,80665 m/s ²)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethylsulfonsäure
H ₂ O	destilliertes Wasser
Inc	Inklusion
IFN	Interferon
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
kb	Kilobasen
KBL	Kilobasen-Ladder
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame, offener Leserahmen
LB	Luria-Bertani
M	molar
MHC	major histocompatibility complex
MOI	<i>multiplicity of infection</i> , Anzahl an infektiösen Einheiten pro Zelle
mRNA	messenger RNA
MS	Multiple Sklerose
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffer saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction

pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pI	post Infection
PM	Proteinmarker
RB	Retikularkörperchen
RLU	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Rpm	Rotation pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	reverse transcriptase PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
spp.	Spezies
SPI	Salmonella Pathogenicity Island
Tab.	Tabelle
Tarp	Translocated actin recruiting phosphoprotein
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA (-Puffer)
TE	Tris-EDTA (-Puffer)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tir	Translocated intimin receptor
Tris	Tris (hydroxymethylethylendiamin)
tRNA	transfer RNA
TTSS	Typ III Sekretionssystem
TWAR-39	Taiwan acute respiratory-Stamm 39
U	unit (definierte Einheit der Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
w/v	weight (gewicht) pro Volumen
Yop	Yersinia outer protein
z.B.	zum Beispiel

Dekadische Vorsilben

X=	1	2	3	6	9	12
10^{-x}	dezi	centi	milli	mikro	nano	piko
	(d)	(c)	(m)	(μ)	(n)	(p)

SI-Einheiten

°C	Grad Celsius	Temperatur
g	Gramm	Gewicht
h	Stunde	Zeit
l	Liter	Volumen
m	Meter	Länge
min	Minute	Zeit
s	Sekunde	Zeit
mol	Mol	Stoffmenge, 1 Mol $6,022 \times 10^{23}$ Teilchen eines Stoffes
V	Volt	Spannung

Nukleotide

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymidin

Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thy	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

1. Einleitung

Chlamydien gehören zu den am weitesten verbreiteten Pathogenen und sind für eine Vielzahl von Krankheiten bei Mensch und Tier verantwortlich (Storz und Page, 1971; Schachter und Dawson, 1978). Charakteristisch für diese obligat intrazellulären Bakterien ist ihr zweiphasiger Entwicklungszyklus, bei dem sie, angepasst auf ihre jeweilige Umgebung, zwei morphologisch unterschiedliche Formen annehmen. Außerhalb der Wirtszelle liegen sie als infektiöse metabolisch inaktive Elementarkörperchen (EB) vor, innerhalb der Wirtszelle differenzieren sie sich zu nicht-infektiösen metabolisch aktiven Retikularkörperchen (RB).

Primär lösen Chlamydien Erkrankungen der Schleimhäute in Atemwegs- Augen- und Genitalbereich aus, die zu Erblindung und Unfruchtbarkeit führen könnten. Des Weiteren wird ein Zusammenhang zwischen chronisch persistierenden Chlamydieninfektionen und der Entstehung von u.a. Asthma, Arteriosklerose, Alzheimer und Multipler Sklerose diskutiert.

Zu den Erregern, die Erkrankungen beim Menschen auslösen können, gehören *C. trachomatis*, der genitale und okulare Erkrankungen verursacht und zu den verbreitetsten sexuell übertragenen Bakterien gehört, *C. pneumoniae*, der respiratorische Erkrankungen, wie Bronchitis und Pneumonien auslöst und *C. psittaci*, dessen natürlicher Wirt Vögel sind, aber zu schweren Pneumonien in Menschen führen kann.

1.1. Entdeckung und Taxonomie der Chlamydien

1907 wurden erstmals cytoplasmatische Einschlusskörper in epithelialen Geweben von Halberstadler und Prowazek beschrieben, nachdem sie infektiöses Material von einem mit Trachom erkrankten Mann in die Augen eines Orang Utans übertragen hatten. Durch Giemsa-Färbung der Epithelzellen konnten sie Partikel erkennen, die in einer blauen Matrix eingelagert zu sein schienen. Aufgrund der Annahme, dass es sich dabei um Protozoen handele, wurden sie wegen der sichtbaren Umrandung als „Chlamydozoa“ bzw. Mantelkörper bezeichnet. Ähnliche Einschlusskörper konnten später auch in genitalen und okularen Material nachgewiesen werden.

Der Wachstumszyklus, der diesen Organismus so einzigartig macht, wurde erstmals 1932 von Bedson und Bland beschrieben. Aufgrund der geringen Größe und des

intrazellulären Replikationszyklus wurden Chlamydien zuerst als Viren eingestuft. 1966 wurden sie einer eigener Ordnung, den *Chlamydiales*, zugeordnet. Durch verbesserte phylogenetische Studien der 16S und 23S rRNA zeigte sich, dass die Ordnung der Chlamydiales eine wesentlich höhere Heterogenität aufweist. Daraufhin wurde die Taxonomie 1999 durch Everett et al. und Rurangirwa et al. überarbeitet.

Die Ordnung der *Chlamydiales* wurde danach in vier Familien unterteilt (Abb. 1): *Chlamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae* und *Waddliaceae*. Die Familie der *Chlamydiaceae* wurde in die Gattungen *Chlamydia* und *Chlamydophila* aufgeteilt. Die Gattung *Chlamydia* wurden in drei Arten unterteilt: *C. suis*, *C. muridarum* und den humampathogenen *C. trachomatis*. Die *Chlamydophila* gliedern sich in sechs Arten von denen hauptsächlich *C. pneumoniae* Erkrankungen beim Menschen auslöst. Neu dazu kamen die *Simkaniaceae* und *Waddliaceae*, die auch als Umweltchlamydien bezeichnet werden, da ihre Wirte Amöben und Insekten sind. Sie bestehen jeweils aus einer Art.

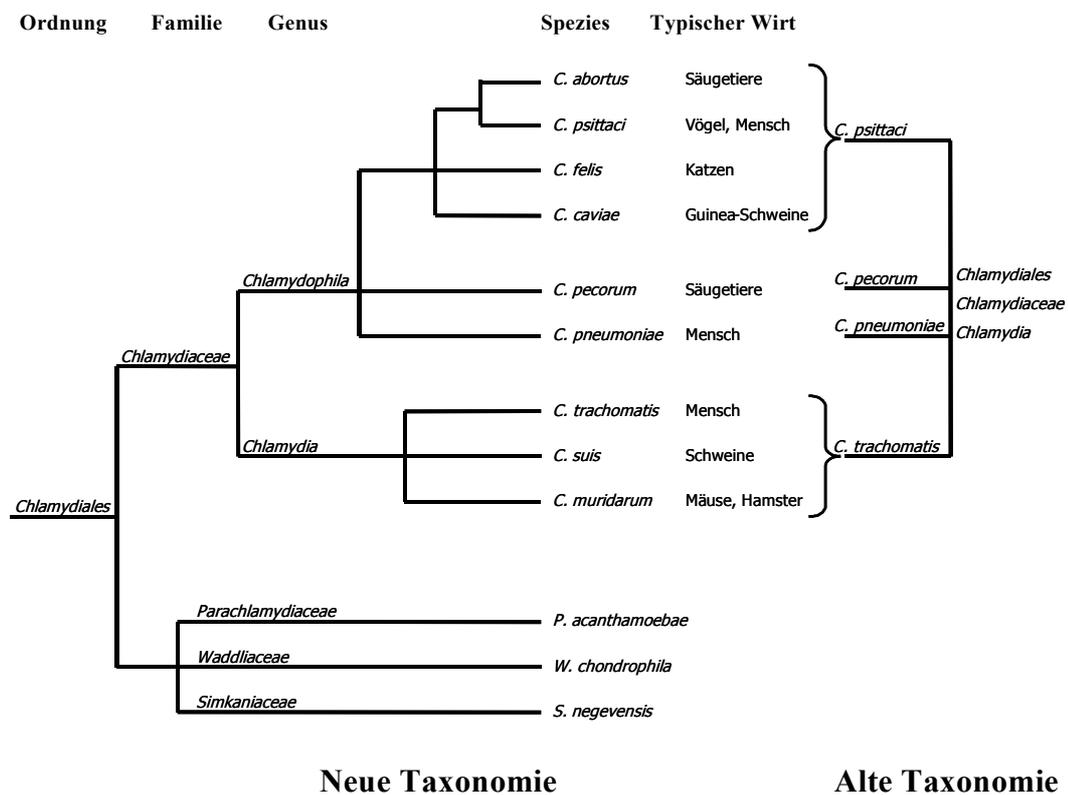


Abb 1: Neue Taxonomie der *Chlamydiales* nach der neuen Klassifizierung von 1999. Die Länge der Linien entsprechen nicht den tatsächlichen phylogenetischen Distanzen

1.2. *Chlamydomphila pneumoniae*

Chlamydomphila pneumoniae wurde erstmals 1965 aus einem Bindehautabschnitt eines taiwanesischen Kindes isoliert und als TW183 (Taiwan Isolat 183) bezeichnet. 1983 wurde das erste Isolat aus einem respiratorischen Trakt isoliert und als AR39 bezeichnet (Grayston et al., 1986). Die beiden Isolate wurden dem gleichen Erreger zugeordnet und als TWAR zusammengefasst. 1989 wurde TWAR mit der Bezeichnung *Chlamydia pneumoniae* als neue Spezies in die Ordnung der Chlamydiales aufgenommen.

Infektionen mit *C. pneumoniae* verursachen eine Vielzahl von respiratorischen Erkrankungen.

Im Durchschnitt ist *C. pneumoniae* für 10% aller Fälle von Pneumonien und 5% aller Fälle von Bronchitis und Sinuitis verantwortlich. Des Weiteren werden Otitis media und Pharyngitis durch *C. pneumoniae* verursacht (Grayston et al., 1993). Außerhalb des Respirationstraktes wurden Erkrankungen wie Meningitis (Sundelof et al., 1993) und Enzephalitis (Norten et al., 1995) als Folge einer *C. pneumoniae*-Infektion beschrieben. *C. pneumoniae* ist daher ein wichtiger Vertreter von humanen Pathogenen (Kauppinen und Saikku, 1995). Erstinfektionen verlaufen meist mild oder asymptomatisch, doch können sie bei älteren oder immunsupprimierten Menschen auch schwere Verläufe annehmen. Ein Zweitausbruch kann Jahre später erfolgen oder chronisch persistieren. Seroepidemiologische Studien zeigen, dass *C. pneumoniae* weltweit vertreten ist. Die Seroprävalenz steigt dabei mit zunehmendem Alter von 50% bei 20jährigen bis auf 75% in höheren Lebensalter (Kuo et al., 1995).

Neben den Erkrankungen, die durch die akute Infektion ausgelöst werden, wird eine Assoziation von chronisch persistierenden Chlamydien mit chronischen Erkrankungen, wie Asthma, chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung (COPD), Lungenkrebs, Arteriosklerose, koronaren Herzerkrankungen, Multipler Sklerose (MS) und Alzheimer diskutiert.

Die wohl am intensivsten betrachtete chronische Erkrankung in Verbindung mit *C. pneumoniae* ist die Arteriosklerose und deren Hauptmanifestation, die koronaren Herzerkrankungen. Seroepidemiologische Studien zeigten, dass die Mehrzahl der Patienten mit koronaren Herzerkrankungen höhere *C. pneumoniae* Antikörper-Titer aufwies (Saikku et al., 1988). Außerdem konnte *C. pneumoniae* in arteriosklerotischen Plaques und Geweben nachgewiesen werden (Shor et al., 1992). Weiterhin fand man Chlamydien auch im Liquor von MS-Patienten (Sriram et al., 1999).

und in Astrozyten und Perizyten von Alzheimer-Patienten (Balin et al., 1998). Außerdem scheinen Patienten mit *C. pneumoniae*-Infektionen eher asthmatische Bronchitis zu entwickeln (Grayston, 1993).

Man vermutet, dass die Entstehung von arteriosklerotischen Läsionen durch eine chronisch-inflammatorischen Reaktion der Gefäßwand nach primärer Schädigung des Endothel durch verschiedene Noxen verursacht wird. Eine persistierende *C. pneumoniae* Infektion, die eine ständige Entzündungsreaktion hervorruft, könnte in dieses Konzept passen.

Normalerweise befallen Chlamydien zuerst die Schleimhäute, von da aus verbreiten sie sich vermutlich über Monozyten bzw. Makrophagen. In vitro Studien zeigten, dass *C. pneumoniae* Makrophagen, Endothelzellen und arterielle glatte Muskelzellen, Schlüsselzellen der Arteriosklerose, infizieren können, und dass es dadurch zur Freisetzung von Adhäsinen, Zytokinen und Proteasen kommt (Gaydos et al., 1996; Summersgill et al., 2000; Netea et al., 2000). Diese Ausschüttung führt zu Aktivierung des Endothels, das wiederum die Einwanderung von Makrophagen und Monozyten ins subendotheliale Gewebe zur Folge hat.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *C. pneumoniae* die Schaumzellbildung induziert, was als Schlüsselereignis der frühen Arteriosklerose gilt (Katalyoglu et al., 1998).

Trotzdem konnte ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Nachweis von *C. pneumoniae* im arteriosklerotisch veränderten Gewebe und der Erkrankung bislang nicht bewiesen werden, ebenso wenig wie zwischen Infektion mit *C. pneumoniae* und MS, Alzheimer, Asthma und COPD. Weiss et al. z.B. konnten keine Chlamydien in arteriosklerotischen Geweben nachweisen und seroepidemiologische Studien über eine Assoziation zwischen *C. pneumoniae* Antikörpertiter und koronaren Herzerkrankungen ließen sich nicht immer reproduzieren (Saikku et al., 1988; Nobel et al., 1999). Weiterhin muss beachtet werden, dass Studien die eine Assoziation zwischen *C. pneumoniae* und Arteriosklerose zeigten, eher veröffentlicht werden, als Studien die keine Assoziation nachweisen konnten (Egger et al., 1997).

Da es sich bei Erkrankungen wie Arteriosklerose um multifaktorielle Erkrankungen handelt, besteht die Möglichkeit, dass eine persistente *C. pneumoniae* Infektion nicht ursächlich für die Entstehung von Arteriosklerose verantwortlich ist, aber das Fortschreiten der Krankheit begünstigt kann.

Studien, ob eine Antibiotikabehandlung sich positiv auf den Krankheitsverlauf von Arteriosklerose, Asthma oder COPD auswirkt, führten zu unterschiedlichen

Ergebnissen (Gupta et al., 1997; Muhlestein et al., 2000). Allerdings ist es mit heute verfügbaren Antibiotika nicht möglich persistente *C. pneumoniae* Infektionen zu behandeln (Gieffers et al., 2001), so dass trotz fehlenden Behandlungserfolgs eine Beteiligung von *C. pneumoniae* an den chronischen Erkrankungen nicht völlig ausgeschlossen werden kann.

1.3. Entwicklungszyklus

Chlamydien sind obligat intrazelluläre Bakterien, die Epithel- und Immunzellen infizieren können. Sie zeichnen sich durch einen zweiphasigen Entwicklungszyklus aus, bei dem die funktionell und morphologisch unterschiedlichen Zellformen auf das extrazelluläre Überleben und die intrazelluläre Vermehrung angepasst sind.

Außerhalb der Wirtszelle liegen sie als infektiöse, metabolisch inaktive Elementarkörperchen (EB) vor (Moulder, 1991). Die EBs sind an das Überleben außerhalb der Wirtszelle angepasst. Ihre äußere Membran besteht aus einem starken Protein-Netzwerk von Disulfidbrückenbindungen, das sie gegen physische Zerstörung schützen soll. Zudem ist die DNA durch chlamydiale Histon-ähnliche Proteine hoch kondensiert (Hackstadt et al., 1991; Barry et al., 1992).

Der Entwicklungszyklus der Chlamydien beginnt mit der Adhäsion und dem Eintritt des EBs in die Wirtszelle. Es wird spekuliert, ob Chlamydien direkt an zelluläre Heparinstrukturen an der Oberfläche der Wirtszelle binden (Su et al., 1996), oder ihre eigene Heparansulfat-ähnliche Struktur ausbilden, die die Oberfläche der EB umhüllt und den Wirtszellheparanrezeptor besetzt (Stephens et al., 2001). Der Eintritt ist ein multifaktorieller Prozess, der sowohl durch einen clatherinabhängigen als auch clatherinunabhängigen Signalweg, einschließlich über einen „Lipid Raft“ abhängigen Signalweg, beobachtet wurde, und von Rac-GTPasen der Wirtszelle und den translozierten aktinrekrutierenden Protein (Tarp) abhängt, das zu einer Aktin-Neuordnung führt (Dautry-Varsat et al., 2004; Carabeo et al., 2002; Clifton et al., 2004). Unter Vermeidung der Bildung eines Phagolysosomes bewegt sich das EB in die perinukleare Region zum Mikrotubuli-Organisationszentrum. Dieser Prozess führt zur Bildung eines Einschlusskörpers, der sog. Inklusion, in der die Chlamydien während ihres gesamten Entwicklungszyklus` verbleiben und das ihnen eine geschützte Nische zur Replikation bietet. Während des Entwicklungszyklus` nimmt das Volumen der

Inklusion kontinuierlich zu und füllt den größten Teil des Cytoplasmas aus. Ein Teil der benötigten Proteine erwerben die Chlamydien dabei durch Fusion mit exocytischen Vesikeln, die Spingomyelin vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportieren und somit zur Maskierung der Inklusion beitragen. Dieser Prozess wird zunächst von Proteinen übernommen, die bereits im EB vorhanden sind, bis durch Retikularkörperchen (RB) synthetisierte Proteine diese Funktion übernehmen (Hackstadt et al., 1998).

Innerhalb der ersten 2 h nach Eintritt der Wirtszelle differenzieren sich die EBs zu nicht-infektiösen metabolisch aktiven RBs, die sich durch binäre Teilung vermehren. Mit der Differenzierung zu RBs kommt es zum Verlust der Infektiösität und zur Dekondensation des Chromosomens. Die DNA-Synthese beginnt 2 – 4 h nach der Infektion. Mit der Vermehrung der RBs expandiert die gebildete Inklusionsmembran, die Volumenzunahme ist nach 8 -12 h pI. sichtbar. Nach ca. 18 h beginnen sich die RBs asynchron in EBs zu differenzieren, die im Lumen des Einschlusskörpers akkumulieren, während sich die restlichen RBs weiter teilen. Abhängig von der Spezies und den Wachstumsbedingungen kommt es 48 – 72 h nach der Infektion zur Freisetzung der EBs durch Exocytose oder Lyse der Wirtszelle und zur Neuinfektion. Eine Übersicht des Entwicklungszyklus` ist in Abb. 2 dargestellt.

Neben der produktiven Infektion, bei der es zur Vermehrung der Chlamydien kommt, konnte Moulder 1980 zeigen, dass Chlamydien in einer aberranten Form in Zellen persistieren können. In persistenter Form ist der Entwicklungszyklus unterbrochen, was es dem Organismus ermöglicht, länger in der Wirtszelle zu verbleiben. Verbessern sich die Bedingungen für die Chlamydien, wird der Entwicklungszyklus reaktiviert und die aberranten Formen wandelt sich wieder in RBs um.

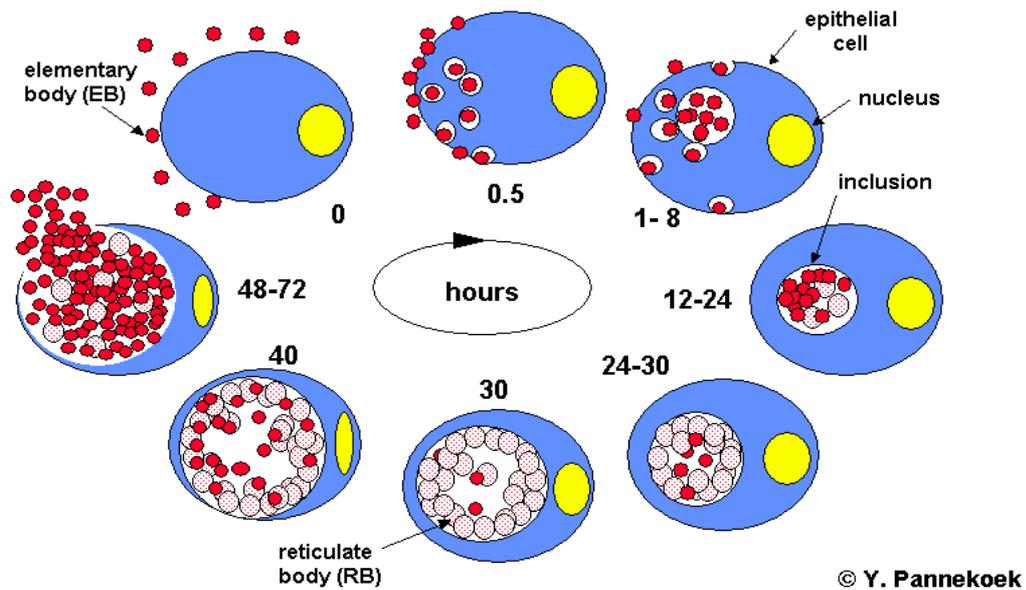


Abb. 2: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus' von *Chlamydia spp.* Der gesamte Entwicklungszyklus findet im Einschlusskörper statt. Nach Eintritt in die Wirtszelle differenzieren sich die Elementarkörperchen (EB) zu Retikularkörperchen (RB). Die RBs vermehren sich durch binäre Teilung und differenzieren sich anschließend wieder zu EBs, die durch Lyse der Zelle freigesetzt werden. Abbildung übernommen von Y. Pannekoek

1.4. Typ III Sekretionssystem

Eine Vielzahl von gram-negativen-, tier- und humanpathogenen Bakterien (*Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Bordetella spp.*, und *E. coli*) bzw. pflanzenpathogenen Bakterien (*Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*) nutzen ein Typ III Sekretionssystem (TTSS) mit dem Ziel, bakterielle Virulenzproteine in die eukaryontische Wirtszelle zu transportieren (Hueck, 1998; Cornelis and Van Gijsegem, 2000; Viprey et al., 1998). Sequenzvergleiche zwischen den verschiedenen Bakterien ergaben eine hohe Ähnlichkeit innerhalb der strukturellen Komponenten der einzelnen TTSSe (Galan and Collmer, 1999).

Die bis zu 20 Strukturgene kodieren für ein nadelähnlichen makromolekularen Sekretionsapparat, der die innere bakterielle Membran, den periplasmatischen Raum, die Peptidoglycanschicht, die äußere bakterielle Membran, den extrazellulären Raum und die Wirtszellmembran durchspannt (Abb. 3).

Die meisten der strukturellen Komponenten zeigen dabei Sequenzhomologie zu Proteinen des Basalkörpers des bakteriellen Flagellums (Aizawa et al., 2001). Es wird daher angenommen, dass das TTSS aus dem bakteriellen Flagellum entstanden ist (Kim, 2001).

Im Unterschied zu anderen bakteriellen Sekretionssystemen benötigt das TTSS den Kontakt zur Wirtszellmembran und wird deshalb als kontaktabhängiges Sekretionssystem bezeichnet.

Einige Bakterien wie *Salmonella enterica Typhimurium*, *Yersinia pestis* und *Yersinia enterocolitica* bilden mehr als nur ein TTSS aus (Foultier, 2003; Haller et al., 2000; Shea et al., 1996). So sind in Salmonellen die Gene in zwei Pathogenitätsinseln gruppiert, die für zwei getrennte TTSSe kodieren. Die Gene des SPI-1 (Salmonella Pathogenitätsinsel 1) kodieren für ein TTSS, das für die Invasion der Salmonellen verantwortlich ist. Die Gene des SPI-2 kodieren für ein TTSS, das für das intrazelluläre Überleben notwendig ist. Die Gene, welche die sekretierenden und strukturellen Komponenten der verschiedenen TTSSe kodieren, befinden sich in der Regel auf einem einzelnen Plasmid oder innerhalb einer abgetrennten Pathogenitätsinsel auf dem Bakterienchromosom.

Während die strukturellen Komponenten des TTSSs konserviert sind, variieren die jeweiligen Effektorproteine der verschiedenen bakteriellen Spezies, da sie an die Bedürfnisse des jeweiligem Bakteriums an seinen Wirt angepasst sind. Eine Identifizierung von Effektorproteinen über Sequenzhomologien ist somit nicht möglich. Des weiteren besitzen Effektorproteine des TTSSs kein einheitliches Signalpeptid, über das sie identifiziert werden könnten. Es wird vermutet, dass ein mögliches Signal innerhalb der ersten AS liegen müsste, da ein Austausch weniger AS bereits in der Nichtsekretion des jeweiligem Proteins resultiert (Michiels et al., 1990; Schesser et al., 1996). In Yersinien scheint eine amphipatische Verteilung von AS innerhalb der ersten 10 N-terminalen AS als Sekretionssignal zu fungieren (Llyod et al., 2001). Und Salmonellen scheinen das konservierte Signal WEK(I/M)XXFF für die Sekretion von Effektorproteine zu nutzen (Miao et al., 2000). Eine alphanische AS (Ile, Leu, Val) oder ein Prolinrest an AS Position 3 oder 4, sowie ein hoher Anteil von Serinresten und das

Fehlen von negativ geladenen Resten innerhalb der ersten 12 AS wird anscheinend als Sekretionssignal bei *Pseudomonas* genutzt (Schechter et al., 2004). Ramamurthi und Schneewind hingegen vermuten, dass das mögliche Sekretionssignal in der mRNA-Sequenz liegt, das Signal aber zusätzlich die Interaktion mit spezifischen tRNA benötigt. Allerdings konnte keines dieser hypothetischen Sekretionssignale bislang auf alle Bakterien mit einem TTSS angewendet werden, so dass eine Identifizierung von Effektoren durch ein fehlendes einheitliches Sekretionssignal erschwert wird.

Oft ist aber der offene Leserahmen (ORF) der Effektorproteine in einem TTSS Subcluster lokalisiert (Subtil et al., 2000), so dass von der Lokalisation der ORFs eventuell auf putative Effektorproteine geschlossen werden kann.

Die Aktivierung des TTSS wird durch ein komplexes Netzwerk kontrolliert, das sowohl aktivierend (Anstieg der Umgebungstemperatur auf Körpertemperatur, Wirtszellkontakt) als auch reprimierend (erhöhter Ca^{2+} -Konzentration, reprimierende Proteine) sein kann (Lambert de Rouvroit et al., 1992; Cornelis et al., 1998). *Yersinien* regulieren die Expression der sekretierten Gene durch Temperaturanstieg, pH-Wert und Salzkonzentration, *Shigellen* über Temperaturveränderung, pH-Wert und Wirtszellkontakt und *P. aeruginosa* über den Ca^{2+} -Spiegel und der Anwesenheit von TTS Faktoren wie Albumin und Casein (Hromockyi et al., 1992; Nakayama et al., 1995; Kim et al., 2005). Eine vorzeitige Sekretion wird außerdem durch die Bindung der Effektorproteine an Chaperone verhindert (Hueck, 1998; Perry et al., 1998; Cornelis, 2000).

Das Chaperon assoziiert mit seinem Effektor im Cytosol und hält es bis zur Translokation in einem ungefalteten bzw. teilgefalteten Zustand (Frithz-Lindsen et al., 1995). Die Effektorsekretion und Translokation erfolgt in zwei zeitliche Phasen: einer frühen nach der Aktivierung des TTSSs und eine späteren. Dabei scheinen einige Effektorproteine schon vor der Aktivierung des TTSSs synthetisiert zu werden. Der Wirtszellkontakt oder andere Stimuli führen dann zur Translokation der Effektorproteine aus diesem vorsynthetisierten Pool.

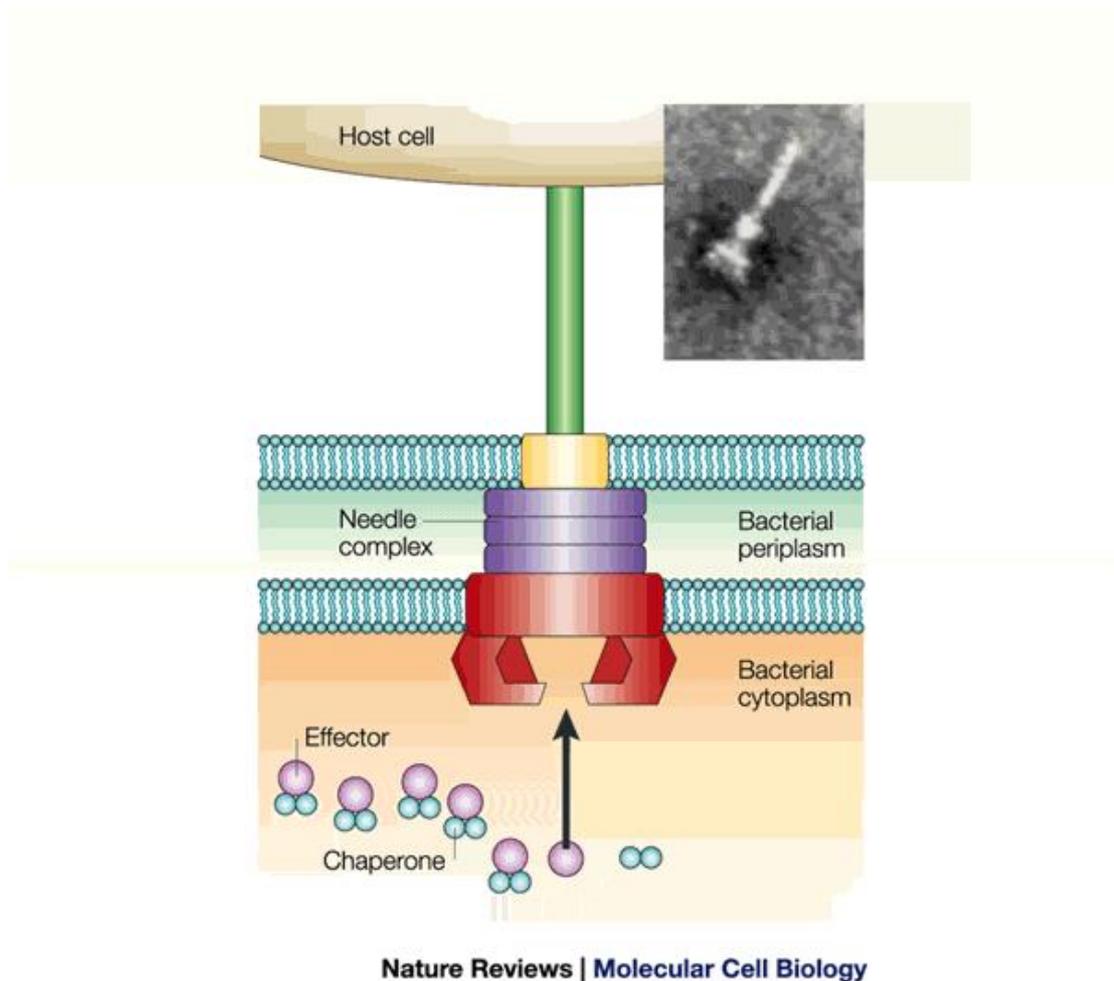


Abb.3: Typ III Sekretionssystem von Gram-negativen Pathogenen. Übernommen aus dem Artikel: Priming virulence factors for delivery into the host, C. Erec Stebbins und Jorge E. Galan, 2003

1.5. Das Typ III Sekretionssystem von Chlamydien

Die Sequenzierung der chlamydialen Genome zeigte, dass *Chlamydia spp.* alle notwendigen Gene für ein funktionelles Typ III Sekretionssystem besitzen (Stephens et al., 1998; Kalman et al., 1999; Read et al., 2000). Den ersten genetischen Beweis lieferte Hsia et al., 1997, der 4 Gene identifizierte, die homolog zu strukturellen und regulatorischen Komponenten eines kontaktabhängigen TTSSs sind. Bislang konnten 13 Strukturproteine des TTSSs identifiziert und deren Transkription bis auf eine Ausnahme (*yscU*) nachgewiesen werden (Slepenkin et al., 2003). Für die Homologen von YopB und YopD konnte auch die Expression nachgewiesen werden (Lugert et al., 2004).

Im Vergleich zu anderen gram-negativen Bakterien unterscheiden sich Chlamydien in der genomischen Anordnung der Gene des TTSSs. In den Genomen anderer gram-negativer Bakterien, in denen ein TTSS identifiziert wurde, sind die Gene auf sogenannten „Pathogenitätsinseln“ gruppiert, die auf dem Chromosom oder einem Plasmid liegen. Chlamydien kodieren für ein einzelnes TTSS, aber in Gegensatz zu anderen Gram-negativen Bakterien sind die Gene des TTSSs in mindestens 6 Subclustern über das gesamte Genom verteilt (Stephens et al., 1998). Die bereits untersuchten Gene *copN* und *yopD* liegen in solchen Subclustern.

Ein weiterer Unterschied zu anderen TTSSen liegt im GC-Gehalt der Subcluster. Während er gewöhnlich 10% unter dem GC-Gehalt des Gesamtgenoms liegt, besteht in Chlamydien kein Unterschied zwischen den GC-Gehalt in den Subclustern und dem Gesamtgenom (Stephens et al., 1998; Kalman et al., 1999).

Da Chlamydien sich genetisch nicht manipulieren lassen, kann eine Sekretion putativer Effektorproteine durch das chlamydiale TTSS nicht nachgewiesen werden. Es konnte aber eine heterologe Sekretion von CopN durch das TTSS von *Y. enterocolitica* gezeigt werden (Fields und Hackstadt, 2000). Für die Einschlusskörpermembranproteine IncA, IncB und IncC konnte eine Sekretion durch das TTSS von Shigellen gezeigt werden (Subtil et al., 2001). Eine Sekretion von CPAF ins Wirtszellcytoplasma konnte für *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* nachgewiesen werden (Heuer et al., 2003; Zong et al., 2001). Das chlamydiale Protein Tarp konnte durch das TTSS von *Y. pseudotuberculosis* sekretiert werden (Clifton et al., 2004).

Eine Signalsequenz findet sich auch in chlamydialen Effektorproteinen nicht. Da eine Sekretion von CopN auch ohne die ersten 15 N-terminalen AS gezeigt werden konnte, scheint in Chlamydien keine N-terminale Signalsequenz zu existieren.

Die Analyse der Sequenzen könnte dennoch zur Identifizierung von putativen Effektoren des TTSSs von *C. pneumoniae* führen (Subtil et al., 2000).

So besitzen Inklusionmembranproteine (Inc), die über das TTSS sekretiert werden, N-terminal eine hydrophobe Domäne von ca. 40 AS (Bannantine et al., 2000, Rockey et al., 1995). Bei mehr als der Hälfte der Proteine, die dieses Merkmal zeigten, konnte eine Lokalisation in der Membran bestätigt werden (Bannantine et al., 2000; Shaw et al., 2000).

Die putativen Effektoren Cpn0708 und Cpn0712 von *C. pneumoniae* kodieren nicht für Signalpeptide anderer Sekretionswege. Weiterhin sind sie in einen Subcluster des TTSSs in Nachbarschaft zu den Strukturgenen *yscN* und *yscC*, sowie einem homologen

Gen des bakteriellen Flagelarsystems (*fliN*) lokalisiert. YscN besitzt ATPase Aktivität, ist im Cytoplasma lokalisiert und interagiert mit membrangebundenen Komponenten des TTSS (Hueck, 1998). YscC bildet ringförmige Komplexe in der äußeren Membran und ist an dem Transport großer Moleküle durch die äußere Membran beteiligt (Hueck, 1998). Gene, die für Effektoren kodieren, sind in enger Nachbarschaft zu ihren Chaperonen lokalisiert. Direkt vor *cpn0708* und *cpn0712* sind Gene lokalisiert, deren Homologe (*cp667* und *ct663*) in *C. trachomatis* für putative Chaperone kodieren. So zeigt Ct663 Homologie zum Typ III Chaperon CesT von enteropathogenen *E coli*, das für die Translokation des Intimin Rezeptorproteins benötigt wird (Creasey et al., 2003).

1.6. Interaktion mit der Wirtszelle

Als obligat intrazelluläre Bakterien müssen Chlamydien die Fähigkeit besitzen die Wirtszelle so zu manipulieren, dass sie in die Wirtszelle eindringen, die zellulären Verteidigungsmechanismen umgehen und die Wirtszelle wieder verlassen können.

Dabei haben Chlamydien verschiedene Möglichkeiten, um mit der Wirtszelle in Kontakt zu treten: Sie können passiv über Oberflächenmoleküle wie LPS, Lipoteichonsäuren, Geißeln oder Hitzeschockproteine mit der Wirtszelle interagieren. Dabei kommt es zur Bindung an Rezeptoren an der Zelloberfläche, wodurch ein Signal ins Innere der Zelle weitergeleitet wird und zur Freisetzung von Cytokinen oder anderen Botenstoffe führt.

Aktiv können sie durch Übertragung von Effektorproteinen über das TTSS auf die Wirtszelle einwirken. Dabei werden Proteine in die Wirtszelle injiziert, so dass sie in die Nähe des Zielproteins gelangen können und so in bestimmte Prozesse der Wirtszelle eingreifen können.

Bereits kurz nach Anlagerung der Elementarkörperchen an die Wirtszelle kommt es zu Veränderung in der Wirtszelle. Die EBs induzieren aktiv eine vermehrte Ausbildung von Mikrovilli, die eine Anhaftung der EBs an die Plasmamembran erleichtern (Carabeo et al., 2003).

Durch den Kontakt der Chlamydien mit der Wirtszelle wird eine lokale Aktinpolymerisation induziert (Carabeo et al., 2002) und es kommt nach den Eindringen zu einer Akkumulation von Tyrosin-phosphorylierten Proteinen um die EBs. Verschiedene Signaltransduktionswege werden induziert in denen zelluläre PI3-Kinase

und MEK-ERK-Kinase involviert sind (Coombes et al., 2002). Die PI3-Kinase ist ein Effektor verschiedener Mitglieder der Ras-Superfamilie von GTPasen, die in die Aktinpolymerisierung involviert sind. Proteine wie Rac und ARF6 (ADP-ribosylation factor 6), die das Aktincytoskelett kontrollieren, werden aktiviert und an die Eintrittsstelle rekrutiert. Diese frühe Aktivierung von Signaltransduktionswegen scheint die Neuordnung des Cytoskeletts zu erleichtern, welches die Aufnahme der Bakterien unterstützt. 30 min – 2 h nach der Aktivierung des Aktincytoskeletts werden die Chlamydien durch Phagozytose aufgenommen (Ward und Murray, 1984; Coomes und Mahoney, 2002).

Nach der Aufnahme in die Wirtszelle bilden Chlamydien einen Einschlusskörper aus, in dem sie während ihres gesamten Entwicklungszyklus verbleiben.

Zur Vermeidung der Wirtszellabwehr fusioniert die Inklusion nicht mit endosomalen und lysomalen Kompartimenten der Wirtszelle, wie es normalerweise während der Endozytose geschieht (Fries et al., 1972; Schramm et al., 1996), sondern fusioniert mit exocytischen Vesikeln, die Spingomyelin vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran bringen. Die aufgenommenen Lipide werden in die wachsende Inklusionmembran eingebaut und dienen gleichzeitig der Maskierung der Inklusion, so dass eine Fusion mit Lysosomen vermieden wird (van Ooij et al., 1998). Dieser Prozess ist unabhängig von der eukaryontischen Proteinsynthese. Er wird zuerst von Proteinen übernommen, die bereits im EB vorhanden sind, bis durch RB synthetisierte Proteine diese Funktion übernehmen (Hackstadt et al., 1998).

Kurz nach der Infektion wandert der Einschlusskörper unter Beteiligung des Cytoskeletts in die perinukleare Region zum Mikrotubuli-Organisationszentrum, wo es in der Nähe des Golgi-Apparates verbleibt (Scidmore et al., 1996; Clausen et al., 1997). Diese Migration des Einschlusskörpers erfolgt durch Interaktion eines noch unbekanntes chlamydialen Effektorproteins mit Dynein.

Neben diesen initialen Eingriffen werden noch weitere Prozesse in der Wirtszellen beeinflusst. Es scheint zu einer transienten oder indirekten Interaktion zwischen den Chlamydien und den Mitochondrien der Wirtszelle zu kommen, da in Chlamydien-infizierten Zellen der mitochondriale Metabolismus erhöht ist (Hatch und McClarty, 1998). Zu Beginn des Infektionszyklus und unter schlechten Bedingungen können Chlamydien ATP von der Wirtszelle erwerben. Weiterhin wurden in der Membran von EB Lipide gefunden die mitochondrialen Ursprungs sind (Hatch und McClarty 1998).

Chlamydien blockieren die mitochondriale Cytochrom c Freisetzung und inhibieren so in der frühen Phase des Entwicklungszyklus die Apoptose der Wirtszelle (Fan et al., 1998; Geng et al., 2000), in der späten Phase des Entwicklungszyklus vermögen sie die Apoptose auch zu induzieren (Perfettini et al., 2002; Miyairi und Byrne, 2006). Bislang sind nur wenige Effektorproteine von Chlamydien bekannt, die für die Veränderungen in der Wirtszelle verantwortlich sind.

CADD ist ein Effektorprotein, das ins Cytosol der Wirtszelle sekretiert wird (Stenner Liewien et al., 2002) Es wird spät im Entwicklungszyklus exprimiert und aktiviert über die Assoziierung mit Death-Domänen von Wirtszellproteinen die Apoptose. Des weiteren wurde eine Interaktion von CADD mit TNFR1, Fas, DR4 und DR5 gezeigt.

CPAF (Chlamydial protease like activity factor) ist ein weiteres Effektorprotein, das im Cytosol der Wirtszelle nachgewiesen werden konnte und moduliert die erworbene Immunantwort gegen chlamydiale Infektionen durch Proteolyse des RFX5-Transkriptionsfaktors. Es reguliert so die MHC 1 und 2 vermittelte Antigenpräsentation herab (Zong et al., 2001; Fan et al., 2002; Heuer et al., 2003).

Zusätzlich führt die Sekretion von Tarp (CT456) zur Aktinaggregation der Wirtszelle und ist an der Internalisation des EBs beteiligt (Clifton et al., 2004).

1.7. Ziele der Arbeit

Die Infektion von Chlamydien führt zu umfangreichen Veränderungen in der Wirtszelle. Nur wenige Effektorproteine von *C. pneumoniae* sind bislang bekannt und ihre Funktion ist oft noch unklar.

Im Rahmen dieser Dissertation sollten putative Effektorproteine des TTSSs von *Chlamydia pneumoniae* identifiziert und deren Funktion in der Wirtszelle untersucht werden. Hierzu wurden Transkription, Expression und Lokalisation der putativen Effektorproteinen Cpn0708 und Cpn0712 in *C. pneumoniae* AR39 infizierten Zellen untersucht. Die TTS der Effektoren sollte mittels eines heterologen Sekretionssystems in Salmonellen überprüft werden. Weiterhin wurde der Einfluss von Cpn0712 auf das Wirtszelltranskriptom untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Nicht gesondert aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Darmstadt, Roth, Karlsruhe oder Sigma, München bezogen. Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit doppelt destillierten Wasser („Bidest“) angesetzt.

2.2. Gebrauchswaren

Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Nunc, Roskilde, Dänemark, Corning/Costar, Bodenheim, Greiner Falcon, Frankfurt, Becton Dickenson, Heidelberg und Eppendorf, Hamburg bezogen.

2.2.1 Membranen und Filtern

0,22µm Millex, Spritzenfilter	Millipore, Bedford, USA
3,0µm Isopore, Membranfilter	Millipore, Bedford, USA
0,2µm sterile Spritzenfilter	Corning/Costar, Bodenheim
Nitrocellulose Membran, Hybond ECL	Amersham Bioscience, Freiburg

2.2.2. Molekulargewichtsstandards

DNA-Standard:

100bp DNA Ladder	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
1kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St.Leon-Rot

Protein-Standard:

Prestained Protein Marker	New England Biolabs, Schwalbach
---------------------------	---------------------------------

2.2.3. Reaktionssets (Kits) und Enzyme

RNA Isolierung

Qiashredder	Qiagen, Hilden
-------------	----------------

Taq DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
Trypsin	Biochrom, Berlin

2.3. Sterilisation

Die Sterilisation von Lösungen erfolgte für 20 min bei 120°C und 10^5 Pascal im Dampfdruckautoklaven oder bei hitzeempfindlichen Lösungen durch Sterilfiltration (Porengröße: 0,2µm). Gebrauchswaren wurden entweder autoklaviert oder über Nacht bei 180°C hitzesterilisiert.

2.4. Puffer und Stammlösungen

Lösungen für den routinemäßigen Gebrauch wurden nach Sambrook et al. (1989) angesetzt. Die dazu benötigten Chemikalien wurden in bidestillierten oder gegebenenfalls in DEPC behandeltem Wasser gelöst, und nach Bedarf autoklaviert oder steril filtriert.

Ampicilin-Stammlösung	50mg Ampicilin/ml Stammlösung
Chloroform-Isoamylalkohol vermischt	Chloroform 24:1 mit Isoamylalkohol
dNTPs	2mM dATP 2mM dGTP 2mM dCTP 2mM dTTP
X-Gal-Stammlösung	20mg X-Gal/ml in N,N-Dimethylformamid
X-Gal-Reaktionsmix	40mg/ml X-Gal-Stammlösung 100mM Ferricyanid 100mM Ferrocyanid

	1,3mM MgCl ₂ 0,02% Triton X 100 0,04% DOC
Fixierlösung	2% Formaldehyd, 0,2% Glutaraldehyd, 2mM MgCl ₂ , 0,02% Triton X 100, 0,04% DOC
Coomassie-Färbelösung	30% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure 0,025% (w/v) Coomassie Brilliant Blue
Entfärbelösung	30% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure
Lysispuffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 10mM Imidazol
Waschpuffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 10mM Imidazol
Elutionspuffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 20- 250mM Imidazol
4 x Proteinauftragungspuffer	250mM Tris-HCl (pH 6,8), 4% SDS, 40% Glycerin, 130 mM Dithiothreitol, 0,004% Bromphenolblau
Laemmli-Laufpuffer	25mM Tris-HCl (pH8,3), 0,2M Glycin, 0,1% SDS
Blockierlösung (WB)	5% Magermilchpulver, 0,02% NaN ₃ in PBS
Waschlösung (WB)	0,1% TritonX-100 in PBS

10 x PBS	140mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,5mM KH_2PO_4 , 4mM Na_2HPO_4
FACS-Puffer	1 x PBS, 0,2% Natriumacid, 15% FKS
FACS-FIX-Puffer	FACS-Puffer, 1% Paraformaldehyd
10 x TE	10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,5
50 x TAE	242g Tris-HCl, 57,1ml Essigsäure, 100ml 0,5M EDTA pH 8,0
Substratpuffer	2% Diethanolamin, 98 μM MgCl_2 in 0,9% NaCl
NBT-Lösung	1mg/ml 4-Nitroblautetrazoliumchlorid
X-Phosphat-Lösung	5mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat in Dimethylformamid
NBT/X-Phosphat-Entwicklungslösung	9ml Substratpuffer, 1ml NBT-Lösung, 0,1ml X-Phosphat-Lösung
Blockierlösung	1% BSA, 0,02% NaN_3 in PBS
Mowiol	2,4g Mowiol, 6g Glycerin, 6ml H_2O , 12ml 0,2M Tris-HCl (pH 8,5)

2.5. Medien, Agarplatten und Antibiotika

2.5.1. Medien für Bakterien

LB-Medium pH 7,5:	1% Trypton
	0,5% Hefeextrakt
	0,5% NaCl

LB-Agar enthielt zusätzlich 1,5% Agar

Das LB-Medium wurde mit destilliertem Wasser angesetzt, autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

2.5.1.2. Medien für die Zellkultur

Alle Zellkulturmedien, Reagenzien und Zusätze wurden von der Firma Biochrom, Berlin gekauft, sofern nicht anders angegeben.

Die zur Kultur von eukaryontischen Zellen verwendeten Medien wurden vor Gebrauch je nach Kulturbedingungen der Zellen mit FKS, Antibiotika und Glutamin versetzt und sterilfiltriert. Für die Langzeitlagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff wurde das Medium mit 10% DMSO angereichert.

Für die Zelllinien wurden folgende Medien verwendet.

Hep-2-Kulturmedium

MEM earle, das mit 2mM L-Glutamin, 1x nicht essentielle Aminosäure, 2,5µg/ml Amphotericin, 25µg/ml Gentamycin, 2,5µg/ml Vancomycin und 10% FKS ergänzt wurde.

Cpn-Kulturmedium

MEM earle, das mit 2mM L-Glutamin, 1x nicht essentielle Aminosäure, 2,5µg/ml Amphotericin, 2,5µg/ml Vancomycin und 10µg/ml Cycloheximid ergänzt wurde.

DMEM (Dulbecco`s MEM)

Instandpuder (Instamed T 043-10), das 4,5g/l Glucose, 580mg/l L-Glutamin enthielt, ergänzt mit 3,7g/l NaHCO₃, pH 7,2, steril filtriert.

RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)

Instandpuder (Instamed T121-10), das 300mg/l L-Glutamin enthielt, ergänzt mit 2g/l NaHCO₃, pH 7,2, steril filtriert.

Reagenzien und Zusätze

<u>Sonstige Zusätze</u>	<u>Stammlösung</u>	<u>Endkonzentration</u>
L-Glutamin	200mM	2mM
EDTA	1%	0,01%
Trypsin,	0,25%	0,0025%
Nicht-essentielle Aminosäuren	100 x	1 x
FKS	100%	10%
Cycloheximid (Sigma-Aldrich)	50µg/ml	1µg/ml
X-α-Gal (Clontech)	20mg/ml	20µg/ml

2.5.2. Antibiotika

Von dem Antibiotikum Ampicillin wurde eine Stammlösung angesetzt, die steril filtriert und bei -20°C gelagert wurde. Das Antibiotikum wurde erst nach den Autoklavieren und Abkühlen der Wachstumsmedien auf 55°C zugegeben.

<u>Antibiotika</u>	<u>Stammlösung</u>	<u>gelöst in Endkonzentration</u>	
Ampicillin (Sigma-Aldrich,)	50mg/ml	H ₂ O	50µg/ml
Penicillin-Streptomycin			
Gentamicin	10mg/ml	H ₂ O	25ml/ml
Vancomycin (Sigma-Aldrich)	125mg/ml	H ₂ O	50µg/ml
AmphotericinB	250µg/ml	H ₂ O	2,5µg/ml

2.6. Verwendete Bakterienstämme, Vektoren, Oligonukleotide

2.6.1. Bakterienstämme

Zur Vermehrung der Vektoren bzw. der rekombinanten DNA wurde der folgende Wirtstamm eingesetzt:

<i>E.coli DH5a</i>	Hanahan et. al., 1985
<i>C. pneumoniae AR39</i>	Grayston et al., 1986

2.6.2. Plasmide

<u>Plasmid</u>	<u>relevante Merkmale</u>	<u>Referenz</u>
pBAD Topo	TOPO Klonierungsstelle, pBAD-Promotor, His ₆ -tag, amp ^r	Invitrogen
pPCR 2.1 TOPO	TOPO Klonierungsstelle, lacZa, amp ^r , kan ^r	Invitrogen
pcDNA3.1/V5-HisTOPOTa	TOPO Klonierungsstelle, CMV-Promotor, His ₆ -tag, amp ^r , neo ^r	Invitrogen
pcDNA4/TO/myc-HisA	CMV-Promotor, amp ^r , neo ^r Myc-tag	Invitrogen
2447	ProB-Promotor, M45-Epitop	Prof. Dr. Hensel, Erlangen
pQE30	T5-Promotor, His ₆ -tag, amp ^r	Invitrogen

2.6.3. Synthetische Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide, die für die Experimente verwendet wurden, wurden von der Firma Sigma-Genosys, Steinheim bezogen und in einer Stammlösung von 100pmol/μl gelöst.

Oligonucleotide	Sequence 5`-3`
16S RTF	GGA ATA CTC ATA CGG AGC AA
16S RTR	AGG TAA GAA CTG CTT GCA GG
pBAD seqf	ATG CCA TAG CAT TTT TAT CC
pBAD seqr	GAT TTA ATC TGT ATC AGG
Cpn0708F	6x GGA TCC ATG ATA GAC CCT GTA GAA
Cpn0708R	6x AAG CTT TTA ACC TAA TTG CGT TGT
Cpn712rev	6x AAG CTT GTA CCT AAA ATA TAG GTT
Cpn712 for	6x GGA TCC ATG GCA GTA CGA TTA ATT
GUCY for	GTG GGG AGT GCA GGG CCA
GUCY rev	TTA TTC TCA AAG GGA TGA TGG A
GADD45 for	GCA CTG CGT GCT GGT GAC GA
GADD45 rev	TCC TTG CAT CAG TGT AGG GAG
CAV1 for	AGC TTT CCC TGC CTC TCA TCA A
CAV1 rev	TGC AGC AAC TCT GAT AGG CTC
KRT7 for	AAC ATC AAG AAC CAG CGT GCC
KRT7 rev	ATG GAA TAA GCC TTC AGG AGC
KRT17 for	AGG ATG CCG AGG ATT GGT TCT
KRT17 rev	TCT TCC ACA ATG GTA CGC ACC
SERPINB3 for	CCG CGG TCT CGT GCT ATC TG
SERPINB3 rev	GAC GAT CAT CAT CAA GAT GA
TNFAIP3 for	AGT GTT CCC AGG TGG CCT TAG
TNFAIP3 rev	ACA TGT TCA GTC TCA GCA GCC
PSG3 for	TTG GTG GCT AAA TGG TCA GAG
PSG3 rev	GGA TTT GGA GCT TTC CAT GCC
709 FS1	6x CTG CAG ATG GCA GAT TTG GAA GTA
TTT	
708 FS1	6x CTG CAG ATG ATA GAC CCT GTA GAA TGT TTG
708 RS	6x GAT ATC ACC TAA TTG CGT TGT CAT
AAT	
713 FS	6x GAA TTC ATG AGA TTG TTT CCA TTC

712 FS	6x GAA TTC ATG GCA GTA CGA TTA ATT GTT GAT
712 RS1	GAT ATC CGT ACC TAA AAT ATA GGT TTT
712 RS	GAT ATC TTT ATT GTA GTC TAT TTT ATA TTT C
2447 Fseq	TGG CAA GTA AAA TAG CCT A
2447 Rseq	GAT CCG CGT CTC TGT CTC
IFIT1F	GAA GCC CTG GAG TAC TAT G
IFIT1R	CAA GAA TTA CAT CAT TAC AGT G
IFIT3F	CAG GAG AAT CTG AAG CTA GTG
IFIT3R	GCT TTT CAG CAT CAG GGA C
EIF5F	CTT GCC AAA GAG ATT CGT GTC
EIF5R	CGA TGT CGT CAT CCT TGT TG
GLP2RF	CTG GTC CTC ATT CCT TTA TTG
GLP2RR	GCC TTC ACT TCT CCA TTG G
TTLL11F	CGC CTG GCA GGG ACC C
TTLL11R	ACA AAA CTT AGA GAG TCC G
LOCF	GTA TAT TCA GAA GAA CAC AGA T
LOCR	CTA GAA ATG GGA CTC TCA G
G3PDHF	TGA AGG TCG GAG TCA ACG CAT TTG GT
G3PDHR	CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC

2.6.4. Antikörper

Primäre Antikörper

Maus-anti-His Taq, IgG	Qiagen, Hilden
Maus-anti-c-myc, IgG	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Maus-anti- <i>C. pneumoniae</i> , IgG	Acris, Hiddenhausen
Maus-anti-Tubulin, IgG	NEB, Schwalbach
Kanninchen-anti- α -Aktin	Dianova, Hamburg
Kaninnchen-anti-rCpn0708	
Kaninnchen-anti-rCpn0712	

Sekundäre Antikörper

AP-konjugiertes Ziege-anti-Maus-IgG	Dianova, Hamburg
AP-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen-IgG	Dianova, Hamburg
Cy3-konjugiertes Ziege-anti-Maus-IgG	Dianova, Hamburg
Cy5-konjugiertes Ziege-anti-Maus-IgG	Dianova, Hamburg

2.6.5. Transfektionsreagenzien

Jet Pei	Biomol
Metafectene	Biontex
Lipafectene	Gibco BRL
Polyfekt	Gibco BRL
HeLa Monster Kit	Gibco BRL

2.6.6. Zelllinien

Zelllinie	isoliert aus
Hep-2	humane Epithelzellen
HeLa	humane Cervixcarcinomzellen

2.7. Standardmethoden und – reaktionen in der Molekularbiologie

Alle gentechnologischen Arbeitsschritte wurden nach den eingeführten molekularbiologischen Standardmethoden durchgeführt, wie sie z.B. in Sambrook et al. (1989) bzw. Ausubel (1992) niedergelegt sind. Reagenzien und Proben für die Durchführung enzymatischer Reaktionen wurden grundsätzlich auf Eis gekühlt und, sofern nicht anders angegeben, mit den mitgelieferten Puffersystemen der Hersteller angesetzt.

Wenn nicht anders angegeben, wurden folgende Standardmethoden nach „Molecular Cloning“ (Sambrook et al., 1989) und „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel 1992) angewandt:

- Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen
- Ligation und Subklonierung von DNA-Fragmenten
- Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA
- Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab (Minipräparation)
- Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren
- Agarose-Gelelektrophorese von DNA

2.8. Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren

2.8.1. Minipräparation von Plasmid-DNA

Diese Methode dient der schnellen Isolierung von kleinen Mengen Plasmid-DNA, wobei die Qualität der DNA für eine Restriktionsanalyse sowie für die Sequenzierung ausreichend ist. Für die Plasmid-Isolierung wurde das Minipräp Kit der Firma Sigma-Aldrich (München) verwendet. Fünf ml LB-Medium (mit 50µg/ml Antibiotikum) wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Aus 600µl der Kultur wurde mit 200µl Glycerin ein Stock angelegt und dieser bei -80°C aufbewahrt. Der Rest der Bakteriensuspension wurde bei 4000 x g für 10 min auf 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200µl Resuspensions-Lösung resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß transferiert. Der Aufbruch der Zellen erfolgte durch Zugabe von 200µl Lysispuffer. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur wurde die Suspension mit 350µl Neutralisierungspuffer pelletiert und der Überstand

durch eine Säule zentrifugiert. Die Säule wurde zweimal gewaschen und die DNA durch ein Zentrifugationsschritt mit 30µl Elutionpuffer gewonnen. Die Ausbeute an Plasmid-DNA betrug 10-15µg hochreiner Plasmid-DNA.

2.8.1.2. Maxipräparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA durch Säulenaffinitätschromatographie wurde der Maxipräp Kit der Firma Sigma-Aldrich (München) nach Herstellerangaben verwendet. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt und ihre Integrität im Agarosegel überprüft. Die mit dieser Methode isolierte Plasmid-DNA kann für Transfektionen von Zelllinien, Restriktionsanalysen, Hybridisierungsexperimente oder Sequenzierungen eingesetzt werden.

2.8.2. Isolierung von RNA

Zur RNA-Isolierung wurde der GenElute Mammalian Total RNA Kit der Firma Sigma Aldrich, München verwendet. 1×10^6 Zellen wurden trypsiniert, abzentrifugiert und das Zellpelett in Lysispuffer mit 10% Merkptoethanol aufgenommen.

Die Isolierung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers. Anschließend erfolgte ein DNase Verdau.

2.8.3. Konzentrationsbestimmungen von DNA und RNA

Die exakte Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren ist für die Durchführung der meisten molekularbiologischen Analysen unabdingbar. Die Konzentrationen wurden mit einem Spektralphotometer (Beckmann) gemessen. Nach Abgleichen der Nullwerte konnte das Absorptionsmaximum der gemessenen Nukleinsäuren (bei 260nm) bestimmt und gleichzeitig Verunreinigungen durch Proteine (bei 280nm) bzw. Salze (bei 230nm) festgelegt werden. Die Nukleinsäurekonzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$C(\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (E_{260} - E_{320}) \times F \times c$$

C = Konzentration der gemessenen Probe

E = Extinktion

F = Verdünnungsfaktor

c = Konzentration_{standard}/Extinktion_{standard}

Für doppelsträngige DNA: c=0,05μg/μl

Für einzelsträngige DNA: c=0,025μg/μl

Für RNA: c=0,04μg/μl

E₂₃₀ = Absorptionsmaximum von Salzen

E₂₆₀ = Absorptionsmaximum von DNA/RNA

E₂₈₀ = Absorptionsmaximum vieler Proteine

Durch eine zusätzliche Messung der Extinktion bei 280nm, dem Absorptionsmaximum der meisten Proteine, kann man den Quotienten E₂₆₀/E₂₈₀ berechnen, ein Maß für die Reinheit der DNA. Der Wert sollte etwa 1,8 - 2 betragen.

Für eine ungefähre Konzentrationsbestimmung wurde ein optischer Vergleich der Ethidiumbromidfluoreszenz von Probe und Standard-DNA im Agarosegel durchgeführt (Sambrook et al., 1989). Bei einer solchen Standard-DNA handelt es sich z.B. um einen DNA-Marker, der Banden bekannter Konzentration besitzt.

2.9. Enzymatische Modifikationen von DNA: Klonierungstechniken

2.9.1. Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen und hydrolysieren spezifische Nukleotidsequenzen von doppelsträngiger DNA (4-8bp). Die dabei entstehenden Enden können je nach Endonuklease 3`- bzw. 5`-überhängend (sticky ends) oder glatt (blunt ends) sein.

Die Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen erfolgte in einem Volumen von mindestens 20μl bei der enzymespezifischen Temperatur für 1-1,5 h, wobei pro μg DNA 5-10 U des jeweiligen Restriktionsenzym eingesetzt wurden. Für Doppelspaltungen wurde entweder ein für beide Enzyme geeigneter Puffer eingesetzt, oder es wurde nach Verdauung mit dem ersten Enzym die DNA ausgefällt, in H₂O gelöst und dann mit dem zweiten Restriktionsenzym geschnitten. Die so gespaltene

DNA wurde anschließend für weiterführende Analysen, wie z.B. gelelektrophoretische Auftrennungen und Isolierungen von DNA-Fragmenten verwendet.

2.9.2. Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierung der 5`-Enden linearisierter Vektor-DNA erhöht die Effizienz bei Klonierung eines DNA-Inserts in einen Vektor, indem sie die intramolekulare Religation der Vektor-DNA verhindert. Hierzu wurde alkalische Phosphatase aus Schrimps (SAP, Boehringer Mannheim) nach Angaben des Herstellers verwendet. Eingesetzt wurden 50 bis 100ng linearisierte Vektor-DNA und 1 U SAP in dem vom Hersteller gelieferten Puffer. Inkubiert wurde zur Dephosphorylierung für 10 min bei 37°C und zur Inaktivierung der SAP für 15 min bei 65°C. Die dephosphorylierte Vektor-DNA konnte ohne weitere Umpufferung in einer Ligation eingesetzt werden.

2.9.3. Ligation eines DNA-Fragmentes in einen Plasmid-Vektor

Die geschnittenen, isolierten und nötigenfalls dephosphorylierten DNA-Fragmente können direkt in die komplementären Restriktionsschnittstellen der Plasmid-DNA ligiert werden. Für den Ligationsansatz wurden 30ng Vektor-Plasmid-DNA, 30-120ng DNA-Insert, 10µl 2x Ligationspuffer und 1µl Quick Ligase eingesetzt. Der Ansatz wurde je nach Protokoll mit dem jeweiligen Vektor für 5 –10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.9.4. Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB-Flüssigkulturen im Schüttelinkubator oder auf LB-Agarplatten im Brutschrank bei 37°C.

LB-Flüssigmedium

1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) NaCl, pH 7

LB-Agarplatten

1,5% (w/v) Agar, 1% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl, pH 7

2.9.5. Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen mit RbCl wurde ausgehend von einer Einzelkolonie oder einem Aliquot einer Dauerkultur der zu transformierenden Zellen eine Übernachtskultur angelegt. Nach 16 h erfolgte eine Expansion der Übernachtskultur in 100ml LB-Medium. Bei Erreichen einer OD_{550nm} von 0,5 wurden die Zellen fünf Minuten auf Eis gekühlt und anschließend bei 3360g und 4°C für fünf Minuten pelletiert. Es erfolgte eine Resuspension des Pellets in 40ml 4°C kalter TFB1-Lösung und 30 min Inkubation auf Eis. Anschließend wurde das Pellet in 2ml TFB2- Puffer aufgenommen und für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Die nun chemisch kompetenten Zellen konnten zu 100µl aliquotiert und mit nur geringer Beeinträchtigung der Transformationseffizienz für mehrere Monate bei -80°C gelagert werden.

2.9.6. Transformation von Bakterien

(nach Hanahan, 1985)

Zur Transformation der Bakterien mit dem Plasmid wurden die kompetenten Zellen zunächst auf Eis langsam aufgetaut. Danach wurde der Ligationsansatz mit 25µl der kompetenten Bakterien gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 90 s bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden 150-200µl der transformierten Bakterien auf eine LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.10. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurden Agarosegele unterschiedlicher Konzentration verwendet. Die Konzentration richtete sich dabei nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente. Ausgenutzt wird bei diesem Verfahren, dass die DNA aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste in einem elektrischen Feld zur Anode wandert. Da das Verhältnis zwischen Ladung und Masse der DNA-Moleküle bei jeder Molekülgröße konstant ist, kann in einer reinen Pufferlösung keine Auftrennung erfolgen. Um eine Auftrennung der DNA-Moleküle nach ihrer Größe zu erreichen,

wurde eine Gelmatrix aus Agarose hergestellt. Gelöste Agarose bildet nach dem Abkühlen ein Netzwerk aus Zuckerketten, das je nach Agarosekonzentration fein- oder grobmaschiger ist. So wurde je nach aufzutrennender Fragmentgröße die Konzentration des Agarosegels festgelegt (Sambrook et al., 1989).

Konzentration (% w/v)	aufzutrennendes Fragment (kb)
0,3	5,0-60
0,6	1,0-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Die horizontale Gelelektrophorese wurde hauptsächlich zur Auftrennung restrigierter, rekombinanter DNA, zur Insertisolierung spezifischer DNA-Fragmente oder zur Kontrolle von PCR-Produkten verwendet. Dazu wurde die Agarose in 100ml 0,5 x TBE-Puffer durch Kochen gelöst, auf 60°C abgekühlt und nach Zusatz von 4µl Ethidiumbromid (10mg/ml) in die vorgefertigten Gelträger überführt. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, dessen flaches, mehrgliedriges Ringsystem zwischen benachbarten Basenpaaren interkaliert und so eine Sichtbarmachung unter UV-Licht ermöglicht. Nach vollständiger Verfestigung des Gels wurde die Elektrophorese in einer mit 0,5 x Laufpuffer gefüllten Gelkammer bei konstanter Voltzahl (6-8V/cm) durchgeführt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/5 Vol 5x Stopmix versehen, dessen Farbstoffe in unterschiedlichen Höhen laufen. Somit konnte schon während des Laufes die Geschwindigkeit kontrolliert werden, mit der die DNA-Moleküle das Gel durchlaufen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel bei kurzweiligem UV-Licht photographiert.

2.10.1. Längenstandards

Um die Größe der enzymatisch verdauten DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde parallel zu den DNA-Proben der „1kb DNA Ladder“-Längenstandard (NEB, Schwalbach) auf das Elektrophoresegel aufgetragen. Durch Vergleich der Bandenstärke von Längenstandard und DNA-Probe konnte zusätzlich die Konzentration der Probe abgeschätzt werden.

2.11. Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Die Isolierung von Restriktionsfragmenten aus einem Agarosegel erfolgte mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit. Die zu isolierende DNA-Bande wurde aus dem Gel geschnitten, das Gelstück gewogen und pro 100mg Gelstück 300µl Puffer A1 und 10µl Glasmilch zugegeben. Der Ansatz wurde 15 min bei 50°C inkubiert und dabei alle 2 min gemischt, um die Glasmilch in Suspension zu halten. Nach Anlagerung der DNA an die Glasmilch wurde der Reaktionsansatz für 30 s bei 12000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet einmal in 300µl Puffer A1 gewaschen, um Agarosereste und andere Kontaminationen zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet zweimal mit jeweils 300µl Puffer A2 gewaschen, danach der Überstand abgenommen, das Pellet getrocknet und in 30µl H₂O gelöst. Die DNA wurde für 5 min bei 50°C eluiert, der Ansatz abzentrifugiert und der Überstand mit der darin enthaltenen DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die typische Ausbeute an DNA-Fragmenten von 300bp lag bei ca. 70-80% (400bp, ca. 50%).

2.12. Methoden der „Polymerase Chain Reaction“ (PCR)

(Saiki et al., 1985)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine Methode, DNA in vitro enzymatisch zu amplifizieren (Mullis und Faloona, 1987). Es lassen sich so kleinste Mengen DNA vervielfältigen, wobei die zu amplifizierende DNA-Größe unter Standardbedingungen bis zu 3kb betragen kann.

Zwei synthetische Oligonukleotide, die den zu amplifizierenden Abschnitt der DNA flankieren, dienen als Primer. Außerdem wird eine hitzestabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* zugefügt (Taq-Polymerase) (Chien et al., 1976). Ausgenutzt wird hier die Eigenschaft der DNA-Polymerasen, einen Einzelstrang zum Doppelstrang polymerisieren zu können, wobei bei der Verwendung der Taq-Polymerase aufgrund ihrer hohen Hitzebeständigkeit die DNA thermisch zu Einzelsträngen denaturiert werden kann, ohne dass dabei das Enzym zerstört wird. Durch sich wiederholende Zyklen (Denaturierung der DNA, Annealing der Primer und Synthese des zweiten Stranges) wird der durch beide Primer begrenzte DNA-Abschnitt amplifiziert. Dabei dient jeder neu gebildete Strang als Matrize für die Synthese eines weiteren, wodurch ein exponentieller Anstieg der Menge des gewünschten DNA-Abschnitts erreicht wird.

2.12.1. PCR an Plasmid-DNA

Die Methode wurde gewählt, um DNA-Fragmente zu amplifizieren, die durch restriktionsenzymatische Spaltung nicht isoliert werden konnten. Dazu wurde folgender Ansatz pipettiert:

X	µl	Template-DNA (30-100ng)
10	pmol/µl	Primer 1 (sequenzspezifisch)
10	pmol/µl	Primer 2 (sequenzspezifisch)
0,5	mM	dNTPs
5	µl	Taq-Polymerase-Puffer (10x)
2,5	U	Taq-Polymerase (Roche)
ad 50	µl	H ₂ O

Die Anzahl der Zyklen, die einzelnen Temperaturschritte und die jeweilige Dauer der Zyklen mussten für jedes DNA-Fragment und für die dafür eingesetzten Primer ausgetestet werden. Der Reaktionsansatz wurde folgendem allgemeingültigen Programm im Thermocycler unterworfen:

30-60 s	94°C	Denaturierung
30-90 s	50-65°C	Annealing
30-90 s	72°C	Elongation

Vor Beginn des ersten Zyklus wurde 3-5 min bei 95°C denaturiert. Nach Abschluss der PCR wurde 1/10 des Ansatzes mit Stopmix 1 gemischt, je nach Größe des zu erwartendem PCR-Produktes auf ein 1-1,5%-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

2.12.3. „Reverse Transcriptase -PCR“ (RT-PCR)

(Kogan et al., 1987)

Die Methode der RT-PCR basiert auf der Umschreibung von mRNA in cDNA (Synthese der komplementären DNA) und einer anschließenden PCR. Mit Hilfe der RT-PCR können kleinste Transkriptmengen detektiert werden. Man nutzt in diesem Verfahren die Eigenschaften der reversen Transkriptase, einer aus RNA-Viren stammenden DNA-Polymerase, die einzelsträngige mRNA als Matrize verwendet und von dieser eine DNA-Kopie herstellt. Diese cDNA dient als Matrize in der darauffolgenden PCR-Reaktion. Zu 1-2µg Gesamt-RNA wurden folgende Komponenten hinzugefügt:

2 µl	RT-Puffer
2 µl	dNTPs
2 µl	Oligo-dT-Primer
1 µl	Rnase Inhibitor
1 µl	Omniscript Reverse Transkriptase (Qiagen)
10 µl	H ₂ O
20µl	Gesamtansatz

Der Reaktionsansatz wurde 60 min bei 37°C inkubiert. Nach der cDNA Synthese wurden 100ng davon für eine PCR eingesetzt.

2.12.4. Real-Time PCR

Real-Time PCR Reaktionen wurden mit dem LightCycler 1.5 (Roche, Mannheim) durchgeführt. Die Real-Time PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, bietet aber zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung. Dem PCR-Ansatz wird der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green zugesetzt. Somit lässt sich bei jedem PCR-Zyklus der PCR der Anstieg der Fluoreszenz als Maß für die Produktentstehung verfolgen (daher „Echtzeit“-PCR) was eine Quantifizierung möglich macht. Die Daten über den Anstieg der Fluoreszenz bei der PCR-Reaktion lässt auf die Ausgangsmenge der amplifizierten Sequenz schließen. Dazu wird die Anzahl der Temperaturzyklen (C_t -Wert) bestimmt, ab der die Fluoreszenz einen definierten Wert innerhalb der exponentiellen Phase der Reaktion übersteigt (Gibson et al. 1996).

Je höher der C_t -Wert beispielsweise ist, je mehr Zyklen also notwendig sind, um den einer bestimmten Produktmenge entsprechenden Fluoreszenzwert zu erreichen, desto geringer war die Ausgangsmenge der amplifizierten DNA.

Um die unterschiedlichen Mengen verschiedener cDNAs vergleichend quantifizieren zu können, muss die Effizienz der Reaktionen mit den unterschiedlichen Primerpaaren identisch sein.

Ein Störfaktor ist die nicht direkt messbare Effizienz der vorangegangenen cDNA-Synthese. Um hier ein einheitliches Maß zu bekommen, wurden die C_t -Werte auf interne Standards bezogen. Dieser Standard muss ein stabiles Expressionsniveau in den zu untersuchenden Geweben oder Zuständen zeigen. Als interner Standard wurde das konstitutiv transkribierte Gen G3PDH verwendet.

Nach erfolgter PCR kann eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden, mit der die Spezifität des Produktes bestimmt werden kann. Dabei wird die DNA durch langsamen Temperaturanstieg aufgeschmolzen. Wird die spezifische Schmelztemperatur des jeweiligen Fragmentes erreicht, trennt sich der Doppelstrang und der Fluoreszenzfarbstoff wird freigesetzt. Durch Vergleich der crossing points können die Fragmente quantifiziert werden. Da Primerdimere einen niedrigeren Schmelzpunkt als doppelsträngige DNA haben, können sie vom spezifischen Produkt unterschieden werden.

Für die Real-Time PCR wurde folgender Ansatz pipettiert:

X	µl	cDNA (100ng)
10	pmol/µl	Primer1 (sequenzspezifisch)
10	pmol/µl	Primer2 (sequenzspezifisch)
4	µl	Enzym-Mix
ad	20µl	H ₂ O

Die Anzahl der Zyklen schwankte zwischen 30 und 40. Die Zyklenzahl, die einzelnen Temperaturschritte und die jeweilige Dauer der Zyklen mussten für jedes DNA-Fragment und für die dafür eingesetzten Primer ausgetestet werden. Der Reaktionsansatz wurde folgendem allgemeingültigen Programm im Light-Cycler unterworfen:

10 min	94°C	initialer Denaturierungsschritt (Aktivierung Taq-Pol)
30-60 s	94°C	Denaturierung
15-30 s	50-65°C	Annealing
20-30 s	72°C	Elongation

2.13. Zellbiologische Methoden

2.13.1. Kultivierung von Säugerzellen

Die adhären wachsende Zelllinie HEp2 wurde in MEM (eagle) Medium mit Earle`s Salzen (Biochrom, Berlin) mit Zusatz von 2mM L-Glutamin, 1x nicht essentiellen Aminosäuren, 2,5µg/ml Amphotericin, 25µg/ml Gentamycin, 2,5µg/ml Vancomycin und 10% FKS in 80 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 5% CO₂ und 37°C. In Abhängigkeit von der Proliferationsrate wurden die Zellen ein- bis zweimal pro Woche geteilt. Die Zellen wurden dazu 1 x mit EDTA Versen gewaschen und mit 0,25% (w/v) Trypsin in PBS abgelöst. Die Zellen wurden bei 400g für 5 min pelletiert, anschließend in frischem Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Zur Langzeitaufbewahrung wurden 2-3 x 10⁶ Zellen

in 1 –2ml selbst hergestelltem Einfriermedium aus Vollmedium (siehe oben) und 10% DMSO resuspendiert und in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.13.2. Kultivierung von *Chlamydomonas reinhardtii* AR39

In 6-Wellplatten kultivierte HEp2-Zellen ($1-1,5 \times 10^6$ Zellen pro Well) wurden mit *Chlamydomonas reinhardtii* AR39 infiziert. Zur Verbesserung der Infektionsrate erfolgte nach Zusatz von 1ml Chlamydien-Suspension (etwa $5 \times 10^6 - 5 \times 10^7$ Chlamydien je ml) pro Well eine Zentrifugation bei 2289g und 35°C für 45 min. Die Platten wurden bei 35°C unter 5% CO₂-Begasung in cycloheximidhaltigem Cpn-Kulturmedium für drei Tage inkubiert. Cycloheximid hemmt hierbei die Proteinsynthese der Wirtszellen und verschafft damit den Chlamydien einen Wachstumsvorteil.

72 h nach Infektionsbeginn wurde der Zellrasen mit einem sterilen Zellschaber vom Boden des Kulturgefäßes gelöst. Die entstandene Suspension wurde mittels einer großlumigen Kanüle (0,9mm Durchmesser) in einer Spritze aufgenommen und durch eine enge Kanüle mit 0,45mm Durchmesser in ein steriles 50ml Zellkulturröhrchen überführt. Durch die bei dieser Behandlung auf die Zellen einwirkenden Scherkräfte erfolgte eine Freisetzung der Chlamydien aus noch nicht lysierten Zellen. Anschließend wurde der Zelldetritus durch zehnminütiges Zentrifugieren bei 800g und 35°C pelletiert. Der die Chlamydien enthaltende Überstand diente zur erneuten Infektion von HEp2 Zellen. Bei hohen Infektionsdosen (mehr als etwa 1×10^7 Chlamydien pro Well) im vorangegangenen Zyklus erfolgte eine 1:10 Verdünnung des Chlamydien-Überstandes in Cpn-Kulturmedium.

2.13.3. Langzeitlagerung von *Chlamydomonas reinhardtii* AR39

Zur Langzeitlagerung wurde die nach 2.13.2. gewonnene Chlamydien-Suspension mit 10% FKS versetzt und in Kyroröhrchen bei –80°C gelagert.

2.13.4. Konzentrationsbestimmung von *Chlamydomonas reinhardtii* AR39

Die Konzentrationsbestimmung von *C. pneumoniae* in einer Chlamydien-Suspension erfolgte über Giemsa-Färbung infizierter Zellen und Auszählung der Einschlusskörper. Hierzu wurden 2×10^5 HEp-2-Zellen pro Well in eine 24-Wellplatte eingesät und mit 300µl verschiedener Verdünnungsstufen (unverdünnt, 1:10; 1:100; und 1:200) des Chlamydien-Überstandes infiziert. 48 bis 52 h nach Infektionsbeginn wurden die Zellen mit eiskaltem Methanol (-20°C) für 10 min fixiert und nach Trocknen an der Luft mit 1:10 in H₂O verdünnter Giemsa-Lösung für 30 min gefärbt. Nach sich daran anschließenden Waschschritten konnte die Anzahl der Einschlusskörper je 100 HEp-2-Zellen ausgezählt werden. Hieraus ließ sich die Konzentration der Chlamydien in der zur Infektion verwendeten Chlamydien-Suspension in ifu/ml (inclusion forming units) bestimmen.

2.13.5. Transfektion eukaryontischer Zellen

Das Prinzip der Transfektion beruht auf der Bildung eines DNA-Transfektionsreagenz-Komplexes, bei dem sich die DNA vom amphotropen Transfektionsreagenz umhüllt an die Oberfläche der Zellen anlagert und auf noch nicht genau bekanntem Weg in die Zellen gelangen kann. Die für die Transfektion vorgesehenen Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion trypsinisiert, die Zellzahl bestimmt und mit einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen pro 12 Well-Platte ausplattiert. Bei einer Konfluenz von 80% wurden die Zellen einmal gewaschen. 2µg des jeweiligen Konstruktes wurden mit 4µl des Transfektionsreagenz Jet Pei (Biomol) für 25 min in 150mM NaCl zur Komplexbildung inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Abhängig von der Toxizität des Transfektionsreagenz wurden die Zellen nach 1,5 – 3,5 h gewaschen. Die Zellen wurden 24 – 48 h inkubiert, und anschließend für weitere Analysen verwendet.

2.13.5.1. Stabile Transfektion eukaryontischer Zellen

Für die Generierung von HeLa-Zellklonen, die Cpn0712 stabil exprimieren, wurden Zellen mit einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen pro 12 Well-Platte ausgesät. Nach 24 h wurde dann nach Angaben des Herstellersprotokolls mit dem jeweiligen Transfektionsreagenz transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde das Medium gegen Selektionsmedium ausgetauscht. Dabei wurde in diesem Fall als Selektionsantibiotikum Geneticin (G418) in einer Endkonzentration von $400 \mu\text{g/ml}$ im herkömmlichen Zellkulturmedium verwendet. Das Selektionsmedium wurde alle drei Tage gewechselt bis makroskopische Zellhaufen zu sehen waren. Diese wurden mit einer Spitze abgelöst, die Zellzahl bestimmt und in 96 Well-Platten vereinzelt. Dabei wurde der Selektionsdruck aufrechterhalten. Um den Anteil der transfizierten Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 90% mittels FACS-Analyse untersucht und die Proben, die Cpn0712 exprimierten, weiter selektioniert.

2.13.6. Herstellung von Zellextrakten

Von den Zellen wurde 48 h nach der Transfektion das Medium abgesaugt, einmal mit EDTA gewaschen und die Zellen anschließend mit je $500 \mu\text{l}$ Trypsin lysiert. Das Zelllysat wurde in Eppendorfgeläße überführt und für weitere Analysen verwendet.

2.13.7. β -Galactosidase-Färbung

Die β -Galaktosidase-Färbung diente der Bestimmung der Transfektionseffizienz und erfolgte durch eine enzymatische Färbereaktion durch das LacZ Gen des Kontrollvektors. Dafür wurde von den transfizierten Zellen das Medium abgezogen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 10 min mit Fixierlösung inkubiert. Nach einmaligen Waschen in PBS wurden die Zellen mit x-Gal-Färbelösung versetzt und für 1 bis 3 h im Dunkeln inkubiert. Die transfizierten Zellen erschienen danach blau.

2.13.8. Analyse von transfizierten HeLa-Zellen mittels Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Die FACS-Analyse wurde benutzt, um Cpn0712 exprimierende Zellklone zu detektieren. Dafür wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Well in eine 96 Well-Platte mit V-Boden überführt. Nach zweimaligen Waschen mit FACS-Puffer, wurden die Zellen 10 min auf Eis mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Um die Zellmembran zu permeabilisieren, wurden die Zellen anschließend 20 min bei 4°C in FACS-Puffer mit Saponin inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper für 1 h. Nach zweimaligen Waschen in FACS-Puffer mit 0,1% Saponin und 0,2% Gelatine wurden die Zellen für 30 min mit dem Zweitantikörper inkubiert. Nach erneuten Waschen wurden die Zellen mit 100µl FACS-FIX-Puffer in FACS-Röhrchen überführt, in denen bereits jeweils 200µl FACS-FIX-Puffer vorgelegt wurden. Anschließend erfolgte die Auszählung der Zellen im FACS-Gerät.

2.13.9. Caspase-Assay

Zum Nachweis der Caspase 3 Aktivität wurden HeLa-Zellen transfiziert und 24 h später für 4 h mit 1µM Staurosporin inkubiert. Anschließend erfolgte die Trypsinierung der Zellen. Das gewaschene und für 15 min in 40µl NP40 Lysispuffer inkubierte Zelllysate wurde zentrifugiert und 10µl des Überstandes zu 90µl DEVD Assaypuffer gegeben. Die Reaktionen wurden für 1 h bei 37°C in 96 Wellplatten inkubiert. Freies AMC wurde in der Wellenlänge 380 nm (Excitation) und 460 nm (Emission) gemessen. Die Werte repräsentieren relative Fluoreszenzeinheiten.

2.14. Proteinchemische Methoden

2.14.1. Expression und Reinigung eines rekombinanten His₆-tag-Fusionsproteins

Zur Expression des rekombinanten Proteins rCpn0708 wurde eine Vorkultur des den entsprechenden Expressionsvektor tragenden *E. coli*-Stammes in LB-Selektionsmedium über Nacht bei 37°C kultiviert. Am folgenden Tag wurde die Vorkultur 1:100 in LB-

Selektionsmedium verdünnt und bei 37°C inkubiert. Für Vorversuche betrug das Kulturvolumen 10ml, für die Gewinnung größerer Mengen des rekombinanten Proteins 1000 bis 1400ml. Bei Erreichen einer OD_{550 nm} von 0,5 erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 0,5mM. In den Vorversuchen wurde für weitere 3,5 bis 6 h, in präparativen Versuchen für 3,5 bis 4 h bei 37°C inkubiert. Schließlich wurde der Kultur einer OD_{550 nm} von 1 entsprechendes Aliquot entnommen und zusammen mit einer vor Induktion entnommen Probe mittels Western Blot und Coomassie-Färbung analysiert. Die restliche Kultur wurde bei 3360g und 4°C für 10 Minuten pelletiert und bei -20°C gelagert.

2.14.2. Enzymatische Lyse von *Escherichia coli*

Zur Aufarbeitung größerer Mengen des in *E. coli* exprimierten rekombinanten Proteins wurden die Bakterien mit Lysozym lysiert. Hierzu wurden die pelletierten Zellen aus einem 250ml Kulturvolumen in 10ml Lysispuffer resuspendiert und in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Nacheinander wurden Lysozym (Endkonzentration 200µg/ml), Triton X-100 (Endkonzentration 1% (v/v)) und NaCl-Lösung (Endkonzentration 0,2M) zugegeben. Nach jeder Zugabe erfolgte eine Inkubation auf Eis für 10 min. Schließlich wurden lösliche und unlösliche Fraktion durch Zentrifugation bei 150.000g und 4°C für 40 min getrennt. Der Überstand mit der löslichen Proteinfraction wurde sorgfältig abgenommen und aufgereinigt bzw. mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Sollte das Pellet mit der unlöslichen Proteinfraction ebenfalls analysiert werden, so wurde es zuvor in 8M Harnstofflösung aufgeköcht.

2.14.3. Prinzip der Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose

Das rekombinante Protein trägt am N-Terminus ein His-tag. Diese sechs Histidin-Moleküle bilden eine Struktur aus, die sich über die stickstoffhaltige Ringstruktur des Histidins an positiv geladene Metallionen wie z.B. Ni²⁺ über Chelatbindungen anlagern kann. Zur Aufreinigung des rekombinanten Proteins wird an eine Sepharosematrix gebundene Nitrilotriessigsäure (NTA) verwendet. Die an Sepharose gebundene NTA-

Gruppe bildet einen Chelatkomplex mit einem Ni^{2+} -Ion aus und bindet dabei das Ni^{2+} -Ion über vier seiner sechs Koordinationsstellen. An die zwei verbleibenden Koordinationsstellen des Ni^{2+} -Ions können sich zwei Histidin-Moleküle des His-tags anlagern und so das aufzureinigende rekombinante Protein an die Ni-NTA-Matrix binden. Zur Elution des rekombinanten Proteins können die Histidin-Reste durch Imidazol, welches die gleiche stickstoffhaltige Ringstruktur wie Histidin besitzt, von der Ni-NTA-Matrix verdrängt werden.

2.14.4. Aufreinigung des rekombinanten His-tag-Fusionsproteins mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose

Zur Aufreinigung des rekombinanten Proteins wurde die lösliche Fraktion des Lysats der *E. coli*-Kultur mit 500 μl Ni-NTA-Suspension (Qiagen) versetzt und zur Bindung des rekombinanten Proteins an die Ni-NTA-Matrix über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Ni-NTA-Matrix in eine Säulenhülle überführt und mit 20ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution des rekombinanten Proteins erfolgte mit Lösungen ansteigender Imidazolkonzentration von 20 bis 250mM oder als Stoßelution mit 250mM Imidazolösung. Zur Stoßelution wurde die Ni-NTA-Matrix nach Überführung in ein Eppendorf-Cup in 500 μl Elutionspuffer aufgenommen und für 30 min bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Danach konnte das nun im Elutionspuffer gelöste rekombinante Protein durch Zentrifugation von der Ni-NTA-Matrix getrennt werden. Zur Steigerung der Ausbeute wurde dieser Schritt mehrmals durchgeführt.

Es folgte eine Analyse von 20 μl des Durchlaufs und der Waschlösung und 5 μl der Eluatfraktionen mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung bzw. Western Blot.

2.14.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen zur weiteren Analyse erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Die im Probenauftragspuffer enthaltene reduzierende Verbindung Dithiothreitol (DTT) spaltet Disulfidbrücken der aufzutrennenden Proteine. Das

Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich über seine ungeladene Kohlenwasserstoffkette in einem festen Massenverhältnis (etwa ein Molekül SDS auf zwei Aminosäurenreste) an und löst intramolekulare nichtkovalente Bindungen. Gemeinsam lösen DTT und SDS Sekundärstrukturen und erreichen die Dissoziation und Solubilisierung komplexer Proteine.

Das anionische Detergenz SDS bewirkt darüber hinaus eine Überdeckung der Eigenladung von Proteinen. Es entstehen Mizellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit, so dass eine elektrophoretische Auftrennung nach Molekülgröße möglich wird. Hierbei wandern die SDS-Proteinkomplexe im elektrischen Feld zur Anode.

Die diskontinuierliche SDS-PAGE bewirkt eine hohe Trennschärfe der Banden. Es kommt ein zweiphasiges, vertikales Gelsystem, bestehend aus Trenngel und Sammelgel, zum Einsatz. Diskontinuität besteht sowohl bezüglich der pH-Werte als auch der Porengröße von Trenn- und Sammelgel. Der pH-Wert des weitporigen Sammelgels liegt mit einem Wert von 6,8 sehr nahe am isoelektrischen Punkt von Glycin. Dadurch besitzt das Glycin eine sehr geringe elektrophoretische Mobilität im Sammelgel. Die Chloridionen besitzen sowohl im Sammel- als auch im Trenngel eine hohe elektrophoretische Mobilität, die Proteine liegen in der Mobilität zwischen Chloridionen und Glycin. Im Bereich der Ionen mit geringer Mobilität stellt sich eine niedrige elektrische Feldstärke, im Bereich derer mit hoher Mobilität eine hohe elektrische Feldstärke ein. Dadurch laufen die Proteine im Sammelgel durch einen Feldstärkegradienten. Am Übergang zum engmaschigen Trenngel erfahren die Proteine einen hohen Widerstand, ihre Wanderung wird dadurch abrupt verlangsamt. Durch diese Effekte werden die Proteine am Beginn des Trenngels konzentriert, es kommt zu einer Zonenschärfung. Das niedermolekulare Glycin kann ohne größeren Widerstand die Grenze zum Trenngel überwinden, besitzt in diesem bei einem pH-Wert von 8,8 eine viel höhere Mobilität als im Sammelgel und überholt die Proteine. Im Trenngel wirkt auf alle Proteine die gleiche Feldstärke, wodurch eine Auftrennung nach der molekularen Größe erreicht wird.

Zum Herstellen des diskontinuierlichen Gelsystems wurde in einer vertikalen Gelapparatur (BioRad) zuerst ein Trenngel mit 10 bis 15% (w/v) Acrylamid und einem pH-Wert von 8,8 gegossen und zur Ausbildung eines glatten Abschlusses mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Acrylamids und Entfernung des Isopropanols wurde auf das Trenngel ein 4,4% (w/v) Acrylamid enthaltendes

Sammelgel (pH=6,8) gegossen. Ein luftblasenfrei eingesetzter Kamm formte Auftragstaschen.

Die zu analysierenden Proteine wurden mit denaturierenden 4× Probenauftragspuffer für fünf bis zehn Minuten auf 96°C erhitzt. Nach vollständiger Polymerisation des Acrylamids wurden die Proben und ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 bis 35mA in Laemmli-Laufpuffer für etwa 90 min, bis der gewünschte Grad der Auftrennung erreicht wurde.

Trenngel

12–15% (w/v) Acrylamid (Acrylamid:Bis-Acrylamid 37,5:1), 0,2% (w/v) SDS, 375mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,04% (w/v) APS, 0,2% (v/v) Temed.

Sammelgel

4,4% (w/v) Acrylamid (Acrylamid:Bis-Acrylamid 37,5:1), 0,2% (w/v) SDS, 125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,05% (w/v) APS, 0,4% (w/v) Temed, 0,004% (w/v) Bromphenolblau.

2.14.6. Coomassie-Färbung

Sollten Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen sichtbar gemacht werden, so wurden sie Coomassie-gefärbt (Weber et al., 1972). Die SDS-Polyacrylamidgele wurden hierbei nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung für eine Stunde bei Raumtemperatur in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation in Coomassie-Entfärbelösung, bis der Hintergrund von Farbrückständen befreit war. Zur Aufbewahrung wurden die Coomassie-gefärbten Gele zwischen zwei angefeuchteten Einmachfolien in einer Halteapparatur eingespannt und mehrere Tage getrocknet.

2.14.7. Western Blot

Der spezifische Nachweis von Proteinen konnte mittels Western Blot erreicht werden. Hierzu erfolgte zunächst ein Transfer der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine im Elektrobplotverfahren auf eine PVDF-Membran. Anschließend konnten die

nachzuweisenden Proteine durch Immundetektion unter Verwendung spezifischer Antikörper auf der Membran sichtbar gemacht werden.

2.14.8. Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran

Zur weiteren Analyse wurden Proteine nach Auftrennung durch SDS-PAGE im halbtrockenen, diskontinuierlichen Elektrophoretungsverfahren (modifiziert nach Kyse-Andersen, 1984) auf Polyvinylidendifluorid-(PVDF-)Membranen übertragen. Dieses Verfahren wird als halbtrocken bezeichnet, weil der Transfer nicht in einer mit Puffer gefüllten Wanne, sondern mittels mit Pufferlösung getränkter Whatman-Filterpapiere stattfindet. Wie auch bei der SDS-PAGE wurde ein diskontinuierliches System verwendet: durch Einsatz eines Systems zweier Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten erfolgt eine Konzentrierung der Proteine im Bereich der PVDF-Membran.

In einer Apparatur für das halbtrockene Elektrophoretungsverfahren von Biometra (Göttingen) wurde die Transfereinheit wie folgt luftblasenfrei aufgebaut:

Graphit-Anode, angefeuchtet mit Bidest

6 Filterpapiere, getränkt in 300mM Tris-HCl, pH 10,4, 20% (v/v) Methanol

3 Filterpapiere, getränkt in 25mM Tris-HCl, pH 10,4, 20% (v/v) Methanol

PVDF-Membran, in 100% (v/v) Methanol

SDS-PA-Gel

9 Filterpapiere, getränkt in 40mM 6-Aminocapronsäure, pH 7,6, 20% (v/v) Methanol

Graphit-Kathode, angefeuchtet mit Bidest

Der Proteintransfer erfolgte bei einem konstanten Stromfluss von 0,8mA pro 1 cm² Transferfläche für 90 min.

2.14.9. Immundetektion

Der spezifische Nachweis auf PVDF-Membranen transferierter Proteine erfolgte mittels Immundetektion. Hierzu wurden zunächst die freien, unspezifischen Bindungsstellen der PVDF-Membran durch halbstündige Inkubation in Blockierlösung bei Raumtemperatur abgesättigt. Danach erfolgte eine Inkubation mit dem in Waschlösung verdünnten Primärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei

4°C bei Verwendung von polyklonalen Antisera. Nach dreimaligem Waschen in Waschlösung wurde die Membran für eine Stunde mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten, Alkalische - Phosphatase- (AP-) konjugierten Sekundärantikörper inkubiert und erneut dreimalig gewaschen. Im Anschluss erfolgten die Äquilibrierung der Membran mit auf 37°C vorgewärmtem Substratpuffer und schließlich die Entwicklung in NBT/X-Phosphat-Lösung. Nachdem sich Signale zeigten, wurde die Färbereaktion durch Waschen mit H₂O gestoppt und die Membran getrocknet.

2.14.10. Quantitative Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen (Lowry et al., 1951) erfolgte unter Verwendung des BCA Protein Assay Kits (Pierce) nach Angaben des Herstellers.

2.14.11. Immunfluoreszenztest

Der Nachweis von Cpn0708 und Cpn0712 auf Einzelzellebene erfolgte mittels Immunfluoreszenztests (IFT). HEp-2-Zellen wurden auf 13mm durchmessende Glasplättchen in 24-Wellplatten eingesät und nach Anwachsen der Zellen mit *C. pneumoniae* infiziert und bei 35°C inkubiert.

Für den Immunfluoreszenztest wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und mit 4% (w/v) Paraformaldehyd (Pfa) in PBS für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend erfolgte ein Permeabilisieren der Zellen mit 0,25% (v/v) Triton X-100 in PBS für 15 min bei Raumtemperatur und ein Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit 1% (w/v) BSA in PBS über Nacht. Die Zellen wurden dann mit in Blockierlösung verdünntem Primärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für je 10 min wurde mit Fluoreszenzfarbstoff (DTAF, Cy2 oder Cy3) konjugiertem Sekundärantikörper unter Lichtausschluss für eine weitere Stunde inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Glasplättchen kurz in entmineralisiertes Wasser getaucht und mit 10µl Mowiol je Glasplättchen auf Objektträger gebracht. Nach Trocknen über Nacht bei 4°C konnten die Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

2.14.12. Proteinextraktion aus *Chlamydomonas reinhardtii* infizierten HEp-2-Zellen

Für Expressionsanalysen wurde ein mit *Chlamydomonas reinhardtii* infizierter HEp-2-Zellrasen mittels eines Zellschabers vom Boden des Kulturgefäßes gelöst. Mittels Passage durch eine englumige Kanüle (0,45mm Durchmesser) erfolgte eine Lyse der Zellen. Die unlösliche Fraktion des Zelllysats wurde durch Zentrifugation bei 830g für 10 min von der löslichen getrennt. Bestandteile der löslichen Fraktion wurden bei 16 000g für 10 min sedimentiert. Die gewonnenen Proben wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Vor Analyse durch SDS-PAGE und Western Blot wurden die Proben in PBS/0,1% (v/v) Triton X-100 aufgenommen, mit 4× Proteinauftragspuffer versetzt und bei 99°C für 5 min inkubiert.

2.14.13. KLH-Kopplung

Um die Antigenität eines Peptids zu erreichen, muss dieses an Träger gekoppelt werden. Als Träger dient das Glycoprotein KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin), welches aufgrund seines hohen Molekulargewichts (45kDa pro Monomer) und seiner starken Immunität besonders geeignet ist.

Zunächst wurden die freien SH-Gruppen des KLH blockiert. Dazu wurden 10mg des pulverisierten KLH in 1ml H₂O gelöst und mit 37,5µl einer 1%igen (w/v) Ethylmaleimid-Lösung versetzt. Anschließend erfolgte die Dialyse gegen 50mM Phosphatpuffer pH 7,5. Für die Kopplung wurde der bifunktionelle Crosslinker SMCC verwendet. SMCC besitzt eine SH-negative Maleimidgruppe sowie eine N-Hydroxysuccinimidgruppe zur Kopplung an primäre Amine. 2,5mg SMCC-Sulfo wurden in 1ml Phosphat-Puffer gelöst und 0,5ml davon zu 1ml der KLH-Lösung gegeben. Es wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die SMCC-KLH-Lösung auf eine mit 50mM Phosphatpuffer, pH 6,8 äquilibrierte PD-10-Säule aufgetragen und in 0,5ml Fraktionen eluiert. Die Identifizierung der KLH-Fraktionen fand über einen Mikrotiterplatten-Bradford-Test statt (20µl Bradford, 60µl PBS, 20µl Probe). Jeweils die ersten drei positiven Fraktionen wurden vereinigt und bei einer OD von 280nm im Photometer gemessen. Im Anschluss daran erfolgte die

Kopplung an das Peptid. Dazu wurden 5mg des Peptids in 1ml Phosphat-Puffer (pH 6,8) gelöst und mit 5mg des KLH-SMCC gekoppelt, indem das KLH-SMCC vorgelegt und das Peptid tropfenweise dazugegeben wurde. Zwischendurch wurde die Probe mittels Vortexen gut gemischt und dann 2,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Dialyse gegen PBS und die Lagerung bei -20°C .

2.14.14. Generierung eines polyklonalen Antiserums

Zur Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen Cpn0708 und Cpn0712 wurden Kaninchen mit dem rekombinanten His₆-tag-Fusionsprotein bzw. mit dem KLH gekoppelten Peptid immunisiert.

Ein Fläschchen des Adjuvans ABM-S (Antibody-Multiplier spezial, Linaris) wurde nach Angaben des Herstellers mit 250 μg des rekombinanten Proteins in 2ml PBS rekonstituiert. Es erfolgte eine subkutane Injektion von 1ml dieser Emulsion an mehreren Applikationsstellen auf dem Rücken des Kaninchens. In Abstand von zwei Wochen wurde je ein Fläschchen ABM-N (Antibody-Multiplier normal, Linaris) in 1ml PBS rekonstituiert. 500 μl des Adjuvans wurden mit 100 μg rekombinantes Protein in 500 μl Elutionspuffer versetzt und zur zweiten Nachboosterung eingesetzt. Eine dritte Boosterung erfolgte nach weiteren zwei Wochen.

Sechs Wochen nach Erstimmunisierung erfolgte die Abnahme von 10ml Blut aus der Ohrarterie des Kaninchens. Zur Koagulation wurde das Blut über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 3360g und 4°C für 10 min konnte das Serum abgenommen, 1:1 mit Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert werden.

2.14.15. Affinitätsreinigung eines polyklonalen Antiserums

Die nach Immunisierung der Kaninchen gewonnenen polyklonalen Antiseren sollten zum Nachweis von nativen Cpn0708 bzw. Cpn0712 in Western-Blot- und Immunfluoreszenz-Analysen in mit *C. pneumoniae* infizierten HEp-2-Zellen eingesetzt werden. Zur Verringerung von Kreuzreaktionen mit Epitopen der HEp-2-Zellen wurden die Antiseren an HEp-2-Zelllysate präabsorbiert.

Zur Gewinnung des Zelllysats wurden HEP-2-Zellen in mehreren 180 cm²-Zellkulturflaschen bis zur Konfluenz kultiviert und nach Abziehen des Mediums mit EDTA-Lösung gewaschen. Die Zellen wurden in Lysispuffer (2,5ml je Flasche) unter Zuhilfenahme eines Zellschabers aufgenommen und über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die unlösliche Fraktion wurde nach einem Zentrifugationsschritt durch Dekantieren von der löslichen Fraktion getrennt und für eine Stunde im kochenden Wasserbad inkubiert. Nach Vereinigung beider Fraktionen erfolgte eine Bestimmung der Proteinkonzentration. Das Lysat wurde mit 4× Proteinauftragspuffer versetzt, für 10 min bei 99°C inkubiert und in eine SDS-PAGE eingesetzt. Je Gel wurde etwa 0,3mg HEP-2-Zelllysate aufgetragen und anschließend in einem Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert.

Über Nacht erfolgte die Inkubation der PVDF-Membran mit 12ml des 1:50 verdünnten Antiserums. Dieses Vorgehen wurde sechsmal wiederholt, um eine hinreichende Abminderung der mit HEP-2-Zellen kreuzreagierenden Antikörper zu erreichen.

2.15. Methode Mikroarray

Der Mikroarray beruht auf der Hybridisierung komplementärer Nucleinsäuren. Dabei können zwei unterschiedliche RNA-Pools direkt miteinander verglichen werden, da beide mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden.

2.15.1. RNA-Isolierung

Die RNA wurde aus mit *cpn0712*- und Vektor-transfizierten Zellen mit Hilfe des Qiagens RNeasy Kits isoliert. Zur Entfernung von Resten von genomischer DNA erfolgte anschließend eine DNase I Behandlung. Die Konzentration der erhaltenen RNA wurde spektrometrisch mit einem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer ermittelt. Die Qualitätsbestimmung erfolgte durch Analyse mit einem Agilent Bioanalyser 2100 Expert. Zur Bewertung wurde das resultierende Elektropherogramm und der erzielte RIN (RNA Integrity Number) Wert herangezogen.

Die zur Hybridisierung notwendigen farbige markierten DNA-Fragmente wurden mit dem SMART Fluorescence Probe Amplification Kit von BD Biosciences hergestellt.

2.15.2. Transkription zu Einzelstrang DNA

Während der RNA Transkription wurde in die entstehende Einzelstrang DNA am 5`- und 3`- Ende eine zusätzliche Oligonukleotidsequenz angefügt. Die Mutterstrang RNA wurde anschließend durch alkalische Hydrolyse zerstört, das Einzelstrang DNA-Template über eine Silika-Säule (Qiagen PCR Quick Kit) aufgereinigt.

2.15.3. Doppelstrang-DNA-Synthese

Aus der Einzelstrang-DNA wurde durch PCR-Amplifikation die zum Hybridisieren notwendige Menge an Doppelstrang-DNA erzeugt. Dazu wurde ausgenutzt, dass die Basenabfolge an den Enden des DNA-Templates bekannt ist. Abweichend vom BD Biosciences SMART Protokoll wurde dabei eine Amplifikationsreaktion je Probe zur Überwachung des Amplifikationsfortschritts verwendet. So wurde sichergestellt, dass zum Einen genügend Doppelstrang-DNA erhalten, zum Anderen aber im exponentiellen Bereich gearbeitet wurde. Die Aufreinigung der Doppelstrang-DNA erfolgte über eine Qiagen PCR Quick Säule.

2.15.4. Aminoallylmodifizierung der DNA

Die erhaltene Doppelstrang-DNA wurde anschließend in einer weiteren PCR-Reaktion durch den Einbau von Aminoallyl-dUTP analogen modifiziert. Da hierzu N18-Randomere verwendet wurden, wurde die entstehende Tochter-DNA gleichzeitig fragmentiert und damit die Spezifität der späteren Hybridisierung erhöht.

2.15.5. Farbstoffmarkierung der DNA

An die aminoallyl-modifizierte DNA wurden durch chemische Kopplung aktivierte Cy-Farbstoffe (Cy3/5, Amersham) gebunden. Nicht gebundene Farbstoffe wurden durch Fällung der DNA abgetrennt, die markierte DNA anschließend mit einer Qiagen PCR Quick Säule aufgereinigt. Die Messung der Farbstoffabsorption und die Bestimmung

der Farbstoffinkorporationsrate je μg DNA erfolgte anschließend mit einem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer.

2.15.6. Hybridisierung der farbstoffmarkierten DNA mit komplementären Oligonukleotiden auf Array

Zur Hybridisierung wurden die zu vergleichenden Proben mit unterschiedlicher Farbmarkierung gemischt. Je Array (Agilent Whole Genome Oligo Microarrays) wurde dabei 0,7-1,5 μg Cy markierter DNA (je nach Farbstoffinkorporationsrate) für die Hybridisierung eingesetzt. Die Hybridisierung und das Waschen der Arrays erfolgte nach dem Agilent `60-mer oligo microarray processing protocol, SSPE` bei 63°C über Nacht (15-18 h).

2.15.7. Datenerfassung und Auswertung

Die Fluoreszenzintensitäten wurden mit einem Agilent Mikroarray Scanner erfasst, gemittelt und in einer Datenbank exponiert. Zur anschließenden Datenanalyse wurden dem Projektdesign entsprechende statistische Modelle herangezogen.

3. Ergebnisse

3.1. Bioinformatische Untersuchung von putativen Effektorproteinen von *Chlamydomonas pneumoniae*

Die Sequenzierung des chlamydialen Genoms zeigte, dass Chlamydien alle notwendigen Gene für ein funktionelles Typ III Sekretionssystem besitzen (Stephens et al., 1998, Kalman et al., 1999). Während die Gene, die für die strukturellen Komponenten des TTSSs kodieren, konserviert sind und im Genom in mind. 6 verschiedenen Subcluster lokalisiert sind (Stephens et al., 1998), macht der geringe Grad an genetischer Konservierung eine Identifizierung von chlamydialen Effektorproteinen über Sequenzhomologien schwierig. Oft sind aber die Gene, die für putative Effektorproteine kodieren, innerhalb eines Typ III Subcluster eingespannt (Schechter et al., 2004).

Basierend auf der genomischen Sequenz vom *C. pneumoniae* Stamm AR39 wurden die Gene *cpn0708* und *cpn0712* aufgrund ihrer Lokalisation im Subcluster III, der Nähe zu putativen Chaperonen (Abb. 4), des Vorhandenseins von eukaryontischen Domänen und des Fehlens von Signalsequenzen für andere Sekretionswege zur weiteren Analyse ausgewählt (Tab. 1).

Des Weiteren wurde *cpn0809* aufgrund seiner Lokalisation in einem Gencluster aus drei Genen, in dem Gene des TTSSs konserviert sind, ausgewählt. Weiterhin konnte eine Lokalisation von Cpn0809 in der Wirtszelle bereits gezeigt werden (Lugert et al., 2004).

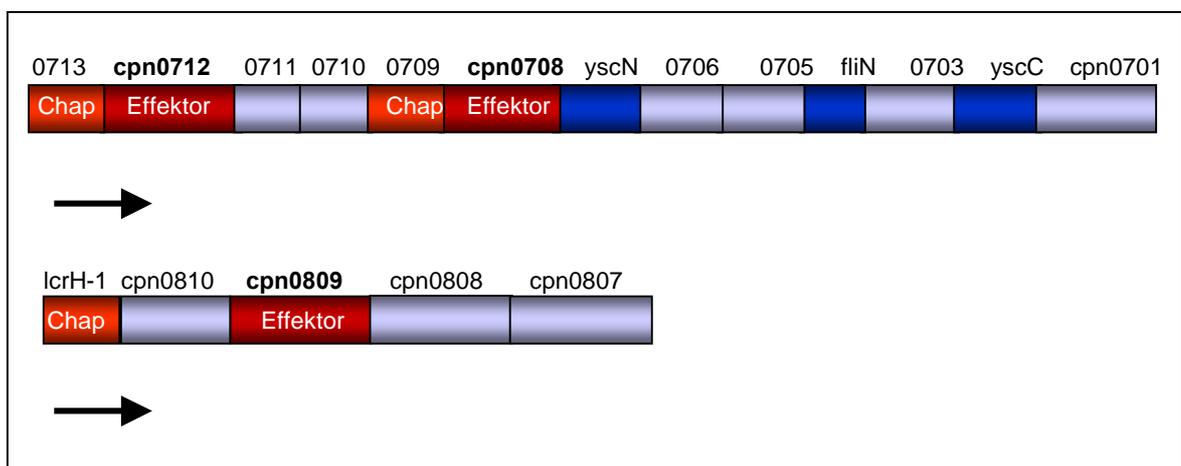


Abb. 4: Subcluster im *C. pneumoniae* AR39 Genom. Gene, die für die strukturellen Komponenten des Typ III Sekretionssystems kodieren, sind blau gekennzeichnet. Die zu untersuchenden Effektorproteine sind rot, ihre putativen Chaperone orange unterlegt. Die Richtung der Transkription ist durch Pfeile gekennzeichnet.

Protein	Homologie	Motive	mögliche Funktionen
Cpn0712	/	FHA-Domäne Homologie zu euk. Adenylatcyclasen SUMOylation Sequenz Coiled-coil DXD-Motiv	Vermittlung von Proteinbindungen über Phosphoserin- und treoninreste kann selbst durch Kinasen phosphoryliert werden Regulation der Wirtszellmorphologie Aktivierung von Signaltransduktionswegen Stabilisierung von Proteinen Vermittlung und Regulation von Proteininteraktionen notwendig für Glycosyltransferaseaktivität
Cpn0708	/	SUMOylation Sequenz Coiled-coil	Stabilisierung von Proteinen Vermittlung von Proteininteraktionen
Cpn0809	YopB	Hydrophobizitätsmuster ähnelt YopB	Translokator

Tab. 1: Die zu untersuchenden putativen Effektorproteine mit ihrer möglichen Homologie zu bekannten TTS Proteinen und ihre durch bioinformatische Analyse identifizierten Domänen

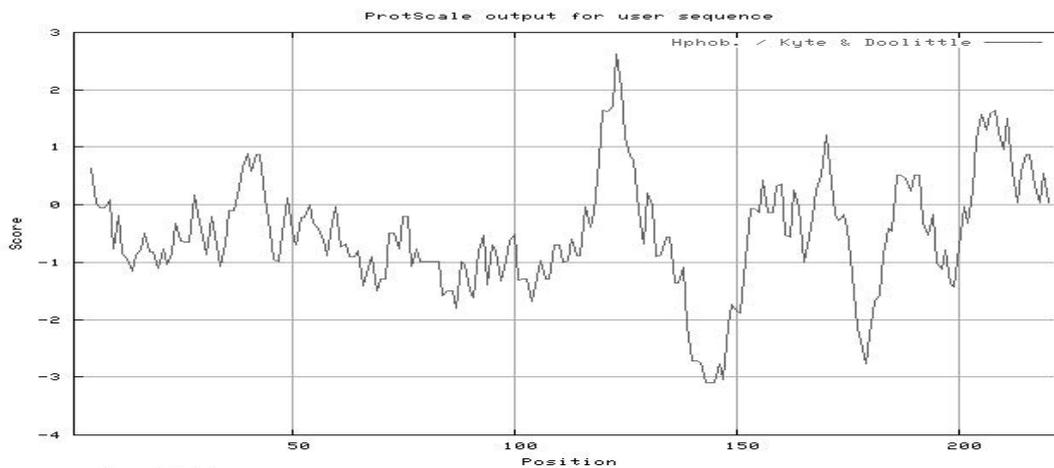
Cpn0708

Der ORF für *cpn0708* liegt im dritten Subcluster. Er umfasst im *C. pneumoniae* Stamm AR39 675bp und kodiert für ein 25kDa großes Protein. Der GC-Gehalt liegt mit 33,5% unter dem des gesamten Genoms (41%).

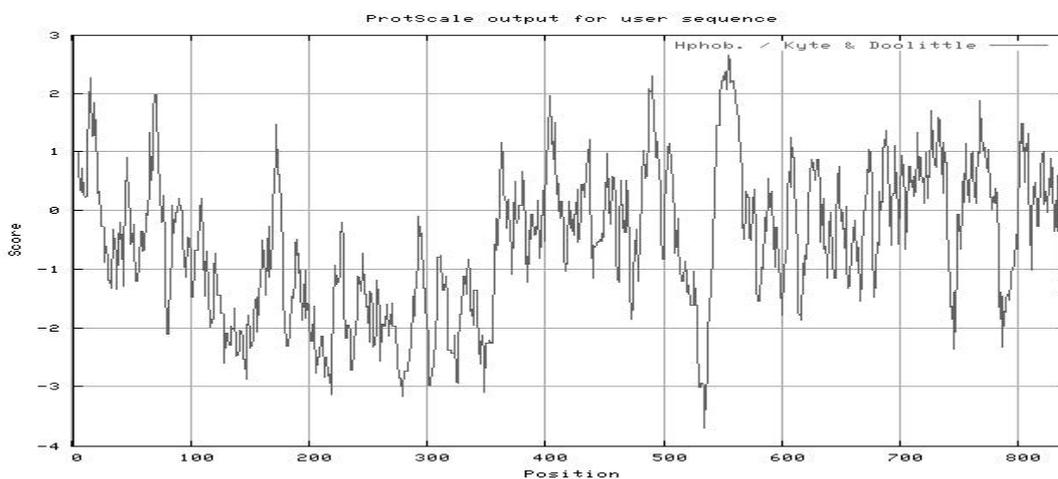
Im *C. pneumoniae* AR39 Genom wird es als hypothetisches Protein bezeichnet. Der ORF des benachbarten *cpn0709* ist homolog zu einem putativen Chaperon von *C. trachomatis* (Slepenkin et al., 2000).

Zur Identifizierung möglicher konservierter Domänen wurden verschiedene Datenbanken verwendet. Das SOSUI-Programm beschreibt Cpn0708 als lösliches Protein. Dem gegenüber definiert das PSLpred Programm es als extrazelluläres Protein. Mit dem COILS

Programm wurde eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine Coiled-Coil Domäne vorhergesagt. Außerdem wurde mit $L_{32}KKD_{35}$ eine SUMOylation Sequenz mit dem konservierten Muster (I/L/V)KXE gefunden. Nach Kyte und Doolittle wurde unter Verwendung von ProtScale⁶ ein Hydrophobizitäts-Plot durchgeführt (Kyte und Doolittle, 1982). Nach diesem Algorithmus weist Cpn0708 einen hydrophoben C-Terminus bei relativ hydrophilen N-Terminus auf (Abb. 5). Ein Homologievergleich von Cpn0708 mittels BLAST-Analyse gegen eine Proteindatenbank (Altschul et al., 1997) lieferte nennenswerte Ähnlichkeiten zu den Proteinen CCA00034 von *C. caviae* GPIC (68% Identität), CF0971 von *C. felis* FE/C-56 (68% Identität), CAB035 von *C. abortus* S26/3 (67% Identität) und CT668 von *C. trachomatis* (63% Identität). Die Funktion dieser hypothetischen Proteine ist nicht bekannt.



Cpn0708



Cpn0712

Abb. 5: Hydrophobizitäts-Plot für Cpn0708 und Cpn0712 nach Kyte und Doolittle (1982). Positive Werte stehen für Hydrophobizität.

Cpn0712

Der ORF von *cpn0712* ist ebenfalls im dritten Subcluster lokalisiert. Er umfasst im *C. pneumoniae* Stamm AR39 2532bp und kodiert für ein 845AS langes Protein. Die vorhergesagte Proteingröße beträgt 92kDa. Der GC-Gehalt liegt mit 37,2% ebenfalls unter dem des gesamten Genoms.

Im AR39 Genom wird es als "Forkhead associated (FHA) domain" Protein mit Sequenzhomologie zur Adenylatcyclase bezeichnet. Cpn0712 enthält zwei Forkhead associated (FHA) Domänen (Position 3-97 und 394-486) und eine putative Phospholipid-Bindestelle (Position 702-756).

Mit L₈₁KNE₈₄, A₁₇₇KAE₁₈₀, P₂₁₂KGE₂₁₅ und V₆₇₆KTE₆₇₉ enthält *cpn0712* außerdem mehrere potentielle SUMOylation Sequenzen mit dem konservierten Muster (I/L/V) KXE (Miao und Miller, 2000). Ein ausgedehntes DXD Motiv, welches in der Familie der Glycosyltransferasen und in chlamydialen Toxin-ähnlichen ORFs vorkommt, ist ebenfalls in Cpn0712 vorhanden (Position 453-459) (Abb. 6) (Belland et al., 2001; Hermann et al., 2005).

	↓ ↓ ↓ ↓
Cpn0712	GGILIEDLD
Cd ToxinA	GG-VYLDVD
TC0437	GG-IYTDLD
TC0438	GG-LYTDLD
CT166	GG-LYTDLD
Consensus	GGXXYXDX

Abb. 6: Vergleich des konservierten „extended DXD motif“ von Cpn0712 mit Cytotoxin -ähnlichen Genen von *C. difficile* und *C. trachomatis* Serovar *MoPn* und *D.* Konservierte AS sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Das Nachbarn *cpn0713* hat Homologie zu anderen TTSS Chaperonen. Wie für Cpn0708 wurde eine hohe Wahrscheinlichkeit für Coiled-coil Formationen vorhergesagt. Mit dem

PSLpred Programm wurde auch für Cpn0712 eine extrazelluläre Lokalisation vorhergesagt. Das SOSUI-Programm beschreibt es als Membranprotein mit 2 Transmembranhelices. Im Hydrophobizitäts-Plot von ProtScale⁶ weist Cpn0712 einen hydrophoben C-Terminus bei relativ hydrophilen N-Terminus auf (Abb. 5). Die drei bis vier Peaks in der N-terminalen Hälfte könnten mögliche Transmembrandomänen repräsentieren. Eine Analyse mittels des SOSUI Programms, das es als Membranprotein mit 2 Transmembranhelices beschreibt, stützt diese Prognose.

Ein Homologievergleich von Cpn0712 mittels BLAST-Analyse gegen eine Proteindatenbank (Altschul et al., 1997) lieferte Ähnlichkeiten zu den Proteinen Adenylat Cyclase von *C. felis* FeK-56 (61% Identität), FHA Domain Protein von *C. caviae* GPIG (62% Identität), CAB031 von *C. abortus* S26/3 (61% Identität), Phosphopeptide Binding Protein von *C. trachomatis* A/HAR13 (55% Identität) und TC00035 von *C. muridarum* Nigg (55% Identität). Über die Funktion dieser Proteine ist nichts bekannt.

Cpn0809

Der ORF von *cpn0809* umfasst in *C. pneumoniae* AR39 1462bp und kodiert für ein 50kDa großes Protein. Der GC-Gehalt von *cpn0809* liegt mit 46% über dem des gesamten Genoms. Das SOSUI-Programm beschreibt Cpn0809 als Membranprotein mit zwei Transmembranhelices. Das PSLpred Programm definiert es als äußeres Membranprotein. Cpn0809 weist einen hydrophoben C-Terminus bei relativem hydrophilem N-Terminus auf. Die 3 bis 4 Peaks des Hydrophatie-Plots in der N-terminalen Hälfte könnten mögliche Transmembrandomänen repräsentieren.

Das Hydrophobizitätsprofil ähnelt den Yersinien Protein YopB. Ähnlich wie in Yersinien ist *cpn0809* in ein Gencluster aus drei Genen zusammen mit *yopD* (*cpn0810*) und *lcrH* (*cpn0811*) lokalisiert. Der Gencluster *yopB/yopD/lcrH* ist im Typ III Sekretionssystem sehr konserviert, in Gegensatz zu anderen gramnegativen Bakterien kommt dieses Triplet in Chlamydien aber zweimal vor.

Die Transkription und Expression von Cpn0809 beginnt erst spät 48 h nach der Infektion (Lugert et al., 2004). Außerdem konnte eine Sekretion von Cpn0809 in die Wirtszelle mittels Immunfluoreszenztest nachgewiesen werden.

3.2. Cpn0708, Cpn0712 und Cpn0809 fehlt ein konserviertes Sekretionssignal

Im Gegensatz zu Proteinen anderer Sekretionssysteme besitzen Effektorproteine des TTSSs kein einheitliches Signalpeptid, über das sie identifiziert werden könnten.

Die Analyse der N-terminalen Aminosäuresequenz der Kandidatengene mittels PSORT und SignalP 3.0 Server (Bendtsen et al., 2004; Gardy et al., 2005) konnte keine konservierten Motive für eine Signalsequenz zeigen.

In *Pseudomonas syringae* wurde die Abwesenheit von negativ geladenen und aliphatischen (Ile, Leu, Val) AS oder Prolinresten an Position 3 oder 4 sowie ein hoher Prozentsatz an Serin als Typ III Sekretionssignal beschrieben (Schechter et al, 2004).

Alle chlamydialen Kandidatengene enthalten negativ geladene AS innerhalb der ersten 12 AS des N-terminalen Bereiches und haben keinen erhöhten Anteil an Serin. Bei Cpn0712 und Cpn0809 kann eine aliphatische AS (Val bei Cpn0712 und Ile bei Cpn0809) an Position 3, und bei Cpn0708 ein Prolin an AS Position 4 gefunden werden (Tab. 2).

In Yersinien wird eine amphipatische Verteilung von AS innerhalb der ersten 10 N-terminalen AS als Sekretionssignal beschrieben. Eine amphipathische Verteilung von AS konnte nur für Cpn0712 gefunden werden.

In Salmonellen scheint das konservierte Signal WEK(I/M)XXFF für die Sekretion von Effektorproteinen des TTSSs notwendig zu sein (Miao und Miller, 2000). In den putativen chlamydialen Effektorproteinen konnte diese Sequenz nicht gefunden werden.

Somit scheinen sich diese hypothetischen konservierten Signalsequenzen von Yersinien, Salmonellen und *P. syringae* nicht auf Chlamydien übertragen zu lassen.

Protein	1	50
Cpn0708	MID <u>P</u> VECFPNLDGDAEAQSITQNSGTPLASELKKDISPFALGSY	
Cpn0712	MAVRLIVDEG <u>P</u> LSGVIFVLEDGISWSIGRDSSANDIPIEDPKLG	
Cpn0809	MSISSSSGPD <u>N</u> QKNIMSQVLTSTPQGVPQQDKLSGNETKQIQQTR	

Tab. 2) Vergleich der N-terminalen Region der putativen Effektorproteine. Prolin-oder aliphatische AS an Position 3 oder 4 sind dick gedruckt. Negative AS innerhalb der ersten 12 AS sind unterstrichen.

3.3. Transkription von *cpn0708* und *cpn0712* während des Infektionszyklus` von *C. pneumoniae* AR39

Um nachzuweisen, ob und zu welchen Zeitpunkten im Infektionszyklus *cpn0708* und *cpn0712* transkribiert werden, wurden semiquantitative RT-PCR-Analysen mit Chlamydien-RNA durchgeführt. Dafür wurden HEp2-Zellen mit *C. pneumoniae* infiziert (MOI=1) und die Gesamt-RNA zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion isoliert: 2 h nach der Infektion (pI.), wenn der Einschlusskörper voll ausgebildet ist, 8 h pI., wenn die Differenzierung zu RBs abgeschlossen ist, 24 h pI., wenn die RBs sich teilen, 48 h pI., wenn die RB Population ihr maximale Teilungsrate erreicht hat und ihre Redifferenzierung in EBs beginnt und 72 h pI., wenn der Einschlusskörper seine maximale Größe erreicht hat und die Freisetzung der EBs beginnt.

Die RT-PCR-Analysen erfolgte mit 100ng der jeweiligen RNA-Probe und mit *cpn0708*- und *cpn0712*-spezifischen Primern. Mit den Primerkombinationen 708A und 708B, sowie 712A und 712B konnte jeweils ein Fragment von 350bp amplifiziert werden. Als interner Standard wurde eine RT-PCR mit 16S RNA spezifischen Primern durchgeführt. Die Intensität der Transkriptionssignale wurde mit dem Scanpack-Programm ausgewertet. Die Intensitätswerte des kontinuierlich exprimierten *16S* Gens wurden als Kontrolle eingesetzt. Damit sollten Unterschiede in den Signalstärken, die durch die steigende RNA-Menge im Entwicklungszyklus und nicht durch die Expression verursacht wurden, ausgeglichen werden. Die Transkription von *cpn0708* setzt im Infektionszyklus nach 8 h ein und wird bis zum Ende des Zyklus mit konstanten Signalstärken transkribiert. Die Transkription des *cpn0712*-Gens setzt im Entwicklungszyklus ebenfalls nach 8 Stunden ein. Nach 72 h wird die Expression schwächer. Insgesamt scheint die Transkription von *cpn0708* und *cpn0712* schwächer als die des *16S*-Gens zu sein, da eine um 19 Zyklen erweiterte PCR durchgeführt wurde, um ein Signal zu erhalten (Abb. 7).

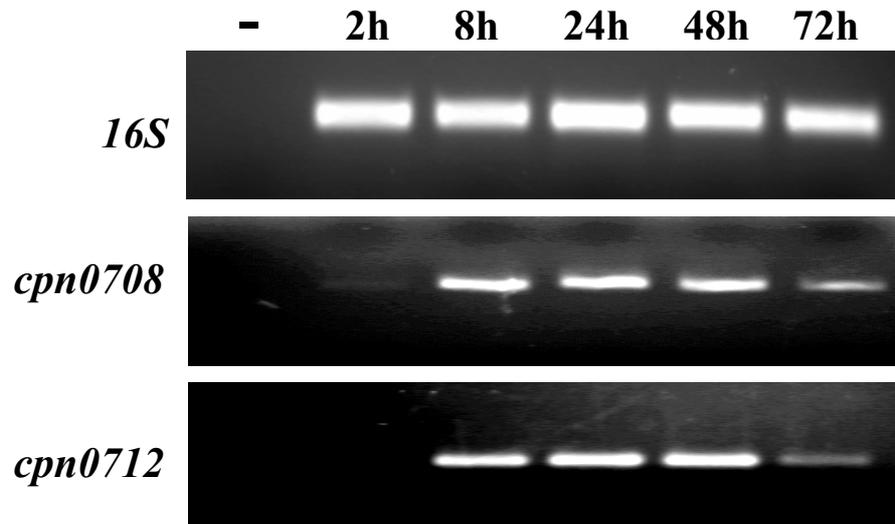


Abb. 7: Analyse der Transkription von *cpn0708* und *cpn0712* in *C. pneumoniae*-infizierten HEp2-Zellen während des Infektionszyklus. Oben: RT-PCR des konstitutiv exprimierten *16S*-Gens, Mitte: normierte Signale der RT-PCR für *cpn0708*, unten: normierte Signale der RT-PCR für *cpn0712*. Als Negativkontrolle (-) dienten nicht-infizierte Zellen. Sowohl für *cpn0708* als auch *cpn0712* konnte eine Transkription nach 8 h nachgewiesen werden.

3.4. Expression von Cpn0708 und Cpn0712

Um die Expression und die intrazelluläre Lokalisation von Cpn0708 und Cpn0712 zu bestimmen, wurden polyklonale Antiseren gegen diese Proteine generiert und in Immunoblot und Immunofluoreszenztests eingesetzt.

3.4.1. Herstellung des Antiserums gegen Cpn0708

3.4.1.1. Klonierung von *cpn0708* in pQE30

Für die Herstellung des rekombinanten Proteins wurde die DNA-Sequenz von *cpn0708* mittels PCR aus chromosomaler *C. pneumoniae*-DNA amplifiziert und über Säulen aufgereinigt. Die ausgewählten Primer gewährleisteten, dass das PCR-Produkt jeweils eine *Bam*HI- und eine *Hind*III-Schnittstelle am 5'- und 3'-Ende besaß. So konnte das PCR-Produkt anschließend in den ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen geschnittenen prokaryontischen Expressionsvektor pQE30 inseriert werden. Der Vektor ermöglicht die Expression des Proteins und eine Aufreinigung über einen His-tag. Nach Transformation von *E. coli* Stamm DH5 α mit dem Ligationsansatz, wurden Plasmidpräparationen aus den erhaltenen Kolonien durchgeführt. Die präparierten Plasmide wurden *Bam*HI und *Hind*III restringiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 8). Plasmide, die ein Insert enthielten, wurden sequenziert, um durch die PCR generierte Mutationen auszuschließen. Für die Expression wurde der Klon 5 verwendet.

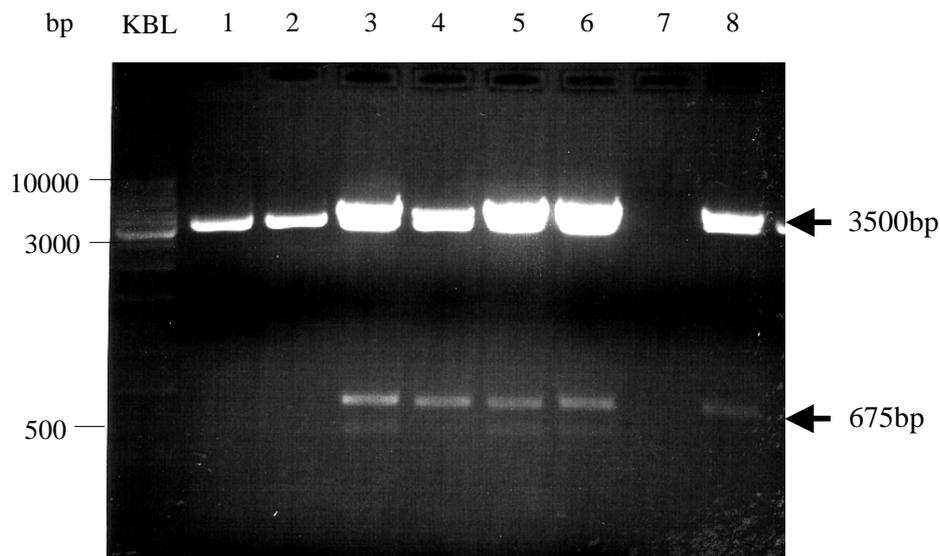


Abb. 8: Gelelektrophoretische Auftrennung der präparierten und restringierten Plasmide. Die Plasmide wurden mit *Hind*III und *Bam*HI geschnitten. Bei einer Insertion von *cpn0708* sollte ein 675bp langes Fragment detektiert werden. Die Klone 3-6 und 8 tragen ein entsprechendes Insert.

3.4.1.2. Nachweis der Expression des Cpn0708-His-Fusionsproteins

Zum Nachweis der Expression des Cpn0708-His-tag-Fusionsproteins in *E. coli* BL21DE32 wurde die Proteinexpression durch IPTG induziert. Dafür wurden kompetente *E. coli* - Zellen mit *cpn0708* transformiert und über Nacht inkubiert. Diese Kultur wurde am nächsten Tag überführt und die Proteinexpression bei einer OD_{550nm} von 0,5 durch Zugabe von 0,5mM IPTG induziert. Nach der enzymatischen Bakterienlyse wurden die Proteine der löslichen und unlöslichen Fraktion gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Als Erstantikörper wurde eine 1:2500 Verdünnung des Maus anti-His Antikörpers verwendet, der gegen den His-tag des Fusionsproteins gerichtet ist. Als Negativkontrolle dienten nicht transformierte Zellen. Im Western Blot konnte nur in der löslichen Fraktion eine spezifische Bande in Höhe von ca. 29kDa detektiert werden. Die theoretisch vorhergesagte Molekülgröße lag bei 25kDa. Die Abweichung zwischen der Proteingröße in der Western Blot Analyse und der theoretisch vorhergesagten Größe könnte durch die Verwendung eines vorgefärbten Proteingrößenstandards bedingt sein, der nach Angaben des Herstellers eine Abweichung von 10 – 15% aufweist. Zusätzlich zu der erwarteten Bande konnten auch noch unspezifische Banden im Bereich von 47-60kDa detektiert werden (Abb. 9).

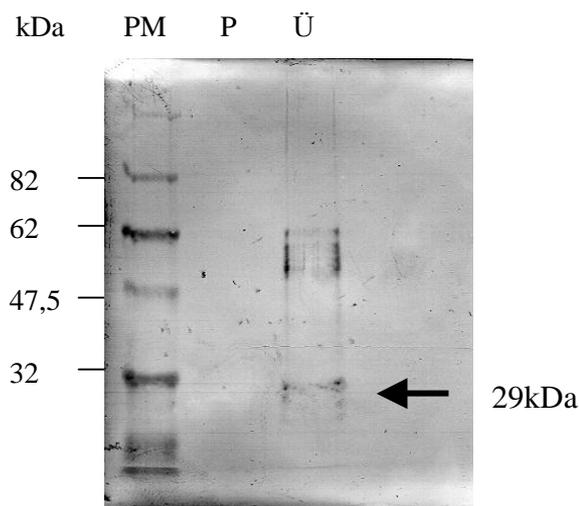
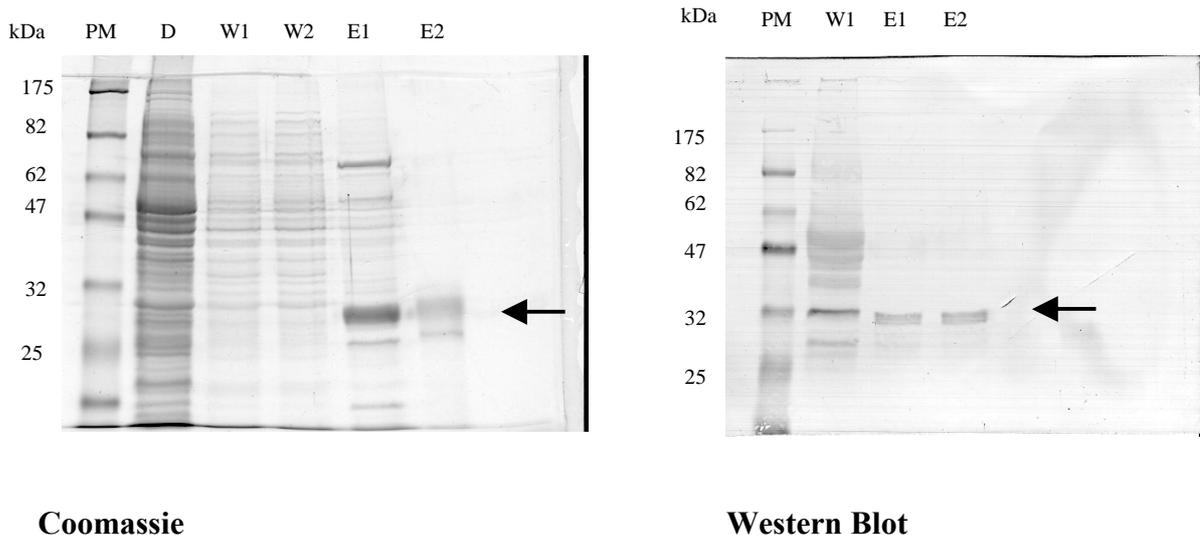


Abb. 9: Enzymatische Lyse der *E.coli*-Zellen und Vergleich der löslichen (Ü) und unlöslichen (P) Fraktion. Im Western Blot konnte das rekombinante Cpn0708 mit einem anti-His Antikörper in der löslichen Fraktion detektiert werden.

3.4.1.3. Expression und Aufreinigung des rekombinanten Cpn0708 aus *Escherichia coli*

Aufgrund des Proteinnachweises von Cpn0708 in der löslichen Fraktion der *E. coli*-Lysate, erfolgte die Proteinaufreinigung unter nativen Bedingungen. Die Induktion erfolgte in einem Kulturvolumen von 1l über 4 h mit 0,5mM IPTG. Anschließend wurden die Bakterien lysiert, zentrifugiert und das rekombinante Protein im Überstand über Nacht mit 1,5ml Ni-NTA inkubiert. Zur Aufreinigung wurde das an die Ni-NTA-Matrix gebundene Protein über eine Säule mit zwei mal 30ml Waschpuffer (darin 15 bzw. 20mM Imidazol) gewaschen. Aliquots aller bei der Proteinaufreinigung aufgefangenen Fraktionen wurden auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und sowohl mit Coomassie angefärbt, als auch einer Immunoblot-Analyse zum spezifischem Nachweis des His-tag-Fusionsproteins durch anti-His-tag-Antikörper unterzogen (Abb. 10).

In den Durchlauf- und Waschfraktionen fand sich kaum rekombinantes Protein, welches dafür mit der ersten Eluatfraktion fast vollständig von der Säule gelöst werden konnte. Allerdings traten neben kleineren Abbauprodukten des Zielproteins auch zwei dominante Banden (30-60kDa) im Eluat auf, die auch unter anderen Aufreinigungsbedingungen nicht beseitigt werden konnten.



Coomassie

Western Blot

Abb. 10: Aufreinigung des rekombinanten Cpn0708. Im Western Blot konnte das rekombinante Cpn0708 in den Eluatfraktionen, aber auch in geringen Mengen im Durchlauf und den Waschfraktionen detektiert werden (siehe Pfeil). Im Western Blot und der Coomassie-Färbung waren neben Cpn0708 noch zwei weitere höhermolekulare Banden zu erkennen.

3.4.1.4. Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen Cpn0708

Das aufgereinigte Protein wurde zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums eingesetzt. Dafür wurden 100µg des gereinigten Proteins der Eluatfraktion E1 mit ABN-S gemischt und in ein Kaninchen injiziert. Im Abstand von je zwei Wochen erfolgten insgesamt zwei Nachboosterungen unter Einsatz von 100µg Protein der Lösung E1 mit ABN-N. Nach weiteren zwei Wochen wurde 10ml Blut abgenommen und daraus das Serum gewonnen.

3.4.1.5. Sensitivitätsnachweis

Die Qualität des Antiserums wurde mit Immunoblot-Analyse überprüft.

Um die Nachweisgrenze des generierten Antiserums zu bestimmen, wurden Verdünnungen des Antiserums von 1:200 bis 1:10000 gegen 100ng des rekombinanten Proteins eingesetzt. Ein 1:2000 verdünntes Antiserum konnte im Immunoblot das rekombinante Protein detektieren. Ebenso wurde eine 1:200 Verdünnung gegen unterschiedliche Mengen des rekombinanten Proteins untersucht. Die Nachweisgrenze lag demnach bei 30ng Protein.

3.4.1.6. Präabsorption des polyklonalen Kaninchenserums

Zur Verminderung von unspezifischen Hintergrundfärbungen, die durch Kreuzreaktionen zwischen dem Antiserum und Wirtszellproteinen verursacht wurden, wurden Präabsorptionen an auf PVDF-Membranen gekoppelte HEp-2-Zelllysate durchgeführt.

3.4.1.7. Expression des nativen Cpn0708 während des chlamydialen Entwicklungszyklus

Das generierte Antiserum wurde dazu benutzt, die Expression von Cpn0708 während des Entwicklungszyklus` von *C. pneumoniae* zu untersuchen. Dafür wurden HEp-2 Zellen mit einer MOI von 1 mit *C. pneumoniae* infiziert und 2 (Inklusion vollständig ausgebildet), 8 (EBs in RBs differenziert), 24 (maximale Teilungsrate), 48 (Start der Differenzierung in EBs) und 72 h (max. Größe der Inklusion, Ausschüttung der EBs) nach der Infektion die jeweiligen Gesamtproteine isoliert und denaturiert. Es wurde eine Proteinmenge, die 1×10^6 Zellen entsprach in einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einer 1:200 Verdünnung des Antiserums gegen Cpn0708 inkubiert. Als Negativkontrolle diente Gesamtprotein von nicht-infizierten HEp2-Zellen. Signale konnten in der Western Blot Analyse in infizierten aber nicht in nicht-infizierten Zellysate detektiert werden. 48 und 72 h pI. konnten Banden detektiert werden. Eine spezifische Detektion von Cpn0708 blieb allerdings fraglich, da nur höhermolekulare Proteine detektierbar waren. Aufgrund der Nachweisgrenze des generierten Antiserums von 30ng kann eine Expression von Cpn0708 nicht ausgeschlossen werden, wenn es eventuell nur in geringem Maße exprimiert wird.

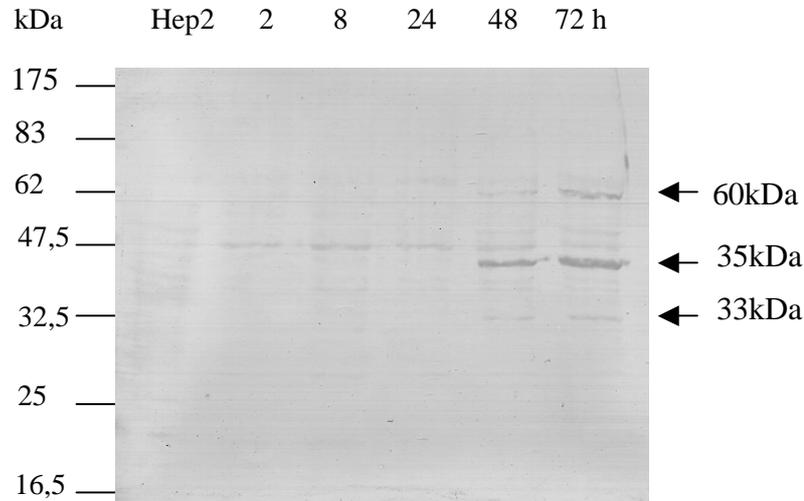


Abb. 11: Immunoblot zur Detektion von Cpn0708 während des chlamydialen Infektionszyklus. Infizierte HEp-2 Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten des Infektionszyklus lysiert und über ein SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit anti-Cpn0708 Serum als Erstantikörper inkubiert. Signale konnten nach 48 h nachgewiesen werden. Ein spezifisches Signal von Cpn0708 in der erwarteten Größe von 25kDa konnte nicht detektiert werden.

3.4.1.8. Nachweis der Expression und intrazelluläre Lokalisation von Cpn0708

Das generierte Antiserum gegen Cpn0708 wurde eingesetzt, um die Expression und Lokalisation von Cpn0708 in der Wirtszelle nachzuweisen. Auf Glasplättchen kultivierte HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* infiziert und nach 2, 8, 24, 48, 60 und 72 h mit Paraformaldehyd fixiert. Nach Permeabilisierung mit Triton X-100 erfolgte eine Inkubation mit dem polyklonalem Antiserum gegen Cpn0708 (1:100 verdünnt). Ein Signal konnte 8 h p.i. detektiert werden, was dem Ergebnis der Transkription von *cpn0708* entsprach. Zur besseren Lokalisation des Proteins wurden Immunfluoreszenztests mit dem Antiserum gegen Cpn0708 (1:100), sowie einem monoklonalen Antikörper (1:200 verdünnt), der gegen *C. pneumoniae* gerichtet ist, durchgeführt. Durch Vergleich der Signale konnte die Lokalisation des Proteins genauer dargestellt werden. Die Abb. 12A und 12B zeigen die Fluoreszenzsignale des Antiserums gegen Cpn0708 und des mAK gegen *C. pneumoniae* im Einschlusskörper. Abb. 12C zeigt die Überlagerung der Fluoreszenzbilder. Das Kandidatenprotein Cpn0708 konnte während des gesamten Entwicklungszyklus` nur innerhalb des Einschlusskörpers nachgewiesen werden, eine Sekretion in die Einschlusskörpermembran oder in das Cytoplasma der Wirtszelle konnte

nicht detektiert werden. Die genaue Überlappung der beiden Fluoreszenzsignale zeigt, dass Cpn0708 nicht aus dem Einschlusskörper ausgeschleust wird.

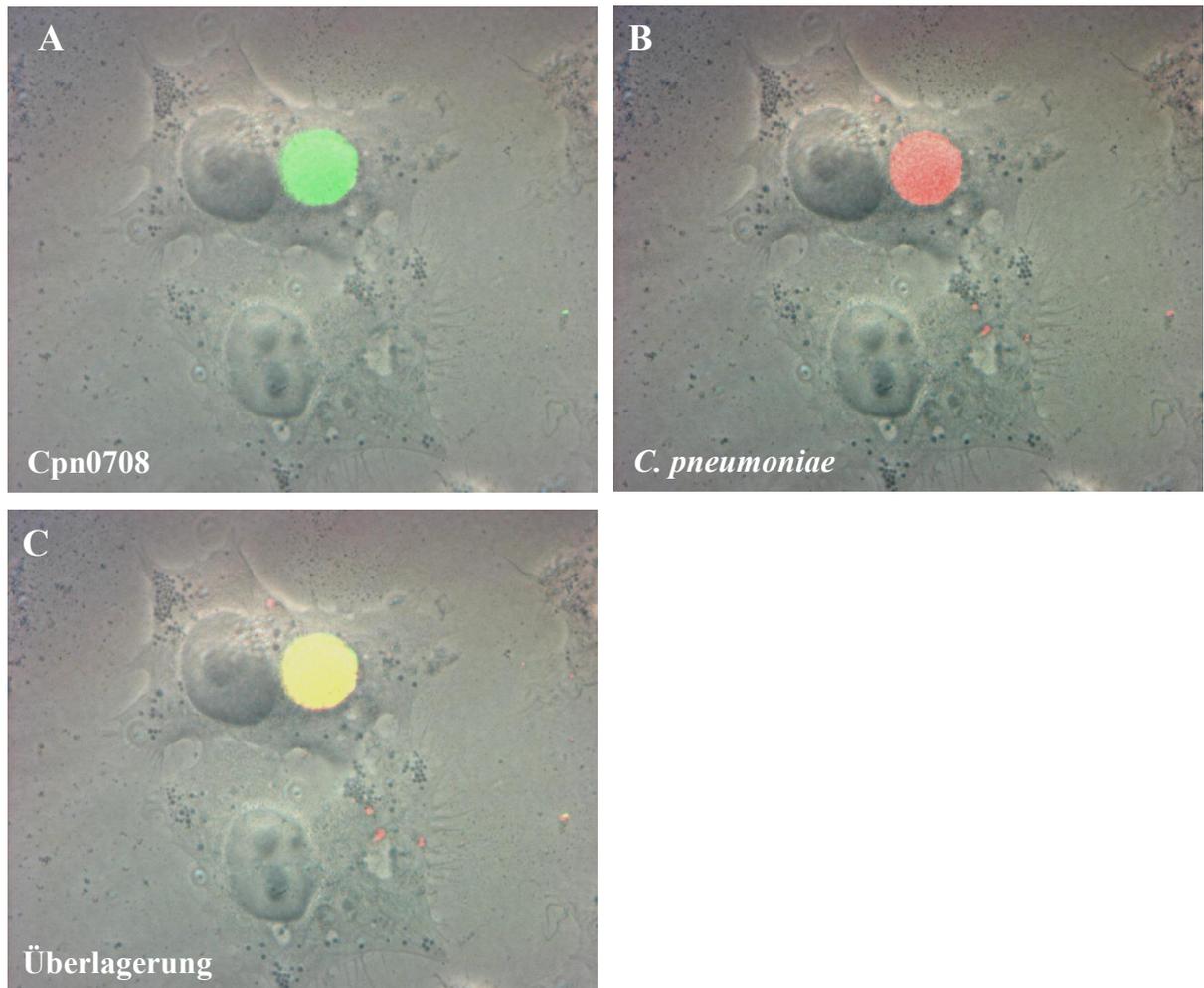


Abb. 12: Immunfluoreszenzbilder von *C. pneumoniae* infizierten HEp-2 Zellen 60 h pI. A) Cpn0708 wurde mit dem generierten Antiserum und mit einem DTAF-konjugierten anti-Kaninchen-IgG sekundären Antikörper (Grün) detektiert. B) Chlamydien wurden mit einem mAK gegen *C. pneumoniae* und einem Cy3-konjugierten anti-Maus-IgG sekundären Antikörper (Rot) detektiert. C) Überlagerung der Fluoreszenzbilder. Die Überlagerung der Signale zeigt sich in der Gelbfärbung des Einschlusskörpers.

3.4.1.9. Serologischer Test

Zum Nachweis der Immunogenität von Cpn0708 wurde überprüft, ob sich in Patientenseren Antikörper gegen Cpn0708 detektieren lassen. Dafür wurden Seren vom Patienten verwendet, bei denen bereits vorher durch eine Chlamydien-positive PCR der Nachweis einer Infektion erbracht wurde. Eine positive Immunreaktion konnte in keiner Probe ermittelt werden. Cpn0708 kommt demnach als serologischer Marker nicht in Betracht (Daten nicht gezeigt).

3.4.2. Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen Cpn0712

Für die Herstellung des rekombinanten Proteins wurde sowohl das gesamte Gen, der 5`Bereich (Nukleotide 1-1257) und der 3`Bereich (Nukleotide 1257-2520) von *cpn0712* mittels PCR auf Chlamydien-DNA amplifiziert und über Säulen aufgereinigt. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass die PCR-Produkte eine *Bam*H1 und eine *Hind*III-Schnittstelle besaßen. Die PCR-Produkte wurde in den ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen geschnittenen prokaryontischen Expressionsvektor pQE30 ligiert und in *E.coli* kloniert. Die Plasmide wurde sequenziert und die induzierte Expression der Kandidatenproteine über Western Blot überprüft. Eine Expression konnte bei keinen der Konstrukte weder in der löslichen Fraktion noch im Pellet nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurde ein aus den AS 133 – 147 von Cpn0712 bestehendes Peptid an KLH gekoppelt. Die Immunisierung des Kaninchens erfolgte mit jeweils 100µg Protein in Abstand von je zwei Wochen.

3.4.2.1. Sensitivitätsnachweis

Um die Nachweisgrenze des generierten Antiserums zu bestimmen, wurden verschiedene Verdünnungen des Antiserums von 1:10 bis 1:10000 gegen 100ng des rekombinanten Proteins eingesetzt. Eine 1:400 Verdünnung konnte das rekombinante Proteine im Immunoblot detektieren. Ebenso wurde eine 1:200 Verdünnung gegen unterschiedliche Mengen (3ng – 200ng) des rekombinanten Proteins eingesetzt. Das Antiserum hatte eine Nachweisgrenze von 30ng.

3.4.2.2. Expression des nativen Cpn0712

Um die Expression des Cpn0712-Gens während des Entwicklungszyklus` zu untersuchen, wurden 2, 8, 24, 48 und 72 h pI. die jeweiligen Gesamtproteine von mit *C. pneumoniae* infizierten HEp2-Zellen isoliert und denaturiert. Die Proteingemische wurden über ein SDS-Gel aufgetrennt. Als Negativkontrolle dienten nicht-infizierte HEp2-Zellen. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einer 1:200 Verdünnung des Antiserums gegen Cpn0712 inkubiert.

Ein Proteinnachweis in der erwarteten Größe von 92kDa konnte nicht erbracht werden. 48 und 72 h pI. konnten zwei niedermolekulare Banden von 52 und 70kDa detektiert werden, die auf posttranslationale Modifikationen von Cpn0712 hindeuten könnten (Abb. 13). Eine Identifizierung dieser Banden mittels Sequenzierung war nicht möglich, so dass nicht ausgeschlossen werden konnte, das es sich bei diesen Banden um ein unspezifisches Signal handelt und der Nachweis der Expression aufgrund der geringen Sensitivität des Antiserums nicht möglich war.

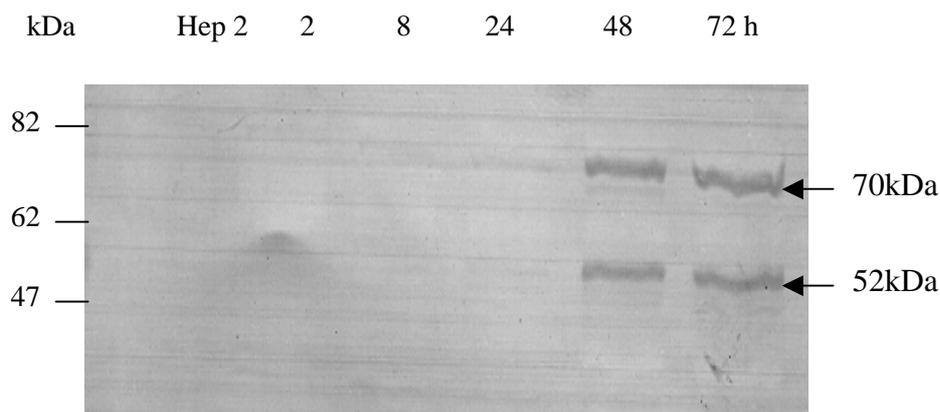


Abb. 13: Immunoblot zur Detektion von Cpn0712 während des Infektionszyklus`. Infizierte HEp-2 Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten des Infektionszyklus lysiert und über ein SDS-Gel aufgetrennt. Nach Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran und Inkubation mit anti-Cpn0712 Serum als Erstantikörper konnten nach 48 h nur niedermolekulare Banden nachgewiesen werden. Das native Protein von 92kDa konnte nicht detektiert werden.

3.4.2.3. Intrazelluläre Lokalisation von Cpn0712

Der Nachweis der Lokalisation von Cpn0712 erfolgte mittels Immunfluoreszenztests. HEp2-Zellen wurden auf Glasplättchen kultiviert und mit *C. pneumoniae* infiziert. 60 h pI. wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert. Nach Permeabilisierung mit Triton X-100 erfolgte eine Inkubation mit polyklonalen anti-Cpn0712 Antiserum (1:100) und einem mAK gegen *C. pneumoniae* (1: 200).

Der mAK färbte spezifisch den Einschlusskörper und die darin enthaltenden Chlamydien (Abb. 14B) Das anti-Cpn0712-Antiserum zeigte im Immunfluoreszenztest ein spezifisches Signal am Rand des Einschlusskörpers sowie ein schwächeres Signal im umliegenden Cytoplasma der Wirtszelle (Abb. 14C). Cpn0712 konnte im Bereich der Einschlusskörpermembran und in der Wirtszelle nur in der näheren Umgebung des Einschlusskörpers lokalisiert werden, in weiter entfernt liegenden Bereichen des Cytoplasmas konnte es nicht mehr nachgewiesen werden. Die Sekretion von Cpn0712 in die Wirtszelle konnte dabei deutlicher gezeigt werden, wenn sich in der Wirtszelle mehrere Einschlusskörper gebildet hatten. 24 und 48 h pI. konnte Cpn0712 nur im Einschlusskörper nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Ein früherer Nachweis von Cpn0712 war aufgrund der geringen Größe der Einschlusskörper nicht möglich. 72 h pI. war die Mehrzahl der Einschlusskörper bereits lysiert. In Zellen, in denen noch Einschlusskörper vorhanden waren, konnten nur noch wenige Chlamydien nachgewiesen werden.

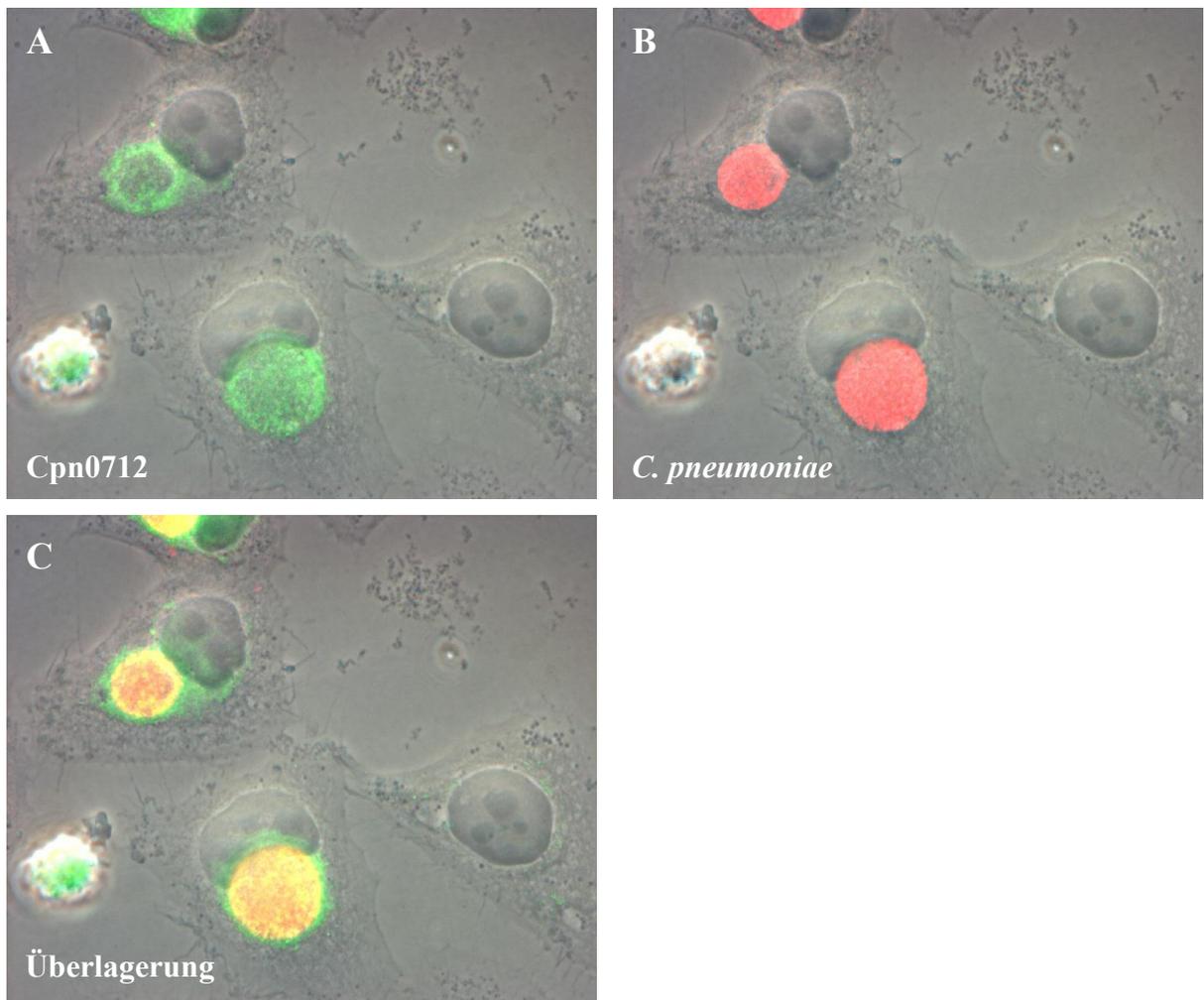


Abb. 14: Immunfluoreszenzbilder von *C. pneumoniae*-infizierten HEp-2 Zellen 60 h pI. A) Cpn0712 wurde mit dem generierten Antiserum und mit einem DTAF-konjugierten anti Kaninchen-IgG Sekundärantikörper (Grün) detektiert. B) Chlamydien wurden mit einem mAK gegen *C. pneumoniae* und einem Cy3-konjugierten anti-Maus-IgG sekundären Antikörper (Rot) detektiert. C) Überlagerung der Fluoreszenzbilder. Eine Lokalisation von Cpn0712 ist innerhalb der Einschlusskörper sowie außerhalb der Einschlusskörper zu erkennen.

3.4.2.4. Serologischer Test

Um nachzuweisen, ob Cpn0712 zum Nachweis einer *C. pneumoniae*-Infektion geeignet ist, wurde das KLH-gekoppelte Peptid gegen 22 Patientenseren, die bereits vorher in der Routinediagnostik als sero-positiv oder -negativ gegen *C. pneumoniae* getestet worden waren, eingesetzt. In keiner der untersuchten Proben konnte eine Reaktion hervorgerufen werden. Ebenso wie Cpn0708 scheint Cpn0712 demnach keine Immunogenität zu besitzen (Daten nicht gezeigt).

3.5. Heterologe Sekretion in Salmonellen

Da Chlamydien sich aufgrund ihres obligat intrazellulären Entwicklungszyklus` nicht genetisch manipulieren lassen, ist ein direkter Nachweis, dass putative Effektorproteine über das TTSS sekretiert werden, nicht möglich. Da gezeigt werden konnte, dass chlamydiale Proteine auch über ein heterologes TTSS von Yersinien und Shigellen transloziert werden können (Fields und Hackstadt, 2000; Subtil et al., 2000), sollte die Typ III Sekretion indirekt mittels eines TTSSs von Salmonellen nachgewiesen werden (Hensel, 2000).

3.5.1. Herstellung der Konstrukte

Salmonellen besitzen zwei TTSSe. Das TTSS, das von *Salmonella enterica serovar Typhimurium* Pathogenitätsinsel 1 (SPI-1) kodiert wird, vermittelt die Invasion von Salmonellen in nicht-phagozitierende Zellen und ist in die Enteropathogenese involviert (Galan, 1999). Das TTSS, das vom SPI-2 kodiert wird, ist für die Aufrechterhaltung des intrazellulären Phänotyps erforderlich (Hensel, 2000). Da das TTSS von Chlamydien dem des SPI-2 kodierten TTSSs von Salmonellen entspricht (Hensel, 2000), wurden *cpn0708* und *cpn0712* unter Kontrolle des SPI-2 spezifischen Promotors ProB kloniert, der eine Expression von heterologen Genen in Salmonellen erlaubt.

Von Prof. Dr. M. Hensel wurde ein Vektor mit der Bezeichnung 2447 zur Verfügung gestellt, der den SPI-2 spezifischen Promotor ProB enthält und ein M45-Epitop des Adenovirusproteins E4-6/7 kodiert, das zur Detektion der Fusionsproteine diene.

Für die Herstellung des 2447-708-Konstruktes wurde das gesamte Gen von *cpn0708* mittels spezifischer Primer (Primersequenzen siehe Material und Methoden) auf genomischer Chlamydien-DNA amplifiziert und mit *EcoRI* und *SmaI* linearisiertem p2447-Vektor ligiert (Abb. 15B).

Für das 2447-712 5`-Konstrukt wurde ein 1,5kb langes Fragment mittels PCR amplifiziert. Das Fragment wurde geschnitten und mit dem linearisierten Vektor ligiert (Abb. 15C).

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass Cpn0708 und Cpn0712 ihr spezifisches Chaperon zur effektiven Sekretion benötigen, wurden weiterhin Konstrukte hergestellt, die für *cpn0708* oder *cpn0712* einschließlich ihrer putativen Chaperone (*cpn0709* und *cpn0713*) kodieren.

Das 2447-709-708-Konstrukt wurde unter Verwendung der Primer 709F und 708R (Sequenzen siehe Material und Methoden) durch PCR amplifiziert. Das 1125bp lange Fragment, das die Gene *cpn0709* und *cpn0708* vollständig enthält, wurde mit *EcoRI* und *SmaI* geschnitten und mit dem ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen geschnittenen Vektor ligiert (Abb. 15A).

Das 2447-713-712 5`-Konstrukt wurden unter Verwendung der Primer 713F und 712R durch PCR amplifiziert. Das 1650bp lange Fragment enthält das Gen *cpn0713* vollständig und die N-terminale Hälfte von *cpn0712* bis Position 1225. Das Fragment wurde geschnitten und mit dem p2447-Vektor ligiert (Abb. 15D).

Für die Herstellung des 2447-713-712-Konstruktes wurde ein 2900bp langes Fragment mittels PCR amplifiziert, das *cpn0713* und *cpn0712* vollständig enthält (Abb. 15E).

Nach der Transformation der jeweiligen Konstrukte wurden die erhaltenen rekombinanten Klone mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft.

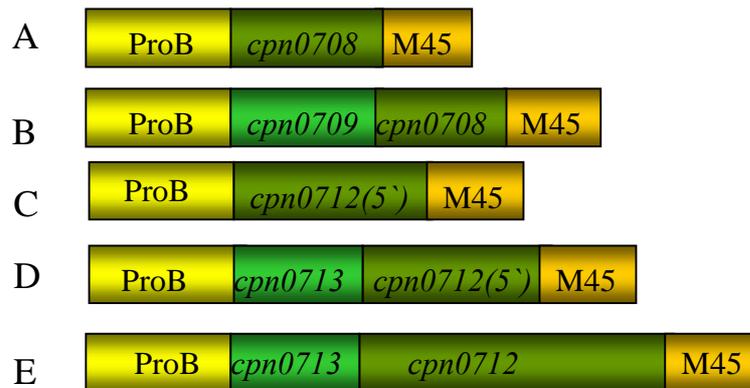


Abb. 15: Schematische Darstellung der Fusionskonstrukte. Die Gene wurden einzeln (dunkelgrün) oder zusammen mit ihren putativen Chaperon (grün) unter der Kontrolle des SPI-2-Promotors ProB (gelb) kloniert. Der Nachweis erfolgte über das M45-Epitop (orange).

3.5.2. Expression und Sekretion in Salmonellen

Der Nachweis der Expression und Sekretion wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hensel (Universität Erlangen) durchgeführt. Hierfür wurden *S. enterica* mit den Konstrukten transformiert und anschließend in einem Selektionsmedium kultiviert, welches die Aktivierung des SPI-2 Promotors induziert. Anschließend wurden die Bakterien lysiert und das Gesamtprotein über ein SDS-Gel aufgetrennt. Mit einem Antikörper gegen das M45 Epitop sollte dann eine Expression in Salmonellen nachgewiesen werden. Eine Expression konnte nur für das Konstrukt p2447-*cpn0713-cpn0712* 5' detektiert werden. Anschließend wurde die Translokation der Konstrukte in die Wirtszelle überprüft. Dafür wurden HeLa-Zellen mit Salmonellen infiziert. 8 h bzw. 16 h nach der Infektion wurde mittels Immunfluoreszenztests die Lokalisation der Fusionsproteine überprüft. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte war ein Signal zu erkennen, das auf eine Translokation im heterologen Salmonellen-System hindeutet.

Die Expression von p2447-*cpn0713-cpn0712* 5' zeigte, dass eine heterologe Expression von chlamydialen Proteinen in Salmonellen grundsätzlich möglich ist. Dass alle anderen Proteine aber nicht exprimiert wurden, deutet auf eine starke Instabilität chlamydialer Proteine in Salmonellen hin, so dass Salmonellen als heterologes Nachweissystem für die Typ III Sekretion eher weniger geeignet zu sein scheinen.

Konstrukt	Expression	Sekretion
2447-709-708	--	--
2447-708	--	--
2447-713-712 5'	--	--
2447-712 5'	--	--
2447-713-712 5'	+	--

Tab. 3: Expression und Sekretion der Fusionskonstrukte in *Salmonella*. Eine Expression konnte nur für das Konstrukt bestehend aus *cpn0713* und den 5' Bereich von *cpn0712* nachgewiesen werden. Eine Sekretion konnte für keines der Konstrukte bestätigt werden.

3.6. Heterologe Expression von Cpn0712 in HeLa-Zellen

Um die Funktion von chlamydialen Effektorproteinen auf die Wirtszelle zu untersuchen, besteht die Möglichkeit, die zu untersuchenden Gene in einen eukaryontischen Expressionsvektor zu klonieren und in Zelllinien zu transfizieren, die als Wirtszelle für *C. pneumoniae* fungieren. Die Genprodukte können dann von der Wirtszelle selbst exprimiert werden.

3.6.1. Herstellung des Cpn0712-His-tag-Konstruktes für die Transfektionsexperimente

Durch Immunfluoreszenztests infizierter Zellen konnte gezeigt werden, dass Cpn0712 ins Cytoplasma der Wirtszelle sezerniert wird. Damit scheint Cpn0712 ein putatives Effektorprotein zu sein, das die Wirtszellphysiologie verändern könnte. Aus diesem Grund wurden Konstrukte hergestellt, mit dem Cpn0712 in eukaryontischen Zellen exprimiert werden kann.

Das Konstrukt für Cpn0712 wurde unter Verwendung der Primer 712H1B und 712H2B (Sequenzen siehe Material und Methoden) durch PCR auf genomischer Chlamydien-DNA amplifiziert. Das 2532bp lange Fragment enthielt das gesamte Gen samt Startcodon. Dabei wurden der Primer 712H1B so gewählt, dass eine Kozak-Sequenz an den 5'-Bereich des PCR-Amplifikates angefügt wird. Das 2532bp lange Fragment wurde in den pcDNA3.1/V5 His-Topo Vektor kloniert und seine Orientierung überprüft. Das Konstrukt wurde pcDNA3.1/V5 His-*cpn0712* genannt (Abb. 16)

Von dem Konstrukt sowie dem pcDNA3.1/V5 His-Topo-control-Vektor wurde eine Plasmid-Maxipräparation durchgeführt.

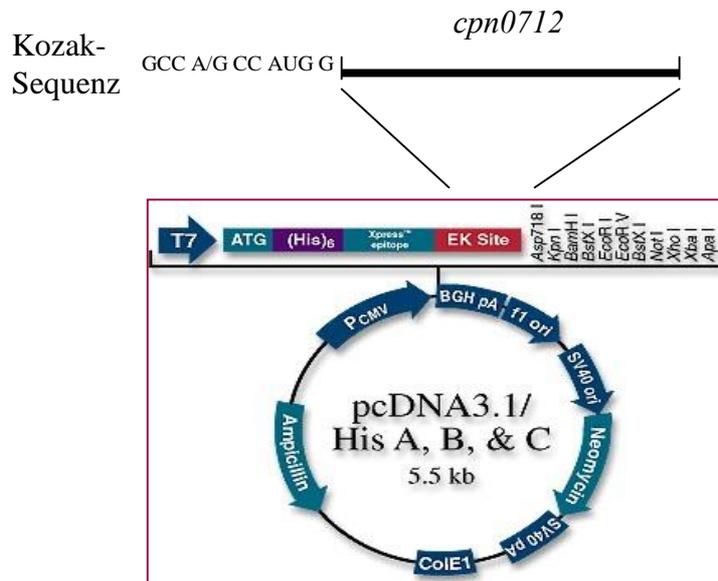


Abb. 16: schematische Darstellung der Herstellung des *cpn0712*-His-Konstruktes. Die Primer wurden so gewählt, dass am 5'-Bereich eine Kozak-Sequenz an das PCR-Produkt angefügt wird, der die Expression des Proteins erleichtern soll.

3.6.2. Bestimmung der Transfektionseffizienz

Bei der Transfektion kommt es bezüglich der Transfektionseffizienz auf die Kombination von Zelllinie, Transfektionsreagenz und Plasmid an. Zur Optimierung der Transfektionseffizienz wurde der pcDNA3.1/V5 His-Topo-control Vektor verwendet. Dieser Vektor trägt das *lacZ*-Gen, das sich zum Nachweis der Transfektionseffizienz durch eine X-Gal Färbung nachweisen lässt.

Es wurden verschiedene Zelltypen (HEp2 und HeLa) verglichen. Im Vergleich zu HEp2-Zellen wiesen HeLa-Zellen eine höhere Transfektionsrate auf, worauf die weiteren Experimente mit dieser Zelllinie erfolgten.

Anschließend wurden die Transfektionsreagenzien Polyfekt, Lipofektene (Gibco BRL), Metafektene (Biontex), CaCl₂, Jet Pei (Biomol) und HeLa Monster Kit (Gibco BRL) getestet. Die Mengen an Plasmid und Reagenzien wurden sowohl nach dem Protokoll der Hersteller als auch in höheren Konzentrationen eingesetzt. Die Zellen wurden 24 h mit

dem jeweiligen Gemisch aus Plasmid und Transfektionsreagenz inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Transfektionseffizienz mittels einer X-Gal-Färbung ermittelt.

Dabei zeigte sich, dass sich höhere Konzentrationen der Transfektionsreagenzien toxisch auf die Zellen auswirkten. Die beste Effizienz wurde mit dem HeLa Monster Kit erzielt, wenn man das Transfektionsreagenz laut Protokoll des Herstellers verwendete. Es wurde so eine mittlere Transfektionseffizienz von 10% erreicht. Bei Polyfekt verbesserte sich die Transfektionsrate, wenn mehr Reagenz als vom Protokoll empfohlen, verwendet wurde. Es wurde eine mittlere Transfektionsrate von 6,2% erreicht. Die höchste Transfektionsrate wurde mit dem Transfektionsreagenz Jet Pei erzielt, wenn das Reagenz in 2 zu 1 Verhältnis zum Plasmid eingesetzt wurde. Es wurde eine mittlere Transfektionsrate von 30% erreicht (Abb. 17).

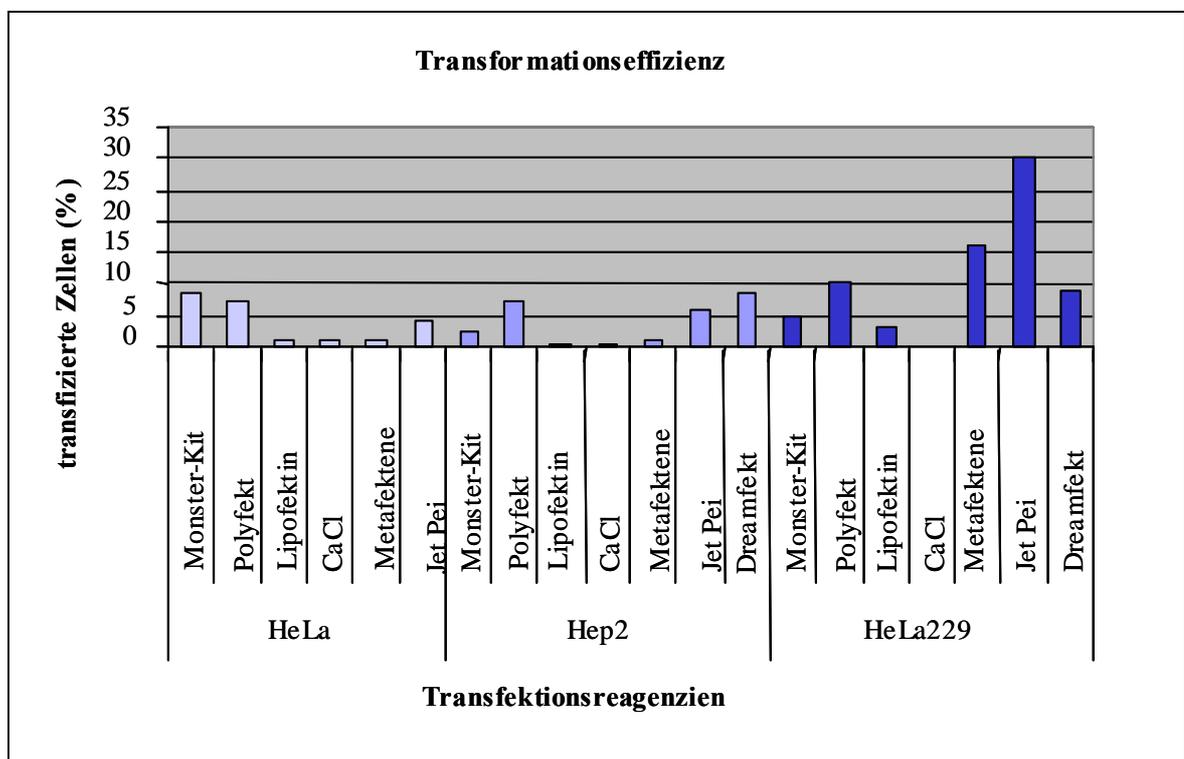


Abb. 17: Bestimmung der Transfektionseffizienz. Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil an transfizierten HeLa-Zellen. Die höchste Transfektionsrate wurde erreicht, wenn man HeLa-Zellen mit dem pcDNA3.1/V5 His TOPO Control Vektor und dem Transfektionsreagenz Jet Pei transfiziert. Die Transfektionseffizienz war in HEp-2 Zellen generell niedriger als in HeLa-Zellen.

Anschließend wurde die optimale Zellzahl mittels Immunfluoreszenztests ausgetestet. Dabei zeigte sich, dass eine Konzentration von 1×10^5 Zellen pro 12-Well in Bezug auf die Transfektionsrate mit dem Kontrollvektor am besten war, aber von vermehrtem Zelltod begleitet wurde. Für die weiteren Transfektionen wurden die Zellen deshalb in einer Konzentration von 5×10^5 verwendet (Tab. 4).

Zellzahl	pcDNA3.1/V5 His Topo control Vektor	pcDNA4/TO/myc HisA-cpn0712
1×10^5	79,0	34,3
5×10^5	60,8	41,5
1×10^6	56,6	46,0
2×10^6	54,0	30,0

Tab. 4: Transfektionsraten (%) mit verschiedenen Plasmiden in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl. Das 712-exprimierende Konstrukt zeigte generell schlechtere Transfektionseffizienzen im Vergleich zum Kontrollvektor.

3.6.3. Herstellung stabiler Transfektanten von HeLa-Zellen zur Expression von Cpn0712

Aufgrund der geringen Transfektionseffizienz der HeLa-Zellen in Rahmen einer transienten Transfektion wurden stabile Transfektanten generiert.

Zur Herstellung einer stabil transfizierten Zelllinie wurden HeLa-Zellen mit dem pcDNA3.1/V5 His-*cpn0712* Konstrukt in linearisierter Form transfiziert. Durch die vorherige Linearisierung mit PvuI sollte die Effizienz, mit der *cpn0712* in das Genom integriert wird, erhöht werden. Außerdem wurde somit die Ruptur von *cpn0712* im Zuge des Rekombinationsereignisses vermieden. Nach der Transfektion wurden die Zellen zuerst in nichtselektivem Medium kultiviert, anschließend wurde das Medium gegen ein Selektionsmedium, das Geneticin in einer Konzentration von 400µg/ml enthält, ausgetauscht. Mit der klonalen Selektion wurde begonnen, als Zellkolonien makroskopisch sichtbar wurden. Dabei wurden einzelne Zellkolonien isoliert und getrennt weiterkultiviert um eine monoklonale Zelllinien zu erhalten.

Nach Antibiotika-Selektion wurden mehr als 40 unabhängige Zellklone pro Transfektion beobachtet. Die Kolonien wurden mittels PCR überprüft. Als Primer wurden 712A und 712B (Sequenzen siehe Material und Methoden) verwendet. Wie exemplarisch in Abb. 18 gezeigt, konnte in 18% der untersuchten Zellkolonien eine Integration von *cpn0712* nachgewiesen werden. Dabei zeigten die Proben eine unterschiedliche Intensität, was darauf schließen lässt, dass es sich bei den PCR-positiven Kolonien noch um eine heterologe Zellpopulation handelt, bei der nur wenige Zellen *cpn0712* integriert hatten. Ein Proteinnachweis war zu diesen Zeitpunkt nicht möglich.

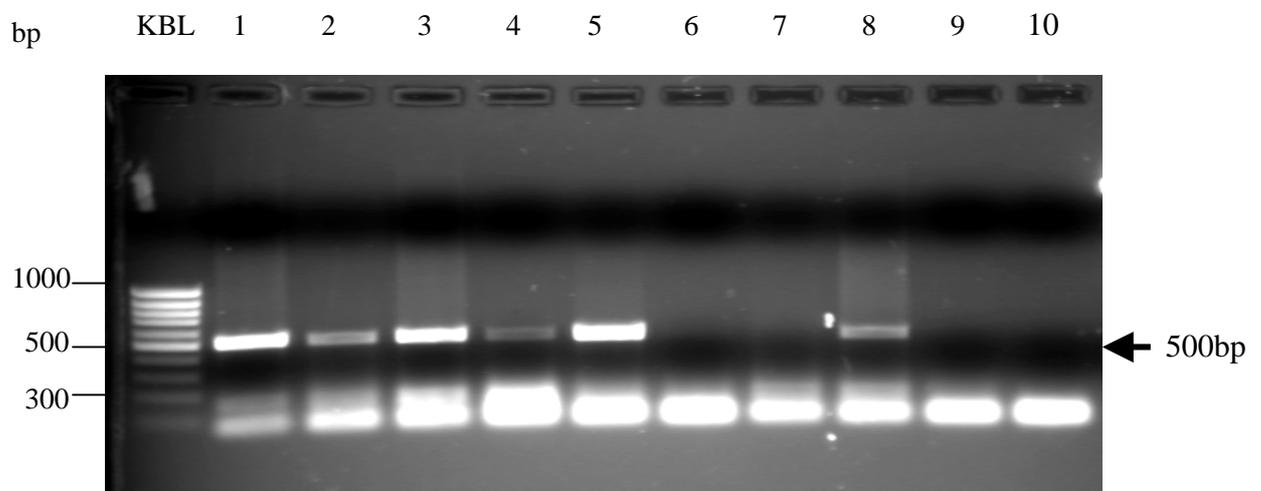


Abb. 18: Überprüfung der Integration des Konstrukts pcDNA3.1/V5 His-*cpn0712* mittels PCR. Gesamt-DNA wurde isoliert und eine PCR mit *cpn0712*-spezifischen Primer durchgeführt. Spuren 1-8: PCR-Analysen verschiedener HeLa-Zellklone; Klone 1-5 und 8 zeigen spezifische Amplifikate unterschiedlicher Intensität, Spur 9 zeigt nicht-transfizierte Zellen, Spur 10 zeigt die Negativkontrolle.

Die Zellen der PCR-positiven Klone wurden erneut vereinzelt und in Selektionsmedium kultiviert. Da ein Nachweis des Proteins mittels Immunfluoreszenztests nicht möglich war, wurde der Fortschritt dieser Selektionierung nach jedem Vereinzlungsschritt mit einer Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)-Analyse überprüft.

Von jeder isolierten Kolonie wurden Zellen in einer FACS-Analyse untersucht. Dafür wurden die Zellen mit einem Erstantikörper gegen das His-Epitop und einem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper inkubiert. Als Positivkontrolle wurde eine stabil

transfizierte Zelllinie verwendet, die β -Arrestin exprimierte. Als Negativkontrolle dienten nicht-transfizierte HeLa-Zellen. Nach der ersten Vereinzelung konnte in 50% der untersuchten Proben keine Expression nachgewiesen werden, in 25% der Proben wurde eine inhomogene Populationen nachgewiesen, die aus Zellen, die Cpn0712 exprimieren und nicht-transfizierten Zellen bestanden und in weiteren 25% der Proben befanden sich ebenfalls transfizierte sowie nicht-transfizierte Zellen, die sich aber durch zwei getrennte Peaks deutlicher voneinander abtrennten. Diese Zellen wurden für die weitere Selektionierung erneut vereinzelt. Von den angewachsenen Zellklonen wurden 50 erneut mittels einer FACS-Analyse untersucht. Nach der zweiten Vereinzelung hatten nur noch 15% der Proben die gleichen Werte wie die Negativkontrolle und zeigten somit keine Expression, 50% der Proben bestanden aus exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellen, die sich bei der FACS-Messung deutlich voneinander abtrennten. Die restlichen Proben zeigten eine inhomogene Population, die aber zum größten Teil aus Zellen, die Cpn0712 nicht exprimierten, bestanden (Abb. 19).

Insgesamt lag die Expressionsintensität aller Proben der zweiten Vereinzelung näher an den Werten der Negativ-Kontrolle, so dass angenommen werden kann, dass die Expression von Cpn0712 abnahm. Dieser Effekt bestätigte sich nach der dritten Vereinzelung. 50% der analysierten Proben zeigten keine Expression mehr, die restlichen Proben zeigten eine inhomogene Population, deren Zellen aber nur noch eine geringe Cpn0712-Expression aufwiesen. Insgesamt wurden mehrere hundert Kolonien für die Selektionierung vereinzelt, jeweils 50 vereinzelte Klone wurden bei jeder Selektionierung mittels FACS-Analyse auf eine Expression von Cpn0712 analysiert, die positiven Klone vereinzelt. Obwohl die transfizierten Zellen sich morphologisch nicht von den nicht-transfizierten Zellen unterschieden und kein cytotoxischer Effekt der transfizierten Zellen beobachtet wurde, war die Herstellung einer Zelllinie, die Cpn0712 dauerhaft exprimierte, nicht möglich.

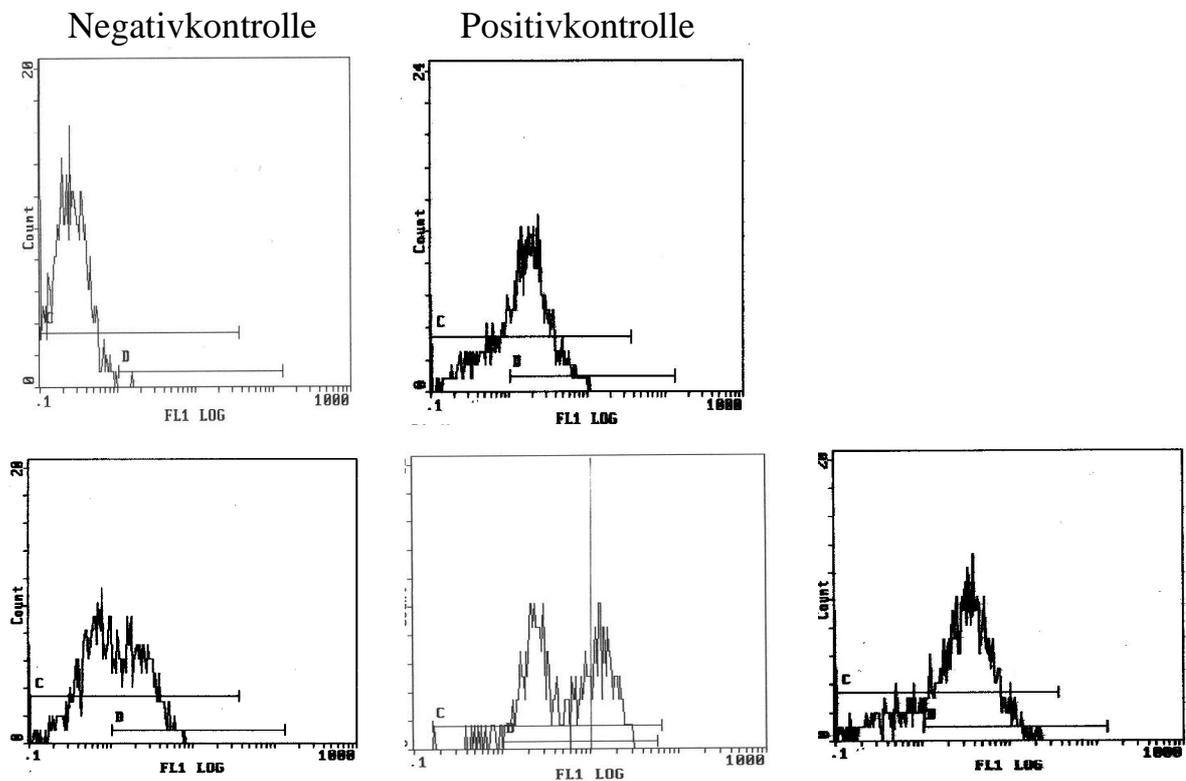


Abb. 19: FACS-Analyse der transfizierten HeLa-Zellen nach der ersten und zweiten Vereinzlung. Als Positivkontrolle wurde eine Zelllinie verwendet, die β -Arrestin stabil transfizierte, als Negativkontrolle wurden nicht-transfizierte HeLa-Zellen verwendet. Rechts: Probe, die noch aus einer inhomogenen Population besteht. Mitte: Probe mit zwei deutlich abgegrenzten Populationen. Links: Probe, die aus überwiegend Cpn0712-exprimierenden Zellen zu bestehen scheint.

3.6.4. Nachweis der Expression von Cpn0809 und Cpn0712 in HeLa-Zellen

Aufgrund der Klonierung in den pcDNA3.1/V5 His-Topo-Vektor konnte zum Nachweis der Expression sowohl das polyklonale Antiserum als auch Antikörper gegen den His-tag und den V5-tag verwendet werden. Als Kontrolle wurde *cpn0809* verwendet, um auszuschließen, dass die verwendeten Antikörper nicht zum Nachweis im Immunoblot geeignet waren. Cpn0809 ist ein weiteres Effektorprotein von *C. pneumoniae*, das 48 h pI exprimiert und sezerniert wird (Lugert et al., 2004).

Aufgrund der geringen Transfektionseffizienz wurde vor dem Immunoblot eine Immunpräzipitation durchgeführt. Die polyklonalen Antiseren und der Antikörper gegen den His-tag erwiesen sich als nicht sensitiv genug, um Cpn0712 und Cpn0809 im

Immunoblot nachzuweisen. Mit einem Antikörper gegen den V5-tag konnte nur eine Expression von Cpn0809 nachgewiesen werden. Es wurden drei Protein-Banden in einer Höhe von ca. 38, 55 und 62kDa detektiert (Abb. 20) Die theoretische Molekülgröße von Cpn0809 lag bei 50kDa. Da eine Expression von Cpn0712 weder nach transients Transfektion noch in den stabilen Transfektanten nachweisbar war, wurde *cpn0712* in einen anderen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert, der den Nachweis mittels eines Antikörpers gegen den myc-tag erlaubt.

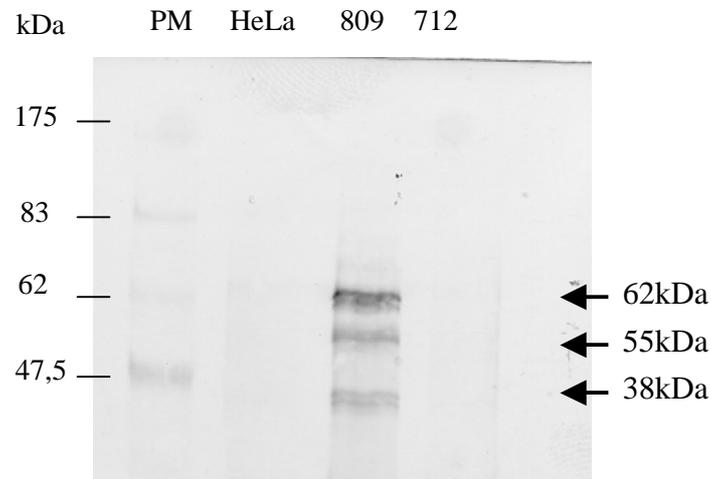


Abb. 20: Nachweis der Expression von Cpn0712 und Cpn0809 in transfizierten HeLa-Zellen. Nach Immunpräzipitation konnte eine Expression nur von Cpn0809 nachgewiesen werden

3.6.5. Klonierung von *cpn0712* und *cpn0809* in pcDNA4/TO/myc-HisA

Das Konstrukt wurde unter Verwendung der Primer 712H1B und 712H2B (Sequenzen siehe Material und Methoden) durch PCR aus genomischer Chlamydien-DNA amplifiziert. Das 2532bp lange Fragment enthielt das gesamte Gen samt Startcodon. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass sich auch hier eine Kozak-Sequenz am 5`-Bereich des PCR-Amplifikates befand. Das vollständige Gen wurde in den pcDNA4/TO/myc-HisA Vektor kloniert und seine Orientierung mittels Sequenzierung überprüft (Abb. 21).

Von dem Konstrukt Nr. 3 sowie dem pcDNA4/TO/myc-HisA-control-Vektor wurde eine Maxipräparation durchgeführt.

Obwohl es möglich war Cpn0809 mittels eines V5-Antikörper im Immunoblot nachzuweisen, konnte auch dieses Protein nicht im Immunfluoreszenztest detektiert werden. Es wurde deshalb ebenfalls in den pcDNA4/TO/myc-HisA Vektor kloniert. Cpn0809 ist ein weiteres Effektorprotein von *C. pneumoniae*, das 48 h pI. exprimiert und sekretiert wird (Lugert et al., 2004). Über seine Funktion innerhalb der Wirtszelle ist nichts bekannt. Seine Lokalisation innerhalb der Zelle sollte daher ebenfalls näher charakterisiert werden. Weiterhin sollte Cpn0809 als Positivkontrolle zum Nachweis eines rekombinanten Proteins mittels myc-tag dienen.

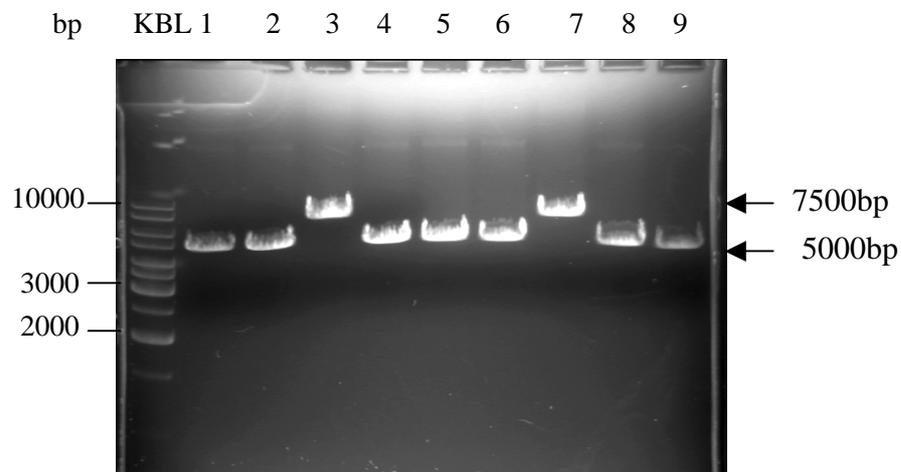


Abb. 21: Linearisierung präparierter Plasmide mit *HindIII*. Zum Nachweis der Integration von *cpn0712* in den Vektor pcDNA4/TO/myc-HisA (5000bp), wurden die Plasmide mit *HindIII* geschnitten. Plasmide 3 und 7 haben ein Insert entsprechender Größe von 2500bp integriert.

3.6.6. Transkription von *cpn0712* und *cpn0809* in HeLa-Zellen

Um nachzuweisen, ob *cpn0712* und *cpn0809* in HeLa-Zellen transkribiert werden, wurden HeLa-Zellen mit dem *cpn0712*-myc- und dem *cpn0809*-myc-Konstrukt transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde die RNA isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. Die RT-PCR erfolgte mit 100ng der jeweiligen RNA-Probe und mit *cpn0712*- und *cpn0809*-spezifischen Primern. Mit den Primerkombination Cpn712for und Cpn712rev (siehe Material und Methoden) konnte ein Fragment von 500bp amplifiziert werden. Mit den Primerkombination Cpn809for und Cpn809rev (siehe Material und Methoden) konnte ein Fragment von 250bp amplifiziert werden. (Abb. 22).

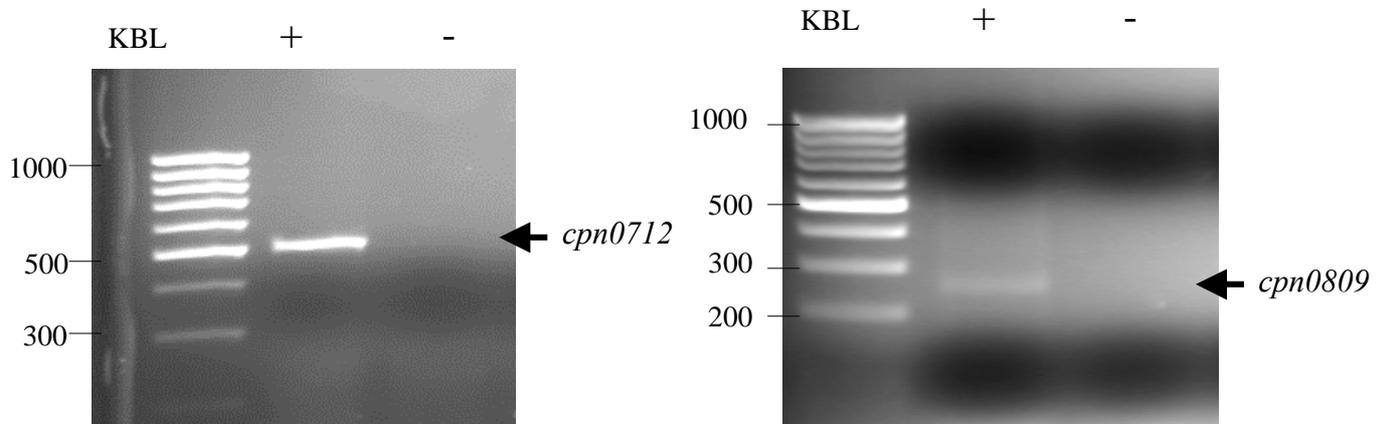


Abb. 22: Transkription von *cpn0712* und *cpn0809* in HeLa-Zellen. Gesamt-RNA wurde aus transfizierten HeLa-Zellen isoliert und mit jeweils 100ng eine RT-PCR durchgeführt. + zeigt jeweils das Ergebnis in transfizierten Zellen, - das Ergebnis in nicht-transfizierten Zellen. *Cpn0712* (A) und *cpn0809* (B) konnte nur in transfizierte Zellen nachgewiesen werden.

3.6.7. Expression von Cpn0712 in HeLa-Zellen

Um nachzuweisen, ob Cpn0712 in HeLa-Zellen exprimiert wird, wurden 24 h nach der Transfektion Zellen lysiert und das Gesamtprotein isoliert. Aufgrund der geringen Transkriptionsrate wurde zuerst eine Immunpräzipitation durchgeführt. Die präzipitierten

Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde der Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen das Myc-Epitop inkubiert. Als Negativkontrolle dienten mock-infizierte Zellen. Es wurden zwei spezifische Banden detektiert, bei ca. 92kDa, der erwarteten Größe von Cpn0712 und bei 45kDa. Die 45kDa Bande könnte eventuell der C-Terminus von Cpn0712 nach Spaltung des Volllängenproteins darstellen (Abb. 23).

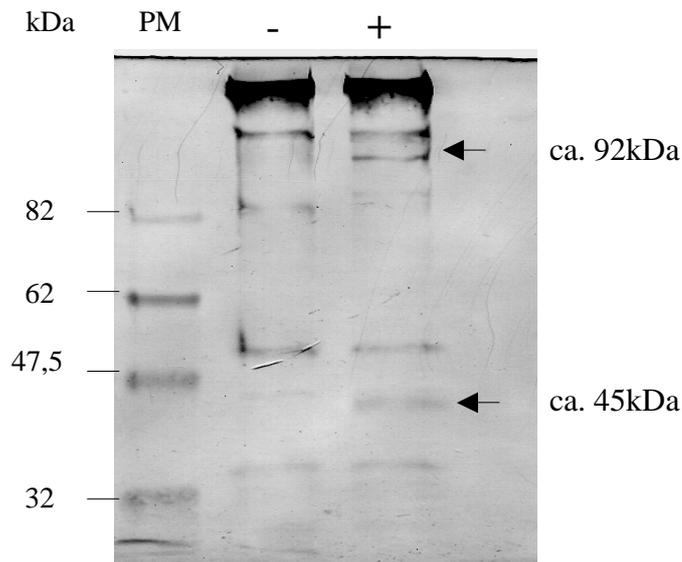
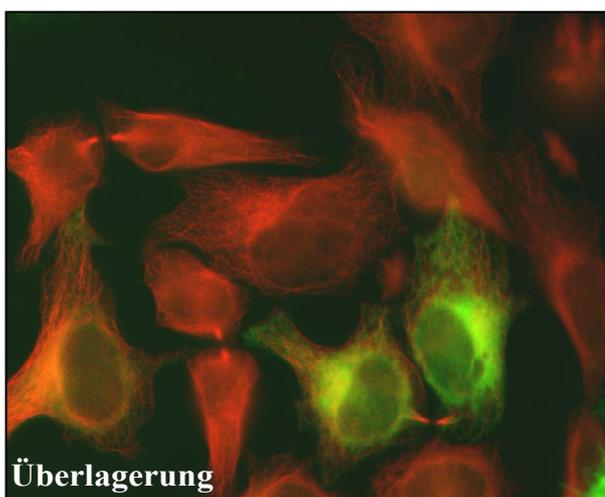
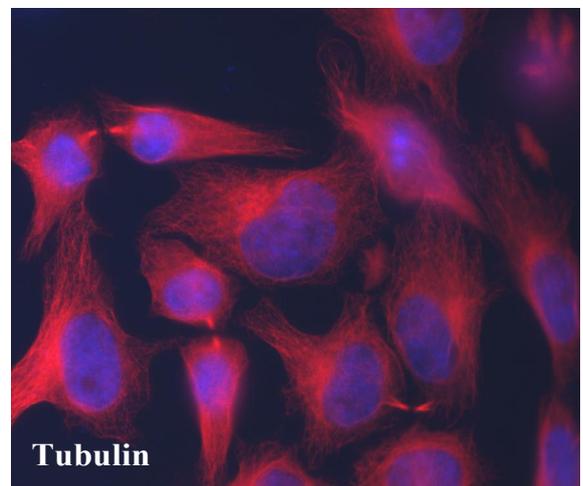
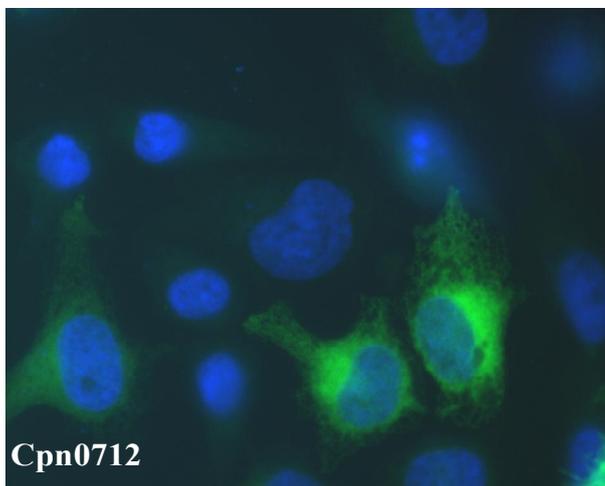


Abb. 23: Expression von Cpn0712 in transfizierten HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden mit dem Ausgangsvektor und dem *cpn0712*-Gen tragenden Vektor transfiziert. Es wurde eine Immunpräzitation durchgeführt und das Lysat gelelektrophoretisch über ein SDS-Gel aufgetrennt. + zeigt jeweils das Ergebnis in transfizierten Zellen, - das Ergebnis in nicht-transfizierten Zellen. Mittels eines myc-Antikörpers konnte spezifische Banden bei ca. 92kDa und 45kDa nachgewiesen werden (siehe Pfeil).

3.6.8. Intrazelluläre Lokalisation von Cpn0712

Um die intrazelluläre Lokalisation von Cpn0712 zu detektieren, wurden Immunfluoreszenztests durchgeführt. Dafür wurden HeLa-Zellen auf Glasplättchen ausgesät und mit pcDNA4/TO/myc-*cpn0712* transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen auf den Glasplättchen fixiert und mit einem Primärantikörper gegen den Myc-tag und einen fluoreszenzmakierten Cy-2 Zweitantikörper inkubiert. Morphologisch unterschieden sich die transfizierten Zellen nicht von den nicht transfizierten Zellen. Es waren keine cytotoxische Effekte zu erkennen, die begründen könnten, warum die Zellen

sich nicht stabil transfizieren ließen. Vereinzelt waren transfizierte Zellen in Vergleich zu den Nachbarzellen vergrößert. Eine Lokalisation von Cpn0712 konnte in Strukturen des Cytoplasmas nachgewiesen werden mit einer Akkumulation um den Zellkern (Abb. 24). Um Cpn0712 genauer lokalisieren zu können, wurden Immunfluoreszenztest durchgeführt mit Antikörpern gegen Calnexin (Marker für ER), α - und β -Tubulin und α -Actin. Die Überlagerung der einzelnen Bilder der Anfärbungen des rekombinanten Proteins und der Anfärbungen mit Calnexin oder α - und β -Tubulin zeigten, dass Cpn0712 nicht am endoplasmatischen Retikulum oder den Mikrotubuli lokalisiert ist (Abb. 24). Im Gegensatz dazu weisen die Untersuchungen aber darauf hin, dass Cpn0712 an den Aktinfilamenten lokalisiert sein könnte (Abb. 25A).



Legende siehe Seite 86

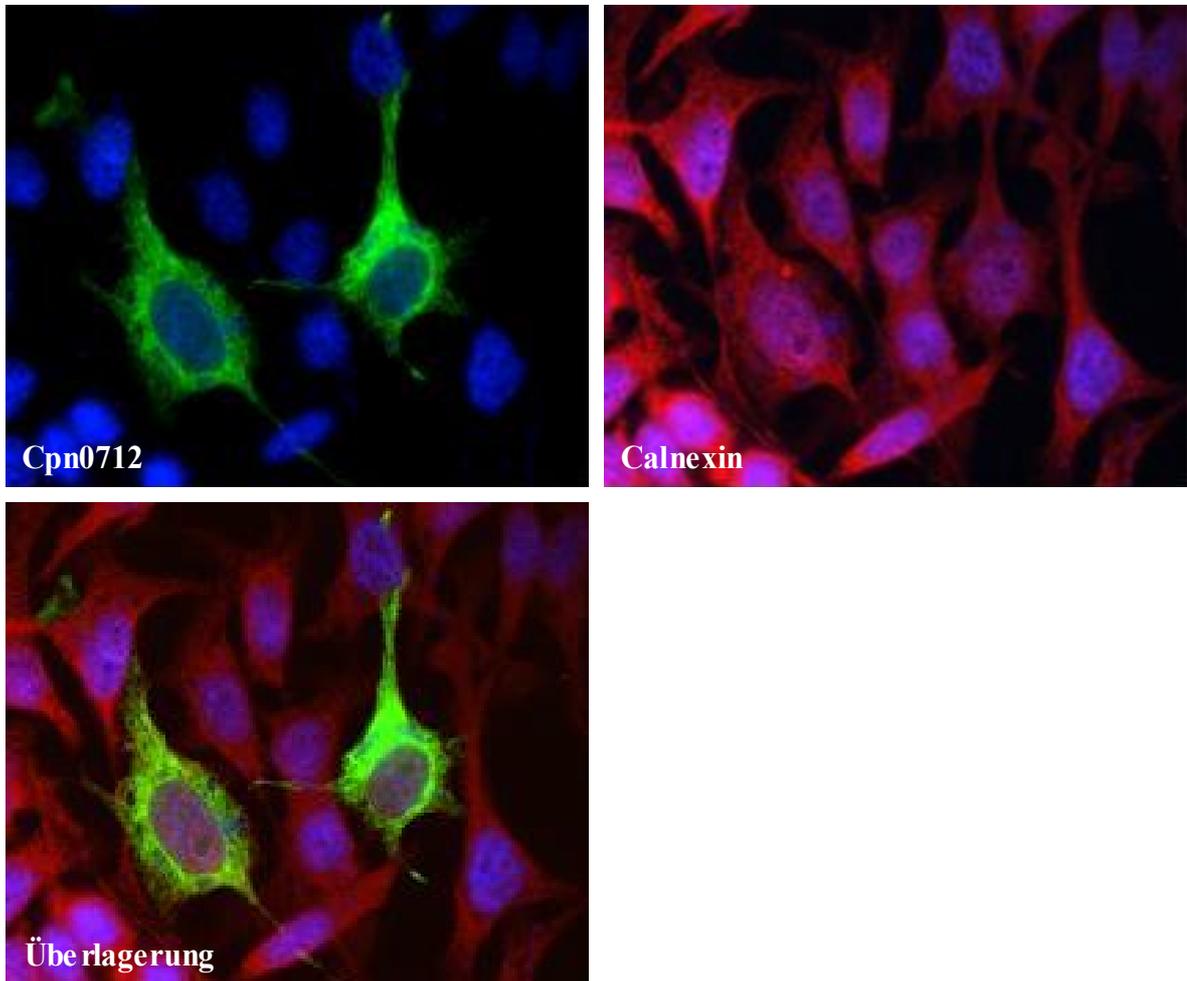


Abb. 24: Intrazelluläre Lokalisation von Cpn0712. HeLa-Zellen wurden mit pcDNA4/TO/myc-*cpn0712* transfiziert. 24 h. nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die intrazelluläre Verteilung des Fusionsproteins (grün), α - und β -Tubulins und Calnexins (rot) mittels Immunfluoreszenztests bestimmt. Die Zellkerne wurden mit Höchst33342 (blau) angefärbt.

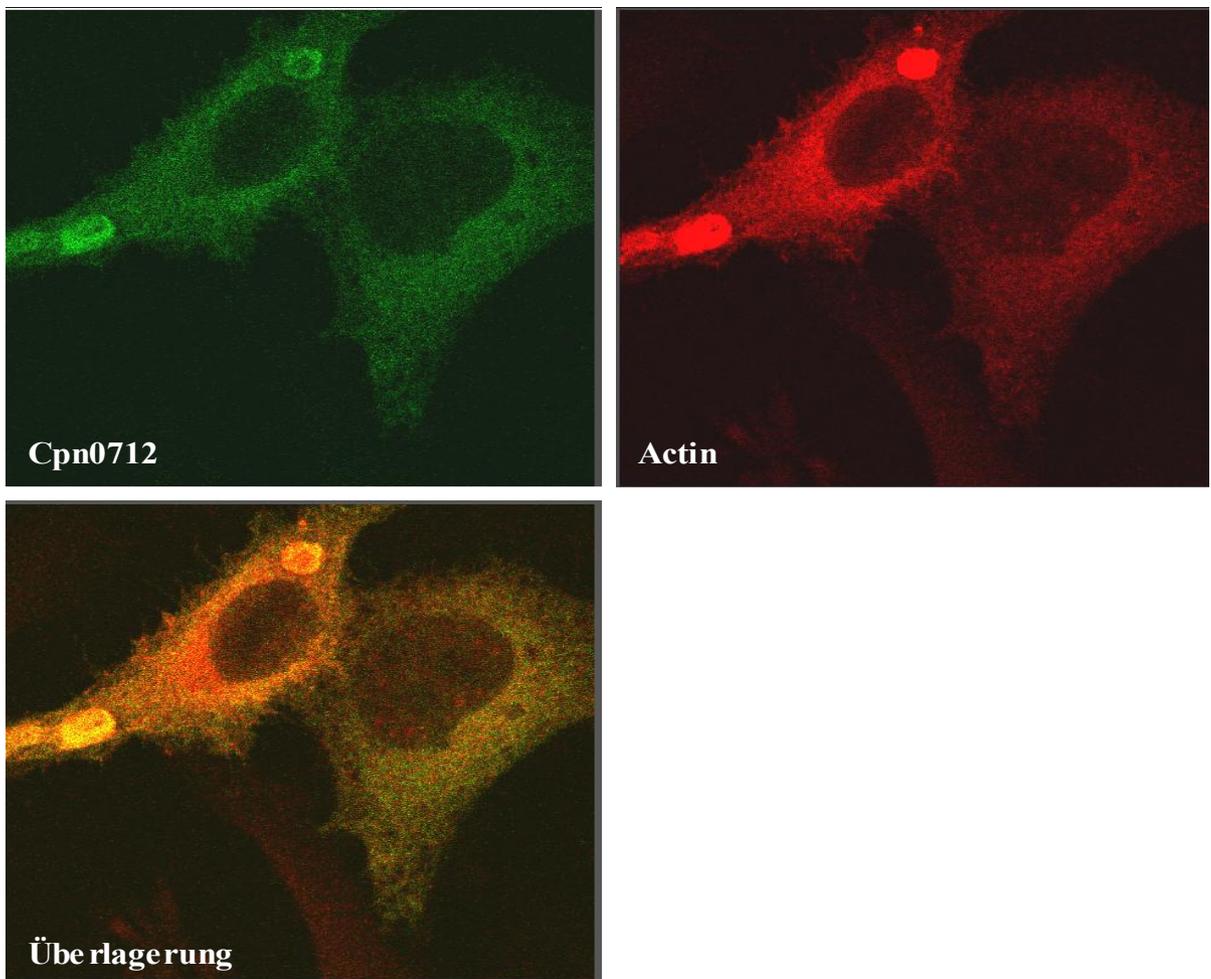
3.6.9. Lokalisation von Cpn0712 am Cytoskelett der Wirtszelle

Die Immunfluoreszenzanalysen erhärteten den Hinweis auf eine mögliche Lokalisation von Cpn0712 an Strukturen des Cytoskeletts. Als indirekter Nachweis einer Kolo­kalisierung sollten die Zellen mit Colchicin behandelt und danach eine Änderung der Lokalisation von Aktin und Cpn0712 untersucht werden.

HeLa-Zellen wurden mit pcDNA4/TO/myc-*cpn0712* transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 4 h mit 10 μ g bzw. 100 μ g Colchicine behandelt. Anschließend wurde die Zellen fixiert und ein Immunfluoreszenztest durchgeführt. Durch die Colchicin-Behandlung kommt es zum Zusammenbruch des Cytoskeletts und einer

Akkumulation von Aktin in der Peripherie der Zelle (Abb. 25B) Nach der Colchicin-Behandlung veränderte sich die Lokalisation von Cpn0712 in gleicher Weise wie die des α -Aktins (Abb. 25B) und es kam zu einer Überlagerung der Signale. Somit scheint Cpn0712 am Cytoskelett lokalisiert zu sein. Ob diese gleichzeitige Akkumulation in der Peripherie aufgrund einer Interaktion von Cpn0712 mit α -Aktin oder durch Interaktion mit anderen Bestandteilen des Cytoskeletts erfolgt, kann nicht eindeutig geklärt werden.

A)



Legende siehe Seite 88

B)

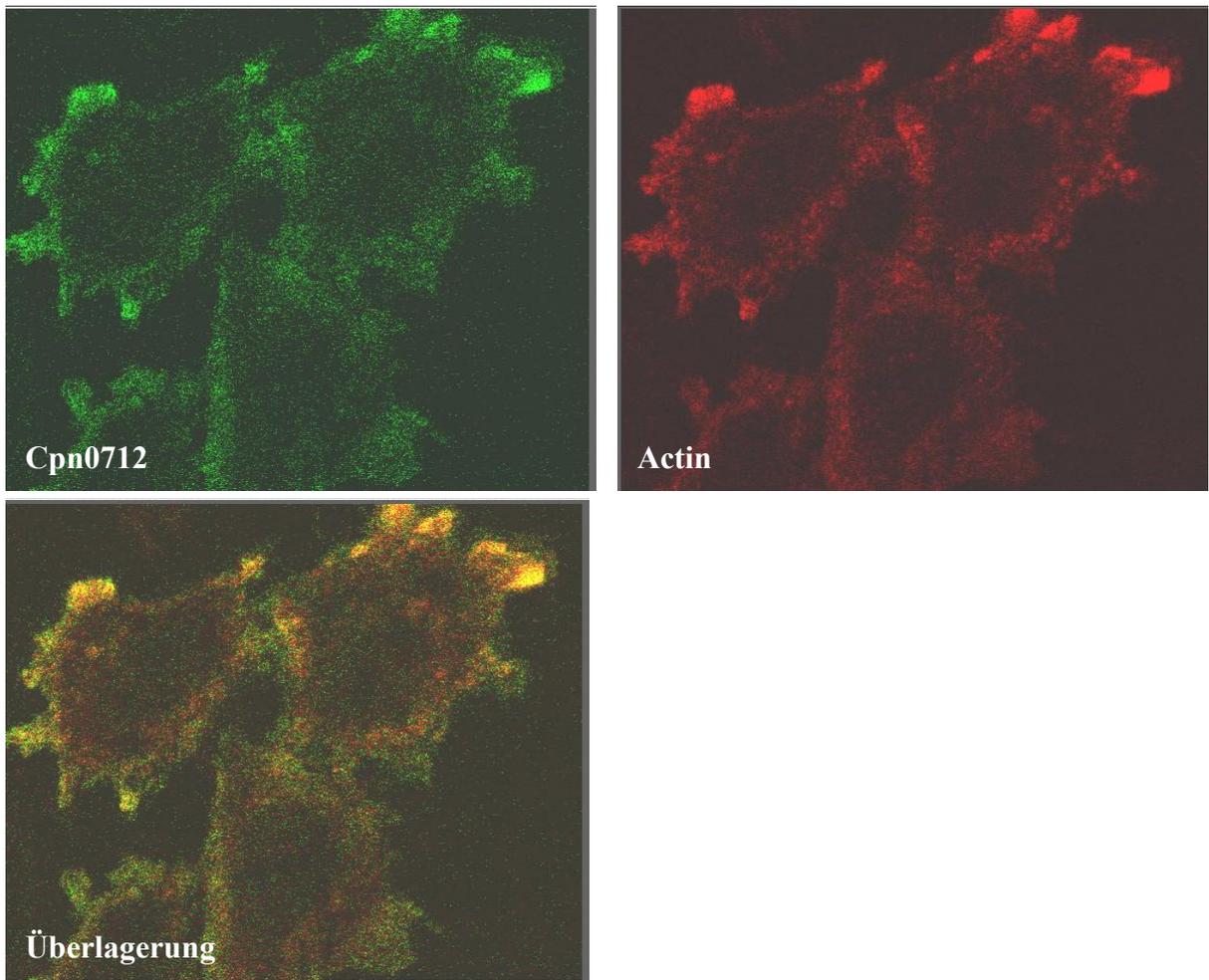


Abb. 25: Nachweis von Cpn0712 vor (A) und nach (B) Colchicin-Behandlung. HeLa-Zellen wurden mit pcDNA4/TO/myc-*cpn0712* transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 100µg Colchicine behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die intrazelluläre Lokalisation von Cpn0712 (grün) und Aktin (rot) mittels Immunfluoreszenztests und Konfokalmikroskopie bestimmt. Eine Ko-Lokalisation konnte durch die Gelbfärbung nach Überlagerung der Bilder gezeigt werden.

3.6.10. Intrazelluläre Lokalisation von Cpn0809

Da mittels Immunfluoreszenztest eine Lokalisation von Cpn0809 auch außerhalb der Inklusion und damit eine Sekretion in die Wirtszelle gezeigt wurde, sollte die Lokalisation des rekombinaten Cpn0809 in der Wirtszelle untersucht werden, um somit einen ersten Hinweis auf die Funktion des Proteins zu bekommen. Die *cpn0809*-transfizierte Zellen wurden auf Glasplättchen ausgesät, 24 h nach transients Transfektion fixiert und mit

einem Antikörper gegen den myc-tag sowie einen fluoreszenzmarkierten Cy-2-Zweitantikörper inkubiert. Dabei zeigte sich eine andere Lokalisation des Cpn0809-Proteins im Vergleich zu Cpn0712. Die Expression von Cpn0809 führte zu einem Expressionsmuster, bei dem das Fluoreszenzsignal im gesamten Cytoplasma detektiert werden konnte, sich aber an bestimmten Bereiche konzentrierte. Eine Ko-Lokalisation mit β -Tubulin und α -Actin konnte ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Immunfluoreszenztest mit einem Antikörper gegen Calnexin (Marker für ER) ergab eine Überlagerung der Signale für Cpn0809 und Calnexin, so dass Cpn0809 am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert zu sein scheint (Abb. 26).

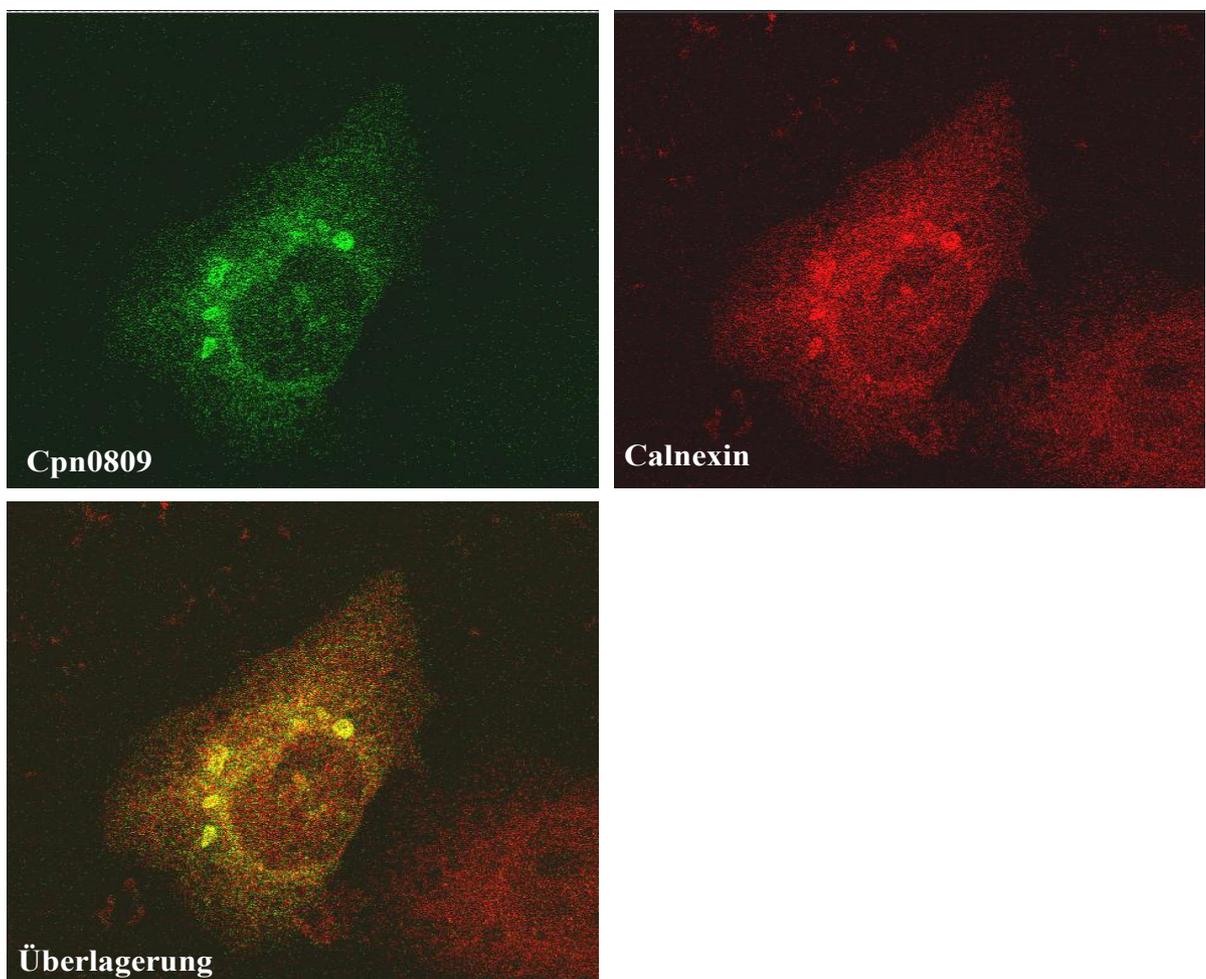


Abb. 26: Intrazelluläre Lokalisation von Cpn0809. Immunfluoreszenztest wurden mit pcDNA4/TO/myc-*cpn0809*-transfizierten HeLa-Zellen durchgeführt. Cpn0809 wurde mit einem Antikörper gegen den myc-tag und einem Cy2-Zweitantikörper (grün) nachgewiesen. Das ER wurde mit einem Antikörper gegen Calnexin und einem Cy3-Zweitantikörper (rot) detektiert. Nach Überlagerung der Bilder zeigte sich durch Gelbfärbung eine Ko-Lokalisation von Cpn0809 und Calnexin.

3.6.11. Einfluss von Cpn0712 auf das Phosphorylierungsmuster von HeLa-Zellen

Bakterien können durch Übertragung von Effektorproteinen Einfluss auf das Phosphorylierungsmuster der Wirtszelle nehmen (Backert et. al., 2005).

Cpn0712 zeigt Homologien zu einer Reihe von Proteinen, die eine mögliche Funktion in der Bindung und Phosphorylierung von Proteinen haben könnten. Alle homologen Proteine besitzen das Motiv für eine Forkhead associated domain. FHA-Domänen dienen der Vermittlung von Proteinbindungen über Phosphoserin- und Phosphothreoninreste und sind an der Regulation von verschiedenen Signaltransduktionswegen beteiligt. Prokaryotische FHA-Domänen sind u.a. an Signaltransduktionswegen, Typ III Sekretion und Wirtsbakterien Interaktionen beteiligt (Plano et al., 1995; Molle et al., 2003). Über die Funktion und die zellulären Interaktionspartner von Cpn0712-homologen Genen ist bislang nichts bekannt.

Die Sequenzanalyse mittels des BLAST- Programms ergab, dass Cpn0712 zwei Forkhead associated (FHA) Domänen (Position 3-97 und 394-486) und eine putative Phospholipid-Bindestelle (Position 702-756) enthält.

Um zu überprüfen, ob Cpn0712 mit Wirtszellproteinen interagiert, sollte das Phosphorylierungsmuster von *cpn0712*-transfizierten Zellen untersucht werden. Dafür wurden 1×10^6 HeLa-Zellen mit *cpn0712*-und nicht-rekombinanten Vektor transfiziert, nach 24 h lysiert und mittels eines SDS-Gels aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurden die Proteine mit einem Antikörper gegen α -Phosphoserin inkubiert. Eine Veränderung im Phosphorylierungsmuster zwischen den mock- und den *cpn0712*- transfizierten Zellen konnte nicht nachgewiesen werden.

Anschließend wurde die Membran mit einen Antikörper gegen α -Phosphothreonine inkubiert. Auch hier zeigte sich keine Veränderung im Phosphorylierungsmuster.

Eine Phosphorylierung von Wirtszellproteinen durch Cpn0712 kann aber nicht ausgeschlossen werden, da nur 30% der Zellen transfiziert waren und eventuell nur wenige Proteine von Cpn0712 phosphoryliert werden (Daten nicht gezeigt).

3.6.12. Cpn0712 und Cpn0809 können Apoptose nicht inhibieren

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Zellen, die mit *C. pneumoniae* infiziert sind, in der Lage sind durch externe Stimuli (z.B. Staurosporin) induzierte Apoptose zu verhindern (Fischer et al., 2004; Fan et al., 1998; Carratelli et al., 2002). Die Inhibierung erfolgt dabei durch eine Verminderung der Cytochrom c Freisetzung und Reduktion der Caspase3 und -9 Aktivität (Fischer et al., 2001). Die chlamydialen Effektorproteine, die für diesen Effekt verantwortlich sind, sind bislang nicht bekannt. Um zu untersuchen, ob Cpn0712 und Cpn0809 im Zusammenhang mit der Reduktion der Caspase3-Aktivität für die durch *C. pneumoniae* verursachte Inhibierung der Apoptose verantwortlich sind, wurden HeLa-Zellen mit *cpn0712* und *cpn0809* transfiziert und 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 4 h mit 1 μ M Staurosporin inkubiert, lysiert und die Caspase3-Aktivität gemessen. Im Vergleich zu nicht-transfizierten und Vektor-transfizierten Zellen zeigten *cpn0712*- und *cpn0809*-transfizierte HeLa-Zellen höhere Caspase3-Aktivität. Aufgrund der geringen Transfektionseffizienz von ca. 35% muss der Unterschied in der Aktivität dabei noch deutlich größer angesehen werden.

Während *C. pneumoniae*-infizierte Zellen die Staurosporin-induzierte Apoptose inhibieren können, scheinen Zellen, die mit *cpn0712* oder *cpn0809* allein transfiziert sind, sensibler auf Staurosporin zu reagieren.

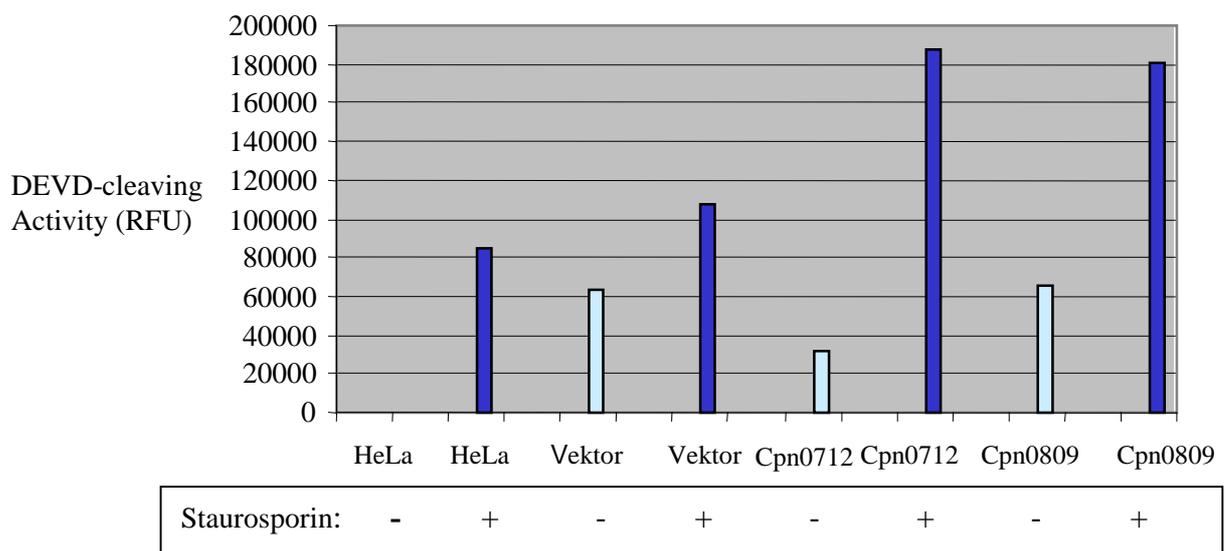


Abb. 26: Effekt von Cpn0712 und Cpn0809 auf die Caspase3-Aktivität. HeLa-Zellen wurden mit Vektor, *cpn0712* oder *cpn0809* transfiziert und die Caspase-Aktivität mit und ohne Staurosporinbehandlung durch das fluoreszierende Substrat DEVD gemessen. Als Kontrolle dienten nicht-transfizierte HeLa-Zellen. Die Daten sind als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) dargestellt.

Der Einfluss von Cpn0712 und Cpn0809 auf die Apoptose von HeLa-Zellen wurde ebenfalls mittels Immunfluoreszenztests untersucht. Dafür wurden HeLa-Zellen mit *cpn0712* und *cpn0809* transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 1 μ M des Kinaseinhibitors Staurosporin für 3,5 h inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und die nukleare Kondensation durch Immunfluoreszenztests analysiert. Die Zellkerne wurden mit einem interkalierenden DNA-Farbstoffes (Hoechst) gefärbt.

Zum Vergleich wurden HeLa-Zellen *in vitro* mit *C. pneumoniae* infiziert. 24 h p.I. wurde die Apoptose durch Inkubation mit 1 μ M Staurosporin induziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit Höchst gefärbt.

Wie in Abb. 27 zu sehen ist, verursacht Staurosporin eine Dekondensation der Zellkerne in nicht-infizierten HeLa-Zellen, während in *C. pneumoniae*-infizierten Zellen die Zellkerne intakt blieben. In den mit *cpn0712*- und *cpn0809*-transfizierten Zellen wurde nach Staurosporinbehandlung ebenfalls eine Dekondensation der Zellkerne beobachtet, was die Ergebnisse der Caspase3 Aktivitätsmessung bestätigt. Die Expression von Cpn0712 oder Cpn0809 bietet der Zelle somit keinen Schutz vor der induzierten Apoptose und ist somit auch für den bei *C. pneumoniae*-infizierten Zellen beobachteten Schutz gegenüber Apoptose nicht verantwortlich. Ohne Staurosporinbehandlung konnte in *cpn0712*- und *cpn0809*-transfizierte Zellen keine Dekondensation der Zellkerne detektiert werden, somit haben Cpn0712 und Cpn0809 auch keinen proapoptotischen Effekt auf die Wirtszelle, wie er zum Ende des Entwicklungszyklus von Chlamydien beobachtet wurde.

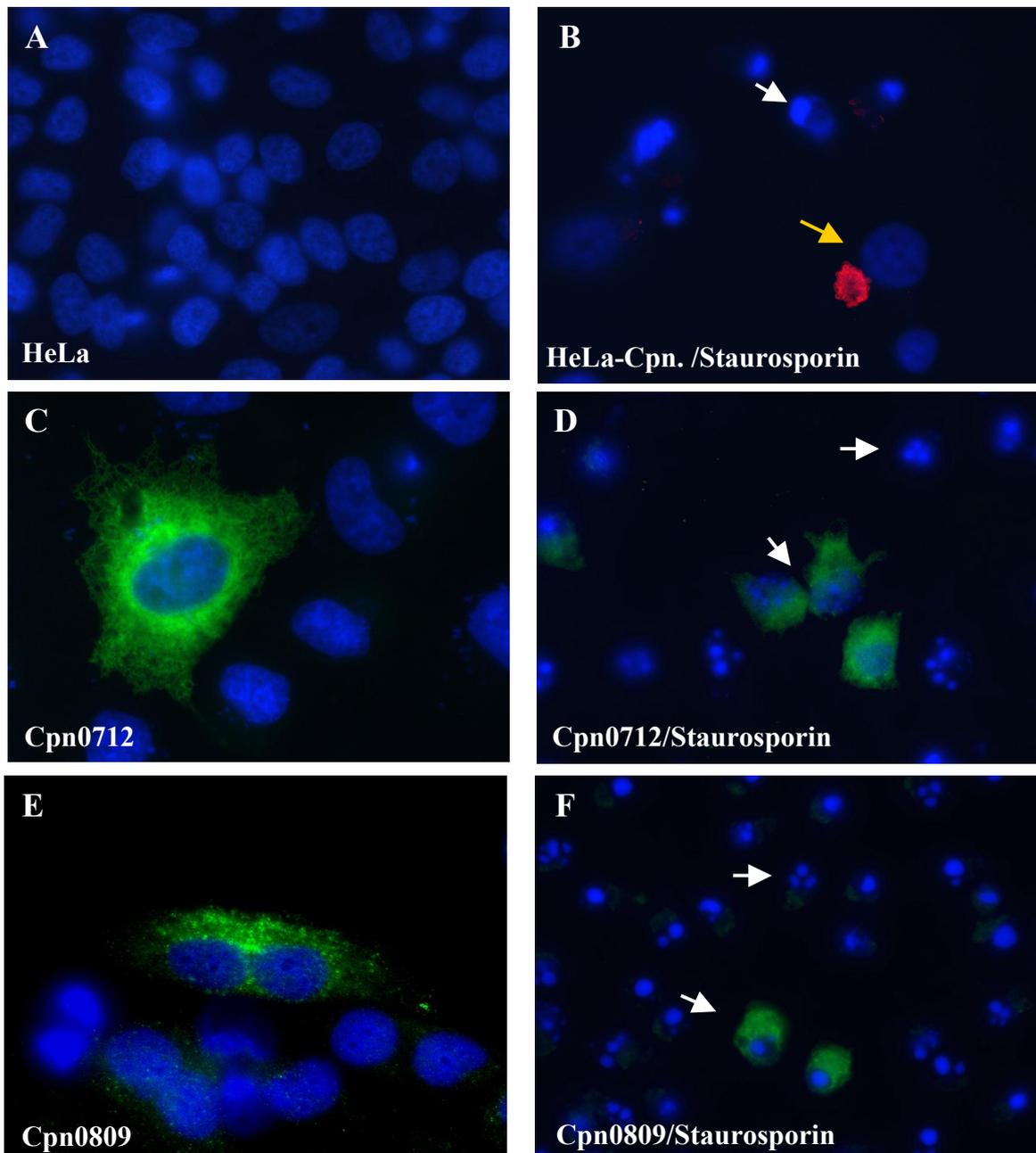


Abb. 27: Cpn0712 und Cpn0809 haben keinen Einfluss auf die Apoptose. A) nicht-infizierte Zellen gefärbt mit Höchst. B) Mit *C. pneumoniae*-infizierte Zellen (rot) wurden 3,5 h mit 1 μ M Staurosporin behandelt. Nichtkondensierte Kerne wurden in Zellen gefunden, die infiziert waren. Uninfizierte Zellen zeigten kondensierte (apoptotische) Kerne. C) Mit *cpn0712*-transfizierte Zellen (grün). Transfizierte Zellen zeigten keine kondensierte Kerne. Apoptose wird somit durch Cpn0712 nicht ausgelöst. D) *cpn0712*-transfizierte Zellen (grün) wurden mit Staurosporin behandelt. Transfizierte Zellen zeigten ebenso wie nicht-transfizierte Zellen kondensierte Zellkerne (Apoptose). E) Mit *cpn0809*-transfizierte HeLa-Zellen (grün). F) *Cpn0809*-transfizierte Zellen nach Staurosporinbehandlung. Auch die Zellkerne der transfizierten Zellen waren kondensiert. Apoptotische Zellen wurden mit weißen Pfeilen gekennzeichnet, infizierte Zellen mit gelben Pfeilen.

3.6.13. Expression von Cpn0712 und Cpn0809 im Wirtszelleytoplasma beeinflusst die nachfolgende Chlamydieninfektion nicht

Für das *C. caviae* Einschlusskörpermembranprotein IncA konnte gezeigt werden, dass die artifizielle Expression von IncA in der Wirtszelle zu einer Reduktion der Einschlusskörper führt und nachfolgende Infektionen mit *C. caviae* blockiert (Alzhanov et al., 2004).

Mittels Immunfluoreszenztest konnte sowohl für Cpn0712 als auch für Cpn0809 eine Sekretion in die Wirtszelle nachgewiesen werden. Die Lokalisation von Cpn0712 verblieb dabei dicht im Bereich des Einschlusskörpers, so dass eine Funktion, die ebenfalls im Zusammenhang mit der Entwicklung des Einschlusskörpers steht, vermutet werden konnte. Um einem möglichen Effekt von Cpn0712 und Cpn0809 auf die Entwicklung des Einschlusskörpers zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit pcDNA4/TO/myc-*cpn0712* und pcDNA4/TO/myc-*cpn0809* transfiziert und 24 h später mit *C. pneumoniae* infiziert. 24 und 48 h pI. wurden die Zellen fixiert und mittels Immunfluoreszenztests analysiert. Die Zellen wurden mit einem Primärantikörper gegen den myc-tag der rekombinanten Proteine und gegen IncA inkubiert und im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Anzahl der transfizierten Zellen wurde vor der Infektion sowie 24 und 48 h pI. ermittelt. Es konnten keine Unterschiede in der Transfektionseffizienz von *cpn0712* und *cpn0809* festgestellt werden.

Anschließend wurde der Prozentsatz von transfizierten Zellen, die Einschlusskörper enthielten, analysiert und mit der Anzahl der Einschlusskörper der nicht-transfizierten Zellen verglichen. pcDNA4/TO/myc-*cpn0712*-transfizierte Zellen wurden fast genauso häufig infiziert wie die umliegenden nicht-transfizierten Zellen (Abb. 28). Es konnten sowohl 24 als auch 48 h nach *C. pneumoniae* Infektion Einschlusskörper in *cpn0712*-transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Die Anzahl der Einschlusskörper war nicht reduziert und es zeigten sich keine morphologischen Veränderungen. Somit blockiert Cpn0712 weder die Infektion mit *C. pneumoniae* noch die Entwicklung der Einschlusskörper.

Im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen konnte ein geringerer Prozentsatz *cpn0809*-transfizierter Zellen nachgewiesen werden, die infiziert waren (Abb. 28). Die Anzahl der Einschlusskörper unterschied sich in transfizierten Zellen nicht von der Anzahl in nicht-transfizierten Zellen, ebenso zeigten sich keine morphologischen Veränderungen (Abb. 29).

Anschließend wurde der Versuch in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt. Zuerst wurden die Zellen mit *C. pneumoniae* infiziert und 24 h später mit pcDNA4/TO/myc-*cpn0712* und pcDNA4/TO/myc-*cpn0809* transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und mittels Immunfluoreszenztests analysiert. Weder bei Cpn0712- noch bei Cpn0809-Expression konnte eine morphologische Veränderung der Einschlusskörper nachgewiesen werden.

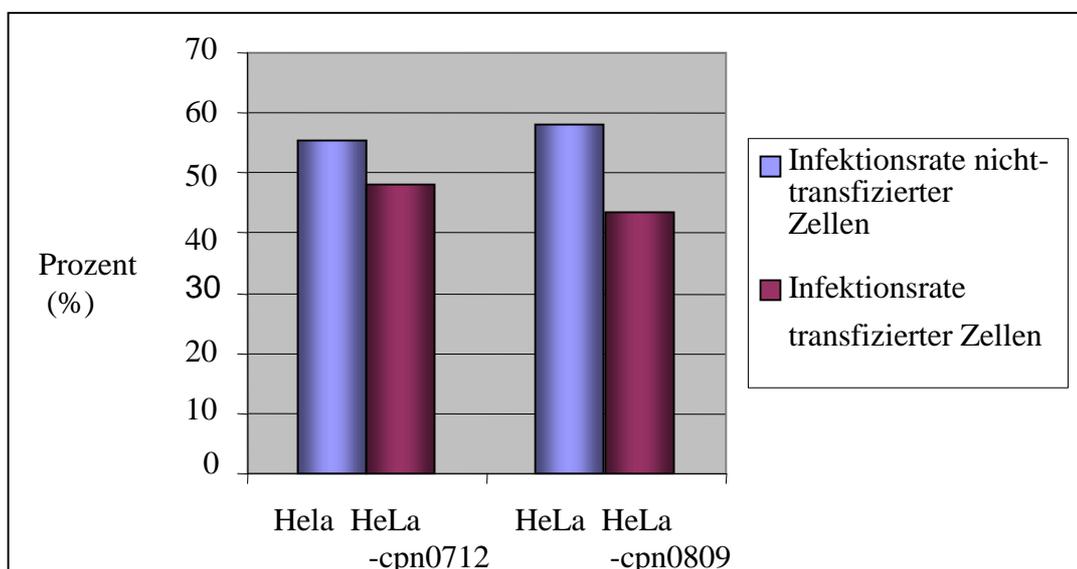


Abb. 28: Quantitative Analyse der Transfektions/Infektionsexperimente. Die gezeigten Daten repräsentieren die Zahl der infizierten Zellen je hundert transfizierter oder nicht-transfizierter Zellen. Jeweils in blau sind die Infektionsraten der nicht-transfizierten HeLa-Zellen dargestellt, in rot sind die Infektionsraten der *cpn0712*- und *cpn0809*-transfizierten HeLa-Zellen dargestellt.

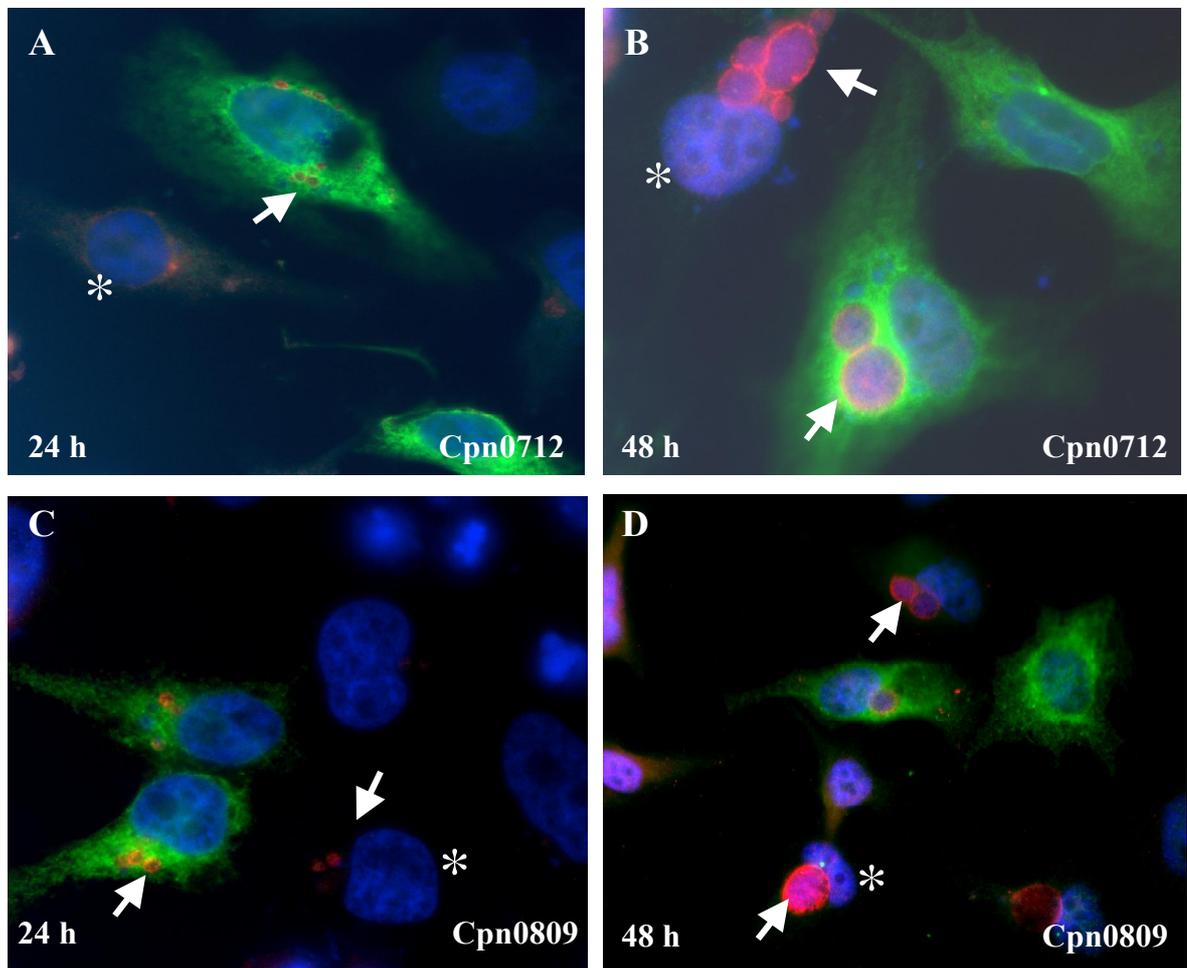


Abb. 29: Effekt der cytosolischen Expression von Cpn0712 und Cpn0809. HeLa-Zellen wurden mit pcDNA4/TO/myc-*cpn0712* und pcDNA4/TO/myc-*cpn0809* transfiziert und 24 h später mit *C. pneumoniae* infiziert. In der Abb. sind jeweils Mischpopulationen von transfizierten (grünes Cytoplasma) und nicht-transfizierten Zellen (*) zu sehen. Die rekombinanten Proteine wurden mit einem anti-myc Antikörper nachgewiesen (grün), die Einschlusskörper wurden mit einem IncA-Antikörper detektiert (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Pfeile zeigen auf Einschlusskörper. Abb. A: HeLa-Zellen transfiziert mit *cpn0712* und anschließend für 24 h mit *C. pneumoniae* infiziert. Abb. B: HeLa-Zellen transfiziert mit *cpn0712* und anschließend 48 h mit *C. pneumoniae* infiziert. Abb. C: HeLa-Zellen transfiziert mit *cpn0809* und 24 h mit *C. pneumoniae* infiziert. Abb. D: HeLa-Zellen transfiziert mit *cpn0809* und 48 h mit *C. pneumoniae* infiziert. Weder bei Cpn0712- noch bei Cpn0809-Expression konnte eine Veränderung der Einschlusskörper in Bezug auf Größe oder Anzahl nachgewiesen werden.

3.7. Einfluss von Cpn0712 auf die Genexpression von HeLa-Zellen

Um den Einfluss von Cpn0712 auf die Genexpression der Wirtszelle zu untersuchen, wurde das Transkriptom von *cpn0712*- und mock-transfizierten HeLa-Zellen mittels cDNA Mikroarray verglichen. Die Frage war, welche Gene signifikant in ihrer Transkription verstärkt oder vermindert sein würden. Das gäbe Aufschluss darüber, ob die Transkription zellulärer Gene durch Cpn0712 beeinflusst wird.

Die Zellen wurden mit *cpn0712* oder Vektor transfiziert und 48 h inkubiert. Bevor die RNA-Pools der transfizierten Zellen für den Array eingesetzt wurden, wurde zunächst die Expression und Transfektionseffizienz mittels Immunfluoreszenztest überprüft. Wie in Abb. 30 dargestellt, zeigten ca. 40% der *cpn0712*-transfizierten HeLa-Zellen eine grüne Fluoreszenz und exprimierten somit Cpn0712.

Gleichzeitig wurde die Gesamt-RNA isoliert und RT-PCR-Analysen mit *cpn0712*- und Aktin-spezifischen Primern durchgeführt, um die Qualität der isolierten mRNA der *cpn0712*-transfizierten bzw. Vektor-transfizierten Zellen zu überprüfen (Abb. 30). Zur Gewährleistung von sauberen und ausreichend konzentrierten Proben wurden die RNA-Isolierung der *cpn0712*-transfizierten bzw. Vektor-transfizierten Zellen und Überprüfung in einem doppelten Ansatz durchgeführt.

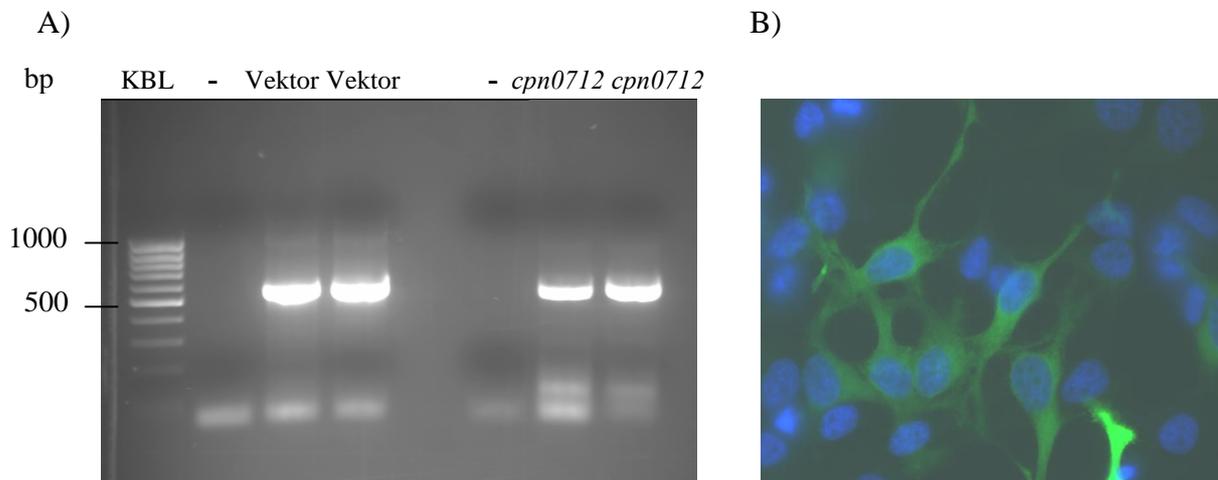


Abb. 30: Kontrolle der *cpn0712*- und Vektor-transfizierten HeLa-Zellen. A) Gesamt-RNA wurde jeweils im doppelten Ansatz von Vektor- und *cpn0712*-transfizierten Zellen isoliert und die Qualität der mRNA durch RT-PCRs überprüft. Für die *cpn0712*-transfizierten Zellen wurden *cpn0712*-spezifischen Primer, für die Vektor-transfizierten Zellen wurden Aktinprimer verwendet. B) Um die Effizienz der *cpn0712*-Transfektion zu bestimmen, wurden Immunfluoreszenztests durchgeführt. Die Zellen wurden mit einem anti-myc-Antikörper und einem Cy2-konjugierten Sekundärantikörper angefärbt. Die Zellkerne wurden mittels Hoechst-Färbereagens (blau) dargestellt.

Während der Aufarbeitung der Proben für den Mikroarray wurde die Menge und Qualität der RNA Proben zusätzlich mittels NanoDrop ND-1000 Spektrometer überprüft. Zur Bewertung wurde das resultierende Elektropherogramm und der erzielte RIN-Wert herangezogen. Es wurde jeweils ein Wert von 9.8 erreicht. Jeweils 1µg wurden für die weitere cDNA-Synthese verwendet. Der Mikroarray wurde in einem vierfachen Ansatz durchgeführt. Die cDNA-Proben, die ausgehend von den RNA-Ansätzen von *cpn0712*- und mock-transfizierten Zellen synthetisiert wurden, wurden je zur Hälfte mit Cy3 und Cy5 markiert. Cy3 markierte cDNA von *cpn0712* wurde mit Cy5 markierter cDNA des Vektoransatzes gemischt und umgekehrt. Jedes Cy3 und Cy5 Paar wurde für die Hybridisierung auf einem cDNA Array (Agilent) verwendet, auf dem sich Oligonukleotide von 40000 humanen Genen befanden. Nach dem Waschen der Chips erfolgte die Messung mittels des Agilent Microarray Scanners. Die Auswertung der Scannerergebnisse wurde vom Transkriptomlabor Göttingen durchgeführt. Zunächst wurde die Gesamtfluoreszenz der einzelnen Chips untereinander normiert und dann die Expressionswerte einzelner Gene untereinander verglichen. Als signifikant verändert reguliert wurden solche Gene eingestuft, die in mindestens einem Ansatz exprimiert und mindestens um den Faktor > 2

verändert transkribiert wurden. Die Gene, die eine signifikant veränderte Expression aufwiesen, sind in Tab. 8 im Anhang aufgelistet.

Es wurden über 1000 Gene identifiziert, deren Transkription sich signifikant (>2 fach) im Vergleich zu den mock-transfizierten Zellen veränderte. Dabei lag die relative Differenz zwischen 7,9 (*phactr*, runterreguliert) und 5,5 (*ca9*, hochreguliert). Selbst beim Vergleich der Gene mit einem signifikanten Unterschied von > 3fach zeigten noch 237 Gene einen signifikanten Unterschied. Davon zeigten 57 Gene eine verstärkte Transkription, während 180 Gene eine schwächere Transkription als die Vergleichsprobe zeigten.

Insgesamt waren damit 74% der in ihrer Expression veränderten Gene herunterreguliert und 26% der Gene hochreguliert.

20% der hochregulierten Gene und 19% der runterregulierten Gene hatten ein „Bipartite nuclear localisation signal“-Motiv in ihrer Sequenz. 9,5% der hochregulierten Gene zeichneten sich durch ein „Immunglobulin-like“-Motiv aus, während 12% der hochregulierten Genen zur „Rhodopsin-like GPCR Superfamily“ gehörten. Der Hauptteil der regulierten Gene (56% der hochregulierten und 31% der runterregulierten Gene) kodierte für Glycoproteine.

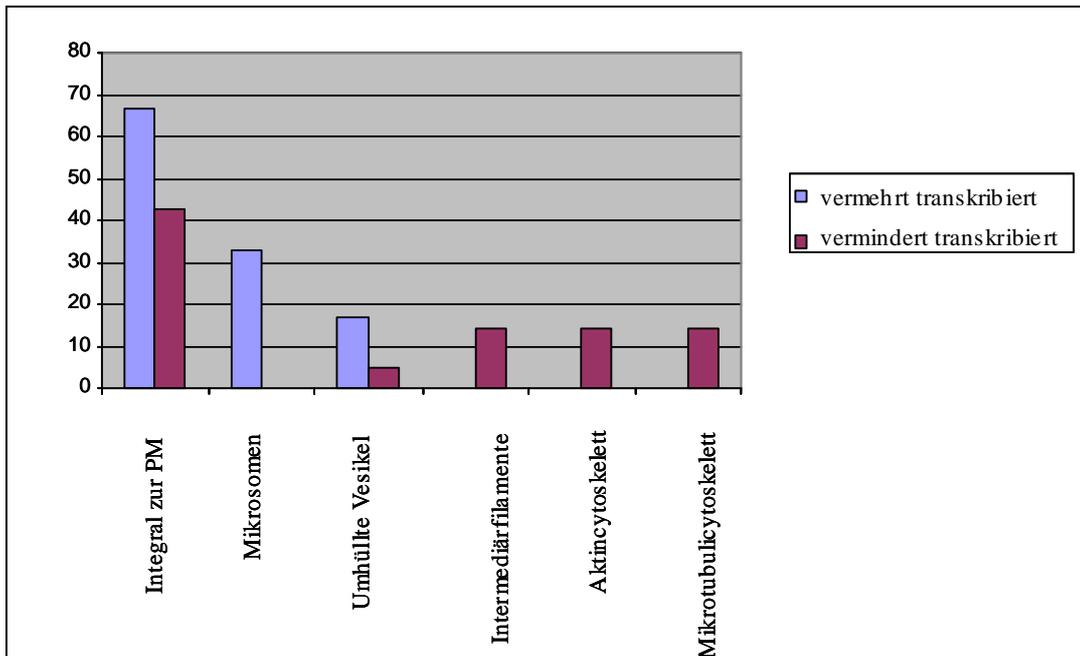
Die Ergebnisse dieser Analyse können dahingehend zusammengefasst werden, dass durch Transfektion mit *cpn0712* die Genexpression der Wirtszelle zum größten Teil herunterreguliert wird. Obwohl Gene, die in verschiedene Signaltransduktionswege involviert sind, verändert transkribiert wurden, geben sie keinen Hinweis auf einen spezifischen Signalweg, der Rückschlüsse auf mögliche Funktionen von Cpn0712 zulassen könnte. Ebenso konnte ein pro-apoptischer Effekt von Cpn0712 nicht bestätigt werden, da nicht nur anti-apoptische Gene sondern auch Gene, die an der Induktion des programmierten Zelltods beteiligt sind, durch die Transfektion von *cpn0712* verändert transkribiert wurden.

3.7.1. Einteilung der durch Cpn0712 verändert transkribierten Gene nach den GeneOntology Kriterien

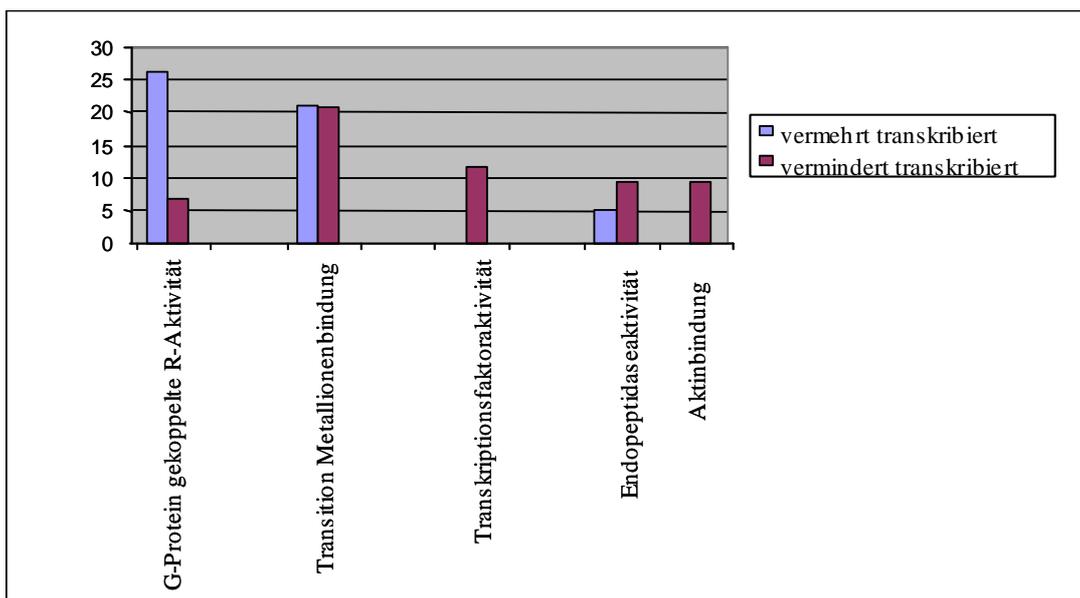
Eine Möglichkeit, große Datenmengen aus Mikroarray-Experimenten funktionell in einen Gesamtzusammenhang zu bringen, bietet die GeneOntology Analyse mit Programmen wie FatiGo (www.babelomics.com). Jedes auf dem Chip enthaltene Gen ist mit einer oder mehreren Gruppen aus den Bereichen molekulare Funktion, zelluläres Kompartiment und

biologischer Prozess verbunden (GO-Gruppen). Mittels dieser Klassifizierung ist die Identifikation funktionell zusammengehöriger Gruppen möglich. Die Analysen gliedern sich in verschiedene Ebenen (1 – 10), wobei die untergeordneten Ebenen immer spezifischer benannt werden. GO-Gruppen mit mehreren in ihrer Transkription modulierten Genen können Aufschlüsse über zugrunde liegende biologische Prozesse liefern, die durch die Expression von Cpn0712 beeinflusst werden. Die im folgenden dargestellten Diagramme wurden auf der Grundlage der FatiGo-plus-Ergebnisse erstellt. Abb. 31A zeigt die Verteilung der in ihrer Transkription veränderten Gene innerhalb der zellulären Komponenten auf der Ebene 5. Dabei zeigte sich, dass mit 67% der verstärkt – und 43% der vermindert transkribierten Gene, die meisten korrespondierenden Proteine integral zur Plasmamembran lokalisiert sind. Die Proteine der verstärkt transkribierten Gene waren außerdem vermehrt an den Mikrosomen und coated Vesikeln lokalisiert, während die Proteine der vermindert transkribierten Gene zu den Bestandteilen der Intermediärfilamente, des Aktincytoskelettes und des Mikrotubulicytoskelettes gehörten. Abb. 31B zeigt die Verteilung der Gene aufgrund ihrer molekularen Funktion auf Ebene 5. Mit 21% der vermehrt transkribierten– und 20,9% der vermindert transkribierten Gene haben die meisten korrespondierenden Proteine eine Funktion in der Metallionenbindung. Die meisten Proteine der vermehrt transkribierten Gene zeigten eine G-Protein gekoppelte Rezeptoraktivität, während sich mit 11,5% nur wenige vermindert transkribierten Gene mit dieser Funktion fanden. Die Proteine der vermindert transkribierten Gene hatten dafür Transkriptionsfaktoraktivität, die bei verstärkt transkribierten Genen nicht gefunden wurde. Abb. 31C zeigt die biologischen Prozesse an denen die verändert transkribierten Gene beteiligt sind. Mit jeweils 30,4% waren die Proteine der verstärkt transkribierten Gene an den Prozessen Immunantwort und oberflächenvermittelter Signaltransduktion beteiligt, während die Proteine der vermindert transkribierten Gene mit 9,8% nur einen geringen Einfluss auf diese Prozesse haben. Die korrespondierenden Proteine der vermindert transkribierten Gene waren hauptsächlich an Prozessen des Protein-, - Makromolekül – und Nukleinsäuremetabolismus involviert. Eine fast gleichmäßige Verteilung der verändert transkribierten Gene fand sich in der Regulation des zellulären Metabolismus und der zellulären Biosynthese.

A) Zelluläre Komponente: Level 5



B) Molekulare Funktionen: Level5



C) Biologische Prozesse: Level5

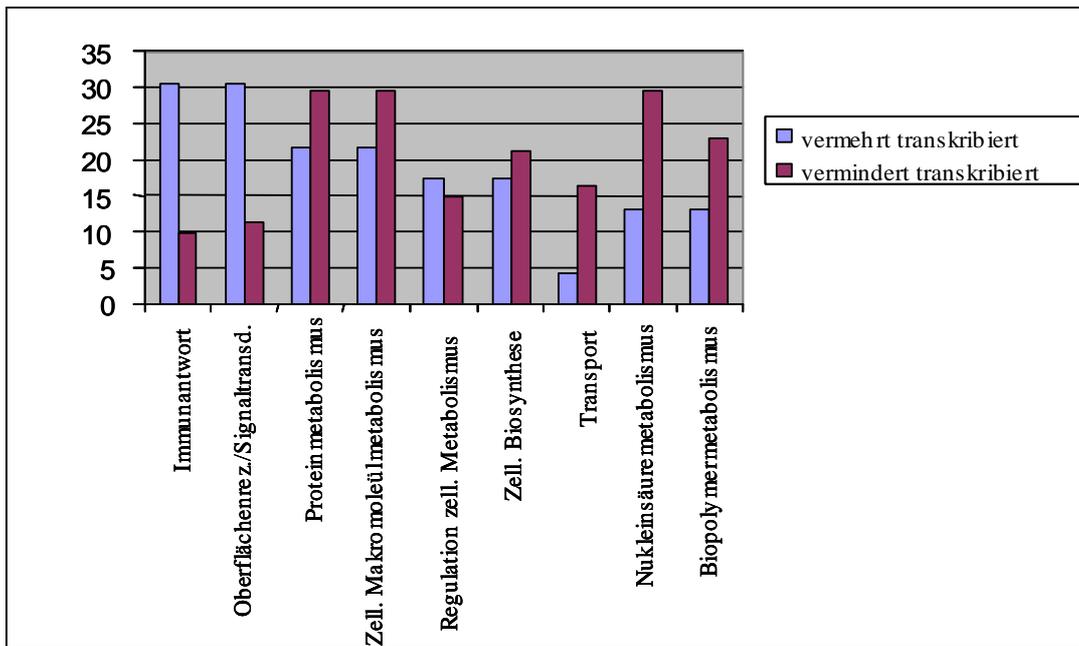


Abb. 31: Klassifizierung der Mikroarray Daten nach den GeneOntology Kriterien. Diese Sortierung ermöglicht die Identifikation funktionell zusammengehöriger Gruppen. Eingegeben wurden die Gene, die eine veränderte Transkription von über 3.0 zeigten. A) Verteilung der Gene innerhalb der zellulären Komponenten, B) Verteilung der Gene nach ihrer molekularen Funktion, C) Verteilung der Gene in biologische Prozesse. Blau: verstärkt transkribierte Gene, Rot: vermindert transkribierte Gene.

3.7.2. Sortierung in Genfamilien

Innerhalb der von Cpn0712 in ihrer Transkription veränderten Gene konnten einige bestimmten Genfamilien zugeordnet werden. Die am stärksten regulierte Familie waren die Pregnancy- β 1-Glycoproteine (PSG) von denen 9 der 11 Mitglieder vermindert transkribiert wurden. Sieben der 11 Mitglieder waren unter den 20 am stärksten in ihrer Transkription verminderten Genen. Acht zeigten eine verminderte Transkription von mehr als 3.0. Die PSGs gehören zur Immunglobulin-Superfamilie (CEA-Familie). Sie werden normalerweise in der Plazenta gebildet und regulieren die maternale Immunantwort in Bezug auf den Fötus. PSGs induzieren hierbei die Sekretion von anti-inflammatorische Cytokinen. Des Weiteren war die Transkription aller drei Mitglieder der Caveolin-Familie vermindert. Die CAV-Proteine sind die Hauptbestandteile der Caveolarmembran. Sie sind für den

initialen Schritt in der Kopplung von Integrinen in den RAS-ERK-Signaltransduktionsweg verantwortlich und an der Zellzyklusprogression beteiligt. Außerdem können sie durch Interaktion mit G-Protein α -Untereinheiten deren Aktivität regulieren.

Auch waren mehrere Mitglieder der Cytokeratine in ihrer Transkription vermindert. Die Cytokeratine gehören zu den Intermediärfilamenten und liegen normalerweise als Heterotetramere aus Typ1 und Typ2 Keratinen vor. Es wurden sowohl Keratine vom Typ1 als auch vom Typ2 in ihrer Transkription vermindert.

Zwei der drei *gadd*-Gene zeigten eine verminderte Transkription. GADD-Proteine sind am MAPK-Signaltransduktionsweg beteiligt und werden durch genotoxischen Stress und „Growth arrest“ Signale induziert. Eine Repression dieser Gene verhindert Apoptose.

Mitglieder weiterer Familien zeigten ein schwächere Transkriptionsverminderung von 2.0-3.0 im Vergleich zu den Vektor-transfizierten Zellen (Tab. 10 Anhang).

3.7.3. Bestätigung der Ergebnisse durch Real Time RT-PCR

Um die Ergebnisse des cDNA-Mikroarray zu bestätigen, wurden Real Time RT-PCRs durchgeführt. Acht in ihrer Transkription veränderte Gene wurden amplifiziert und die Ergebnisse mit denen des Mikroarrays verglichen. Als Ausgangsmaterial wurden dieselben RNA-Proben, wie für den Mikroarray verwendet. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und in den Konzentration 1ng, 10ng und 100ng verwendet. Um eine veränderte Expressionsstärke durch unterschiedliche Mengen an RNA auszuschließen, wurde zuerst eine PCR mit dem konstitutiv exprimierten *g3pdh* durchgeführt und die RNA-Proben nach dessen Expressionsstärke normiert. Für die Bestätigung durch Real Time RT-PCR wurden repräsentative Gene ausgesucht: *Krt7* und *krt17* (Intermediärfilamente), *serpinB3* und *tnfaip3* (Immunantwort), *psg3* (maternale Immunantwort), *cav1* (Caveolin), *ddit3* (Signaltransduktion), *gucy1b* (Guanylate-cyclase). Für fast jedes in seiner Transkription verminderte Gen konnte die Transkriptionsänderung bestätigt werden (Tab. 5). Die Transkriptionsänderung konnte auch bestätigt werden, wenn RNA aus einem weiteren Transfektionsansatz eingesetzt wurde. Die Hochregulation von *serpinB4* konnte jedoch nicht bestätigt werden.

Um zu überprüfen, ob dieser Effekt spezifisch für Cpn0712 ist, wurde die Expression von *krt7*, *krt17* und *psg3* in *cpn0809*-transfizierten Zellen untersucht. Im Vergleich zu mock-infizierten Zellen wurden *krt7* und *krt17* durch Cpn0809 in ihrer Transkription verstärkt,

somit wurden diese Gene durch die Anwesenheit von Cpn0809 in eine andere Weise als durch Cpn0712 reguliert. *Psg3* zeigte in *cpn0809*-transfizierten Zellen ebenfalls ein verminderte Transkription (Tab. 5).

3.7.4. Vergleich der Genexpression von infizierten zu transfizierten HeLa-Zellen

Um zu überprüfen, ob die regulierten Gene nach Expression von Cpn0712 bei einer normalen Chlamydieninfektion in gleicher Weise in ihrer Transkription verändert werden, wurde das Expressionsmuster dieser Gene in HeLa-Zellen untersucht, die 24 h und 62 h mit *C. pneumoniae* infiziert wurden. Dabei wurde eine Infektionsrate von 30% gewählt, um den gleichen Hintergrund wie in den transfizierten Proben zu erhalten. Fast alle untersuchten Gene zeigten nach Infektion mit *C. pneumoniae* eine zur Transfektion mit *cpn0712* entgegengesetzte Transkriptionsänderung (Tab. 5). Die Gene wurden zu den zwei getesteten Zeitpunkten zwar unterschiedlich stark reguliert, doch zeigte sich kein Wechsel in der Art der Transkription (vermehrt bzw. vermindert), die dann mit dem *cpn0712*-transfizierten Zellen übereinstimmen würde. Somit unterscheidet sich der Effekt, den Cpn0712 alleine auf die Genexpression der Wirtszelle ausübt, erheblich von dem Effekt, der durch eine Chlamydieninfektion ausgelöst wird.

Gen	Mikroarray Vektor- Cpn0712	Real-Time PCR			
		Vektor Cpn0712	HeLa- HeLa-Cpn24h	HeLa- HeLa-Cpn62h	Vektor- Cpn0809
<i>krt7</i>	-3,7	-5,00	3,97	3,60	2,50
<i>krt17</i>	-4,1	-4,56	3,46	5,40	1,80
<i>cav1</i>	-3,1	-5,10	5,60	4,60	-22,00
<i>psg3</i>	-6,0	-22,30	3,35	0,48	
<i>tnfaip3</i>	-4,6	-7,90	44,00	3,48	
<i>gucylb</i>	-5,4	-2,17	2,49	2,36	
<i>znfx1b</i>	-5,4	-15,34	9,80	2,11	
<i>serpinb4</i>	3,6	-4,20	-13,48	-3,70	

Tab. 5: *C. pneumoniae*- und Cpn0712-induzierte Veränderung der Genexpression ermittelt durch Mikroarray und Real Time RT-PCR. In *cpn0712* -transfizierten Zellen wurde die Genexpression mittels Mikroarray und Real Time RT-PCR überprüft. Für die *C. pneumoniae*-Infektion wurde die Genexpression mittels Real Time RT-PCR zu 2 verschiedene Zeitpunkten (24 und 62 h pI.) untersucht. Positive Werte stehen für eine verstärkte Transkription des Gens durch Cpn0712 bzw. *C. pneumoniae*, negative Werte für eine verminderte Transkription.

3.7.5. Vergleichender Einfluss von *C. pneumoniae* und Cpn0712 auf die Genexpression von HeLa-Zellen

Mit Ausnahme von *serpinB4* zeigte keines der ausgewählten Gene, deren Transkriptionsänderung mittels RT-Real Time-PCR überprüft wurde, die gleiche Änderung in *cpn0712*-transfizierten und *C. pneumoniae*-infizierten Zellen.

Um zu überprüfen, welche der durch Cpn0712 in ihrer Transkription veränderten Gene auch durch *C. pneumoniae* in gleicher Weise verändert werden, wurden HeLa-Zellen mit *C. pneumoniae* infiziert und 54 h inkubiert. Der Anteil der mit *C. pneumoniae*-infizierten Zellen wurde durch eine Giemsa-Färbung bestimmt. In 70% der Zellen konnten Einschlusskörper nachgewiesen werden. Während der Aufarbeitung der Proben für den Mikroarray wurde die Menge und Qualität der RNA Proben mittels NanoDrop ND-1000 Spektrometer überprüft. Zur Bewertung wurde das resultierende Elektropherogramm und der erzielte RIN-Wert herangezogen (Abb. 33). Anschließend wurde ein Mikroarray, der nur aus den durch Cpn0712 allein regulierten Genen besteht, durchgeführt.

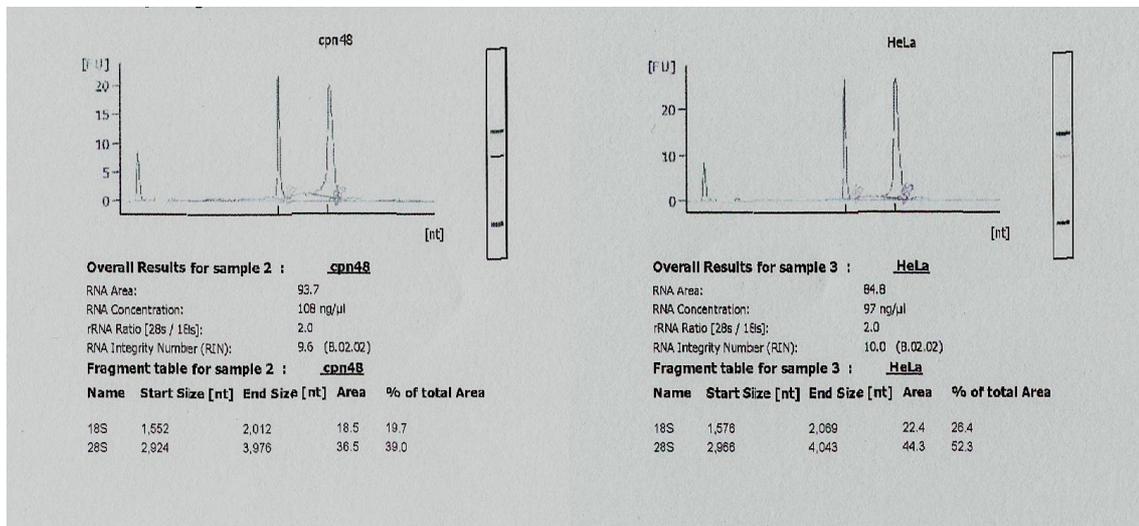


Abb. 33: Elektropherogramm der RNA der infizierten und nicht-infizierten HeLa-Zellen. Die infizierten HeLa-Zellen hatten einen RIN-Wert von 9,6; die nicht-infizierten Zellen den Höchstwert von 10,0. Somit konnte die RNA für den Mikroarray verwendet werden.

Es wurden 435 Gene identifiziert, deren Transkription sich signifikant (>2 fach) im Vergleich zu den nicht-infizierten Zellen veränderte. Dabei lag die relative Differenz zwischen 5,8 (*igfbp3*, runterreguliert) und 5,1 (*cyr61*, hochreguliert).

Insgesamt waren damit 51,3% der Gene runterreguliert und 48,7% der Gene hochreguliert. Die relative Differenz der durch *C. pneumoniae* in ihrer Transkription veränderten Gene lag dabei im gleichen Bereich wie die durch Cpn0712 verändert transkribierten Gene, allerdings zeigten nur wenige Gene eine Modulation ihrer Transkription, die mehr als 3-fach erhöht, bzw. erniedrigt war. Die Mehrzahl der durch Cpn0712 in ihrer Transkription veränderten Gene wurden ebenfalls durch *C. pneumoniae* beeinflusst, allerdings in anderer Richtung.

Es wurden nur 6 Gene identifiziert, deren Transkription sich sowohl in infizierten als auch in transfizierten Zellen in gleicher Weise änderte. 2 Gene der „Interferon induced protein with tetratricopeptid 3 repeat- Family“ (*ifit1* und *ifit3*) und ein unbekanntes Gen, das einer Asparagine Synthetase ähnelt (Tab. 6) wurden verstärkt transkribiert. Eine verminderte Transkription zeigten *glp-2r* (glucagon like peptid 2 receptor), *eif5* (eukaryotic translation initiation factor 5) und ein unbekanntes Gen, das der „Tyrosin ligase like family member 11“ ähnelt (Tab.6). Ein Zusammenhang mit Chlamydien wurden bislang nur für *ifit1* und *ifit3* erwähnt (Ren et al., 2003; Lad et al., 2005).

Gen	Name	Familienmitglied auf den Chip	bio. Prozess	Regulation durch Cpn0712	Regulation durch <i>C. pneumoniae</i>
<i>ifit1</i> <i>ifit3</i>	Interferon induced protein with tetratricopeptid 3 repeat	5 5	Immunantwort	2,9 2,6	2,2 2,9
<i>loc464157</i>	similar to asparagine synthetase	2	Metabolismus	2,5	1,6
<i>glp-2r</i>	Glucagon like peptide 2 receptor	1		-2,9	-2,4
<i>eif5</i>	eukaryotic translation initiation factor	39	Zellzyklus	-2,2	-2,5
<i>loc491355</i>	similar to tubulin tyrosin ligase like family member 11 (tll11)	1		-2,3	-1,6

Tab. 6: Gene, die durch Cpn0712 und *C. pneumoniae* in gleicher Weise in ihrer Transkription moduliert wurden. In den ersten 2 Spalten sind der Gennamen und die Abkürzung des Namens vermerkt. In den nächsten Spalten sind die Anzahl der Familienmitgliedern, die auf dem Chip vorkamen und die biologischen Prozesse zu denen sie gehören, eingetragen. In den weiteren Spalten stehen die Faktoren der jeweiligen Regulation durch Cpn0712 bzw. *C. pneumoniae* Infektion. Positive Werte stehen für eine Hochregulation des Gens, negative Werte für eine Runterregulation des Gens.

3.7.6. Bestätigung der Ergebnisse durch Real Time RT-PCR mittels Light Cycler

Um die Ergebnisse des cDNA-Mikroarrays zu bestätigen, wurden Real Time RT-PCRs eingesetzt, um die 6 verändert transkribierten Gene zu amplifizieren und die Ergebnisse mit denen des Mikroarrays zu vergleichen. Als Ausgangsmaterial wurden dieselben RNA-Proben, wie für den Mikroarray verwendet. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und 100ng für die PCR eingesetzt. Um eine veränderte Expressionsstärke durch unterschiedliche Mengen an RNA auszuschließen, wurde zuerst eine PCR mit dem konstitutiv exprimierten *g3pdh* durchgeführt und die RNA-Proben nach dessen Expressionsstärke normiert. Für jedes dieser Gen konnte die Regulation mittels Real Time RT-PCR bestätigt werden (Tab. 7).

Von den 40000 Genen, die mittels des Mikroarrays analysiert wurden, zeigten ca. 1000 Gene eine mehr als zweifach veränderte Transkription im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen, aber nur 6 dieser Gene zeigten die gleiche Transkriptionsänderung in *C. pneumoniae*-infizierten Zellen (Tab. 7).

Gen	HeLa- <i>C. pneumoniae</i>		Vektor-Cpn0712	
	Real Time RT-PCR	Mikroarray	Real Time RT-PCR	Mikroarray
<i>s tlll1</i>	-1,22	-1,60	-3,10	-2,31
<i>EIF5</i>	-3,11	-2,47	-4,17	-2,19
<i>glp-2r</i>	-3,92	-2,42	-2,10	-2,93
<i>ifit1</i>	1,41	2,19	2,10	2,90
<i>ifit3</i>	2,65	2,86	1,73	2,56
<i>Loc464157</i>	3,24	1,56	3,20	2,46

Tab. 7: *C. pneumoniae*- und Cpn0712- induzierte Veränderung der Genexpression ermittelt durch Mikroarray und Real Time RT-PCR. Für alle in beiden Mikroarray gleich in ihrer Transkription modulierten Gene konnte diese Veränderung durch Real Time RT-PCR bestätigt werden.

Da Chlamydien sich bisher nicht genetisch manipulieren lassen, ist es nicht möglich, die Funktion eines einzelnen Gens durch ein Knock-out-Konstrukt zu analysieren. Aufgrund der fehlenden Möglichkeit mittels Knock-out Mutanten die Funktion von chlamydialen Genen zu untersuchen, wurde der Mikroarray auf seinen Nutzen überprüft, die Funktion von Cpn0712 zu untersuchen. Ein eindeutiges Ergebnis konnte mit dieser Methode nicht erreicht werden. Eine Vielzahl von Genen war durch die Anwesenheit von Cpn0712 in der Wirtszelle in ihrer Expression verändert. Die Transkription veränderte sich aber in entgegengesetzter Weise als *C. pneumoniae* das Wirtszelltranskriptom beeinflusst. Die 6 Gene, die sowohl durch Cpn0712 als auch durch *C. pneumoniae* in gleicher Weise in ihrer Transkription verändert werden, sind an unterschiedlichen Prozessen beteiligt und gaben damit noch keinen klaren Hinweis welche Funktion das sezernierte Cpn0712 auf die Wirtszelle hat. Wie diese Gene tatsächlich durch Cpn0712 beeinflusst werden und welchen Einfluss sie auf den Infektionsverlauf von Chlamydien haben, muss in weiteren Studien untersucht werden.

4. Diskussion

Voraussetzung für die Vermehrung und das intrazelluläre Überleben von Chlamydien ist die Interaktion mit ihrer Wirtszelle. Die Invasion in die Wirtszelle moduliert zahlreiche Prozesse innerhalb der Zelle. Während der Endocytose kommt es zu Thyrosinphosphorylierungen von Wirtszellproteinen und Akkumulation von Aktin an der Eintrittsstelle (Carabeo et al., 2004; Fawaz et al., 1997). Chlamydien verursachen eine Proteolyse von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, beeinflussen die Apoptose und greifen in den exocytischen Weg ein um Spingomyelin und -cholesterolhaltige Vesikel aufzunehmen um durch die Maskierung des Einschlusskörpers eine Degradation durch Lysosomen zu vermeiden (Fan et al., 1998; Perfettini et al., 2002; van Ooij et al., 1998). Der Eingriff in diese Prozesse erfolgt durch Virulenzfaktoren, die in und über die Einschlusskörpermembran sekretiert werden. Wie bei anderen gramnegativen Bakterien enthält auch das chlamydiale Genom Gene, die für die strukturellen Komponenten des TTSSs kodieren (Hsia et al., 1997; Stephens et al., 1998). Obwohl der Beweis der Funktionalität des chlamydialen TTSSs noch aussteht, konnte die Sekretion einiger chlamydialer Proteine gezeigt werden (Subtil et al., 2005). Eine Identifikation der Effektorproteinen wird durch die verstreute Lokalisation der strukturellen Komponenten erschwert. Die wenigen bekannten Proteine wurden eher zufällig (Tarp), durch ihre Lokalisation innerhalb eines Subclusters (Cpn0705) oder aufgrund eukaryontischer Domänen identifiziert (CADD) (Clifton et al., 2004; Subtil et al., 2005; Stenner-Liewen et al., 2002).

Tarp ist an der rezeptorvermittelten Endozytose beteiligt, indem es über Interaktionen mit Motiven in seinem C-Terminus und Aktin dessen Nukleation vermittelt (Clifton et al., 2004; Jewett et al., 2006).

CADD (Stenner Liewien, 2002) aktiviert über die Assoziierung mit Death-Domänen von Wirtszellproteinen die Apoptose. Des weiteren wurde eine Interaktion von CADD mit TNFR1, Fas, DR4 und DR5 gezeigt.

CPAF (Chlamydial protease like activity factor) moduliert die erworbene Immunantwort gegen chlamydiale Infektionen durch Proteolyse des RFX5- Transkriptionsfaktors. Es reguliert so die MHC 1 und 2 vermittelte Antigenpräsentation herab (Zong et al., 2001; Fan et al., 2002; Heuer et al., 2003).

Im Rahmen dieser Dissertation sollten die putativen Typ III sezernierten Effektoren Cpn0708, Cpn0712 und Cpn0809 charakterisiert werden.

Cpn0708 und *cpn0712* liegen in einen Subcluster des TTSS-Genkomplexes, der Gene für die strukturellen Komponenten *yscN* (*cpn0707*) und *yscC* (*cpn0704*) enthält.

Genaufwärts von *cpn0708* und *cpn0712* sind Gene lokalisiert, deren Homologe (*cp667* und *ct663*) in *C. trachomatis* für putative Chaperone kodieren. So zeigt Ct663 Homologie zum Typ III Chaperon CesT von enteropathogenen *E coli*, das für die Translokation des Intimin Rezeptorproteins benötigt wird (Creasey et al., 2003).

Des weiteren konnten Herrmann et al., 2005 eine Sekretion von Cpn0703, Cpn0709 als auch Cpn0712, die von Genen dieses Subcluster kodiert werden, zeigen. Sequenzhomologien von *cpn0708* und *cpn0712* konnten nur zu orthologen Proteinen anderer Chlamydienspezies gefunden werden, so dass über die Funktion dieser Proteine nur spekuliert werden kann.

Cpn0809 liegt in einem Subcluster zusammen mit *lcrH-1*, dessen Homolog in *Yersinia spp.* für das Chaperon von YopB und YopD fungiert. Cpn0809 besitzt bezüglich der Größe und des Hydrophobizitätsprofils Ähnlichkeit zu YopB und YopD nicht aber hinsichtlich der Sequenz. Sequenzhomologien konnten nur zu orthologen Proteinen anderer Chlamydienspezies gefunden werden. Eine Lokalisation außerhalb des Einschlusskörpers und damit eine Funktion als Effektorprotein konnte bereits von Lugert et al., 2004 beschrieben werden.

4.1. Charakterisierung von Cpn0708 und Cpn0712 während des Entwicklungszyklus`

Wie bereits für *cpn0809* untersucht, wurde die Transkription von *cpn0708* und *cpn0712* zu verschiedenen Zeitpunkten während des Entwicklungszyklus` von *C. pneumoniae* untersucht. Eine Transkription konnte für beide Gene erst 8 h pI. detektiert werden mit konstanten Signalstärken bis 48 h und einen leichten Abfall nach 72 h pI. Damit gleicht die Transkription von *cpn0708* und *cpn0712* der Transkription der strukturellen Gene, die im gleichen Subcluster liegen. Für *yscN* (*cpn0702*) und *yscC* (*cpn0707*) wurde ebenfalls ein Transkriptionsbeginn nach 8 h mit einem Maximum nach 36 – 48 h pI. nachgewiesen (Slepenkin et al., 2003), so dass angenommen werden kann, dass alle Gene des Subclusters unter der gleichen Regulation stehen. Während des Entwicklungszyklus` werden die chlamydialen Gene zeitlich reguliert exprimiert und können in (i) früh transkribierte Gene (2 h pI.), die vorwiegend in DNA-, RNA-, und Proteinsynthese involviert sind, (ii) in

Mitzyklus-transkribierte Gene (6-12 h pI.), zu denen Gene des Intermediärmetabolismus und strukturelle Gene gehören und (iii) in spät transkribierte Gene (<20 h pI), die an der terminalen Differenzierung von RB zu EB beteiligt sind, unterteilt werden (Shaw et al., 2000).

YscJ, *yscL*, *yscR*, *yscS* und *yscT*, die für die strukturellen Proteine des TTSSs kodieren, werden ebenfalls ab 8 h pI. transkribiert mit einem Maximum nach 32 - 48 h.

Effektorproteine werden zu jedem Zeitpunkt des Entwicklungszyklus` transkribiert und sezerniert. Tarp, ein chlamydiales Effektorprotein, das lokale Cytoskelettveränderungen an der Eintrittsstelle induziert, wird während des mittleren bis späten Zeitpunktes des Entwicklungszyklus` transkribiert (Belland et al., 2003; Jewett et al., 2006), Cpn1020 wird bereits nach 2 h transkribiert (Lugert et al., 2004), während Cadd, das wahrscheinlich über Death-Rezeptoren die Apoptose der Wirtszelle aktiviert, erst nach 48 h transkribiert wird (Stenner-Liewen et al., 2002). Die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse von *cpn0708* und *cpn0712* deuten auf eine Funktion im mittleren Entwicklungszyklus hin, zu dem auch die Gene der strukturellen Komponenten und des Intermediärmetabolismus exprimiert werden. Weiterhin sollte die Expression von Cpn0708 und Cpn0712 während des Entwicklungszyklus` untersucht werden. Es wurden polyklonale Antiseren gegen Cpn0708 und Cpn0712 hergestellt und diese im Immunoblot mit *C. pneumoniae* AR39 infizierten HEP2-Zellen eingesetzt.

Eine spezifische Detektion von Cpn0708 in der erwarteten Größe von 25kDa konnte mittels Immunoblot nicht nachgewiesen werden. Es konnten jedoch reaktive höhermolekulare Proteinbanden detektiert werden, die möglicherweise auf posttranslationale Modifikationen oder Dimerisierung des Proteins hindeuten könnten. Es könnte aber auch zu einer Kreuzreaktion mit einem anderen chlamydialen Protein gekommen sein.

48 h und 72 h pI. konnten für Cpn0712, statt der nativen Größe von 92kDa, zwei Proteinbanden detektiert werden, die auf Höhe von 70 und 52kDa erschienen. Außer diesen Signalen fanden sich keine weiteren Proteinbanden im Immunoblot. Beide Proteinbanden konnten in den Extrakten aus nicht-infizierten Zellen und zu früheren Zeitpunkten nicht detektiert werden. Aufgrund der Sensitivitätsgrenze des Antiserums von 30ng kann ein früherer Expressionsbeginn nicht ausgeschlossen werden. So konnte Hermann et al. eine schwache Expression von Cpn0712 im *C. pneumoniae* Stamm TW189 bereits 30 min pI. nachweisen. In der von Hermann durchgeführter Kinetik konnte eine schwache Expression von Cpn0712 zu den Zeitpunkten 0,5, 6 und 24 h pI. detektiert

werden, eine starke Expression von Cpn0712 zeigte sich auch dort erst 48 und 72 h pI. Obwohl die maximale Expression im späten Entwicklungszyklus sich gleicht, ist es doch unwahrscheinlich, dass Cpn0712 im Stamm AR39 gespalten wird, im Stamm TW189 jedoch nicht. Zusätzlich zu einer proteolytischen Spaltung wäre somit auch eine Kreuzreaktion mit einem anderen chlamydialen Protein möglich.

Mittels Immunofluoreszenztest wurde die intrazelluläre Lokalisation von Cpn0708 und Cpn0712 bestimmt. Cpn0708 konnte während des gesamten Entwicklungszyklus ausschließlich im Einschlusskörper nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine genaue Kolo-kalisation von Cpn0708 mit einem gegen *C. pneumoniae* gerichteten Antikörper. Somit handelt es sich bei Cpn0708 nicht um ein mit Wirtszellfaktoren interagierendes Effektorprotein. In anderen Spezies wurden Coiled-coil Motive wie die in Cpn0708 in Proteinen gefunden, die das TTSS bilden sowie an der selektiven Regulation der Sekretion beteiligt sind (Surette und Stock, 1996; Renzoni et al., 2001). Aufgrund seiner Lokalisation im Subcluster des TTSSs sowie einem Transkriptionsbeginn, der strukturellen Komponenten gleicht, ist eine Funktion von Cpn0708 in der Ausbildung des TTSSs möglich.

Cpn0712 konnte in der Einschlusskörpermembran sowie im umliegenden Cytoplasma nachgewiesen werden. Da sich sezernierte Proteine im Cytosol der Wirtszellen verdünnen, konnte ein starkes Signal nur in Zellen mit mehreren Einschlusskörpern nachgewiesen werden. Eine Lokalisation sowohl in der Einschlusskörpermembran als auch im Cytoplasma der Wirtszelle könnte darauf hindeuten, dass Cpn0712 mehrere Funktionen ausübt. Das enterohämorrhagische *E. coli* Protein EspB konnte in der Wirtszellmembran und im Cytoplasma detektiert werden und hat eine Funktion sowohl im Translokationsapparat als auch als Effektor, da es für die Translokation von Tir und für eine Reduzierung von Aktinstressfasern verantwortlich ist (Knutton et al., 1998; Taylor et al., 1999).

Cpn0712 enthält 2 FHA-Domänen. FHA-Domänproteine anderer Erreger sind membranassoziiert und an der Sekretion von Virulenzfaktoren beteiligt: Pas von *E. coli* ist an der Sekretion anderer Effektoren sowie an der Anheftung und dem Eindringen in die Wirtszelle beteiligt (Kresse et al., 1998). YscD ist in der Sekretion von anderen Proteinen involviert (Plano et al., 1995). Ein weiteres Protein mit 2 FHA-Domänen ist der ABC-Transporter von *M. tuberculosis*. Es fungiert als Transporter und ist Teil eines Signalweges, der eukaryotischen STK-Wege ähnelt. Ein sezerniertes FHA-Domänprotein

könnte Signaltransduktionwege der Wirtszelle beeinflussen, die in der Zellproliferation oder DNA-Reparatur involviert sind.

Eine Sekretion von Cpn0712 konnte erst nach 55 h pI. detektiert werden. Zu früheren Zeitpunkten konnte Cpn0712 nur in der Einschlusskörpermembran nachgewiesen werden. Da Cpn0712 anscheinend nur in geringen Mengen ausgeschleust wird, ist eine Sekretion zu einem früheren Zeitpunkt, aufgrund der Sensitivität des Antiserums allerdings nicht ausgeschlossen. So konnten Hermann et al. (2006) eine Sekretion von Cpn0712 20 h pI., jedoch keine Sekretion zu späteren Zeitpunkten detektieren.

Der Nachweis von Cpn0712 im Cytoplasma der Wirtszelle deutet auf eine Translokation durch das chlamydiale TTSS hin. Derzeit gibt es noch keine Möglichkeit Chlamydien genetisch zu manipulieren, so dass – z.B. durch knockout-Experimente - eine Bestätigung einer Typ III Sekretion über das TTSS von Chlamydien nicht möglich ist. Da die Gene, die für die Bildung des TTSS-Apparates kodieren, sehr konserviert sind, ist ein Nachweis durch ein heterologes TTSS denkbar.

Für putative chlamydiale Effektorproteine konnte eine Sekretion über ein heterologes TTSS anderer gramnegativer Bakterien gezeigt werden. Eine Sekretion von CopN und IncC von *C. trachomatis* konnte durch das TTSS von Yersinien gezeigt werden (Fields und Hackstadt, 2000), während IncA, IncB und IncC von *C. pneumoniae* durch das TTSS von *S. flexneri* transloziert werden konnten (Subtil et al., 2001). Zur Bestätigung einer Typ III-Sekretion von Cpn0712 sollte in dieser Arbeit das TTSS von Salmonellen benutzt werden. Zusätzlich sollte eine mögliche Typ III-Sekretion von Cpn0809 gezeigt werden.

Salmonellen besitzen zwei TTSS, die von zwei getrennten Pathogenitätsinseln (SPI-1 und SPI-2) kodiert werden. SPI-1 und SPI-2 gleichen sich in der Größe, aber unterscheiden sich in der genetischen Organisation und Funktion. Die primäre Rolle des SPI-1 kodierten TTSS liegt in der Invasion von intestinalen Zellen (Shea et al., 1996), das SPI-2 kodierte TTSS dient mit seinen Effektorproteinen dem Überleben und der Vermehrung innerhalb der Wirtszelle (Kuhle und Hensel, 2004).

Zum Nachweis einer möglichen Typ III-Sekretion wurden die Gene *cpn0712* und *cpn0809* unter der Kontrolle des SPI-2-spezifischen Promotors ProB in das Plasmid 2447 kloniert. Da Chaperone eine wichtige Rolle im Transport und der Ausschleusung von Typ III sekretierten Proteinen spielen, wurden außerdem Konstrukte hergestellt, die für *cpn0708* oder *cpn0712* einschließlich ihrer putativen Chaperone (*cpn0709* und *cpn0713*) kodieren. Obwohl Cpn0708 nicht im Cytoplasma der Wirtszellen nachgewiesen werden konnte,

wurde es in die Untersuchung mit einbezogen, da aufgrund der geringen Sensitivität des Antiserums eine eventuelle schwache Sekretion nicht ausgeschlossen werden konnte. Eine Expression in Salmonellen konnte nur für das Konstrukt, das aus *cpn0713* und den 5'-Bereich von *cpn0712* besteht, nachgewiesen werden, jedoch konnte keine Sekretion in die Wirtszelle gezeigt werden. Zum Zeitpunkt der Untersuchung gab es noch keine Veröffentlichungen, ob eine Sekretion von chlamydialen Proteinen durch das heterologe TTSS von Salmonellen möglich ist. Ho und Starnbach konnten zu einem späteren Zeitpunkt eine Sekretion CopD, Pkn5 und CopN von *C. trachomatis* durch das TTSS von Salmonellen zeigen. Durch die Besonderheit der Salmonellen zwei TTSS zu besitzen, die unterschiedliche Proteine translozieren, besteht die Möglichkeit, dass chlamydiale Proteine, die nicht durch das SPI-2-kodierte TTSS sekretiert werden, durch das SPI-1-kodierte TTSS sekretiert werden. So konnte CopN, ein mit der Einschlußkörpermembran assoziiertes Protein, welches möglicherweise den Deckel des TTS-Apparates bildet und an der Regulation des TTSSs beteiligt ist, nur durch das SPI-1-kodierte TTSS transloziert werden, während CopD und Pkn5 durch das SPI-2-kodierte TTSS transloziert wurden (Ho und Starnbach, 2005). Da die Funktion von Cpn0708, Cpn0712 und Cpn0809 nicht bekannt ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie eventuell durch das SPI-1-kodierte TTSS transloziert werden könnten. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass chlamydiale Effektorproteine in einem heterologen TTSS zum Teil mit so geringer Effizienz transloziert werden, dass ihre Detektion aufgrund limitierter Nachweisgrenzen nicht gelingt. Eine Translokation von IncA, Cpn0026, Cpn0308 und Cpn0585 konnte im Wildtyp von *S. flexneri* nicht nachgewiesen werden. Erst in der *ipaB*-Mutante, die eine Dereglulation der Aktivität des TTSSs aufweist, konnte eine Translokation dieser Proteine gezeigt werden (Subtil et al., 2001). In *S. enterica* scheinen chlamydiale Effektorproteine mit geringerer Effizienz sezerniert zu werden. Ein Nachweis der Sekretion mittels Immunoblot und Immunfluoreszenztest, wie in unseren Untersuchungsansatz, konnte auch für CopN, CopD und Pkn5 nicht nachgewiesen werden. Erst durch die sensitivere Methode der CD8+ T-Zellpräsentation war es Ho und Starnbach möglich die Sekretion dieser Proteine nachzuweisen. Obwohl eine Sekretion von Cpn0708 und Cpn0712 im heterologen TTSS von Salmonellen nicht gezeigt werden konnte, ist eine Translokation dieser Proteine durch das chlamydiale TTSS nicht ausgeschlossen. Dautry-Varsat und Subtil beschrieben sowohl die Sekretion von Cpn0712 als auch die seines Homologs CT664 in *C. trachomatis* durch das TTSS von Shigellen (Dautry-Varsat und Subtil, 2007).

4.2. Kolokalisation von Cpn0712 und Cpn0809 mit Wirtszellkomponenten

Bislang ist es nicht möglich, Chlamydien genetisch zu manipulieren. Um die Funktion der putativen Effektorproteine in der Wirtszelle zu untersuchen, wurden *cpn0809* und *cpn0712* in einen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert und in Zelllinien transfiziert, die sich mit Chlamydien infizieren lassen. Sowohl HEp2 als auch HeLa-Zellen ließen sich nur schwer mit den Effektorgen tragenden Plasmiden transfizieren. Im Vergleich zum Kontrollvektor war die Transfektionsrate fast um 50% reduziert. Aufgrund der geringen Transfektionsrate und dem dadurch bedingten Hintergrund an nicht-transfizierten Zellen, wurde mit der Herstellung von stabilen Transfektanten begonnen. Um eine Rekombination innerhalb des Gens zu vermeiden, wurden beide Vektoren vor der Transfektion restringiert, was zur Folge hatte, dass die ohnehin schon geringe Transfektionsrate weiter sank, da sich die geschnittene DNA weniger gut transfizieren ließ. Obwohl die Integration mittels PCR nachgewiesen werden konnte, war die Expression beider Proteine nach der vierten Vereinzelnung nicht mehr nachweisbar. Ursache könnte die geringe Transfektionseffizienz und die damit verbundene lange Kultivierung der transfizierten Zellen sein, um zu einer stabil transfizierten Zelllinie zu gelangen. In Laufe der Zeit kommt es zu Veränderungen im Genom, die zu Veränderungen der Eigenschaften der Zelle führen und die Expression des transfizierten Gens sinken lassen kann (Mülhardt, 1999). Ebenso können transgierende inhibierende Genprodukte Einfluss auf das Expressionsmuster haben. Des Weiteren können Zellen bei längerer Inkubation Resistenzen gegen das zur Selektion verwendete Antibiotikum entwickeln, so dass auch Zellen, die die entsprechenden Effektoren nicht integriert haben, im Medium wachsen können.

Zum besseren Nachweis der Proteine Cpn0712 und Cpn0809 wurden beide Gene in einen anderen Expressionsvektor kloniert, der die Detektion beider Proteine als Fusionsproteine mit einem myc-tag erlaubte. Eine Expression von Cpn0712 und Cpn0809 konnte trotzdem nur nach vorheriger Anreicherung durch eine Immunpräzipitation detektiert werden. Die schwache Expression könnte an der geringen Transfektionseffizienz liegen.

Für Cpn0809 wurden zusätzlich zu der erwarteten Größe von 50kDa zwei weitere Proteinbanden detektiert, was möglicherweise auf posttranslationale Modifikationen oder Interaktionen mit der Wirtszelle hinweisen könnte. Die Expression von Cpn0712 war trotz Immunpräzipitation sehr schwach. Auch hier konnten zwei Proteinbanden detektiert werden. Eine in der erwarteten Größe von 92kDa und eine weitere von 45kDa. Es könnte sich dabei um ein Degradationsprodukt handeln.

Nach Transfektion der Wirtszelle konnte mittels Immunfluoreszenztests eine Kolokalisation von Cpn0809 und dem endoplasmatischen Retikulum (ER) gezeigt werden. Eine entsprechende Kolokalisation mit dem ER konnte auch für IncA von *C. caviae* (Delavoye et al., 2004), Cpn0147, Cpn0146 (Luo et al., 2007) und Cpn1027 von *C. pneumoniae* (Flores et al., 2007) in transfizierten Zellen gezeigt werden. Gemeinsam ist diesen Proteinen, dass sie alle im Zuge der Infektion in der Einschlusskörpermembran lokalisiert sind, obwohl sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert werden. Im Gegensatz dazu zeigte Cpn0809 nach Infektion keine ausschließliche Lokalisation in der Einschlusskörpermembran, sondern wurde sowohl im Einschlusskörper als auch im Cytoplasma der Wirtszelle nachgewiesen (Lugert et al., 2004), obwohl sein Homolog CT578 von *C. trachomatis* ebenfalls nur in der Membran nachgewiesen wurde (Fields et al., 2005) und das zu YopB ähnliche Hydrophobizitätsmuster eine Funktion als Translokator und somit ebenfalls eine Membranlokalisation impliziert. Möglich wäre, dass Cpn0809 sowohl eine Funktion als Translokator als auch als Effektor einnimmt.

Das ER ist an der Biosynthese von zellulären Molekülen, Proteinen und Lipiden beteiligt, die entweder zum Bestandteil des ER werden oder zum Golgi-Apparat, zur Plasmamembran, Lysosom oder Endosom transportiert werden. Seine Hauptfunktion besteht darin abhängig von bereits in der Proteinsequenz enthaltenden oder durch Modifikation seinerseits angehängten Signalsequenzen Proteine zu ihrem Bestimmungsort zu sortieren und zu transportieren. Außerdem kontrolliert die regulatorische Maschinerie des ER die Route von neu synthetisierten Proteinen, die für den exozytischen Weg, den endozytischen Weg und für Phagosomen bestimmt sind.

Im Cytosol synthetisierte Proteine werden ins Lumen des ER befördert, wo sie geschnitten und gefaltet werden. Fehlgefaltete Proteine werden zurück ins Cytosol transportiert, wo sie durch das Proteasom degradiert werden. Bakterien, wie *V. cholerae*, vermögen diesen Mechanismus zu nutzen, um sein Toxin ins Cytosol zu bringen.

Des Weiteren ist das ER an dem Aufbau von Molekularkomplexen, die für die Antigenpräsentation durch MHC Klasse 1 und 2 involviert sind, beteiligt. Eine Störung der ER-Biogenese beeinflusst daher auch die Antigenpräsentation und Immuneffektorfunktion. Das ER ist somit ein wichtiges Angriffsziel von intrazellulärer Pathogenen, da die Induktion von ER-Stress die Persistenz in der Zelle unterstützt. Die Zerstörung von Proteinfaltungen und die daraus folgende Akkumulation von ungefaltenden MHC Klasse I Molekülen im ER führt zu einer verminderten MHC Klasse I Expression und damit zum Schutz vor der Immunabwehr.

Kleine GTPasen, die in Rezeptorrecycling und ER-Golgi-Verkehr involviert sind, konnten in der Einschlusskörpermembran nachgewiesen werden, so dass eine Interaktion von membranassoziierten Chlamydienproteinen und den GTPasen angenommen werden kann (Rzomp et al., 2003). Ob Cpn0809 mit diesen GTPasen interagiert und dadurch den ER-Golgi-Verkehr beeinflusst, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Die späte Expression von Cpn0809 zu einem Zeitpunkt, zu dem sich die RBs in EBs umwandeln und der Einschlusskörper seine maximale Größe erreicht, könnten auf eine Funktion in der terminalen Differenzierung der Bakterien und Lyse der Wirtszelle hindeuten. Die Lokalisation eines spät exprimierten Proteins wie Cpn0809 am ER könnte somit nicht nur der Beeinflussung des Wirtszelltranskriptoms, sondern sogar der Zerstörung der Wirtszelle dienen: Cpn0809 könnte den Transport endogener Proteine behindern oder verhindern, so dass die Anhäufung der Proteine zum Tod der Zelle führt, welches es den Chlamydien erlauben würde, die Zelle zu verlassen. Das könnte auch erklären, warum es nicht möglich war, Cpn0809 stabil in HeLa-Zellen zu exprimieren. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass in Zellen, die mit *cpn0809* transfiziert wurden, die Caspase 3-Aktivität erhöht war. Allerdings war ein apoptotischer Effekt von Cpn0809 in Immunfluoreszenztests phänotypisch nicht detektierbar.

Cpn0712 konnte im Cytoplasma mit einer Akkumulation um den Zellkern nachgewiesen werden. Dabei konnte eine Kollokalisierung von Cpn0712 mit bestimmten Strukturen beobachtet werden, die möglicherweise vom Cytoskelett gebildet werden. Eine Lokalisation von Cpn0712 im ER sowie dem Mikrotubuli-Netzwerk konnte durch Immunfluoreszenztests ausgeschlossen werden.

Als weiterer Hinweis auf einer Interaktion von Cpn0712 mit Bestandteilen des Cytoskeletts veränderte sich die Lokalisation von α -Aktin und Cpn0712 nach Colchicinbehandlung in gleicher Weise. Eine Interaktion mit α -Aktin könnte somit möglich sein.

Das Cytoskelett ist eine dynamische Struktur und stellt ein Filament-Netzwerk dar, das die mechanische Integrität der Zelle aufrechterhält. Zusammen mit dynamischen Interaktionen mit der zellulären Membran sind Aktin-assoziierte Strukturen an Zellteilung, Adhäsion und Motilität beteiligt. Diese Prozesse erfordern die Reorganisation des Aktincytoskeletts, wofür aktinbindende Proteine verantwortlich sind. Für intrazelluläre Bakterien ist das Cytoskelett ein wichtiges Angriffsziel, da dessen Modulation die Invasion und das

intrazelluläre Überleben des Pathogens erleichtern und die Bewegung innerhalb der Zelle ermöglichen.

So wurde bei Pathogenen wie *Y. enterocolitica*, *EHEC*, *S. flexneri* und *S. enterica*, beobachtet, dass sie Veränderungen des Aktincytoskeletts induzieren (Iriarte und Cornelis, 1998; Ohl und Miller, 2001; Frankel et al., 1998; Chen et al., 1996; Gruenheid und Finlay, 2003). Die Effektorproteine SseF und SseG von *S. enterica* interagieren mit dem Wirtszell-Mikrotubuli-Cytoskelett der Wirtszelle (Kuhle et al., 2004) und YopT von *Y. pseudotuberculosis* zerstört die Aktinfilamentstruktur (Iriarte und Cornelis, 1998). Das Effektorprotein ActA von *Listeria spp.* interagiert mit dem Arp2/3 Komplex und führt so zur Polymerisation von Aktinfilamenten am Bakterium und ermöglicht dessen Bewegung innerhalb der Zelle (Welch et al., 1997).

Die Invasion von Chlamydien geht mit einer gestörten Cytoskelett-Architektur der Wirtszelle einher. So führt das Effektorprotein Tarp von *C. trachomatis* zur Anreicherung von Aktin an der Eintrittsstelle des EBs in die Wirtszelle. Nach Eintritt der EBs und Bildung des Einschlusskörpers kommt es zur Interaktion eines noch unbekanntes chlamydialen Effektors mit Dynein, das den Einschlusskörper in die perinukleare Region in der Nähe des Golgi-Apparates transportiert (Clausen et al., 1997). Obwohl auch der Einschlusskörper von *C. pneumoniae* perinukleär lokalisiert ist, wird *cpn0712* zu spät transkribiert, um Einfluss auf den Eintritt der Chlamydien und den Transport in die perinukleäre Region zu haben.

Es konnte gezeigt werden, dass als weitere Bestandteile des Cytoskeletts auch die Intermediärfilamente durch Chlamydien beeinflusst werden: Krt8, eine Hauptkomponente der Intermediärfilament-Genfamilie, wird durch eine Chlamydien-Protease gespalten (Dong et al., 2004). Die proteolytische Modifikation von Krt8 unterstützt das bakterielle intrazelluläre Wachstum, da die Spaltung die Menge an Intermediärfilamenten reduziert, die ansonsten die Vakuolengröße begrenzen würde. Mikroarray-Analysen von *cpn0712*-transfizierten Zellen ergaben eine verminderte Transkription verschiedener Keratin-kodierender Gene, so dass Cpn0712 an der Reduktion der Intermediärfilamente beteiligt sein könnte, und so die Expansion des Einschlusskörpers unterstützt.

Viele Cytoskelettproteine zeichnen sich durch ein Coiled-coil-Motiv aus. Die Liganden von Coiled-coil-Interaktionen tendieren dazu ebenfalls Coiled-coil-Motive zu sein, so dass es zu einer Interaktion von Cpn0712 mit Proteinen des Cytoskeletts über sein Coiled-coil Motiv kommen könnte. So interagieren G-Actin und F-Actin über das Coiled-coil-Motiv

mit den sezernierten Proteinen SipA und SipC von *S. enterica* (Zhou et al., 1999), α -Actin mit Tir und Krt8 mit SipC von *S. enterica* (Scherer et al., 2000).

4.3. Einfluss von Cpn0712 und Cpn0809 auf den Einschlusskörper

Während des Entwicklungszyklus` einer natürlichen Infektion konnte Cpn0712 sowohl im Bereich der Einschlusskörpermembran, als auch im Cytosol der Wirtszelle nachgewiesen werden, wobei das Protein nur in einem begrenzten Bereich um den Einschlusskörper detektiert werden konnte. Die begrenzte Lokalisation in der Nähe des Einschlusskörpers könnte auf eine Funktion in der Unterstützung der Einschlusskörperentwicklung hindeuten, wie es für Inc-Proteine gezeigt wurde. Inc-Proteine sind an der cytosolische Seite des Einschlusskörpers lokalisiert und können mit Wirtszellproteinen interagieren. Durch die heterologe Expression von IncA von *C. caviae* wird die Neuinfektion blockiert und die Entwicklung des Einschlusskörpers gestört (Delavoie, 2004). Um zu untersuchen, ob Cpn0712 oder Cpn0809 die nachfolgende Infektion von *C. pneumoniae* beeinflussen, wurden Zellen transient mit *cpn0712* und *cpn0809* transfiziert. 24 h später wurden die Zellen mit *C. pneumoniae* infiziert und weitere 24 und 48 h später analysiert. Es wurde die Anzahl der infizierten Zellen in transfizierten und nicht-transfizierten Zellen verglichen. Dabei zeigte sich kein Unterschied in der Infektionsrate zwischen transfizierten und nicht-transfizierten Zellen. Während IncA von *C. caviae* nachfolgende Infektionen signifikant blockiert, zeigten andere bakterielle Proteine keinen Einfluss auf Neuinfektionen. Die heterologe Expression von Cpn1027, - eines hypothetischen Proteins, das in der Einschlusskörpermembran lokalisiert ist-, konnte eine *C. pneumoniae*-Infektion nicht inhibieren (Flores et al., 2007). Die heterologe Expression von IncC von *C. caviae* und *C. trachomatis* führt ebenfalls nicht zur Blockierung nachfolgender Infektionen.

Des weiteren wurde der Einfluss von Cpn0712 und Cpn0809 auf die Entwicklung des Einschlusskörpers untersucht, weil in anderen Arbeiten die Expression von IncA von *C. caviae* in der Wirtszelle zu morphologisch veränderten Einschlusskörpern und vergrößerten RBs führt (Alzanov et al., 2004). Der Vergleich der Einschlusskörper in transfizierten und nicht-transfizierten Zellen zeigte jedoch weder für Cpn0712 noch für Cpn0809 einen Einfluss auf Größe und Anzahl der Einschlusskörper, so dass diese bakteriellen Proteine weder eine inhibierende Rolle auf die Infektionskapazität der Wirtszelle noch auf die intrazelluläre Entwicklung des Einschlusskörpers zu haben scheint.

4.4. Einfluss von Cpn0712 auf das Wirtszelltranskriptom

Die Verwendung von Mikroarrays erlaubt die gleichzeitige Untersuchung einer Vielzahl von Genen und ermöglicht somit die Identifizierung von Genen, die für weitere Analysen verwendet werden können. Verschiedene Mikroarrays wurden bereits durchgeführt, um die Interaktion von *C. pneumoniae* mit verschiedenen Wirtszellen zu untersuchen (Coombes und Mahoney, 2001; Virok et al., 2003; Shi und Tkunaga 2004).

Um den Einfluss von Cpn0712 auf das Wirtszelltranskriptom zu untersuchen und einen ersten Hinweis auf seine Funktion innerhalb der Wirtszelle zu bekommen, wurden HeLa-Zellen transient mit *cpn0712* transfiziert und die Veränderung der Genexpression zwischen *cpn0712*- und Vektor-transfizierten Zellen mittels Mikroarray verglichen.

Es konnten über 1000 Gene ermittelt werden, deren Expression sich signifikant, d.h. mehr als 2-fach veränderte. Dabei wurden 74% der Gene vermindert transkribiert. Die Ergebnisse konnten teilweise durch Real Time RT-PCR bestätigt werden.

Aufgrund des Einzelexperimentcharakters können Mikroarray-Ergebnisse mit einem hohen statistischen und systematischen Fehler behaftet sein. Während der systematische Fehler durch Vergleich mit anderen Methoden überprüft werden kann, ist eine Reduktion des statistischen Fehlers nur durch Vergleich mehrerer Mikroarrayexperimente untereinander möglich. Aufgrund des derzeitigen hohen Kostenfaktors von Mikroarrays ist diese Möglichkeit oft limitiert. Um die Fehlerrate dennoch möglichst gering zu halten, müssen die Versuchsparameter konstant gehalten werden. Die Zellen wurden daher zur gleichen Zeit mit *cpn0712* oder Vektor transfiziert, unter den gleichen Bedingungen inkubiert und die RNA gleichzeitig aufbereitet.

Es wurde ein Mikroarray mit 40000 Oligonukleotide verwendet, wobei ein Teil der Gene durch mehrere Oligonukleotide auf dem Chip repräsentiert wurde. Cpn0712 moduliert die Expression einer Vielzahl zellulärer Gene unterschiedlicher Funktion. Insgesamt wurde die Transkription von 2,5% der untersuchten Gene durch Cpn0712 beeinflusst: Hiervon zeigten 74% eine verminderte Transkription durch Cpn0712. Damit scheint Cpn0712 eine inhibierende Funktion auf das Wirtszelltranskriptom auszuüben. Untersuchungen mit dem frei verfügbarem FatiGo Programm unter www.babelomics.org konnten keinen bestimmten zellulären Prozess zeigen, der durch Cpn0712 beeinflusst wird.

Einige Gene wurden mittels Real Time RT-PCR untersucht um einerseits die Ergebnisse des Mikroarrays zu bestätigen und andererseits die Cpn0712 -induzierten Veränderungen mit denen durch *C. pneumoniae* zu vergleichen. Es gab eine sehr gute Übereinstimmung

zwischen den Ergebnissen des Mikroarrays und der Real Time RT-PCR. Die veränderte Transkription von 8 der 9 untersuchten Gene ließ sich so bestätigen.

Der Vergleich zwischen Cpn0712 und *C. pneumoniae* ergab eine gegensätzliche Veränderung der Transkription dieser Gene. Daraufhin wurde ein Mikroarray durchgeführt, um die Gentranskription nach natürlicher *C. pneumoniae* Infektion zu untersuchen. Es wurde ein Chip mit 10000 Genen eingesetzt, auf dem die durch Cpn0712 beeinflussten Gene enthalten waren. Nur 6 Gene konnten identifiziert werden, deren Transkription in gleicher Weise durch Cpn0712 und natürlicher *C. pneumoniae*-Infektion beeinflusst wird.

Obwohl der Vergleich mit der in der Literatur beschriebenen, durch Chlamydien induzierten Veränderungen des Wirtszelltranskriptoms durch die Verwendung unterschiedlicher Wirtszellen, Chlamydienstämme oder Versuchsbedingungen beschränkt ist, konnte die Modulation der Transkription einiger Gene, z.B. die verstärkte Transkription von *tnfaip3* und *krt17* und die verminderte Transkription von *insig1* durch die Infektion mit Chlamydien bestätigt werden (Eickhoff et al., 2007; Lad et al., 2005). Weiterhin fanden sich auch Gene, die sowohl den Ergebnissen in infizierten als auch transfizierten Zellen entsprachen.

Exemplarisch werden nachfolgend einige der durch Cpn0712 beeinflussten Gene näher dargestellt. So wurde z.B. die Transkription einiger Gene der Cytokeratin-Familie inhibiert. Keratine gehören zur Intermediärfilament-Familie, die Bestandteile des Cytoskeletts sind. Eines der durch Cpn0712 beeinflussten Gene war *krt17*: Neben seiner Cytoskelettfunktion reguliert Krt17 die Proteinsynthese und das Zellwachstum durch Bindung des Adaptorproteins Stratifin (Kim et al., 2006). Eickhoff et al. berichteten 2007 von einer verstärkten Transkription des *krt17*-Gens 24 h nach *C. pneumoniae*-Infektion und einer verminderten Transkription 96 pI. Mittels Real Time RT-PCR konnte in dieser Arbeit ebenfalls eine verstärkte Transkription von *krt17* 24 h nach *C. pneumoniae* Infektion gezeigt werden. *Krt17* wird im persistenten Zustand vermindert transkribiert, mittels Mikroarray und Real Time RT-PCR konnte in *cpn0712*-transfizierten Zellen ebenfalls eine verminderte Transkription von *krt17* gezeigt werden, womit der Effekt von Cpn0712 auf die Wirtszelle eher mit dem persistenten als dem aktiven Infektionszustand zu korrelieren scheint.

Ifit1 und *ifit3* kodieren für „Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats“ und wurden sowohl in *cpn0712*-transfizierten als auch *C. pneumoniae*-infizierten Zellen

verstärkt transkribiert. Die anderen beiden Mitglieder dieser Familie (*ifit2* und *4*) wurden nach *C. pneumoniae*-Infektion ebenfalls verstärkt transkribiert, während sie von Cpn0712 unbeeinflusst blieben.

Eine verstärkte Expression dieser Gene konnte auch in Mikroarrays, die mit *C. trachomatis* durchgeführt wurden, nachgewiesen werden (Ren et al., 2003; Lad et al., 2005).

Die Mitglieder dieser Proteinfamilie sind zusammen auf Chromosom 10 lokalisiert und zeichnen sich durch konservierte „Interferon Stimulated Response Elemente“ (ISRE) innerhalb der Promotorregionen und mehrerer konservierter TPR-Motive in der Aminosäuresequenz aus. Gene anderer Erreger führten zu einer verstärkten Transkription von *ifit3*: So wurden alle Mitglieder der IFIT-Familie im Mausmodell durch virale Infektionen in ihrer Expression moduliert (Wachter et al., 2006). Mikroarray-Studien konnten die verstärkte Transkription von *ifit1* und *ifit2* durch Infektion mit dem Adenovirus Typ12 sowie ebenfalls die verstärkte Transkription von *ifit3* durch das Polyomavirus nachweisen (Dorn et al., 2005; Grinde et al., 2007) und das Cytomegalovirus induziert die Expression von *ifit3* in neonatalen und adulten Gehirnen (van de Pol et al., 2007). Außerdem wurde eine verstärkte Expression der *Ifit*-Gene in humanen Monozyten durch *Neisseria meningitidis* gezeigt (Ovstebo et al., 2008). Welchen genauen Einfluss die durch Cpn0712-induzierte Expression von *Ifit3* auf die Wirtszelle und den Infektionsverlauf hat, konnte und sollte diese Arbeit nicht klären. Diese Fragestellung bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten.

Sowohl in *cpn0712*-transfizierten, als auch in *C. pneumoniae*-infizierten Zellen wurde die Transkription des „Glucagon-like peptide-2 receptor“ GLP-2R verringert. Das korrespondierende Protein ist ein Mitglied der „Klasse B-Glucagon-Sekretin-ähnlichen G-Protein gekoppelten Rezeptor Superfamilie“ und interagiert mit Glucagon-like Peptiden, die hauptsächlich in epithelialen L-Zellen des Darms exprimiert werden (Buhl et al., 1988; Munroe et al., 1999). GLP-2R aktiviert verschiedene Signaltransduktionswege, die an der ERK1/2-Aktivierung und Apoptose gekoppelt sind (Köhler et al., 2005). Dabei induziert der GLP-2R Rezeptor einen Signaltransduktionsweg, der durch eine Reduktion der Aktivität der Caspase3 und -8 die durch externe Stimuli (z.B. Cycloheximid) induzierte Apoptose inhibiert (Yusta et al., 2000). Eine Inhibierung der Expression des Rezeptors würde diesem Prozess entgegenwirken. In der Tat scheinen Chlamydien die Apoptose der Wirtszelle im späten Infektionsstadium zu induzieren (Perfettini et al., 2002). Und *cpn0712*-transfizierte Zellen zeigten nach Staurosporinbehandlung eine höhere Caspase3-

Aktivität als nur mit dem Vektor-transfizierten Zellen. Ob die durch Cpn0712 induzierte Caspase3-Aktivität tatsächlich auf eine Interaktion mit GLP-2R beruht, müssen weitere Untersuchungen klären.

Ebenfalls vermindert transkribiert wurde der eukaryontische Initiationsfaktor 5 (*eIF5*), der zu den Proteinen gehört, die die Initiation der Translation vermitteln. Die Initiation der Translation ist ein komplexer Prozess, in welchem die Initiator-tRNA, 40S, 60S und ribosomale Untereinheiten durch eukaryontische Initiationsfaktoren (eIFs) in einem 80S Ribosom am Initiationscodon der mRNA zusammengefügt werden. EIF5 stimuliert die GTPase-Aktivität von an Met-tRNA gebundenem eIF2 und seine C-terminale Domäne. Es bindet eIF2 und eIF3 an den MFC (multifactor complex) und stimuliert somit die Bindung des Translationskomplexes an die 40S-Untereinheit, um den Präinitiationskomplex zu bilden (Asano et al., 2001). Ein Zusammenhang von Chlamydien und eukaryontischen Initiationsfaktoren wurde bislang noch nicht beschrieben. Unklar bleibt, warum von den 39 *eIF*-Genen, die auf dem Chip präsent sind, nur *eIF5* durch Cpn0712 in seiner Transkription beeinflusst wurde, obwohl das Protein keine Sonderstellung unter den eIFs einnimmt und auch keine Regulationselemente besitzt, welche eIF5 von anderen eIFs unterscheidet.

Weiterhin wurde die Transkription von zwei noch nicht in ihrer Funktion beschriebenen Genen durch Cpn0712 und *C. pneumoniae* in gleicher Weise moduliert. Die Transkription eines Gens, das Ähnlichkeit zur Asparagin-Synthetase besitzt, wurde durch Cpn0712 und *C. pneumoniae* verstärkt. Asparagin-Synthetasen katalysieren die Glutamin- und ATP-abhängige Umwandlung von Aspartat zu Asparagin. Die Transkription eines Gens, das *tll11* ähnelt, wurde vermindert. TLL11 ist ein Mitglied der Familie der "Tubulin Tyrosin Ligase-ähnlichen Proteine", die sich durch eine TTL-Domäne auszeichnen. Die Mitglieder dieser Familie katalysieren Ligationen von verschiedenen Aminosäuren an Tubulin oder anderen Substraten. Über die genauen Funktionen dieser beiden Gene ist aber noch nichts bekannt. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob die Interaktion von Cpn0712 mit diesen Proteinen eine Bedeutung für die Infektion von *C. pneumoniae* hat.

Erstmalig wurde in dieser Arbeit gezeigt, wie die Funktion eines Effektorproteins von *C. pneumoniae* mittels Mikroarray untersucht werden kann. Die Modulation der Transkription der hier beschriebenen Gene schien spezifisch für Cpn0712 zu sein, da ein Mikroarray mit *cpn1020*-transfizierten Zellen ein anderes Muster der Transkriptionsveränderungen

zeigte. Die Unterschiede in der Modulation des Wirtszelltranskriptoms, die sich zwischen Cpn0712 und die natürliche *C. pneumoniae*-Infektion ergab, kann verschiedene Ursachen haben. Eickhoff et al. (2007) konnten zeigen, dass sich die Modulation der Transkription einiger Gene verändert, wenn Chlamydien in einen persistenten Zustand eintreten, so dass die Unterschiede zwischen Cpn0712 und *C. pneumoniae* einen Hinweis auf eine Funktion von Cpn0712 in der Persistenz von Chlamydien geben könnte. Zu verschiedenen Zeitpunkten sezernierte Effektorproteine können einen unterschiedlichen Einfluss auf die Wirtszelle haben, um diese an die veränderten Bedürfnisse während des Infektionszyklus anzupassen. So wirkt beispielsweise das Effektorprotein SptP von *S. enterica* den Effekten von SopE und SopE2 entgegen, indem es die durch diese Effektorproteine verursachten Cytoskelett-Neuordnungen wieder in den ursprünglichen Zustand zurücksetzt (Fu und Galan, 1999). Es ist zwar auch möglich, dass der Effekt von Cpn0712 auf das Wirtszelltranskriptom durch andere bakterielle Proteine ausgeglichen oder ihm sogar entgegen wirkt, doch bleibt in dieser Arbeit unklar, warum ein einzelnes Effektorprotein das Wirtszelltranskriptom so unterschiedlich im Vergleich zur natürlichen Chlamydieninfektion beeinflusst. In dieser Hinsicht muss deshalb darauf hingewiesen werden, dass die Zellen im Mikroarray nicht die gleichen Bedingungen widerspiegeln, die Cpn0712 in der Wirtszelle während der natürlichen Infektion hat. In *C. pneumoniae*-infizierten Zellen werden mehrere Effektorproteine gleichzeitig sekretiert, die zusammen das Wirtszelltranskriptom beeinflussen, so dass sich ein anderes Muster der Transkriptionsstärken ergibt.

Darüber hinaus kann eine mögliche posttranslationale Modifikation des Effektors einen Einfluss auf seine Funktion haben: Das *H. pylori*-Protein CagA muss z.B. zunächst phosphoryliert werden, bevor es Mitglieder der Rho-Familie aktivieren kann. Das Effektorprotein Tir von *E. coli* fungiert erst als Rezeptor von Intimin, nachdem es von einer eukaryontischen Kinase phosphoryliert wird (Knutton et al., 1998; Taylor et al., 1999; Stein et al., 2002). So konnten auch Johnson und Mahoney (2007) zeigen, dass Cpn0712 durch PknD phosphoryliert wird. Daher ist es gut möglich, dass die fehlende Phosphorylierung des transfizierten Cpn0712 ein Grund für das unterschiedliche Transkriptionsmuster ist. Alternativ kann nicht ausgeschlossen werden, dass Cpn0712 im natürlichen Infektionsweg eine Prozessierung benötigt, bevor es sezerniert wird. So wird z.B. das Effektorprotein CPAF als 70kDA Protein synthetisiert, in zwei Fragmente gespalten, die dann intramolekulare Dimere bilden. Nur in diesem Zustand ist CPAF fähig das Wirtszellprotein RFX5 zu degradieren (Dong et al., 2004). Weiterhin wäre es möglich,

dass Cpn0712 erst im Komplex mit einem anderen chlamydialen Protein mit Wirtszellproteinen interagiert.

Abschließend kann festgestellt werden, dass Mikroarray-Analysen eine sensitive Methode zur Untersuchung von Wirts-Pathogen-Interaktionen von genetisch nicht manipulierbaren Organismen darstellen kann. Die Modulation der Transkription einiger Gene nach *C. pneumoniae*-Infektion, z.B. die verstärkte Transkription von *tnfaip3* und *krt17* und die verminderte Transkription von *insig1* von veröffentlichten Mikroarray-Analysen konnte bestätigt werden (Eickhoff et al., 2007; Lad et al., 2005). Aufgrund der signifikanten Unterschiede der Mikroarray-Analysen transfizierter gegen infizierter Zellen bedarf es zur Untersuchung der Funktion eines einzelnen bakteriellen Effektorproteins noch weiterer Optimierung, so muss z.B. vorher geklärt werden in welchen Zustand das Effektorprotein in der Wirtszelle vorliegt. Diese Untersuchungen sind aber ein erster Schritt um zukünftige Strategien für die Analyse bakterieller Effektoren von genetisch nicht manipulierbarer Erreger zu entwickeln.

5. Zusammenfassung

Chlamydomphila pneumoniae verursacht atypische Pneumonien und wird darüber hinaus mit einigen chronischen Erkrankungen wie chronisch obstruktiver Lungenerkrankung oder Arteriosklerose in Verbindung gebracht. Der gesamte Entwicklungszyklus der obligat intrazellulären Chlamydien findet in der Wirtszelle in einer Vakuole, dem Einschlusskörper, statt. Die Sekretion von Effektorproteinen durch das Typ III Sekretionssystem (TTSS) bietet den Chlamydien die Möglichkeit, über die Membran des Einschlusskörpers in Signalprozesse der Wirtszelle eingreifen zu können.

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von putativen Effektorproteinen des TTSS hinsichtlich ihrer Transkription, Lokalisation und Funktion in der Wirtszelle. Die putativen Effektorproteine Cpn0708 und Cpn0712 wurden aufgrund ihrer Zugehörigkeit zu einem Subcluster des TTSS-Genkomplexes ausgewählt. Für Cpn0809 konnte eine Expression 48 h nach der Infektion (pI) und eine Lokalisation innerhalb der Wirtszelle gezeigt werden.

Die Transkription von *cpn0708* und *cpn0712* konnte in Infektionsversuchen mittels RT-PCR-Analysen 8 h pI. nachgewiesen werden, wobei zum Ende des Entwicklungszyklus` eine Verminderung der Transkription zu erkennen war.

Zur Analyse der Expression und Lokalisation wurden polyklonale Antiseren gegen die entsprechenden rekombinanten Proteine generiert. Immunfluoreszenztests von *C. pneumoniae*-infizierten Wirtszellen zeigten eine Lokalisation von Cpn0708 ausschließlich im Einschlusskörper, so dass ein Einfluss auf die Wirtszelle eher unwahrscheinlich ist. Cpn0712 dagegen konnte im Einschlusskörper, sowie im umliegenden Cytoplasma der Wirtszelle detektiert werden.

Da Chlamydien sich genetisch nicht manipulieren lassen, sollte die Sekretion der bakteriellen Effektorproteine über ein heterologes TTSS in Salmonellen bestätigt werden. Da sie jedoch mit Ausnahme des Konstruktes, das aus *cpn0713* und dem 5`Bereich von *cpn0712* bestand, in Salmonellen nicht detektiert werden konnten, scheint dieses System nicht geeignet zu sein, um eine heterologe Typ III Sekretion von chlamydialen Proteinen zu überprüfen.

Daher wurde hier mittels Transfektionsversuchen der entsprechenden Chlamydiengene in HeLa-Zellen die Funktion von Cpn0712 und Cpn0809 in der Wirtszelle untersucht. Cpn0809 konnte am ER lokalisiert werden, während Cpn0712 an Bestandteile des Cytoskeletts assoziiert zu sein scheint. Weder die Entwicklung des Einschlusskörpers

noch der Verlauf nachfolgender Infektionen wurde durch die Expression von rekombinantem Cpn0712 bzw. Cpn0809 beeinflusst.

Mittels Mikroarray wurde die durch Cpn0712 bzw. *C. pneumoniae* ausgelöste Veränderung der Genexpression in der Wirtszelle untersucht. Dies sollte einen ersten Einblick des Einflusses von Cpn0712 auf die Wirtszelle liefern.

Es wurden 237 Wirtszellgene gefunden, deren Transkription sich durch Expression von Cpn0712 in der Wirtszelle um das Dreifache veränderte. Sechs Gene wurden identifiziert, die durch Cpn0712 und *C. pneumoniae* in gleicher Weise in ihrer Transkription verändert wurden, aber auch eine Vielzahl von Genen, die eine gegensätzlich veränderte Transkription aufwiesen. Das Beispiel *krt17* zeigte, dass ein Wirtsgen abhängig vom aktiven oder persistierenden Zustand der Chlamydien zwischen einer verstärkten und einer verminderten Transkription wechseln kann: In dieser Arbeit konnte eine vermehrte Transkription von *krt17* nach *C. pneumoniae*-Infektion und eine verminderte Transkription nach Transfektion mit *cpn0712* nachgewiesen werden, so dass die Unterschiede zwischen Cpn0712 und *C. pneumoniae* einen Hinweis auf eine Funktion von Cpn0712 im Persistenzstadium der Chlamydieninfektion darstellen könnte. Diese Arbeit hat gezeigt, dass Mikroarray-Analysen prinzipiell als neue Methode geeignet sind, die Bedeutung von bakteriellen Effektorproteinen von *C. pneumoniae* für die Wirtszellphysiologie zu untersuchen. Das andererseits aber noch Optimierung dieser Methode zukünftig nötig sind.

5.1. Summery

Chlamydophila pneumoniae causes atypical pneumoniae and is also discussed as a risk factor for a wide range of chronic diseases like chronic obstructive pulmonary disease or atherosclerosis. Throughout their intracellular life cycle, Chlamydophila stay enclosed within a host cell membrane vacuole, termed an inclusion. The secretion of effector proteins through a type III secretion system (TTSS) offers the bacteria the possibility to interfere with host cell processes. The aim of this work was to identify putative type III secretion effector proteins of *C. pneumoniae* and to analyse their transcription, localization and function within their host cell.

Putative effector proteins Cpn0708, Cpn0712 were selected because of their location within a subcluster of the TTSS. Cpn0809 has been shown to be expressed 48 h pI. and to be localized outside of the inclusion.

Using RT-PCR assays on infected cells, transcription of *cpn0708* and *cpn0712* could be detected 8 h pI. with a decrease at the end of the developmental cycle. To analyse the expression and localisation, polyclonal antisera were generated against recombinant proteins under investigation. In immunofluorescence assays, which were carried out on infected host cells, Cpn0708 was detected only within the inclusion indicating that Cpn0708 has no function as effector protein in the host cell itself. In contrast, Cpn0712 was detected in the inclusion and in the surrounding cytoplasm.

Because Chlamydia are resistant to genetic manipulation, secretion of Cpn0712, Cpn0708 and Cpn0809 should be confirmed with the heterologous TTSS of Salmonella. With the exception of *cpn0713-cpn0712* 5', none of the proteins could be expressed in Salmonella. For this, Salmonella seems not to be an appropriate heterologous TTSS for the expression of chlamydial proteins.

Using transfection experiments, possible functions of Cpn0712 and Cpn0809 within the host cell were analysed. When artificially expressed by the host, Cpn0809 was localized to the ER while Cpn0712 associated with components of the cytoskeleton. Furthermore, expression of recombinant Cpn0712 and Cpn0809 could be shown to have no influence on the development of the inclusion. No differences could be detected in spite of the size or the amount of the inclusion bodies. Furthermore, expression of both proteins had no effect on subsequent infection with *C. pneumoniae*.

Microarray-analysis was used to analyse the change of the host cell transcriptome induced by Cpn0712 or *C. pneumoniae*. This should give a first insight of the influence of Cpn0712 on the host cell. 237 host cell genes could be determined whose transcription was altered after expression of Cpn0712. Six of them were regulated in the same direction as in *C. pneumoniae*-infected cells but also many genes whose transcription was changed in the opposite direction. Transcription of *krt17* for example changed between active infection and persistence, we could confirm up-regulation of *krt17* after infection with *C. pneumoniae* and down-regulation after transfection with *cpn0712*. This gave the hint that the differences between Cpn0712 and *C. pneumoniae* could be due to a function of Cpn0712 in the state of persistence. Our study showed that microarray-analysis could be used as a method for analysing the influence of bacterial effector of *C. pneumoniae* on the host physiology. However further optimisation of this method would be necessary for future investigation.

6. Literaturverzeichnis

Aizawa SI (2001): Bacterial flagella and type III secretion systems, *FEMS Microbiol Lett.*, **202**, 157-64

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389–3402.

Alzanov D, Barnes J, Hruby DE, Rockey DD (2004): Chlamydial development is blocked in host cells transfected with *Chlamydomophila caviae* incA. *BMC Microbiology*, **4**, 24

Asano K, Shalev A, Phan L, Nielsen K, Clayton J, Valasek L, Donahue TF, Hinnebusch AG (2001): Multiple roles for the C-terminal domain of eIF5 in translation initiation complex assembly and GTPase activation. *EMBO J*, **20**, 2326-2337

Ausubel FM (1992): Current protocols in molecular biology. Wiley and Sons INC., New York, USA 1992

Backert S und Selbach M (2005): Tyrosine-phosphorylated bacterial effector proteins: the enemies within. *Trends Microbiol*, **13**, 476-484

Balin BJ, Gerard HC, Arking EJ, Appelt DM, Branigan PJ, Abrams JT, Whittum-Hudson JA, Hudson AP (1998): Identification and localization of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's brain. *Med Microbiol Immunol* **187**, 23–42.

Bannantine JP, Griffiths R S, Viratyosin W, Brown W J, Rockey D D (2000): A secondary structure motif predictive of protein localization to the chlamydial inclusion membrane. *Cell Microbiol* **1**, 35-47.

Barry CE 3rd, Hayes SF, Hackstadt T (1992): Nucleotid condensation in *Escherischia coli* that express a chlamydial histone homolog. *Science*, **256**, 377-379

Bedson SP, Bland JW (1932): Morphological study of psittacosis virus, with the description of a developmental cycle. *Br J Exp Pathol* **13**, 461–466.

Belland RJ, Scidmore MA, Crane DD, Hogan DM, Withmire W, McClarty G, und Cadwell HD (2001): *Chlamydia trachomatis* cytotoxicity associated with complete and partial cytotoxin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** : **139** 84-13989

Belland RJ, Nelson DE, Virok D, Crane DD, Hogan D, Sturdevant D, Beatty WL, Caldwell HD (2003): Transcriptome analysis of chlamydial growth during IFN-gamma-mediated persistence and reactivation. *Proc Natl Acad Sci*, **26**, 15971-15976

Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004): Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, **340**, 783-795

Buhl T, Thim L, Kofod H, Orskov C, Haring H, Holst JJ (1988): Naturally occurring products of proglucagon 111-160 in the porcine and human small intestine. *J Biol Chem*, **18**, 8621-8624

Busch C, Hofmann F, Selzer J, Munro S, Jeckel D und Aktories K (1998): a common motif of eukaryotic glycosyltransferase is essential for the enzyme activity of large clostridial cytotoxins. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 19566-19572

Carabeo RA, Grieshaber SS, Fischer E, Hackstadt T (2002): *Chlamydia trachomatis* induces remodeling of the actin cytoskeleton during attachment and entry into HeLa cells. *Infect Immun* **70**, 3793-3803

Carabeo RA, Grieshuber SS, Hasenkrug A, Dooley C, Hackstadt T (2002): Requirement for the RAC GTPase in *Chlamydia trachomatis* invasion of non-phagocytic cells. *Traffic* **5**, 418-425

Carabeo RA, Mead DJ, Hackstadt T (2003): Golgi-dependent transport of cholesterol to the *Chlamydia trachomatis* inclusion. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 6771–6776.

Carratelli, C. R., A. Rizzo, M. R. Catania, F. Galle, E. Losi, D. L. Hasty, and F. Rossano (2002): *Chlamydia pneumoniae* infections prevent the programmed cell death on THP-1 cell line. *FEMS Microbiol Lett* **215**, 69-74.

Chen, L. M., S. Hobbie, and J. E. Galan (1996): Requirement of CDC42 for *Salmonella* induced cytoskeletal and nuclear responses. *Science* **274**, 2115-2118.

Chien A, Edgar DB, Trela JA (1976): Deoxiribonucleotid acid polymerase from extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol*, **3**, 15550-1557

Cho K und Zusman DR (1999): Sporulation timing in *Myxococcus xanthus* is controlled by the espAB locus. *Mol Microbiol*, **4**, 714-725

Clausen JD, Christiansen G, Holst HU, Birkelund S (1997): *Chlamydia trachomatis* utilizes the host cell microtubule network during early events of infection. *Mol Microbiol*, **3**, 441-449

Clifton DR, Fields KA, Grieshaber SS, Dooley CA, Fischer ER, Mead DJ, Carabeo RA, 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.

Collazo C M, Galán J E (1997): The invasion-associated type III secretion system of *Salmonella typhimurium* directs the translocation of Sip proteins into the host cell. *Mol Microbiol*, **24**, 747–756

Coombes BK, Mahony JB (2001): cDNA array analysis of altered gene expression in human endothelial cells in response to *Chlamydia pneumoniae* infection. *Infect Immun.* **3**, 1420-1407

Coombes BK, Mahony JB (2002): Identification of MEK- and phosphoinositide 3-kinase-dependent signalling as essential events during *Chlamydia pneumoniae* invasion of HEP2 cells. *Cell Microbiol* **4**, 447–460.

Cornelis GR, Van Gijsegem F (2000): Assembly and function of Type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol* **54**, 735-734

Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, Geuijen C, Iriarte M, Neydt C, Sory MP, Stainier I (1998): The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev*, **4**, 1315-1552

Creasey EA, Delahay RM, Bishop AA, Shaw RK, Kenny B, Knutton S, Frankel G (2003): CesT is a bivalent enteropathogenic *Escherichia coli* chaperone required for translocation of both Tir and Map. *Mol Microbiol* **47**, 209-221.

Dautry-Varsat A, Balañá ME, Wyplosz B (2004): *Chlamydia* – host cell interactions: recent advances on bacterial entry and intracellular development. *Traffic*, **5**, 561-570.

Dautry-Varsat A, Subtil A (2007): Secreted chlamydia polypeptides, polynucleotides coding therefor, therapeutic and diagnostic uses thereof. United states patent, 20070003568

Dawson CR, Schachter J (1978): Sexually transmitted chlamydial eye infections are not trachoma. *JAMA*, **17**, 1790-1791

Delevoeye C, Nilges M, Dautry-Varsat A, Subtil A (2004): Conservation of the biochemical properties of IncA from *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia caviae*. *The journal of biol. Chemistry*, **5**, 46896-46906

DeVeer MJ, Sim H, Whisstock JC, Devenish RJ, Ralph SJ (1998): IFI60/ISG60/IFIT4, a new member of the human IFI54/IFIT2 family of interferon-stimulated genes. *Genomics*, **2**, 267-277

Dong F, Sharma J, Xiao Y, Zhong Y, Zhong G (2002): Intramolecular dimerization is required for the chlamydia-secreted protease CPAF to degrade host transcriptional factors. *Infect Immun*, **7**, 3869-3875

Dong F, Su H, Huang Y, Zhong Y, Zhong G (2004): Cleavage of host keratin 8 by a Chlamydia-secreted protease. *Infect Immun*, 7, 3863-3868

Dorn A, Zhao H, Granberg F, Hösel M, Webb D, Svenson C, Petterson U, Doerfler W (2005): Identification of specific cellular genes up-regulated late in adenovirus type 12 infection. *J Virol*, 4, 2404-2412

Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C (1997): Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ* 13, 629–634.

Eickhoff M, Thalmann J, Hess S, Martin M, Kruppa J, Brandes G, Klos A (2007): Host cell responses to *Chlamydia pneumoniae* in IFN- α -induced persistence overlap those of productive infection and are linked to genes involved in apoptosis, cell cycle, and metabolism. *Infect Immun* Epub ahead of print.

Everett KD, Bush RM, Andersen AA (1999): Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* 49, 415–440.

Fan T, Lu H, Hu H, Shi L, McClarty GA, Nance DM (1998): Inhibition of apoptosis in chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J. Exp. Med.*, 187, 487-496

Fan P, Dong F, Huang Y, Zhong G (2002): *Chlamydia pneumoniae* secretion of a protease-like activity factor for degrading host cell transcription factors required for major histocompatibility complex antigen expression. *Infect Immun* 70, 5–349

Fawaz FS, van Ooij C, Homola E, Mutka SC, Engel J N (1997): Infection with *Chlamydia trachomatis* alters the tyrosine phosphorylation and/or localization of several host cell proteins including cortactin. *Infect. Immun.* 65, 5301-5308

Fields KA, Hackstadt T (2000): Evidence for the secretion of *Chlamydia trachomatis* CopN by a type III secretion mechanism. *Mol Microbiol* 38, 1048–1060.

Fields KA, Fischer ER, Mead DJ, Hackstadt T (2005): Analysis of putative *Chlamydia trachomatis* chaperones Scc2 and Scc3 and their use in the identification of type III secretion substrates. *J Bacteriol*, **187**, 6466–6478.

Fischer SF, Schwarz C, Vier J, Häcker G (2001): Characterization of antiapoptotic activities of *Chlamydia pneumoniae* in human cells. *Infect Immun*, **11**, 7121-7129

Fischer SF, Vier J, Kirschnek S, Klos A, Hess S, Ying S, Hacker G (2004): Chlamydia inhibit host cell apoptosis by degradation of proapoptotic BH3-only proteins. *J Exp Med*, **200**, 905-916.

Flores R, Luo J, Chen D, Sturgeon G, Shivshankar P, Zhong Y, Zhong G (2007): Characterization of the hypothetical protein Cpn1027, a newly identified inclusion membrane protein unique to *Chlamydia pneumoniae*. *Microbiology*, **Pt3**, 777-786

Foultier B, Troisfontaines P, Vertommen D, Marenne MN, Rider M, Parsot C, Cornelis GR (2003): Identification of substrates and chaperone from the *Yersinia enterocolitica* 1B Ysa type III secretion system. *Infect Immun*, **1**, 242-253

Francis MS, Aili M, Wiklund ML, Wolf-Watz H (2000): A study of the YopD-IcrH interaction from *Yersinia pseudotuberculosis* reveals a role for hydrophobic residue within the amphipatic domain of YopD. *Mol Microbiol*, **1**, 85-102

Friis RR (1972): Interaction of L cells and *Chlamydia psittaci*: entry of the parasite and host responses to its development. *J Bacteriol* **110**, 706–721.

Frithz-Lindsen E, Rosquist R, Johansson L, Forsberg A (1995): The chaperone-like protein YerA of *Yersinia pseudotuberculosis* stabilizes YopE in the cytoplasm but is dispensible for targeting to the secretion loci. *Mol Microbiol*, **4**, 635-647

Fu Y, Galan JE (1999): A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature*, **401**, 293-297.

Galan JE, Collmer A (1999): Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**, 1322–1328.

Gardy JL, Laird MR, Chen F, Rey S, Walsh CJ, Ester M, Brinkman FS (2005): PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. *Bioinformatics*, **21**, 617-623

Gaydos CA, Summersgill JT, Sahney NN, Ramirez JA, Quinn TC (1996): Replication of *Chlamydia pneumoniae* in vitro in human macrophages, endothelial cells, and aortic artery smooth muscle cells. *Infect Immun* **64**, 1614–1620.

Geng Y, Shane RB, Berencsi K, Gonozol E, Zaki MH, Margolis DJ, Trinchieri G, Rook AH (2000): *Chlamydia pneumoniae* inhibits apoptosis in human peripheral blood mononuclear cell through induction of IL-10. *J. Immunol*, **164**, 5522-5529

Gibson UE, Heid CA, Williams PM (1996): A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*, **10**, 995-1001

Gieffers J, Fullgraf H, Jahn J, Klinger M, Dalhoff K, Katus HA, Solbach W, Maas M (2001): *Chlamydia pneumoniae* infektion in circulating human monocytes is refractory to antibiotics treatment. *Circulation*, **103**, 351-356

Grayston JT, Kuo CC, Campbell LA, Wang SP (1989): *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* strain TWAR. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 88.

Grayston JT, Kuo CC, Wang SP, Altman J (1986) : A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections. *N Engl J Med*, **3**, 161-168

Grayston JT (1992): Infections caused by *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. *Clin Infect Dis* **15**, 757–761

Grayston JT, Aldous MB, Easton A, Wang SP, Kuo CC, Campell LA, Altmann L (1993): Evidence that *Chlamydia pneumoniae* causes pneumonia and brochitis. *J Infect Dis*, **5**, 1231-1235

Grinde B, Gayorfar M, Rinaldo CH (2007): Impact of a polyomavirus (BKV) infection on mRNA expression in human endothelial cells. *Virus Res*, **1**, 86-94

Gruenheid, S. and B. B. Finlay (2003): Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature* **422**:775-781.

Gupta S, Leatham EW, Carrington D, Mendall MA, Kaski JC, Camm AJ (1997): Elevated *Chlamydia pneumoniae* antibodies, cardiovascular events, and azithromycin in male survivors of myocardial infarction. *Circulation*, **15**, 404–407.

Guttman DS, Vinatzer A, Sarker SF, Ranall MV, Kettler G, Greenberg JT (2002): A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Science* **294**, 1722-1726

Hackstadt T (1998): The diverse habitats of obligate intracellular parasites. *Curr Opin Microbiol* **1**, 82–87.

Hackstadt T (1991) : Purification and N-terminal amino acid sequences of *Chlamydia trachomatis* histone analogs. *J Bacteriol*, **21**, 7046-7049

Halberstaedter L, Prowazek SV (1907): Über Zelleinschlüsse parasitärer Natur beim Trachom. *Arb Kais Gesundheitsamte* **26**, 44–47.

Haller JC, Carson S, Pederson KJ, Pierson DE (2000): A chromosomally encoded type III secretion pathway in *Yersinia enterocolitica* is important in virulence. *Mol Microbiol*, **6**, 1436-1446

Hanahan D (1985): Techniques for transformation of *E. coli*. DNS cloning a practical approach. *Glover DM, IRL Press, Oxford-Washington D.C.*

Hatch GM und McClarty G (1998): Phospholipid composition of purified *Chlamydia trachomatis* mimics that of the eucaryotic host cell. *Infect Immun*, **8**, 3727-2735

Hensel M (2000): Salmonella pathogenicity island 2. *Mol Microbiol*, **5**, 1015-1023

Hermann M, Schumacher A, Mühldorfer I, Melchers K, Prothmann C, Dammeier S (2005): Identification and characterization of secreted effector proteins of *Chlamydomonas reinhardtii* TW 183. *Res Microbiology*, **6**, 513-524

Heuer DV, Brinkmann V, Meyer TF, Szczeppek AJ (2003): Expression and translocation of chlamydial protease during acute and persistent infection of the epithelial Hep2-cells with *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell Microbiol.* **5**, 315-942

Ho TD und Starnbach MN (2005): The *Salmonella enterica* serovar typhimurium encoded type III secretion systems can translocate *Chlamydia trachomatis* proteins into the cytosol of host cells. *Infect Immun*, **2**, 905-911

Hromockyj A E, Tucker S C, Maurelli A (1992): Temperature regulation of *Shigella* virulence: identification of the repressor gene *virR*, an analogue of *hns*, and partial complementation by tyrosyl transfer RNA (tRNA^{Tyr}). *Mol Microbiol.*, **6**, 2113–2124

Hsia RC, Pannekoek Y, Ingerowski E, Bavoil PM (1997): Type III secretion genes identify a putative virulence locus of *Chlamydia*. *Mol Microbiol* **25**, 351–359.

Hueck CJ (1998): Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 379–433.

Iriarte M und Cornelis GR (1998): YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton, *Mol Microbiology*, **29**, 915-929

Jewett TJ, Fischer ER, Mead DJ, Hackstadt T (2006): Chlamydial TARP is a bacterial nucleator of actin. *Proc Natl Acad Sci*, **42**, 15599-15604

Johnson DL, Mahoney JB (2007): *Chlamydomonas reinhardtii* PknD exhibits dual amino acid specificity and phosphorylates Con0712, a putative type III secretion YscD homolog. *J Bacteriol*

Kalayoglu MV, Byrne GI (1998): Induction of macrophage foam cell formation by *Chlamydia pneumoniae*. *J. Infect. Dis*, **177**, 725-729

Kalman S, Mitchell W, Marathe R, Lammel C, Fan J, Hyman RW, Olinger L, Grimwood J, Davis RW, Stephens RS (1999): Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nat Genet* **21**, 385–389.

Kauppinen M, Saikku P (1995): Pneumonia due to *Chlamydia pneumoniae*: prevalence, clinical features, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis*, **21 Suppl 3**, 244–252.

Kim J, Ahn K, Min S, Jia J, Ha U, Wu D, Jin S (2005): Factors triggering type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **Pt11**, 3575-3587

Kim JF (2001): Revisiting the chlamydial type III protein secretion system: clues to the origin of type III protein secretion. *Trends Genet*, **2**, 65-69

Kim S, Wong P, Coulombe P A (2006): A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial growth. *Nature* **441**, 362-365.

Knutton S, Rosenshine I, Pallen MJ, Nisan I, Neves BC, Wolff C, Dougan G, Frankel G (1998): A novel EspA-associated surface organelle of *enteropathogenic Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J*, **8**, 2166-2176

Köhler JA, Yusta B, Drucker DJ (2005):The HeLa cell glucagon-like peptide-2 receptor is coupled to regulation of apoptosis and ERK1/2 activation through divergent signaling pathways. *Mol Endocrinol*, **2**, 459-473

Kogan SC, Doherty M Gitschier J (1987): An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA-sequences. *N. Eng. J. Med.*, **317**, 985-990

Kresse AU, Schulze K, Deibel C, Ebel F, Rohde M, Chakraborty T, Guzman CA (1998): Pas, a novel protein required for protein secretion and attaching and effacing activities of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **17**, 4370-4379

Kuhle V, Jackel D, und Hensel M (2004): Effector proteins encoded by salmonella pathogenicity island 2 interfere with the microtubule cytoskeleton after translocation into host cells. *Traffic* **5**:356-370

Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT (1995): *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microbiol Rev* **8**, 451–461.

Kyhse-Andersen J (1984): Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**, 203–209.

Kyte J, Doolittle RF (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, **157**, 105–132.

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685

Lambert de Rouvroit C, Sluiter C, Cornelis GR (1992) : Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol*, **3**, 395-409

Lad SP, Fukuda EY, de la Maza LM, Li E (2005): Up-Regulation of the Jak/Stat1 Signal Pathway during *Chlamydia trachomatis* Infection. *Journal of Immunology*, **174**, 7186-7193

Lawton DG, Longstaff C, Wallance BA, Hill J, Leary SE, Titball RW und Brown KA (2002): Interaktion of the type III secretion pathway proteins LcrV and LcrG from *Yersinia pestis* are mediated by coiled-coil domains. *J Biol Chem* **277**: 38714-38722

Lloyd SA, Forsberg A, Wolf W, Francis MS (2001): Targeting exported substrates to the yersinia TTSS: different functions for different signals? *Trends Microbiol* **9**, 367-371

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265–275.

Lugert R, Kuhns M, Polch T, Gross U (2004): Expression and localization of type III secretion-related proteins of *Chlamydia pneumoniae*. *Med Microbiol Immunol* **193**, 163–171.

Luo J, Liu G, Zhong Y, Jia T, Chen D, Zhong G (2007): Characterization of hypothetical Cpn0146, 0147, 0284 and 0285 that are predicted to be in the *Chlamydia pneumoniae* inclusion membrane. *BMC Microbiol* **7**:38

Miao EA, Miller S (2000): A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella typhimurium*. Proceedings of the national academy of science. **97**, 7539-7544

Michiels T, Wattiau P, Brasseur R, Ruyschaert J-M, Cornelis G (1990): Secretion of Yop proteins by yersiniae. *Infect Immun*, **58**, 2840–2849

Miyairi I, Byrne GI (2006): Chlamydia and programmed cell death. *Curr Opin Microbiol*, **1**, 102-108

Molle V, Kremer L, Girard B, Besra, GS, Cozzone AJ und Prost JF, (2003): An FHA phosphoprotein recognition domain mediates protein EmbR phosphorylation by PknH, a Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* , **42**, 15300-15309

Moulder JW (1991): Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol Rev*. **55**, 143-190

Moulder JW, Levy NJ, Schulman LP (1980): Persistent infection of mouse fibroblasts (L cells) with *Chlamydia psittaci*: evidence for a cryptic chlamydial form. *Infect Immun*, **3**, 874-883

Muhlestein JB, Anderson JL, Carlquist JF, Salunkhe K, Horne BD, Pearson RR, Bunch TJ, Allen A, Trehan S, Nielson C (2000): Randomized secondary prevention trial of azithromycin in patients with coronary artery disease: primary clinical results of the ACADEMIC study. *Circulation* **102**, 1755–1760.

Munroe DG, Gupta AK, Kooshesh F, Vyas TB, Zizkalla G, Wang H, Dernchysyn L, Yang ZJ, Kamboj RK, Chen H, McCallum K, Sumner-Smith M, Drucker DJ, Crivici A (1999): Prototypic G protein-coupled receptor for the intestinotrophic factor glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci*, **96**, 1569-1573

Mullis KB, Faloona FA (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**, 335-350

Mülhardt C (1999): Der Experimentator: Molekularbiologie, Gustav Fischer Verlag, 1999

Nakayama S, Watanabe H (1995): Involvement of *cpxA*, a sensor of a two-component regulatory system, in the pH-dependent regulation of expression of *Shigella sonnei virF* gene. *J Bacteriol.*, **177**, 5062–5069

Netea MG, Selzman CH, Kullberg BJ, Galama JM, Weinberg A, Stalenhoef AF, Van der Meer JW, Dinarello CA (2000): A cellular components of *Chlamydia pneumoniae* stimulate cytokine production in human blood mononuclear cells. *Eur J Immunol* **30**, 541–549.

Nobel M, Torrente A, Peter O, Genne D (1999): No serological evidence of association between *chlamydia pneumoniae* infection and acute coronary heart disease

Norten R, Schepetiak S, Kok TW (1995) : *Chlamydia pneumoniae* pneumoniae with endocarditis *Lancet*, **345**, 1376–1377.

Ovstebo R, Olstad OK, Brusletto B, Moller AS, Aase A, Haug KB, Brandtzaeg P Kierulf P (2008): Identification of genes particularly sensitive to lipopolysaccharide

(LPS) in human monocytes induced by wild-type versus LPS-deficient *Neisseria meningitidis* strains. *Infect Immun*, **6**, 2685-2698

Ohl ME und Miller SI (2001): Salmonella: a model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med* **52**, 259-274

Perfettini JL, Darville T, Dautry-Varsat A, Rank RG, Ojcius DM (2002): Inhibition of apoptosis by gamma interferon in cells and mice infected with *C. muridarum* (the mouse pneumonitis strain of *C. trachomatis*). *Infect Immun*. **70**, 2559-2565

Perry DG, Daugherty GL, Martin WJ (1999): Clatherin-coated pit-associated proteins are required for alveolar macrophage phagocytosis. *J Immunol*, **1**, 380-386

Plano GV, Straley SC (1995): Mutations in yscC, yscD and yscG prevent high-level expression and secretion of V antigen and Yops in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol*, **13**, 3843-3854

Ramamurthi KS und Schneewind O (2003): *Yersinia yopQ* mRNS encodes a bipartite type III secretion signal in the first 15 codons. *Mol Microbiol*, **50**, 1189-1198

Read TD, Brunham RC, Shen C, Gill SR, Heidelberg JF, White O, Hickey EK, Peterson J, Utterback T, Berry K, Bass S, Linher K, Weidman J, Khouri H, Craven B, Bowman C, Dodson R, Gwinn M, Nelson W, DeBoy R, Kolonay J, McClarty G, Salzberg SL, Eisen J, Fraser (2000): Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39. *Nucleic Acids Res* **28**, 1397-1406.

Ren Q, Robertson SJ, Howe D, Barrows LF, Heinzen RA (2003): Comparative DNS Microarray Analysis of Host Cell Transcriptional Response to Infection by *Coxiella burnetii* or *Chlamydia trachomatis*. *Ann.NY. Acad.Sci*, **990**, 701-713

Renzone D, Esposito D, Pfuhl M, Hinton JC, Higgins CF, Driscoll PC, Ladbury JE (2001): Structural characterisation of the N-terminal oligomerization domain of the bacterial chromatin-structuring protein, H-NS. *J Mol Biol*, **5**, 1127-1137

Rockey DD, Heinzen RA, Hackstad T (1995): Cloning and characterization of a *Chlamydia psittaci* gene coding for a protein localized in the inclusion membrane of infected cells. *Mol Microbiol*, **4**, 617-626

Rurangirwa FR, Dilbeck PM, Crawford TB, McGuire TC, McElwain TF (1999): Analysis of the 16S rRNA gene of micro-org. WSU 86-1044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order Chlamydiales: proposal of *Waddliaceae* fam.nov. *Waddlia chondrophila* gen. Nov, spp.nov. *Int J Syst Bacteriol*. **49**, 577-581

Rzomp KA, Scholtes LD, Brigg BJ, Whittaker GR, Scidmore MA (2003): Rab GTPases are recruited to chlamydial inclusions in both a species-dependent and species-independent manner. *Infect Immun*, **10**, 5855-5870

Saiki RK, Scharf S, Fallon F, Mullis KB, Horn GT, Ehrlich HA, Arnheim N (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354

Saikku P., Ruutu P., Leinonen M., Panelius J., Tupasi T.E., Grayston J.T. (1988): Acute lower-respiratory-tract infection associated with chlamydial TWAR antibody in Filipino children. *J Infect Dis* **158**, 1095–1097.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): Molecular cloning : A laboratory manual. 2 Auflage Cold Spring Harbor Laboratory, New York

Shea JE, Hensel M, Gleeson C, Holden DW (1996) : Identifikation of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*

Schechter LM, Roberts KA, Jamir Y, Alfano JR, Collmer A (2004): *Pseudomonas syringae* type III secretion system targeting signals and novel effectors studied with a Cya translocation reporter. *The journal of bacteriology* **186** , 543-555

Scherer, C.A., Cooper, E., and Miller, S.I. (2000) : The *Salmonella* type III secretion translocon protein SspC is inserted into the epithelial cell plasma membrane upon infection. *Mol Microbiol*, **37**, 1133–1145.

Schesser K, Frihtz-Lindsten E, Wolf-Watz H(1996): Delineation and mutational analysis of the *Yersinia pseudotuberculosis* YopE domains which mediate translocation across bacterial and eukaryotic membranes. *J Bacteriol.*, **178**, 7227–7233

Shi Y und Tokunaga O (2004): *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) infection upregulates atherosclerosis-related gene expression in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Atherosclerosis*, **2**, 245-253

Shor A, Kuo CC, Patton DL (1992): Detection of *Chlamydia pneumoniae* in coronary arterial fatty streaks and atheromatous plaques. *S Afr Med J* **82**, 158–161.

Schramm N, Bagnell CR, Wyrick PB (1996): Vesicles containing *Chlamydia trachomatis* serovar L2 remain above pH 6 within HEC-1B cells. *Infect Immun* **64**, 1208–1214.

Scidmore MA, Rockey DD, Fischer ER, Heinzen RA, Hackstadt T (1996): Vesicular interactions of the *Chlamydia trachomatis* inclusion are determined by chlamydial early protein synthesis rather than route of entry. *Infect Immun* **64**, 5366–5372.

Slepenkin A, Motin V, de la Maza LM, Peterson EM (2003): Temporal expression of type III secretion genes of *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun* **71**, 2555–2562.

Sriram S, Stratton CW, Yao S, Tharp A, Ding L, Bannan JD, Mitchell WM (1999): *Chlamydia pneumoniae* infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Ann Neurol* **46**, 6–14.

Stebbins CE und Galan JE (2003) : Priming virulence factors for delivery into the host. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **4**, 738-744

Stein M, Bagnoli F, Halenbeck R, Rappuoli R, Fantl WL, Covacci A (2002): c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motif. *Mol Microbiol*, **43**, 683-686

Stenner-Liewen F, Liewen H, Zapata JM, Pawlowski K, Godzik A, Reed JC (2002): CADD, a *Chlamydia* protein that interacts with death receptors. *J Biol Chem* **277**, 9633–9636.

Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J, Marathe R, Aravind L, Mitchell W, Olinger L, Tatusov RL, Zhao Q, Koonin EV, Davis RW (1998): Genome Sequence of an Intracellular Pathogen of Humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* **282**, 754–759.

Stephens RS, Koshiyama K, Lewis E, Kubo A (2001): Heparin-binding outer membrane protein of Chlamydiae. *Mol Microbiol*. **40**:691-699.

Storz J and Page LA (1971): Taxonomy of the Chlamydiae: Reasons for classifying organism of the genus *Chlamydia*, family Chlamydiaceae in a separate order, Chlamydiales ord, nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*. **21**, 332-334

Su H, Raymond L, Rockey PP, Fischer E, Hackstadt T, Caldwell HD (1996): A recombinant *C. trachomatis* major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptor on epithelial cell. *Proc. Natl. Acad. Sci*, **93**, 11143-11148

Subtil A, Blocker A, Dautry V (2000): Type III secretion system in *Chlamydia* species: identified members and candidates. *Microbes Infect*. **2**, 367-369.

Subtil A, und Dautry-Varsat A (2001): Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery. *Mol. Microbiol*. **39**: 792-800

Subtil A, Delevoye C, Balana ME, Tastevin L, Perrinet S, Dautry-Varsat A (2005): A directed screen for chlamydial proteins secreted by a type III mechanism identifies a translocated protein and numerous other new candidates. *Mol Microbiol*, **56**, 1636–1647

Summersgill JT, Molestina RE, Miller RD, Ramirez JA (2000): Interactions of *Chlamydia pneumoniae* with human endothelial cells. *J Infect Dis* **181** Suppl 3, 479–482.

Sundelof B, Gnarpe H, Gnarpe J (1993): An unusual manifestation of *Chlamydia pneumoniae* infection: meningitis, hepatitis, iritis and atypical erythema nodosum. *Scand J Infect Dis* **25**,259–261.

Surette MG und Stock JB (1996) : Role of alpha-helical coiled-coil interactions in receptor dimerization, signaling, and adaptation during bacterial chemotaxis. *J Biol Chem*, **30**, 17966-17973

Taylor KA, Luther PW, Sonnenberg MS (1999): Expression of the EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* within HeLa cells affects stress fibers and cellular morphology. *Infect Immun*, **1**, 120-125

Wachter C, Müller M, Hofer MJ, Getts DR, Zabaras R, Ousman SS, Terenzi F, Sen GC, King NJ, Campell IL (2007): Coordinated regulation and widespread cellular expression of interferon-stimulated genes (ISG) ISG-49, ISG-54, and ISG-56 in the central nervous system after infection with distinct viruses. *J Virol*, **2**, 860-871

Ward, ME, Murray A (1984): Control mechanisms governing the infectivity of *Chlamydia trachomatis* for HeLa cells: mechanisms of endocytosis. *J Gen Microbiol* **130**, 1765–1780.

Weber K, Pringle JR, Osborn M (1972): Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. *Methods Enzymol*, **26**, 3–27.

Weiss SM, Roblin PM, Gaydos CA, Cummings P, Patton DL, Schulhoff N, Shani J, Frankel R, Penney K, Quinn TC, Hammerschlag MR, Schachter J (1996): Failure to detect *Chlamydia pneumoniae* in coronary atheromas of patients undergoing atherectomy. *J Infect Dis*, **4**, 957-962

Welch MD, Iwamatsu A, Mitchison TJ (1997): Actin polymerisation is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature*, **385**, 265-269

Wood M W, Rosqvist R, Mullan P B, Edwards M H, Galyov E E(1996): SopE, a secreted protein of *Salmonella dublin*, is translocated into the target eukaryotic cell via a sip-dependent mechanism and promotes bacterial entry. *Mol Microbiol*, **22**, 327–338

Van den Pol AN, Robeck MD, Gosh PK, Ozduman K, Bandi P, Whim MD, Wollmann G (2007): Cytomegalovirus induces interferon-stimulated gene expression and is attenuated by interferon in the developing brain. *J Virol*, **1**, 332-348

Van Ooij C, van Ijendoorn S, Nishijima M (1998): Acquisition of host-derived sphingolipids are essential for the intracellular growth of *C. trachomatis*. In: Chlamydial infections. Proceedings of the ninth international symposium on human chlamydial infection. International Chlamydia symposium, *San Francisco, USA*, 91–94.

Viprey V, Del Greco A, Golinowski W, Broughton WJ, Perret X (1998): Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in Rhizobium. *Mol Microbiol*, **6**, 1381-1389

Virok D, Loboda A, Kari L, Nebozhyn M, Chang C, Nichols C, Endresz V, Gonczol E, Berencsi K, Showe MK, Showe LC (2003) : Infection of U937 monocytic cells with *Chlamydia pneumoniae* induces extensive changes in host cell gene expression. *J Infect Dis*, **9**, 1310-1321

Yusta B, Boushey RP, Drucker DL (2000): The glucagon-like peptide-2 receptor mediates direct inhibition of cellular apoptosis via a cAMP-dependent protein kinase-independent pathway. *J Biol Chem*, **45**, 35345-35352

Zhou, D., Mooseker, M.S., and Galan, J.E. (1999) Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science*, **283**, 2092–2095.

Zong G, Fan P, Ji H, Dong F, Huang Y (2001): Identifikation of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factor. *Journal of experimental medicine* **193**, 935-942

7. Anhang

7.1 Tabellarische Übersicht der durch Cpn0712 und *C. pneumoniae* beeinflussten Gene

8) Tabellarische Übersicht der Gene, deren Expression sich durch die Transfektion mit *cpn0712* im Mikroarray um mindestens das Dreifache veränderte. Mit + ist die Verstärkung der Transkription gegenüber der Gene in den Vektor-transzifizierten Zellen gekennzeichnet, mit - ist die Verminderung der Transkription gekennzeichnet.

Vermindert transkribierte Gene	-
PHACTR3	7,9
LOC 139431	6,9
FYB	6,7
PSG9	6,5
PSG3	6,0
PSG1	5,8
WFDC6	5,7
GPR1	5,5
PSG8	5,5
GUCY182	5,4
FLJ32926	5,4
ZFHX1B	5,4
GYPB	5,3
PSG7	5,1
PSG8	5,1
CML2	4,9
PSG6	4,9
PSG5	4,8
NEDD9	4,8
SLC4A8	4,7
ANKRD1	4,7
FGF18	4,7
ROHT2	4,7
TNFAIP3	4,6
CYR61	4,6
GPC3	4,6
ZGPAT	4,6
CDX1	4,6
IAPP	4,6
PEA15	4,5
CD33	4,5
PTPRR	4,5
SPANXD	4,5
ARHGEF15	4,4
TLE4	4,3
CREB5	4,2

Verstärkt transkribierte Gene	+
CA9	5,5
UGT1A3	5,2
ECEL1	4,3
ELTD1	4,1
INHBB	3,9
UBE2L6	3,8
CXCL9	3,6
SERPINB4	3,6
BJ-TSA-9	3,5
CFH	3,5
ASS	3,5
PTGS1	3,5
FLJ22655	3,5
HCLS1	3,5
FLJ40217	3,4
ADRB3	3,4
RASSF4	3,4
ASS	3,4
FOS	3,4
SCD	3,2
VAMP1	3,2
FLJ20920	3,2
FLJ32096	3,1
RNASE4	3,1
ASS	2,1
OR4F4	3,0
KRTAP15-1	3,0
GLCE	3,0
EFNA2	3,0
TM4SF11	3,0

NTN4	4,2
KRT14	4,2
GRIK3	4,2
KLK13	4,2
GPCR5a	4,2
KRT17	4,1
KRT14	4,1
CYR61	4,1
II1RL2	4,0
DUX1	4,0
KRT14	4,0
GGA2	4,0
PPP1R15a	3,9
TCP10	3,9
TAGLN	3,8
SERPINE1	3,8
II18	3,8
KRT14	3,8
SPANXA2	3,8
RBM24	3,8
DKK1	3,7
DDIT3	3,7
SQSTM1	3,7
OPN4	3,7
PRSS16	3,7
MGC87631	3,7
KRT7	3,7
OPN4	3,7
PRSS16	3,7
Mgc87631	3,7
KRT7	3,7
C2orf10	3,6
ZBTB10	3,6
NOVA1	3,6
PFKFB3	3,6
ZD52F10	3,6
ARHGAP8	3,6
CPA4	3,6
LANCL2	3,6
ATP10A	3,6
FIGN	3,5
HIST1H1T	3,4
MITF	3,4
FLJ10287	3,4
TACR1	3,4
DCN	3,4
SPTAN1	3,4
FLJ30473	3,4
SPRY3	3,4
CBLB	3,4
HSF2BP	3,4
LMLN	3,4
CAV2	3,4

C6orf216	3,4
ATF3	3,3
FKBP6	3,3
KRT17	3,3
KCNMB3	3,3
CR2	3,3
GPCR5A	3,3
ATF3	3,3
MID1	3,3
IL24	3,3
NY-REN-7	3,2
SQSTM1	3,2
C10orf39	3,2
PPP4R1L	3,2
Cyr61	3,2
DNAJB6	3,2
LCN7	3,2
MYO9B	3,2
NGFB	3,2
C21orf29	3,2
KIAA1529	3,1
AE2	3,1
FLJ37953	3,1
PTPRB	3,1
H1F0	3,1
CAV1	3,1
ZNF585A	3,1
BNC2	3,1
FBXW10	3,1
DDIT3	3,1
PDE2A	3,1
PSG4	3,1
CAV1	3,1
JARID1B	3,1
KIAA1196	3,1
CRA	3,1
GADD45A	3,0
ZRF	3,0

9) **Tabellarische Übersicht der Gene, deren Expression sich durch die Infektion mit *C. pneumoniae* im Mikroarray um mindestens das 2,3 fache veränderte.** Gene, die durch Cpn0712 und *C. pneumoniae* in gleicher Weise in ihrer Transkription moduliert wurden, sind rot gekennzeichnet. Mit + ist die Verstärkung der Transkription gegenüber der Gene in den nicht-infizierten Zellen gekennzeichnet, mit - ist die Verminderung der Transkription gekennzeichnet.

Vermindert transkribierte Gene	-
IGFBP3	5,8
ALDH3A1	4,8
IGFBP3	4,4
GREM2	4,3
LXN	4,3
FAM83A	4,2
PTGS1	3,9
PDK4	3,7
ECEL1	3,5
RNF24	3,4
CFH	3,4
NDRG2	3,3
SERPINB4	3,3
IDH2	3,3
RORC	3,3
TUB	3,2
CFHR3	3,1
EEF2K	3,1
FGG	3,1
CREG1	3,1
ELTD1	3,1
IMPA2	3,1
TUB	3,1
RGC32	3,0
FCGR2A	3,0
IMPA2	3,0
ASS1	3,0
PCOLCE	3,0
CD79A	3,0
CD59	2,9
PITX1	2,9
CLU	2,9
GMDS	2,9
CD59	2,9
RNASE4	2,9
DPYSL2	2,9
ISYNA1	2,8
TCEA3	2,8
PBXIP1	2,7
COL15A1	2,7
GLCE	2,7
MOSPD3	2,7
PLLP	2,7

Verstärkt transkribierte Gene	+
CYR	5,1
IL24	4,9
IL24	4,8
IL7R	4,5
CYR	4,4
CYR	4,3
CCND1	4,1
STC2	4,0
STC2	3,9
ANXA2	3,9
STC2	3,9
CCND1	3,9
DKK1	3,8
IFIT2	3,8
ANXA2	3,8
CYR	3,8
FYB	3,6
FYB	3,6
FOSL1	3,6
PDE2A	3,6
ANXA2PA	3,5
TAGLN	3,5
ANXA3	3,5
FOSL1	3,5
CCDC114	3,4
KRT17	3,4
PDE2A	3,4
SLC3A2	3,3
TNFAIP3	3,3
KRT14	3,3
KRT14	3,3
PEA15	3,2
PTPRR	3,1
ITFG2	3,0
KRT14	3,0
RHOT2	3,0
KRR1	3,0
IL7R	3,0
GPRC5A	2,9
GPATC4	2,9
GLIPR1	2,9
GUCY1B2	2,9
STAC	2,9

MPP1	2,7
DBNDD1	2,7
OCEL1	2,7
RAB31	2,6
TH	2,6
DPYSL2	2,6
RAB40C	2,6
MFAP2	2,6
SNCG	2,6
CLU	2,6
OPN3	2,6
Septine5	2,6
PBXIP1	2,6
SELENBP1	2,5
CYBA	2,5
STEAP4	2,5
ASF1B	2,5
INSIG1	2,5
COCH	2,5
VIPR2	2,5
FGG	2,5
INSIG1	2,5
SERPINB3	2,5
ANXA11	2,5
RARRES1	2,5
MB	2,5
EIF5	2,5
RGC32	2,5
ALDH2	2,5
FGG	2,5
KIAA0101	2,4
MOSC1	2,4
SCGB1A1	2,4
DPT	2,4
PDK4	2,4
ANKRD38	2,4
SMOC1	2,4
GLP2-R	2,4
PH-4	2,4
TTLL1	2,4
KLRC3	2,4
GAS6	2,4
NIPSNAP1	2,4
PLD1	2,4
PLD1	2,4
TCEA2	2,4
NT5C3L	2,4
SH3KBP1	2,4
PGD	2,4
GREM2	2,3
ULK1	2,3
SNAP25	2,3
UGT1A3	2,3

PFKFB3	2,9
PSG3	2,9
IFIT3	2,9
RHOT2	2,8
AFT3	2,8
DDIT3	2,8
CSF2RA	2,8
GADD45A	2,8
AMMECR1	2,7
TNFAIP3	2,7
PSG9	2,7
GPRC5A	2,7
SPRY3	2,7
SPRY3	2,6
YWHAZ	2,6
ATF3	2,6
KRT80	2,6
ACTB	2,6
RND2	2,6
RND2	2,6
WDR73	2,5
NT5E	2,5
DLL4	2,5
ID3	2,5
NEXN	2,5
KRT80	2,5
ACTB	2,5
ATAD1	2,5
PSAT1	2,5
SERPINE1	2,4
RBMS1	2,4
ACTB	2,4
CXCL10	2,4
KIAA1529	2,4
GBP1	2,4
CXCL10	2,4
CORO1C	2,4
KIAA1751	2,4
PPP1R1A	2,4
ID3	2,4
PLAUR	2,4
CORO1C	2,3
MKI67IP	2,3
YWHAZ	2,3
RAB27B	2,3
CPA4	2,3

10) Tabellarische Übersicht von Genfamilien, bei denen mehrere Mitglieder durch Cpn0712 in ihrer Transkription moduliert wurden. Angegeben sind die Familie, die regulierten Mitglieder sowie die biologischen Prozesse an den sie beteiligt sind. Wurden die Gene durch mehr als ein Oligonukleotid auf den Chip repräsentiert, so wurde auch die Spezifität dieses Gens angegeben.

Familie	Gen	Spezifität	Funktion
Pregnancy specific β Glycoprotein	PSG1	2 von 2	Maternale Immun-Antwort
	PSG3		
	PSG4		
	PSG5		
	PSG6		
	PSG7		
	PSG8		
	PSG9		
	Cytokeratine		
KRT7			
KRT14			
KRT17			
Caveolin 3 Mitglieder	CAV1	3 von 3	Signal-Transduktion
	CAV2		
	CAV3		
RAS Onkogen Familie	RAB20		Signal-Transduktion
	RAB26		
	RAB32		
	RAB38		
dual spez Phosphatase	DUSP10	2 von 2	Signal-Transduktion
	DUSP16		
	DUSP3		
growth arrest and damage	GADD45	2 von 2	Signal-Transduktion
	DDIT3		
G Protein-gekoppelte Rezeptor-Aktivität	1		Receptor Aktivität Signal-Transduktion
	52		
	141		
	135		
Interferon Induzierte Proteine	IFI44		Immun-Antwort
	IFI1		
	IFI3		
Serin-Proteinase Inhibitor	SerpinB3		Immun-Antwort
	SerpinB4		
	SerpinI1		
	SerpinE1		
Septin	Septin3		Immun-Antwort
	Septin4		
	Septin5		
	Septin6		
TNFassociated Protein TNFRSF	3	2 von 2	Apoptose
	9		
	10D		
	21		
	11B		

Tripartite motif containing Protein	TRIM6 TRIM9 TRIM29 TRIM36 TRIM42	2 von 2	Bindung
ATP-Bindungs-Kassette	ABCA10 ABCB10 ABCF2		Transport

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Neue Taxonomie der <i>Chlamydiales</i> nach der neuen Klassifizierung von 1999	2
Abb. 2: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von <i>Chlamydia spp.</i>	7
Abb. 3: Typ III Sekretionssystem von Gram-negativen Pathogenen.	10
Abb. 4: Subcluster im <i>C. pneumoniae AR39</i> Genom.	52
Abb. 5: Hydrophobizitäts-Plot für Cpn0708 und Cpn0712 nach Kyte und Doolittle.	54
Abb. 6: Vergleich der konservierten „extended DXD motif“ von Cpn0712 mit Cytotoxin- ähnlichen Genen von <i>C. difficile</i> und <i>C. trachomatis</i> Serovar <i>MoPn</i> und <i>D.</i>	55
Abb. 7: Analyse der Transkription von <i>cpn0708</i> und <i>cpn0712</i> in <i>C. pneumoniae</i> –infizierten HEp2-Zellen während des Infektionszyklus.	59
Abb. 8: Gelelektrophoretische Auftrennung der präparierten und restringierten Plasmide	60
Abb. 9: Enzymatische Lyse der <i>E. coli</i> -Zellen und Vergleich der löslichen (Ü) und unlöslichen (P) Fraktion	61
Abb. 10: Aufreinigung des rekombinanten Cpn0708.	62
Abb. 11: Immunoblot zur Detektion von Cpn0708 während des chlamydialen Infektionszyklus	65
Abb. 12: Immunfluoreszenzbilder von <i>C. pneumoniae</i> -infizierten Hep-2 Zellen 60 h pi.	66
Abb.13: Immunoblot zur Detektion von Cpn0712 während des Infektionszyklus	68
Abb. 14: Immunfluoreszenzbilder von <i>C. pneumoniae</i> -infizierten HEp-2 Zellen 60 Std pi.	70
Abb. 15: Schematische Darstellung der Fusionskonstrukte.	72
Abb. 16: schematische Darstellung der Herstellung des <i>cpn0712</i> -His-Konstruktes.	75
Abb. 17: Bestimmung der Transfektionseffizienz.	76
Abb. 18: Überprüfung der Integration des Konstrukts pcDNA3.1/V5 His- <i>cpn0712</i> mittels PCR.	78

Abb. 19: FACS-Analyse der transfizierten HeLa-Zellen nach der ersten und zweiten Vereinzelung.	80
Abb. 20: Nachweis der Expression von Cpn0712 und Cpn0809 in transfizierte HeLa-Zellen.	81
Abb. 21: Linearisierung präperierter Plasmide mit HindIII.	82
Abb.22: Transkription von <i>cpn0712</i> und <i>cpn0809</i> in HeLa-Zellen.	83
Abb.23: Expression von Cpn0712 in transfizierte HeLa-Zellen.	82
Abb. 24: Intrazelluläre Lokalisation von Cpn0712.	84
Abb. 25: Nachweis von Cpn0712 vor (A) und nach (B) Colchicin-Behandlung.	88
Abb. 26: Intrazelluläre Lokalisation von Cpn0809.	89
Abb. 26: Effekt von Cpn0712 und Cpn0809 auf die Caspase3-Aktivität	91
Abb. 27: Cpn0712 und Cpn0809 haben keinen Einfluss auf die Apoptose	93
Abb. 28: Quantitative Analyse der Transfektions/Infektionsexperimente.	95
Abb. 29: Effekt der cytosolischen Expression von Cpn0712 und Cpn0809.	94
Abb. 30: Kontrolle der <i>cpn0712</i> - und Vektor-transfizierten HeLa-Zellen.	95
Abb. 31: Klassifizierung der Mikroarray Daten nach den GeneOntology Kriterien.	102
Abb. 32: Elektropherogramm der RNS der infizierten und nicht infizierten HeLa-Zellen.	103

7.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Die zu untersuchenden putativen Effektorproteine mit ihrer möglichen Homologie zu bekannten TTS Proteine und ihre durch bioinformatische Analyse identifizierten Domänen.	53
Tab. 2: Vergleich der N-terminalen Region der putativen Effektorproteine.	57
Tab. 3: Expression und Sekretion der Fusionskonstrukte in <i>Salmonella</i> .	73
Tab. 4: Transfektionsraten (%) mit verschiedenen Plasmiden in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl.	77
Tab. 5: <i>C. pneumoniae</i> und Cpn0712-induzierte Veränderung der Genexpression ermittelt durch Mikroarray und Real Time RT-PCR.	104

Tab. 6: Gene, die durch Cpn0712 und <i>C. pneumoniae</i> in gleicher Weise in ihrer Transkription moduliert wurden.	107
Tab.7: <i>C. pneumoniae</i> - und Cpn0712-induzierte Veränderung der Genexpression ermittelt durch Mikroarray and Real Time RT-PCR.	108

Publikationen, die aus dieser Arbeit hervorgingen:

Characterization and intracellular localization of putative *Chlamydia pneumoniae* effector proteins. Müller N., Sattelmacher F., Lugert R., Groß U. *Med. Microbiol. Immunol.* 2007

Kongressbeiträge, die aus dieser Arbeit hervorgingen:

Characterization of effector proteins of *Chlamydia pneumoniae*. Müller N., Lugert R., Groß U., *Vortrag Symposium*, Marburg, 2005

Expression and localization of bacterial effector proteins of *C. pneumoniae*. Müller N., Lugert R., Gross U., *Poster DGHM*, 2005

Expression and localization of type III-secreted proteins of *Chlamydia pneumoniae*. Müller N., Lugert R., Kuhns M, Polch T., Groß U., *Vortrag DGHM*, 2004

.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. Uwe Gross möchte ich mich herzlichst bedanken für die Überlassung des interessanten Themas sowie für seine hervorragende Betreuung und die konstruktive Korrektur des Manuskriptes.

Ferner danke ich Prof. Dr. Hans Joachim Fritz für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Meinen Laborleiter Dr. Raimond Lugert danke ich für die geduldige und unkomplizierte Betreuung, seine stetige Ansprechbarkeit und schnelle Durchsicht des Manuskriptes.

Herrn Prof. Dr. Michael Hensel danke ich für die Bereitstellung der Plasmide für die Salmonellenkonstrukte und für die Durchführung der Sekretionsexperimente.

Ein herzliches Dankeschön geht an Valeska, Diana, Andrea, Nicole, Marcel und Florian, sowie den weiteren Mitarbeiter des Instituts für die gute Zusammenarbeit und die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre.

Bei Sandra möchte ich mich für ihre Hilfe bei Computerproblemen bedanken.

Meine Eltern möchte ich für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen in mich bedanken. Außerdem danke ich ihnen für ihr großes Interesse an dieser Arbeit und ihre aufbauenden Worte.

Lebenslauf

Nicole Müller

- Geburtsdatum:** 10.12.1976
- Geburtsort:** Northeim
- Familienstand:** ledig
- Nationalität:** deutsch
- Schule:** 1983 – 1987 Grundschule Sebexen
1987 – 1989 Orientierungsstufe Kalefeld
1989 – 1993 Realschule Kalefeld
1993 – 1996 Wirtschaftsgymnasium Northeim
- Studium:** 1996 – 2002 Studium Biologie (Diplom), Georg August-Universität Göttingen
Februar 1999 Diplomvorprüfungen in den Fächern Mikrobiologie, Botanik, Chemie und physikalische Chemie
Mai 2001 Diplomprüfung in den Fächern Entwicklungsbiologie, Mikrobiologie und Humangenetik
Juni 2001 – April 2002 Diplomarbeit in der Abteilung Humangenetik an der Georg August Universität Göttingen unter Anleitung von Prof. Wolfgang Engel mit dem Thema: „Zur Funktion und Regulation des *Atf7-Gens*“
Juni 2002 Abschluss des Studiums der Biologie mit dem Diplom
- Promotion:** September 2002- März 2007 experimentelle Arbeiten zur Dissertation am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Georg-August-Universität Göttingen bei Prof. Dr. U. Gross über das Thema: „Identifikation und Charakterisierung von Effektorproteinen des Typ III Sekretionssystems von *Chlamydophila pneumoniae*“

Sebexen, den 16.09.08