

Aus der Abteilung Medizinische Mikrobiologie  
(Prof. Dr. med. U. Groß)  
im Zentrum Hygiene und Humangenetik  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Untersuchungen zum putativen Effektorprotein  
CPn0809 des Typ-III-Sekretionssystems von  
*Chlamydophila pneumoniae***

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
MARTIN KUHNS  
aus  
OSTERODE AM HARZ

Göttingen 2006

**Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel**

**1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Groß**

**2. Berichterstatter/-in: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. L. Walter**

**3. Berichterstatter/-in:**

**Tag der mündlichen Prüfung: 27. April 2006**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

**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.

### **Tagungsbeiträge**

**Kuhns M:** Untersuchungen zum Typ III-Sekretionssystem von *Chlamydia pneumoniae*. 1. Deutscher Chlamydienworkshop, Berlin, 27.02. bis 01.03.2003.

**Kuhns M, Müller N, Polch T, Lugert R, Groß U:** Typ-III Sekretion in *Chlamydia pneumoniae*. 3. Deutscher Chlamydienworkshop, Jena, 09.03. bis 11.03.2005.

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Entdeckung der Chlamydien	1
1.2	Systematik der Chlamydien	2
1.3	Eigenschaften und Entwicklungszyklus der Chlamydien	3
1.4	Entdeckung und medizinische Bedeutung von <i>Chlamydomytila pneumoniae</i>	6
1.4.1	Akute Infektion des Respirationstraktes	7
1.4.2	Mit <i>Chlamydomytila pneumoniae</i> assoziierte chronische Erkrankungen	8
1.4.3	Diagnostik	10
1.5	Interaktion von <i>Chlamydomytila pneumoniae</i> mit der Wirtszelle	11
1.6	Das Typ-III-Sekretionssystem der Chlamydien	12
1.7	Ziele der Arbeit	15
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>16</b>
2.1	Organismen / Zelllinien	16
2.2	Nukleinsäuren	16
2.2.1	Plasmide	16
2.2.2	Oligonukleotide	17
2.2.3	DNA-Längenstandard	17
2.3	Proteine	17
2.3.1	Molekulargewichtsmarker	17
2.3.2	Antikörper	17
2.4	Nährmedien und Zusätze	18
2.4.1	Nährmedien für die Zellkultur	18
2.4.2	Nährmedien für Bakterien	19
2.4.3	Nährmedien für Hefen	19
2.4.4	Zusätze	19
2.5	Standardlösungen und Puffer	20
2.6	Reaktionssets (Kits) und Enzyme	20

2.6.1	Kits	20
2.6.2	Enzyme	21
<b>2.7</b>	<b>Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte</b>	<b>21</b>
2.7.1	Chemikalien	21
2.7.2	Verbrauchsmaterialien	22
2.7.3	Geräte	22
<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>23</b>
3.1.1	Kultivierung von HEp-2-Zellen und <i>Chlamydomophila pneumoniae</i>	23
3.1.1.1	Kultivierung von HEp-2-Zellen	23
3.1.1.2	Kultivierung von <i>Chlamydomophila pneumoniae</i> AR39	23
3.1.1.3	Langzeitlagerung von <i>Chlamydomophila pneumoniae</i>	24
3.1.1.4	Konzentrationsbestimmung von <i>Chlamydomophila pneumoniae</i>	24
3.1.2	Anzucht und Manipulation von Bakterien und Hefen	24
3.1.2.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	24
3.1.2.2	Herstellung von chemisch kompetenten <i>Escherichia-coli</i> -Zellen	25
3.1.2.3	Transformation chemisch kompetenter <i>Escherichia-coli</i> -Zellen	25
3.1.2.4	Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
3.1.2.5	Herstellung kompetenter <i>Saccharomyces-cerevisiae</i> -Zellen	26
3.1.2.6	Transformation kompetenter <i>Saccharomyces-cerevisiae</i> -Zellen	27
3.1.2.7	Yeast Mating	27
<b>3.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>28</b>
3.2.1	Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren	28
3.2.1.1	Isolierung von genomischer DNA aus <i>Chlamydomophila pneumoniae</i>	28
3.2.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	28
3.2.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
3.2.1.4	Gewinnung von Gesamt-RNA aus <i>Chlamydomophila-pneumoniae</i> -infizierten HEp-2-Zellen	29
3.2.1.5	Aufreinigung und Umpufferung von PCR-Produkten	29

3.2.2	Analyse von Nukleinsäuren	30
3.2.2.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung	30
3.2.2.2	Agarosegelelektrophorese	30
3.2.2.3	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	31
3.2.2.4	Sequenzierung von DNA	31
3.2.3	Amplifikation von Nukleinsäuren	32
3.2.3.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	32
3.2.3.2	Semiquantitative RT-PCR	33
3.2.4	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	35
3.2.4.1	Restriktionsendonukleaseverdau von DNA	35
3.2.4.2	Dephosphorylierung von DNA	35
3.2.4.3	Ligation von DNA mittels Quick T4 DNA Ligase	35
3.2.4.4	Ligation von PCR-Fragmenten in TOPO-TA-Vektoren	35
<b>3.3</b>	<b>Proteinchemische Methoden</b>	<b>37</b>
3.3.1	Expression und Reinigung eines rekombinanten His <sub>6</sub> -Tag-Fusionsproteins	37
3.3.1.1	Prinzip des pBAD-TOPO-Expressionssystems	37
3.3.1.2	Expression des rekombinanten Proteins in <i>Escherichia coli</i>	38
3.3.1.3	Enzymatische Lyse von <i>Escherichia coli</i>	38
3.3.1.4	Prinzip der Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose	39
3.3.1.5	Aufreinigung des rekombinanten His-Tag-Fusionsproteins mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose	39
3.3.2	Analyse von Proteinen	40
3.3.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
3.3.2.2	Coomassie-Färbung	41
3.3.2.3	Western Blot	42
3.3.2.3.1	Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran	42
3.3.2.3.2	Immundetektion	43
3.3.2.4	Quantitative Proteinbestimmung	44
3.3.2.5	Immunfluoreszenztest	44

3.3.2.6	Proteinextraktion aus <i>Chlamydomophila-pneumoniae</i> -infizierten HEP-2-Zellen	45
3.3.2.7	Proteinextraktion aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
<b>3.4</b>	<b>Generierung eines polyklonalen Antiserums</b>	<b>46</b>
3.4.1	Immunisierung eines Kaninchens zur Gewinnung eines polyklonalen Antiserums	46
3.4.2	Affinitätsreinigung eines polyklonalen Antiserums	47
<b>3.5</b>	<b>Das Yeast-Two-Hybrid-System</b>	<b>47</b>
3.5.1	Prinzip des Yeast-Two-Hybrid-Systems	48
3.5.2	Test auf Autoaktivierung der Reportergene durch DNA-BD-Konstrukte	50
3.5.3	Amplifikation einer cDNA-Genbank in <i>Escherichia coli</i>	51
3.5.4	Yeast-Two-Hybrid-Screen einer HeLa-cDNA-Genbank	51
3.5.5	Ausschluss unspezifischer Aktivierung der Reporter	52
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>54</b>
<b>4.1</b>	<b>Eigenschaften von CPn0809</b>	<b>54</b>
<b>4.2</b>	<b>Transkription von <i>cpn0809</i> in <i>Chlamydomophila pneumoniae</i> AR39</b>	<b>55</b>
<b>4.3</b>	<b>Expression von CPn0809</b>	<b>57</b>
4.3.1	Klonierung eines rekombinanten <i>cpn0809</i> -Fragmentes in <i>Escherichia coli</i>	57
4.3.2	Optimierung der Expression des rekombinanten CPn0809-Fragmentes in <i>Escherichia coli</i>	58
4.3.3	Expression und Aufreinigung des rekombinanten CPn0809-Fragmentes in <i>Escherichia coli</i>	59
4.3.4	Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen rCPn0809	60
4.3.5	Präabsorption des polyklonalen Kaninchenserums	61
4.3.6	Expression von CPn0809 in <i>Chlamydomophila pneumoniae</i> AR39	61
4.3.7	Lokalisation von CPn0809 in <i>Chlamydomophila-pneumoniae</i> -infizierten HEP-2-Zellen	62

<b>4.4</b>	<b>Immunogenität von CPn0809</b>	<b>65</b>
<b>4.5</b>	<b>Yeast-Two-Hybrid-Screening-Versuch</b>	<b>66</b>
4.5.1	Vorbereitung der Yeast-Two-Hybrid-Screening-Untersuchung	67
4.5.1.1	Klonierung von <i>cpn0809</i> in das Yeast-Two-Hybrid-Köderplasmid	67
4.5.1.2	Nachweis der Expression von DNA-BD-CPn0809 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67
4.5.1.3	Ausschluss der Autoaktivierung von Reportern durch das CPn0809-Köderkonstrukt	68
4.5.1.4	Amplifikation einer HeLa-cDNA-Genbank in <i>Escherichia coli</i>	69
4.5.2	Yeast-Two-Hybrid-Screening-Untersuchung	69
4.5.3	Identifizierung falsch-positiver Interaktionskandidaten	73
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY</b>	<b>88</b>
6.1	Deutsch	88
6.2	English	89
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>90</b>
7.1	Verzeichnis der Abbildungen	90
7.2	Verzeichnis der Tabellen	91
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>92</b>



**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AD	(Transkriptions-) Aktivierende Domäne
<i>ADE2</i>	Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase-Gen aus <i>S. cerevisiae</i>
amp <sup>r</sup>	Ampicillin-Resistenz
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4Chloro-3-Indolylphosphat
BD	(DNA-) Bindende Domäne
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
cfu	colony forming units (koloniebildende Einheiten)
COPD	Chronisch obstruktive Lungenkrankheit
<i>C. pneumoniae</i>	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>
<i>C. psittaci</i>	<i>Chlamydophila psittaci</i>
CTCL	Kutanes T-Zell-Lymphom
C-Terminus	Carboxy-Terminus
<i>C. trachomatis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
Cy2	Carbocyanin
Cy3	Indocarbocyanin

---

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTAF	Diaminotriazinylaminofluorescein
DTT	Dithiothreitol
E	Einheiten
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Elementarkörper
et al.	et alii (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
etc.	et cetera
FCS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (9,80665 m/s <sup>2</sup> )
<i>GAL4</i>	Gen des Transkriptionsfaktors Gal4 aus <i>S. cerevisiae</i>
H <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
<i>HIS3</i>	Imidazolglycerolphosphat-Dehydratase-Gen aus <i>S. cerevisiae</i>
Ig	Immunglobulin
kan <sup>r</sup>	Kanamycin-Resistenz
kbp	kilo-Basenpaare
kDa	kilo-Dalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
LB	Luria Bertani
<i>LEU2</i>	β-Isopropyl-Dehydrogenase-Gen aus <i>S. cerevisiae</i>

---

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

<i>MEL1</i>	$\alpha$ -Galaktosidase-Gen aus <i>S. cerevisiae</i>
mRNA	messenger RNA
MS	Multiple Sklerose
NaAc	Natriumacetat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
o. g.	oben genannte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
rCPn0809	rekombinant hergestelltes CPn0809
RK	Retikularkörper
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	sodium dodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
spp.	Spezies
ssDNA	einzelsträngige DNA
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA (-Puffer)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

---

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

TNF $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$ (Tumornekrosefaktor $\alpha$ )
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<i>TRP1</i>	N-(5'-phospho-ribosyl)-anthranilat-Isomerase-Gen aus <i>S. cerevisiae</i>
TTSS	Typ-III-Sekretionssystem
U	definierte Einheit der Enzymaktivität (unit)
u. a.	unter anderem
UTP	Uraciltriphosphat
UV	ultraviolett
Vol	Volumen
w/v	weight (Gewicht) pro Volumen
X- $\alpha$ -Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl $\alpha$ -D-galactopyranoside
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
$\emptyset$	Durchmesser

**Nukleoside**

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymidin

**Aminosäuren**

A	Ala	Alanin	I	Ile	Isoleucin
C	Cys	Cystein	K	Lys	Lysin
D	Asp	Asparaginsäure	L	Leu	Leucin
E	Glu	Glutaminsäure	M	Met	Methionin
F	Phe	Phenylalanin	N	Asn	Asparagin
G	Gly	Glycin	P	Pro	Prolin
H	His	Histidin	Q	Gln	Glutamin

---

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

R Arg Arginin

V Val Valin

S Ser Serin

W Trp Tryptophan

T Thr Threonin

Y Tyr Tyrosin

**Dekadische Vorsilben**

$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-6}$	$10^{-9}$	$10^{-12}$
dezi (d)	centi (c)	milli (m)	mikro ( $\mu$ )	nano (n)	piko (p)

**Einheiten**

$^{\circ}\text{C}$  Grad Celsius

g Gramm

l Liter

m Meter

min Minute

s Sekunde

h Stunde

d Tag

mol Mol

M molar

V Volt

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Entdeckung der Chlamydien

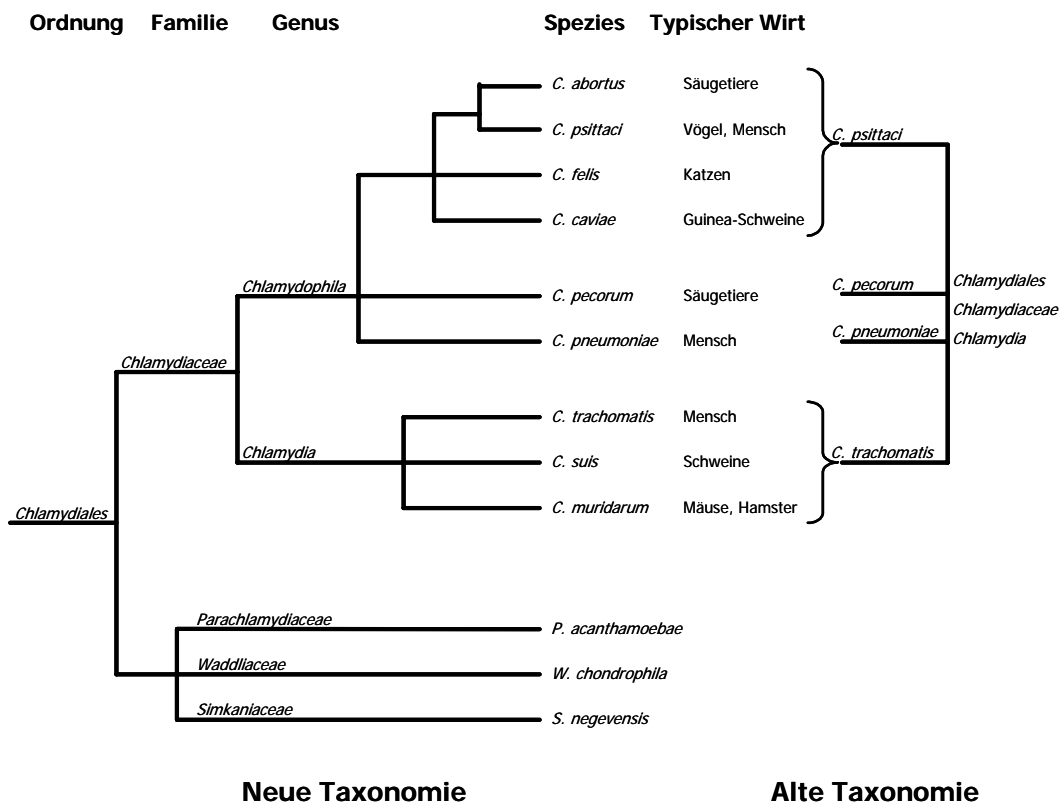
Erstmals beschrieben wurden Chlamydien Anfang des 20. Jahrhunderts. Die Bezeichnung „*Chlamydia*“ geht auf Ludwig Halberstaedter und Stanislaus Prowazek zurück. Ihnen gelang 1907 die erfolgreiche Übertragung eines Trachoms mittels eines Abstriches von einem erkrankten menschlichen Auge auf Orang-Utan-Augen [HALBERSTAEDTER & PROWAZEK, 1907]. Durch Giemsa-Färbung konjunktivaler Epithelzellen konnten sie Partikel unterschiedlicher Größe in intrazytoplasmatischen Vakuolen erkennen. Diese Partikel hielten sie für das auslösende Agens des Trachoms. Abgeleitet vom griechischen Wort *Chlamys* für Mantel benannten sie den neu entdeckten Erreger des Trachoms wegen der sichtbaren Umhüllung der Partikel *Chlamydozoa*. Ähnliche Einschlüsse wurden im Laufe der Zeit in Konjunktivalzellen von Neugeborenen mit Nicht-Gonokokken-Einschlusskonjunktivitis sowie in Gebärmutterhälsen von deren Müttern und bei männlichen Patienten mit Nicht-Gonokokken-Urethritis entdeckt. Eine Kultivierung der Chlamydien schien nicht möglich zu sein. Des Weiteren überwandten Chlamydien Filter, die unpassierbar für alle bis dahin bekannten Bakterien waren. Aus diesen Gründen wurden die Chlamydien zunächst als Viren betrachtet.

1929–1930 kam es zum Ausbruch einer bis dahin unbekannteren atypischen und oftmals schwer verlaufenden Pneumonie. Als Überträger stellten sich Psittaciden (Papageien und Sittiche) heraus. Sehr kleinen, in der Giemsa-Färbungen basophilen Partikeln konnte eine ätiologische Beziehung zu dieser nach dem Übertragungsweg Psittakose genannten Erkrankung nachgewiesen werden [BEDSON & BLAND, 1932]. Darüber hinaus beschrieb Samuel Bedson 1932 erstmals den charakteristischen Entwicklungszyklus der Chlamydien und schrieb ihnen bakterielle Eigenschaften zu [BEDSON & BLAND, 1932]. Die Einordnung von Chlamydien als Prokaryonten erfolgte jedoch erst 1965, nachdem neue Zellkulturtechniken und die Elektronenmikroskopie ermöglichten, auf das Vorhandensein von Ribosomen und die genauere Struktur der Zellwand zu schließen.

## 1.2 Systematik der Chlamydien

Lange Zeit wurden Chlamydien aufgrund ihres obligat intrazellulären Lebensstiles, der zunächst unmöglichen Kultivierung und ihrer geringen Größe als Viren betrachtet. Nach Einordnung der Chlamydien als Prokaryonten 1965 wurden sie zunächst mit den ebenfalls obligat intrazellulär lebenden Rickettsien gruppiert. 1966 wurde die Gruppe *Chlamydia* eingeführt und über lange Jahre war *Chlamydiales* die einzige Ordnung, die mit den *Chlamydiaceae* nur eine Familie und mit *Chlamydia* nur eine Gattung beinhaltete.

Mittels neuer molekularbiologischer Methoden wie u. a. DNA-DNA-Reassoziaton und DNA-Sequenzanalysen wurden Ende der 80er Jahre neue Arten entdeckt, hierunter auch *Chlamydophila pneumoniae* [GRAYSTON et al., 1989]. Die ursprüngliche Differenzierung der verschiedenen Arten erfolgte aufgrund morphologischer Kriterien: des Glykogengehalts der Einschlusskörper, der Antigenstruktur der Zellwand und des Wirtsspektrums [MOULDER, 1988]. Inzwischen werden Sequenzunterschiede bestimmter Gene, v. a. der *16S*- und *23S*-Sequenz, zur taxonomischen Einordnung herangezogen [EVERETT et al., 1999; BUSH & EVERETT, 2001]. Diese Taxonomie berücksichtigt auch evolutionsbezogene Erkenntnisse und teilt die Familie *Chlamydiaceae* in die zwei Gattungen *Chlamydia* und *Chlamydophila*. *Chlamydia* beinhaltet drei Arten, darunter *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila* umfasst neben *Chlamydophila pneumoniae* noch fünf weitere Arten. Darüber hinaus wurde die Ordnung *Chlamydiales* um die Gattungen *Parachlamydiaceae*, *Waddliaceae* und *Simkaniaceae* erweitert (*Abb. 1*).



**Abb. 1:** Links: Neue Taxonomie der *Chlamydiales* nach der Reklassifikation unter Berücksichtigung evolutionsbezogener Erkenntnisse von 1999. Rechts: Alte Taxonomie. [Schaubild modifiziert nach EVERETT et al., 1999; BUSH & EVERETT, 2001]. Die Länge der Linien ist nicht proportional zu den tatsächlichen phylogenetischen Distanzen.

### 1.3 Eigenschaften und Entwicklungszyklus der Chlamydien

Chlamydien sind obligat intrazelluläre, unbewegliche Bakterien. Der Zellwandaufbau entspricht mit einer inneren und äußeren Membran im Wesentlichen dem gramnegativer Bakterien, einschließlich eines familienspezifischen Lipopolysaccharid- (LPS-)Antigens. Jedoch konnte Peptidoglycan in Chlamydien nicht oder nur in geringen Mengen nachgewiesen werden [SU et al., 1985; FOX et al., 1990], obwohl Chlamydien alle für die Synthese von Peptidoglycan benötigten Gene besitzen und sensibel für Penicillin sind [MOULDER, 1993; STEPHENS et al., 1998]. Ob Chlamydien z. B. lediglich geringe Mengen Peptidoglycan produzieren oder ein atypisches, von dem anderer gramnegativer Bakterien verschiedenes Peptidoglycan bilden, bleibt unklar. Die



Stabilität der Membranstruktur wird u. a. durch Disulfidbrücken zwischen cysteinreichen Proteinen der äußeren Zellwandmembran gewährleistet [EVERETT & HATCH, 1995].

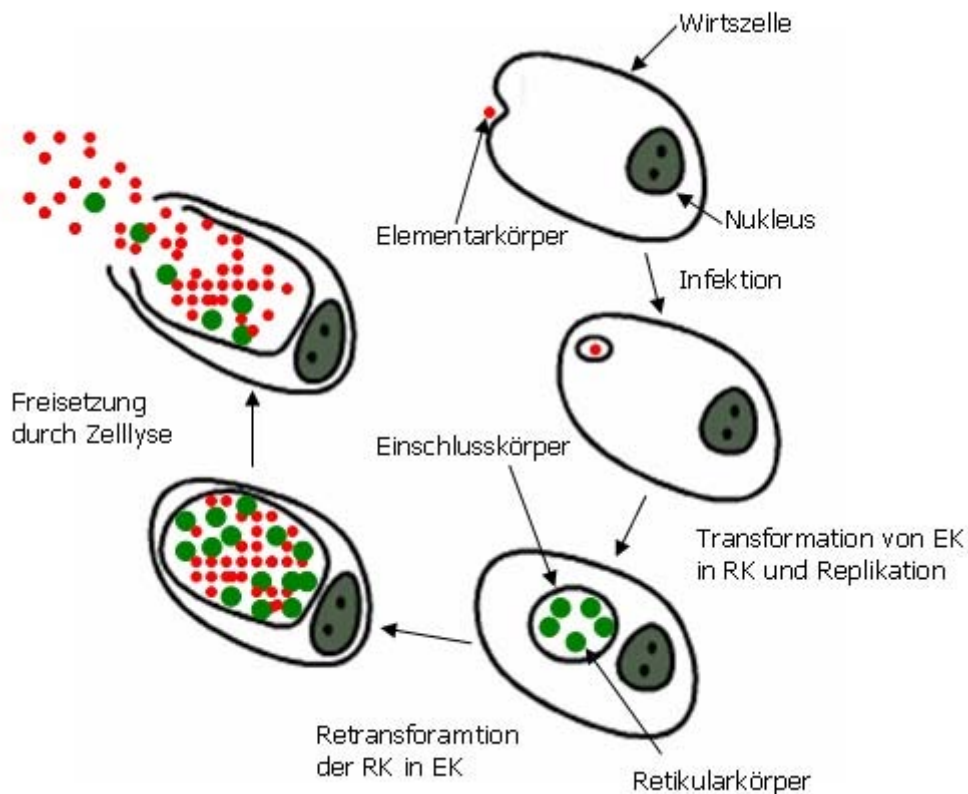
Schon lange ist bekannt, dass Chlamydien über viele Stoffwechselwege der Prokaryonten wie z. B. Synthese von Proteinen, DNA, RNA und Phospholipiden verfügen. Entgegen früheren Annahmen scheinen Chlamydien keine obligaten Energieparasiten zu sein. Die Analyse des Genoms hat gezeigt, dass Chlamydien wahrscheinlich Glutamat, unter Umständen auch Glucose und 2-Oxoglutarat, als Carbonquelle nutzen und ATP generieren können. Darüber hinaus besitzen sie für ADP/ATP-Translokasen kodierende Gene, so dass sie wahrscheinlich einen Teil ihres Energiebedarfes über den Metabolismus der Wirtszelle decken können [STEPHENS et al., 1998; KALMAN et al., 1999].

Chlamydien verfügen über ein relativ kleines Genom. Das Genom von *Chlamydia trachomatis* umfasst etwa 1 Mbp, das von *Chlamydophila pneumoniae* ist mit 1,2 Mbp, etwas größer [STEPHENS et al. 1998; KALMAN et al., 1999]. Die chlamydialen Genome sind damit nur wenig größer als die der Mycoplasmen, den Bakterien mit den bislang kleinsten bekannten Genomen (0,6–0,8 Mbp). Das Genom von *E. coli* ist mit 4,6 Mbp etwa viermal größer. Unter den 1073 mutmaßlich für Proteine kodierenden Sequenzen von *C. pneumoniae* konnten für 214 keine homologen Sequenzen im Genom von *C. trachomatis* identifiziert werden. *Vice versa* besitzt *C. trachomatis* wahrscheinlich 70 Proteine, die in *C. pneumoniae* nicht vorkommen. Diese speziesspezifischen Proteine könnten Unterschiede zwischen den Arten bezüglich Biologie, Wirtszelltropismus und Pathogenese bestimmen. Im Vergleich zu *C. trachomatis* verfügt *C. pneumoniae* über eine höhere Invasivität und kann in einem breiteren Spektrum an Wirtszellen überleben. Dieses könnte sich im größeren Genom widerspiegeln [KALMAN et al., 1999]. Neben genetischen Unterschieden gibt es innerhalb der *Chlamydiaceae* auch Unterschiede bezüglich des Metabolismus. So produzieren *Chlamydophila* spp. im Gegensatz zu *Chlamydia* spp. kein nachweisbares Glykogen [KUO et al., 1986]. Darüber hinaus besitzen *Chlamydia* spp. zwei, *Chlamydophila* spp. jedoch nur ein für ribosomale RNA kodierendes Operon [STEPHENS et al., 1998].

Der obligat intrazelluläre Lebensstil bedingt einige essentielle Fähigkeiten. So müssen Chlamydien in Wirtszellen eindringen, sich im feindlichen intrazellulären Milieu vermehren und den Abwehrmechanismen des Wirtes entgehen sowie schließlich die Wirtszelle wieder verlassen und bis zur erneuten Infektion außerhalb der Zelle überdauern können. An diese Anforderungen haben sich die Chlamydien im Laufe ihrer Evolution durch Erwerb eines charakteristischen biphasischen Entwicklungszyklus, der erstmal 1932 beschrieben wurde, adaptiert [BEDSON & BLAND, 1932].

Zu Beginn des Entwicklungszyklus liegen die Chlamydien als Elementarkörper (EK) vor. Die EK sind mit einem Durchmesser von 0,2–0,3 µm relativ klein, metabolisch inaktiv und besitzen eine widerstandsfähige Zellwand, die ihnen das Überleben in der Umwelt ermöglicht (Abb. 2). Die EK sind die (einzige) infektiöse Form der Chlamydien und können nach Adhäsion in permissive Zelllinien durch Phagozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose eindringen [WARD & MURRAY, 1984; WYRICK et al, 1989]. Innerhalb von zwei Stunden nach Internalisierung der EK erfolgt die Konversion zu Retikularkörpern (RK). Die nicht infektiösen RK sind die replikative Form der Chlamydien. Bei der Konversion kommt es zu einer sukzessiven Größenzunahme mit Anstieg des Volumens etwa um den Faktor 30 und zur Dekondensation der in den EK unter Beteiligung zweier Histon-ähnlicher Proteine stark verdichteten DNA [KAUL & WENMAN, 1998]. Die RK besitzen einen Durchmesser von etwa 1–1,5 µm, eine dünnere, permeablere Zellwand als die EK, sind metabolisch aktiv und vermehren sich durch binäre Teilung. Zum Ende des Entwicklungszyklus kommt es zur Rekonversion von RK zu EK. Die Länge des Entwicklungszyklus ist je nach Spezies verschieden und dauert bei *C. pneumoniae* 72–96 h, bei *C. trachomatis* 32–48 h. Die EK werden schließlich durch Lyse der Zelle oder Exozytose freigesetzt [RAULSTON & WYRICK, 2000; SCIDMORE-CARLSON & HACKSTADT, 2000].

Der gesamte Entwicklungszyklus findet in einem abgetrennten vesikulären Kompartiment, der Einschlusskörper oder Inklusion genannten parasitophoren Vakuole, statt. Der Einschlusskörper stellt für die Chlamydien eine Nische dar, in der sie vor der Abwehr des Wirtes geschützt sind. Während des Infektionszyklus nimmt die lichtmikroskopisch nachweisbare Inklusion an Größe zu, bis sie fast das gesamte Zytoplasma der Wirtszelle einnimmt.



**Abb. 2:** Schematisch dargestellter Entwicklungszyklus der Chlamydien. Der gesamte Entwicklungszyklus ist in einer Vakuole, dem Einschlusskörper, lokalisiert. Nach Internalisierung der Elementarkörper (EK) findet deren Konversion zu metabolisch aktiven Retikularkörpern (RK) statt. Die RK vermehren sich durch binäre Teilung und rekonvertieren schließlich zu EK, die durch Lyse der Zelle oder Exozytose freigesetzt werden. Die Dauer des Entwicklungszyklus ist abhängig von der Spezies und beträgt für *C. trachomatis* 32–48 h und für *C. pneumoniae* 72–96 h.

## 1.4 Entdeckung und medizinische Bedeutung von *Chlamydomphila pneumoniae*

Erstmals wurde *Chlamydomphila pneumoniae* 1965 aus dem Bindehautabstrich eines Kindes isoliert. Dieses Isolat wurde als TW183 (Taiwan Isolat Number 183) bezeichnet und als atypischer *C. psittaci*-Stamm klassifiziert [GRAYSTON, 1965]. Das erste Isolat aus dem respiratorischen Trakt konnte 1983 gewonnen werden und wurde als AR39 bezeichnet. Die Isolate AR39 und TW183 wurden dem gleichen Erreger zugeordnet und als TWAR-Stamm bezeichnet [GRAYSTON et al., 1986]. 1989 erfolgte die Klassifizierung des TWAR-Erregers als weitere Chlamydienspezies, die den Namen *Chlamydia pneumoniae* erhielt [GRAYSTON et al., 1989]. Nach Sequenzierung des Genoms von *C. pneumoniae* 1999 erfolgte im Rahmen einer neuen taxonomischen Einteilung der *Chlamydiales* die Umbenennung in *Chlamydomphila pneumoniae* [EVERETT et al., 1999].

*Chlamydophila pneumoniae* ist häufiger Erreger v. a. respiratorischer Infektionen auf der ganzen Welt. Die Seroprävalenz gegen *C. pneumoniae* gerichteter Antikörper ist abhängig vom Lebensalter. Sie ist gering bei Kleinkindern, beträgt bei 20jährigen etwa 50% und im höheren Lebensalter etwa 75% [KUO et al., 1995b]. Beim männlichen Geschlecht und in weniger entwickelten, tropischen Ländern werden höhere Werte für die Seroprävalenz gefunden [SAIKKU et al., 1988; KARVONEN et al., 1994]. Für die Inzidenz akuter Infektionen mit *C. pneumoniae* wurde mit 6–9% ein Maximum bei 5 bis 14jährigen gefunden, bei über 19jährigen beträgt sie nur noch 1,5% [ALDOUS et al., 1992]. Die hohen Werte für die Seroprävalenz legt nahe, dass so gut wie jeder Mensch im Laufe des Lebens eine Infektion mit *C. pneumoniae* durchmacht und auch Reinfektionen auftreten [GRAYSTON, 1992].

Übertragungsweg der Infektion mit *C. pneumoniae* ist höchstwahrscheinlich die Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch. Die Kontagiosität scheint eher gering zu sein. Asymptomatischen Trägern wird aufgrund der hohen Prävalenzraten eine besondere Funktion als Infektionsquelle zugeschrieben [GRAYSTON, 1992].

Entgegen der Annahme, *C. pneumoniae* sei auf den Mensch als Wirt beschränkt, konnten Infektionen anderer Säugetiere wie Pferde oder Koalas und bestimmter Reptilien- und Froscharten nachgewiesen werden [BODETTI et al., 2002].

### **1.4.1 Akute Infektion des Respirationstraktes**

Das Spektrum der klinischen Manifestation einer akuten Infektion des Respirationstraktes mit *C. pneumoniae* reicht von asymptomatischen Verläufen über milde Symptome bis zur Bronchitis und Pneumonie. Dabei scheinen die asymptomatischen Verläufe bis zu 90% auszumachen [KLEEMOLA et al., 1988]. Bei bis zu 4,7% gesunder, asymptomatischer Studienteilnehmer konnte *C. pneumoniae* im Nasopharynx nachgewiesen werden [GNARPE et al., 1991; MIYASHITA et al., 2001]. Verschiedene Studien untersuchten die Häufigkeit von *C. pneumoniae* als auslösendes Agens ambulant erworbener Pneumonien. Die Ergebnisse dieser Studien wichen z. T. erheblich voneinander ab, so fanden GAYDOS et al. [1996] in 3,4%, LIEBERMAN et al. [1996] in 17,9% und KAUPPINEN & SAIKKU [1995] in 43% eine *C. pneumoniae*-Infektion als Ursache ambulant erworbener Pneumonien. Im Mittel ist *C. pneumoniae* mit 10% der ambulant erworbenen Pneumonien und 5% der Bronchitiden und Sinusitiden weltweit assoziiert [KAUPPINEN & SAIKKU, 1995]. Erste, vorläufige Daten des „Kompetenznetzes Ambulant Erworbener Pneumonie“ (CAPNETZ) deuten jedoch darauf hin, dass *C. pneumoniae* in Deutschland für weniger als 5% der ambulant erworbenen Pneumonien verantwortlich ist [WELLINGHAUSEN et al., 2005]. Ein Erregernachweis gelang bei den CAPNETZ-Untersuchungen jedoch nur in 25% der Fälle. Bei bis

zu 40% der Patienten wurde eine Koinfektion mit einem anderen Keim, meist Pneumokokken, beschrieben [FANG et al., 1990; KAUPPINEN & SAIKKU, 1995; FILE & TAN, 1997]. Daneben ist *C. pneumoniae* Erreger von Pharyngitiden und Otitis media. Bei älteren Patienten, bei Kindern in Entwicklungsländern sowie bei immunsupprimierten Patienten wurden gehäuft schwerere Krankheitsverläufe beobachtet [KAUPPINEN & SAIKKU, 1995; HEINEMANN et al., 2000]. Beschrieben wurde auch epidemieartiges Auftreten des Erregers [KLEEMOLA et al., 1988; KARVONEN et al., 1993; TROY et al., 1997].

Neben Erkrankungen des Respirationstraktes sind auch andere Manifestationen der Infektion mit *C. pneumoniae* beschrieben, z. B. Endokarditiden [NORTON et al., 1995], Myokarditiden [WESSLEN et al., 1992], Meningitiden [SUNDELOF et al., 1993], Enzephalitiden [FRYDEN et al., 1989] und das Guillain-Barré-Syndrom [HAIDL et al., 1992].

Darüber hinaus wurden chronisch persistierende Infektionen mit *C. pneumoniae* beschrieben und entsprechende Zellkulturmodelle entwickelt [HYMAN et al., 1991; HAMMERSCHLAG et al., 1992; PANTOJA et al., 2001].

#### **1.4.2 Mit *Chlamydomphila pneumoniae* assoziierte chronische Erkrankungen**

Zahlreiche, in ihrer Entstehung bislang nicht aufgeklärte chronische Erkrankungen werden mit einer *C. pneumoniae*-Infektion in Verbindung gebracht. Dabei sind u. a die chronischen Erkrankungen des Respirationssystems Asthma bronchiale, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD) und Bronchialcarcinom zu nennen, aber auch Erkrankungen anderer Organsysteme wie Atherosklerose mit den Manifestationen Koronare Herzerkrankung (KHK) und Apoplex, Multiple Sklerose (MS), Morbus Alzheimer und kutanes T-Zell-Lymphom (CTCL). Ausgangspunkt ist zumeist eine Assoziation zwischen einem Nachweis von Antikörpern gegen *C. pneumoniae* und dem Auftreten der entsprechenden Erkrankung. Darüber hinaus werden in Studien zur Verbindung von *C. pneumoniae* und chronischen Erkrankungen häufig Assoziationen zwischen dem Nachweis des Erregers und einer chronischen Erkrankung, das Vorhandensein von *C. pneumoniae* in pathologisch verändertem Gewebe oder ein therapeutischer oder prophylaktischer Nutzen von Antibiotika gegen eine chronische Erkrankung untersucht.

Die wohl am intensivsten betrachtete chronische Erkrankung in Verbindung mit *C. pneumoniae* ist die Atherosklerose. Ein Nachweis von *C. pneumoniae* in atheromatösen Plaques und Gefäßen von KHK- und Schlaganfallpatienten gelang erstmals 1992 [SHOR et al., 1992] und konnte in vielen weiteren Studien bestätigt werden [KUO et al., 1995a; MAASS et al., 1997; PETERSEN et al., 1998].

Darüber hinaus konnte *C. pneumoniae* im Liquor von MS-, im Gehirngewebe von Alzheimer-, und in der Haut von CTCL-Patienten nachgewiesen werden [BALIN et al., 1998; SRIRAM et al., 1999; LAYH-SCHMITT et al., 2000; ABRAMS et al., 2001].

*In vitro* konnte gezeigt werden, dass *C. pneumoniae* Makrophagen, Endothelzellen und Gefäßmuskelzellen infizieren kann [GAYDOS et al., 1996], und dass *C. pneumoniae*-infizierte Endothelzellen vermehrt Adhäsionsfaktoren wie E-Selektin, ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular adhesion molecule-1) und ELAM-1 (endothelial leucocyte adhesion molecule-1) exprimieren [SUMMERSGILL et al., 2000]. Diese Adhäsionsfaktoren begünstigen eine Anlagerung von Monozyten. Mit *C. pneumoniae* infizierte Makrophagen exprimieren vermehrt Entzündungsmediatoren TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-6, Interleukin-8 und Interferon- $\gamma$  [HEINEMANN et al., 1996; NETEA et al., 2000]. Eine Beteiligung von *C. pneumoniae* an der Pathogenese ist aufgrund dieser Daten durchaus denkbar. Jedoch konnte ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Nachweis von *C. pneumoniae* im atherosklerotisch veränderten Gewebe und der Erkrankung bislang nicht bewiesen werden. Ebenso wenig konnte ein Kausalzusammenhang zwischen der Infektion mit *C. pneumoniae* und MS, Alzheimer, Asthma, COPD oder CTCL gezeigt werden.

Darüber hinaus sind die Studien, die eine Assoziation von *C. pneumoniae* und Atherosklerose zeigten, kritisch zu betrachten. Die Studien mit höchster statistischer Präzision, erreicht durch eine hohe Teilnehmerzahl, doppelt-blind randomisierte Kontrollgruppen und prospektives Studiendesign, zeigten eher keine signifikante Korrelation. Es ist auch davon auszugehen, dass Studien, die keine Korrelation zwischen *C. pneumoniae* und Atherosklerose zeigen konnten, eher nicht publiziert wurden [EGGER et al., 1997]. Ähnlich verhält es sich mit den Studien zu Asthma und COPD.

Ob eine antibiotische Therapie mit Chinolonen, Makroliden oder Tetrazyklinen sich positiv auf die Entwicklung der KHK auswirkt, kann nicht abschließend beantwortet werden. Erste Studien zeigten einen positiven Effekt [GUPTA et al., 1997; STONE et al., 2002]; weitere, z. T. größer angelegte Studien konnten keinen signifikanten Effekt zeigen [DUNNE, 2000; MUHLESTEIN et al., 2000; LUCHSINGER et al., 2002; CERCEK et al., 2003]. Ein positiver Effekt einer gegen *C. pneumoniae* wirksamen Antibiotikatherapie hinsichtlich des Schlaganfallrisikos oder der Entwicklung von Asthma konnte ebenfalls nicht eindeutig gezeigt werden [LUCHSINGER et al., 2001; RICHELDI et al., 2005]. Es ist aber zu bedenken, dass gegen eine persistierende Infektion, z. B. in Monozyten, bislang keine Therapeutika zur Verfügung stehen [GIEFFERS et al., 2001].

Es kann daher nicht abschließend beurteilt werden, ob die bei den chronischen Erkrankungen in krankhaftem Gewebe nachgewiesenen Chlamydien kausal mit der Erkrankung in Beziehung stehen oder sekundär z. B. mit Monozyten eingewandert sind. Es ist eher unwahrscheinlich, dass

*C. pneumoniae* ursächlich an all diesen verschiedenen chronischen Erkrankungen beteiligt ist. Gegen eine kausale Beteiligung von *Chlamydomphila pneumoniae* bei der Pathogenese der KHK spricht auch die in verschiedenen Ländern gleich hohe Seroprävalenz für *C. pneumoniae*-Antikörper und die von Land zu Land sehr unterschiedlichen KHK-bedingten Mortalitäten. Denkbar ist aber eine Beteiligung von *C. pneumoniae* am Krankheitsgeschehen z. B. durch Modifikation der Immunantwort oder Steigerung der Expression von Entzündungsmediatoren und Adhäsionsfaktoren. Letztendlich konnte bislang für keine der chronischen Erkrankungen die Frage einer Beteiligung von *C. pneumoniae* am Krankheitsgeschehen beantwortet werden.

### **1.4.3 Diagnostik**

Zur Diagnostik einer Infektion mit Chlamydien kann der Nachweis von Antikörpern oder bakterieller DNA oder die Anzucht des Erregers eingesetzt werden. Serologische Methoden sind weit verbreitet, die Diagnose einer akuten Infektion wird bei einer deutlichen Serokonversion wie einer Vervierfachung des IgG-Titers oder bei einer Erhöhung des IgM-Titers auf  $\geq 1:16$  gestellt [DOWELL et al., 2001]. Jedoch gibt es bislang keine validierten serologischen Marker zur Diagnostik einer persistierenden Infektion.

Die Isolierung und Anzucht des Erregers in der Zellkultur zeigt sehr sicher eine bestehende Infektion an [BOMAN & HAMMERSCHLAG, 2002]. Da *C. pneumoniae* jedoch relativ schwer zu kultivieren ist, insbesondere aus klinischen Proben, ist die Sensitivität der Isolierung und Anzucht vergleichsweise gering und die Zahl der falsch-negativen Ergebnisse hoch.

Der Nachweis von DNA des Erregers mittels PCR ist eine sehr empfindliche und schnell durchzuführende Methode. Kleinste Mengen DNA des Erregers sind noch nachweisbar, darüber hinaus gelingt die Detektion nicht mehr vermehrungsfähiger Erreger, wie sie in Modellen zur Persistenz beschrieben wurden. Allerdings sind die PCR-Methoden zur Diagnostik der Infektion mit *C. pneumoniae* bislang nicht standardisiert und es wurden Probleme mit der Reproduzierbarkeit beschrieben [BOMAN & HAMMERSCHLAG, 2002]. Die hohe Empfindlichkeit erhöht auch das Risiko, falsch-positive Ergebnisse zu erhalten.

## 1.5 Interaktion von *Chlamydomphila pneumoniae* mit der Wirtszelle

Um der Abwehr des Wirtes entgehen und in der feindlichen intrazellulären Umgebung überleben zu können, müssen Chlamydien über die Membran des Einschlusskörpers mit der Wirtszelle kommunizieren und in bestimmte Prozesse der Wirtszelle eingreifen [WYRICK, 2000]. Bereits nach Anlagerung der Elementarkörper an die Wirtszelle sind Einflüsse der Chlamydien in der Wirtszelle detektierbar. So können wenige Minuten nach Anlagerung Tyrosin-Phosphorylierungen und eine Aktin-Mobilisation in der Wirtszelle nachgewiesen werden [COOMBES & MAHONY, 2002]. 15 min nach der Anlagerung werden vermehrt Mikrovilli an der Zelloberfläche ausgebildet. An der Basis dieser Mikrovilli ist eine Anhaftung der Elementarkörper an die Plasmamembran aufgrund geringerer elektrostatischer Gegenkräfte erleichtert [CARABEO et al., 2003]. Innerhalb von 30 min bis 2 h nach Aktivierung des Aktin-Zytoskelettes werden die Chlamydien durch rezeptorvermittelte Endozytose oder Phagozytose in die Wirtszelle aufgenommen [WARD & MURRAY, 1984; WYRICK et al, 1989; COOMBES & MAHONY, 2002].

Nach Internalisierung befinden sich die Chlamydien in einer parasitophoren Vakuole, in der der gesamte Entwicklungszyklus stattfindet. Diese Vakuole, genannt Einschlusskörper, ist umgeben von einer von der Plasmamembran der Wirtszelle abgeleiteten Membran. Die Fusion des Einschlusskörpers mit Lysosomen, wie es normalerweise bei Durchlaufen des endozytotischen Pfades geschieht, wird unterbunden [FRIIS, 1972]. Dieser Prozess ist zunächst unabhängig von einer chlamydialen Proteinsynthese. Im Elementarkörper bereits vorhandene Proteine scheinen hierfür in der Frühphase der Infektion verantwortlich, bevor durch die Retikularkörper synthetisierte Proteine diese Aufgabe übernehmen [HACKSTADT, 1998; SCIDMORE et al., 2003]. In mit *C. trachomatis* infizierten Zellen kann zwei Stunden nach Internalisierung eine Translokation der Einschlusskörper unter Beteiligung des Zytoskelettes der Wirtszelle in Richtung des Golgi-Apparates beobachtet werden [SCIDMORE et al., 1996b; CLAUSEN et al., 1997]. Weiterhin kann sowohl für *C. trachomatis* als auch für *C. pneumoniae* gezeigt werden, dass es zu einer von der Proteinbiosynthese der Chlamydien abhängigen Fusion der Einschlusskörper mit vom Golgi-Apparat sezernierten, Sphingomyelin- und Cholesterin-haltigen Vesikeln des exozytotischen Pfades kommt [SCIDMORE et al., 1996a; HACKSTADT, 1998; WOLF & HACKSTADT, 2001; CARABEO et al., 2003]. Die aufgenommenen Lipide decken einerseits den Bedarf der während des Entwicklungszyklus wachsenden Membran des Einschlusskörpers, andererseits könnten diese Lipide eine Maskierung des Einschlusskörpers bewirken und so einer Fusion mit Lysosomen entgegenwirken [VAN OOIJ et al., 1998].



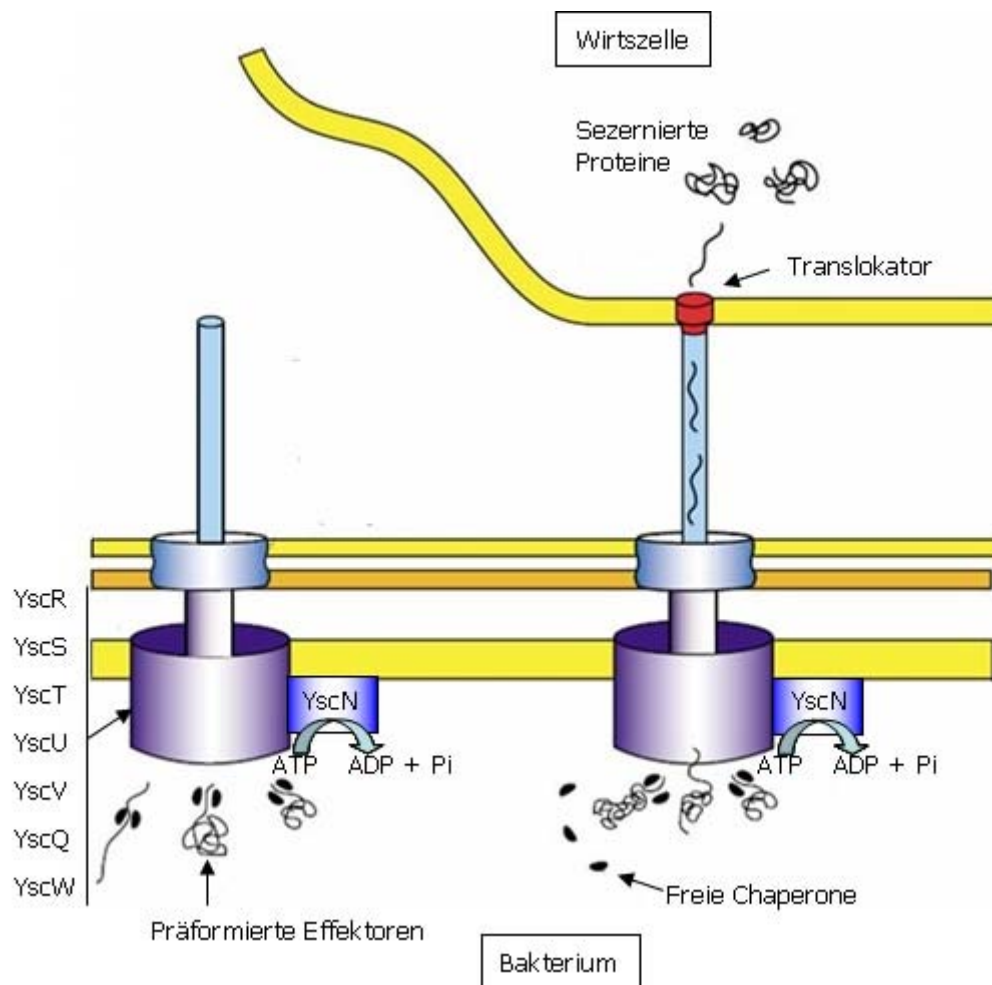
Darüber hinaus werden noch weitere zelluläre Prozesse beeinflusst. Eine von den Chlamydien ins Zytoplasma sezernierte Protease degradiert den Transkriptionsfaktor RFX5 und reguliert so die MHC I und II vermittelte Antigenpräsentation herab [ZHONG et al., 2001; FAN et al., 2002; HEUER et al., 2003]. Des Weiteren vermögen Chlamydien die Apoptose der Wirtszelle sowohl zu inhibieren und als auch zu induzieren: das konservierte chlamydiale Protein CADD wird spät im Entwicklungszyklus exprimiert und aktiviert wahrscheinlich über Interaktion mit Death-Rezeptoren die Apoptose der Wirtszelle [STENNER-LIEWEN et al., 2002]. Daneben ist gezeigt, dass Chlamydien die Apoptose der Wirtszelle inhibieren [RAJALINGAM et al., 2001; WAHL et al., 2001; CARRATELLI et al., 2002; FISCHER et al., 2004]. Die Identifizierung der verantwortlichen Faktoren gelang jedoch noch nicht.

## 1.6 Das Typ-III-Sekretionssystem der Chlamydien

Chlamydien besitzen wie viele andere gramnegative Bakterien ein Typ-III-Sekretionssystem. 1997 wurden erstmals Homologe zu Genen des Typ-III-Sekretionssystems anderer Spezies in *C. psittaci* identifiziert [HSIA et al., 1997]. Die Daten verschiedener Projekte zur Sequenzierung chlamydialer Genome zeigten, dass *Chlamydia* spp. die für ein Typ-III-Sekretionssystem notwendigen Gene besitzt [STEPHENS et al., 1998; KALMAN et al., 1999; READ et al., 2000]. Bereits in den 70er Jahren wurden erstmals elektronenmikroskopisch charakteristische Strukturen auf der Zelloberfläche der Chlamydien beobachtet [MATSUMOTO & MANIRE, 1970; MATSUMOTO et al., 1976; MIYASHITA et al., 1993]. Diese Strukturen sind v. a. am Ort des Kontaktes von Chlamydien und Wirtszelle lokalisiert und weisen Ähnlichkeiten zum Typ-III-Sekretionssystem von *Salmonella* auf [BAVOIL & HSIA, 1998; KUBORI et al., 1998; ROCKEY & MATSUMOTO, 1999].

Ein Typ-III-Sekretionssystem dient vielen gramnegativen Pathogenen wie z. B. *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Pseudomonas* und *Bordetella* zum Einbringen von Virulenz-assoziierten Effektorproteinen in Wirtszellen [HUECK, 1998; WINSTANLEY & HART, 2001] (Abb. 3). Der aus bis zu 20 Strukturproteinen zusammengesetzte Sekretionsapparat bildet einen Tunnel durch die aus innerer Membran, periplasmatischen Spalt, Peptidoglycanschicht und äußerer Membran bestehenden Zellwand der Bakterien und endet in einer nadelähnlichen Struktur, die es ermöglicht, Effektoren in die Membran oder das Zytoplasma der Wirtszelle zu injizieren [GALAN & COLLMER, 1999]. Das Typ-III-Sekretionssystem ist im Vergleich zu anderen bakteriellen Sekretionssystemen u. a. durch seine Aktivierung bei Kontakt mit der Wirtszelle charakterisiert; daher wird es auch als kontaktabhängiges Sekretionssystem bezeichnet. Die Frage, ob Typ-III-sezernierte Proteine ein Sekretionssignal besitzen, wird kontrovers diskutiert [GHOSH, 2004].

Vorgeschlagen wurden Signale, die in den ersten 15 Codons der mRNA kodiert oder innerhalb der ersten 50 Aminosäuren des Proteins lokalisiert sind. In die Sekretion von Effektoren sind oftmals Chaperone involviert. Ihnen könnte eine Funktion bezüglich des Schutzes der bakteriellen Zelle vor einer toxischen Wirkung des Effektors, der Faltung bzw. Entfaltung der Effektoren für die Passage durch den Sekretionsapparat und auch der Erkennung der Effektoren als Substrat für den Sekretionsapparat zukommen [GHOSH, 2004].



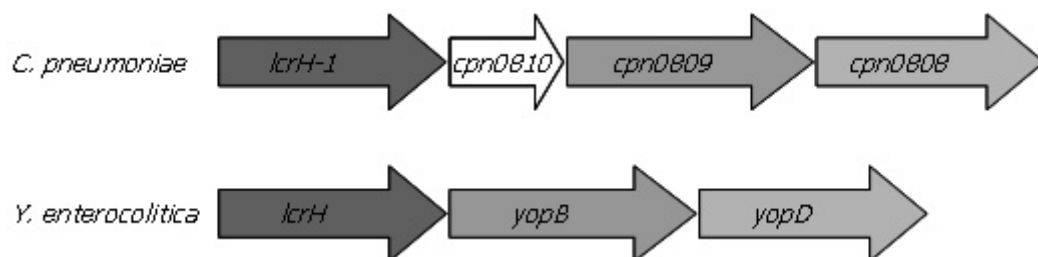
**Abb. 3:** Schematischer Aufbau des Typ-III-Sekretionsapparates, basierend auf den Homologien zu *Yersinia* spp. Durch den Kontakt mit der Plasmamembran der Wirtszelle wird der Sekretionsapparat aktiviert. Im Bakterium präformiert vorliegende Effektoren werden über den Apparat mit Hilfe von Chaperonen in die Plasmamembran oder das Zytoplasma der Wirtszelle sezerniert. Die Energie für den Transport liefert die ATPase YscN [Schaubild modifiziert nach JOURNET et al., 2005, Seite 43].

Für Chlamydien wird eine Reihe von Interaktionen mit der Wirtszelle beschrieben oder vermutet. Ein Typ-III-Sekretionssystem könnte ein wichtiger Faktor für *Chlamydia* sein, um über die Einschlusskörpermembran in Prozesse der Wirtszelle eingreifen zu können [HSIA et al., 1997].

In *C. pneumoniae* konnten bislang 13 Strukturproteine des Typ-III-Sekretionssystems identifiziert und deren Transkription bis auf eine Ausnahme (*yscU*) nachgewiesen werden [SLEPENKIN et al.,

2003]. Für einige der Strukturproteine wurde darüber hinaus deren Expression gezeigt [LUGERT et al., 2004]. Die Organisation der Typ-III-Sekretion-assoziierten Gene im Genom der Chlamydien unterscheidet sich von der in anderen gramnegativen Bakterien [SUBTIL et al., 2000]. In den Genomen der gramnegativen Bakterien, in denen bislang ein Typ-III-Sekretionssystem identifiziert werden konnte, befinden sich die Typ-III-Sekretion-assoziierten Gene vereint in einer Pathogenitätsinsel auf einem Plasmid oder dem Chromosom. In *Chlamydia* sind die entsprechenden Gene in mindestens vier verschiedenen Subclustern über das Genom verteilt. Der GC-Gehalt dieser Gene ist in *Chlamydia* etwa identisch mit dem des Gesamtgenoms, bei anderen gramnegativen Spezies liegt er typischerweise 10% darunter [STEPHENS et al., 1998; KALMAN et al., 1999]. Die für Strukturproteine kodierenden Gene sind konserviert, wohingegen die für Effektoren kodierende Gene aufgrund der verschiedenen Funktionen, die sie übernehmen, zwischen den Spezies variieren. Diese Umstände und das Fehlen eines bekannten Sekretionssignals erschweren die Identifizierung von Effektoren des Typ-III-Sekretionssystems in *Chlamydia*.

Durch Auswertung der Sequenzen konnten dennoch putative Effektoren des Typ-III-Sekretionssystems von *C. pneumoniae* identifiziert werden [SUBTIL et al. 2000]. Ein putativer Effektor ist das hypothetische Protein CPn0809. Wie für Effektoren des Typ-III-Sekretionssystem gefordert, kodiert *cpn0809* nicht für ein Signalpeptid eines anderen Sekretionsweges. Weiter ist *cpn0809* in einem Subcluster des Typ-III-Sekretionssystems in enger Nachbarschaft zu *lcrH-1* lokalisiert (Abb. 4).



**Abb. 4:** Genomische Organisation des *lcrH-1*-Subclusters von *C. pneumoniae* (oben) und des *lcrH*-Clusters von *Yersinia enterocolitica* (unten) im Vergleich. Es bestehen bestimmte Ähnlichkeiten zwischen *cpn0809/cpn0808* und *yopB/yopD*, die für Typ-III-sezernierte Translokatoren kodieren.

*LcrH-1* ist homolog zu *lcrH*, das in *Yersinia* spp. für ein Chaperon der Translokatoren YopB und YopD kodiert. YopB und YopD werden über den Typ-III-Sekretionsapparat ausgeschleust und sind an der Bildung einer Pore in der Plasmamembran der Wirtszelle beteiligt [NEYT & CORNELIS, 1999]. Es besteht keine Ähnlichkeit zwischen *cpn0809* und *yopB* oder *yopD* auf Sequenzebene, wohl aber hinsichtlich des Hydrophobizitätsprofils und der Größe der kodierten Proteine. Da Gene für Effektoren des Typ-III-Sekretionssystems zumeist im Genom in enger Nachbarschaft zu Genen ihrer Chaperone lokalisiert sind und das Hydrophobizitätsprofil ein wichtiges Kriterium für die Sekretion über den Typ-III-Sekretionsapparat ist, sprechen obige Feststellungen zusammen mit

dem Fehlen eines Signalpeptides für eine mögliche Typ-III-Sekretion von CPn0809 [SUBTIL et al., 2000].

Da Chlamydien bislang nicht genetisch manipuliert werden können, lässt sich die tatsächliche Sekretion putativer Effektoren über den chlamydialen Typ-III-Sekretionsapparat wohl nur schwer zeigen. Hinweise auf die Typ-III-Sekretion eines Proteins in *Chlamydia* liefert dessen Sekretion über ein heterologes Typ-III-Sekretionssystem. So konnte u. a. für die Einschlusskörper-Membranproteine, die so genannten Inc-Proteine, gezeigt werden, dass ihre N-Termini von dem Typ-III-Sekretionsapparat in *Shigella flexneri* als Substrat erkannt und sezerniert werden [SUBTIL et al., 2001]. Die Inc-Proteine werden nach Sekretion in die Membran des Einschlusskörpers eingelagert [ROCKEY et al., 1995; LUGERT et al., 2004]. Für IncA aus *C. trachomatis* konnte mittels eines Yeast-Two-Hybrid-Systems eine Interaktion mit sich selbst gezeigt werden [HACKSTADT et al., 1999]. Wahrscheinlich ist es an der Fusion homotypischer Einschlusskörper in mit *C. trachomatis* mehrfach infizierten Zellen maßgeblich beteiligt. Auch interagierte IncG aus *C. trachomatis* im Yeast-Two-Hybrid-System mit humanen 14-3-3 $\beta$ , ein an der Signaltransduktion zur Regulation verschiedener Zellprozesse beteiligtes Protein [SCIDMORE & HACKSTADT, 2001].

CopN ist ein weiteres Protein aus *C. trachomatis*, für das eine Sekretion über ein heterologes Typ-III-Sekretionssystem, in diesem Fall *Yersinia enterocolitica*, gezeigt werden konnte [FIELDS KA & HACKSTADT, 2000]. Das zu CopN homologe YopN ist in *Yersinia* als eine Art Deckel des Apparates an der Regulation der Typ-III-Sekretion beteiligt [RAMAMURTHI & SCHNEEWIND, 2002].

Für das chlamydiale Protein Tarp konnte eine Sekretion über den Typ-III-Sekretionsapparat in *Yersinia pseudotuberculosis* gezeigt werden [CLIFTON et al., 2004; 2005]. In der Wirtszelle ist es bei der Internalisierung der Elementarkörper beteiligt.

## 1.7 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, den putativen Effektor CPn0809 des Typ-III-Sekretionssystems von *Chlamydomphila pneumoniae* näher zu charakterisieren. Zunächst wurden Transkription, Expression und Lokalisation dieses hypothetischen Proteins in mit *C. pneumoniae* AR39 infizierten humanen Wirtszellen gezeigt. Weiterhin sollte mittels eines Yeast-Two-Hybrid-Systems ein Interaktionspartner der Wirtszelle identifiziert werden, um Hinweise auf die Funktion von Cpn0809 erlangen zu können. Darüber hinaus wurde die Immunogenität von CPn0809 untersucht, um die Möglichkeit des Einsatzes dieses Proteins in der serologischen Diagnostik zu prüfen.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Organismen / Zelllinien

#### Zelllinie

HEp-2 Humane Epithelzellen, ATCC: CCL-23

<b>Mikroorganismen</b>	<b>Stamm</b>	<b>Referenz</b>
<i>Chlamydomophila pneumoniae</i>	AR39	GRAYSTON et al., 1986
<i>Escherichia coli</i>	DH5 $\alpha$	HANAHAN, 1983
	BNN132	ELLEDGE et al., 1991
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AH109	JAMES et al., 1996
	Y187	HARPER et al., 1993

### 2.2 Nukleinsäuren

#### 2.2.1 Plasmide

<b>Plasmid</b>	<b>Relevante Merkmale</b>	<b>Referenz</b>
pBAD TOPO	TOPO Klonierungsstelle, pBAD-Promoter, His <sub>6</sub> -Tag, amp <sup>r</sup>	Invitrogen
pCR 2.1 TOPO	TOPO Klonierungsstelle, <i>lacZ<math>\alpha</math></i> , amp <sup>r</sup> , kan <sup>r</sup>	Invitrogen
pGBKT7	<i>GAL4</i> DNA-BD, <i>TRP1</i> , kan <sup>r</sup> , c-Myc-Tag	LOURET et al., 1997
pGBKT7-53	murines P53 in pGBKT7	Clontech
pACT2	<i>GAL4</i> AD, <i>LEU2</i> , amp <sup>r</sup>	LI L et al., 1994
pGADT7	<i>GAL4</i> AD, <i>LEU2</i> , amp <sup>r</sup> , HA	CHIEN et al., 1991
pGADT7-T	SV 40 large T-Antigen in	Clontech
pCL1	wild-typ <i>GAL4</i> Gen, <i>LEU2</i> , amp <sup>r</sup>	FIELDS S & SONG, 1989

### 2.2.2 Oligonukleotide

<b>Name</b>	<b>Sequenz 5'→3'</b>
16S RTF	GGA ATA CTC ATA CGG AGC AA
16S RTR	AGG TAA GAA CTG CTT GCA GG
C809 RTF	ACA GAA ACA GCT CCA CAA CA
C809 RTR	CCC GGG CTT GGG GAC CTC AG
C809 TOPOF	TCT ATT TCA TCT TCT TCA GGA
C809 TOPOR	GAC AGT ATC CAT TGT TCC TTC
pBAD SEQF	ATG CCA TAG CAT TTT TAT CC
pBAD SEQR	GAT TTA ATC TGT ATC AGG
C809 Y2HF	NNN NNN CCA TGG ATT CTA TTT CAT CTT CTT CA
C809 Y2HR	AAA TTT GGA TCC AGC GAT GGC TCC GCT GAT
SeqY2HIM	ATT CAG ACA TTG GGA GAA
T7-5'Seq-Y2H	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC
BD-3'Seq-Y2H	TTT TCG TTT TAA AAC CTA AGA GTC
HeLaLib-5'Seq	TTA CCC ATA CGA TGT TCC
HeLaLib-3'Seq	AGG CAA AAC GAT GTA TAA ATG

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma ARK (Steinheim) bezogen.

### 2.2.3 DNA-Längenstandard

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

## 2.3 Proteine

### 2.3.1 Molekulargewichtsmarker

Prestained Protein Marker	New England Biolabs (Schwalbach)
---------------------------	----------------------------------

### 2.3.2 Antikörper

#### **Primär-Antikörper**

Maus-anti-His-Tag, IgG	Qiagen (Hilden)
------------------------	-----------------

Maus-anti-c-Myc, IgG	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Maus-anti- <i>C.-pneumoniae</i> , IgG	Acris (Hiddenhausen)

### **Sekundär-Antikörper**

AP-konjugiertes Ziege-anti-Maus-IgG	Dianova (Hamburg)
AP-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen-IgG	Dianova (Hamburg)
AP-konjugiertes Kaninchen-anti-Mensch-IgG	Dianova (Hamburg)
AP-konjugiertes Kaninchen-anti-Mensch-IgM	Dianova (Hamburg)
AP-konjugiertes Kaninchen-anti-Mensch-IgA	Dianova (Hamburg)
DTAF-konjugiertes Esel-anti-Kaninchen-IgG	Dianova (Hamburg)
Cy3-konjugiertes Ziege-anti-Maus-IgG	Dianova (Hamburg)

## **2.4 Nährmedien und Zusätze**

### **2.4.1 Nährmedien für die Zellkultur**

#### **HEp-2-Kulturmedium**

MEM (Eagle) Medium mit Earle's Salzen	Biochrom (Berlin)
komplementiert mit	
10% (v/v) inaktiviertem FCS	Biochrom (Berlin)
2 mM <sub>L</sub> -Glutamin	Biochrom (Berlin)
1× nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom (Berlin)
2,5 µg/ml Amphotericin	Biochrom (Berlin)
25 µg/ml Gentamycin	Biochrom (Berlin)
2,5 µg/ml Vancomycin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

#### **CPn-Kulturmedium**

MEM (Eagle) Medium mit Earle's Salzen	Biochrom (Berlin)
komplementiert mit	
2 mM <sub>L</sub> -Glutamin	Biochrom (Berlin)
1× nicht essentiellen Aminosäuren	Biochrom (Berlin)
2,5 µg/ml Amphotericin	Biochrom (Berlin)
25 µg/ml Gentamycin	Biochrom (Berlin)
2,5 µg/ml Vancomycin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
1 µg/ml Cycloheximid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

## 2.4.2 Nährmedien für Bakterien

### LB (Luria Bertani)-Medium, pH 7,0

1% (w/v) Trypton	Becton Dickinson (Heidelberg)
0,5% (w/v) Hefeextrakt	Becton Dickinson (Heidelberg)
0,5% (w/v) NaCl	Merck (Darmstadt)
Für Platten zusätzlich 1,5%(w/v) Agar	Merck (Darmstadt)

## 2.4.3 Nährmedien für Hefen

### YPDA-Vollmedium (pH 6,5)

2% (w/v) Glucose	Merck (Darmstadt)
2% (w/v) Pepton	Merck (Darmstadt)
1% (w/v) Hefeextrakt	Becton Dickinson (Heidelberg)
0,003% (w/v) Adenin-Hemisulfat	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Für Platten zusätzlich 2% (w/v) Agar	Merck (Darmstadt)

### SD-Selektionsmedium (pH 5,8)

10% (v/v) 10× Dropout-Lösung	Merck (Darmstadt)
2% (w/v) Glucose	Merck (Darmstadt)
0,67% (w/v) Hefe Stickstoff Basis ohne Aminosäuren	Merck (Darmstadt)
Für Platten zusätzlich 2% (w/v) Agar	

### 10× Dropout-Lösungen

10× -Leu/-Trp Dropout-Lösung:	
6,4 g/l -Leucin/-Tryptophan-Dropout-Supplement	Clontech (Heidelberg)
10× -Ade/-His/-Leu/-Trp Dropout-Lösung:	
5 g/l -Adenin/-Histidin/-Leucin/-Tryptophan-Dropout-Supplement	Clontech (Heidelberg)

## 2.4.4 Zusätze

Antibiotika	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	50 mg/ml	100 µg/ml
Gentamycin (Biochrom, Berlin)	10 mg/ml	25 µg/ml
Kanamycin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	50 mg/ml	50 µg/ml
Vancomycin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	125 mg/ml	50 µg/ml



Amphotericin B (Biochrom, Berlin)	250 µg/ml	2,5 µg/ml
<b>Sonstige Zusätze</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Endkonzentration</b>
L-Glutamin (Biochrom, Berlin)	200 mM	2 mM
Nicht-essentielle Aminosäuren (Biochrom, Berlin)	100×	1×
Cycloheximid (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	50 µg/ml	1 µg/ml
FCS (Biochrom, Berlin)	100%	10%
X-α-Gal (Clontech, Heidelberg), in DMF	20 mg/ml	20 µg/ml

## 2.5 Standardlösungen und Puffer

EDTA (Versen)	1% (w/v) in PBS ohne Ca <sup>2+</sup> / Mg <sup>2+</sup>
1x PBS	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1x TE	10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 7,5 alle Biochrom (Berlin)

## 2.6 Reaktionssets (Kits) und Enzyme

### 2.6.1 Kits

#### RNA Isolation

Qiashredder	Qiagen (Hilden)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
RNase freie DNase	Promega (Mannheim)

#### Reverse Transkription

QIAGEN OneStep RT-PCR Kit	Qiagen (Hilden)
---------------------------	-----------------

#### Plasmid-DNA Isolation

QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)

### **Genomische-DNA Isolation**

QIAamp DNA Mini Kit Qiagen (Hilden)

### **DNA-Extraktion aus Agarosegelen**

QIAEX II Gel Extraction Kit Qiagen (Hilden)

### **DNA-Aufreinigung**

QIAquick PCR Purification Kit Qiagen (Hilden)

### **Proteinkonzentrationsbestimmung**

Pierce BCA Protein Assay Kit Pierce (Rockford, IL, USA)

### **Ligation**

Quick Ligation Kit New England Biolabs (Schwalbach)

## **2.6.2 Enzyme**

Lysozym	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Lyticase	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Proteinase K	Roth (Karlsruhe)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Schwalbach)
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Roche (Mannheim)
Trypsin	Biochrom (Berlin)

## **2.7 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte**

### **2.7.1 Chemikalien**

Die verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Boehringer (Mannheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Calbiochem (Bad Soden), oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit doppelt destilliertem Wasser („Bdest“) angesetzt.

## 2.7.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wurden von folgenden Firmen bezogen: Nunc, Roskilde, Dänemark; Falcon, Becton-Dickinson, Heidelberg; Corning/Costar, Bodenheim; Greiner, Frickenhausen; Braun, Braun-Melsungen, Melsungen.

## 2.7.3 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Modell, Hersteller</b>
Brutschränke	Heraeus (Hanau)
Fluoreszenzmikroskop	DM R, Leica (Heidelberg)
Geldokumentationsanlage	BioDoc II, Biometra (Göttingen)
Gelelektrophoresekammern für Agarosegelelektrophorese	von Keutz Labortechnik (Reiskirchen)
Gelelektrophoresekammern für PAGE	Mini Protean II, Biorad (München)
Magnetrührer	RCT basic, IKA Labortechnik (Staufen)
pH-Meter	766 Calimatic, Knick (Berlin)
Pipetten	Reference, Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Photometer	Ultraspec 1000, Pharmacia Biotech (Freiburg)
Schüttelinkubator	SM-30 Control, Johanna Otto GmbH (Hechingen)
Semi-Dry Blotter	Sartorius (Göttingen)
Spannungsgeräte	EPS 500/400 und 600, Pharmacia Biotech (Freiburg)
Sterilbank	BDK-S 1800, BDK Luft- und Reinraumtechnik (Sonnenbühl)
Thermocycler	T3, Biometra (Göttingen)
Thermomixer	Compact, Eppendorf (Hamburg)
Überkopfschüttler	Renner GmbH (Dannstadt)
UV-Tisch	TFX-20M, Gibco BRL (Eggenstein)
Vortexer	Reax Top, Heidolph (Kelheim)
Waagen	• BP 221 S, Sartorius (Göttingen) • LP 6200 S, Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Zellkulturmikroskop	DM IL, Leica (Heidelberg)
Zentrifugen	• Megafuge 2.0 und 2.0 RS, Heraeus (Hanau) • 5417 C und 5415 R, Eppendorf (Hamburg) • RC-26 Plus, Sorvall-Kendro (Hanau) • Optima LE 80-K, Beckman-Coulter (Krefeld)

## 3 METHODEN

### 3.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1 Kultivierung von HEp-2-Zellen und *Chlamydophila pneumoniae*

##### 3.1.1.1 Kultivierung von HEp-2-Zellen

Als Wirtszellen zur Kultivierung der Chlamydien dienten HEp-2-Zellen. Die Anzucht der Zellen erfolgte in 80 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37 °C unter 5% CO<sub>2</sub>-Begasung in HEp-2-Kulturmedium. Nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens wurde das Kulturmedium abgegossen, der Zellrasen mit EDTA Versen gewaschen und die adhärennten Zellen mit 0,25% (w/v) Trypsin in PBS abgelöst. Die Zellen wurden bei 400 g für 5 Minuten pelletiert, anschließend in frischem Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt.

##### HEp-2-Kulturmedium

MEM (Eagle) Medium mit Earle's Salzen, komplementiert mit 10% (v/v) inaktiviertem FCS, 2 mM L-Glutamin, 1× nicht essentiellen Aminosäuren, 2,5 µg/ml Amphotericin, 25 µg/ml Gentamycin und 2,5 µg/ml Vancomycin.

##### 3.1.1.2 Kultivierung von *Chlamydophila pneumoniae* AR39

In 6-Napfplatten kultivierte HEp-2-Zellen ( $1-1,5 \times 10^6$  Zellen je Napf) wurden mit *Chlamydophila pneumoniae* AR39 infiziert. Zur Verbesserung der Infektionsrate erfolgte nach Zusatz von 1 ml Chlamydien-Suspension (etwa  $5 \times 10^6-5 \times 10^7$  Chlamydien je ml) je Napf eine Zentrifugation bei 2289 g und 35 °C für 45 Minuten. Die Platten wurden bei 35 °C unter 5% CO<sub>2</sub>-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 (0,9 mm Durchmesser) in einer Spritze aufgenommen und durch eine enge Kanüle mit 0,45 mm Durchmesser in ein steriles 50-ml-Zellkulturrohrchen überführt. Durch die bei dieser Behandlung

auf die Zellen einwirkenden Scherkräfte erfolgte eine Freisetzung der Elementarkörperchen aus noch nicht lysierten Zellen. Anschließend wurde der Zelldetritus durch zehnmütiges Zentrifugieren bei 800 g und 35 °C pelletiert. Der die Elementarkörper enthaltende Überstand diente zur erneuten Infektion von HEp-2-Zellen. Bei hohen Infektionsdosen (mehr als etwa  $1 \times 10^7$  Chlamydien je ml) im vorangegangenen Zyklus erfolgte eine 1:10 Verdünnung des Chlamydien-Überstandes in CPn-Kulturmedium.

#### CPn-Kulturmedium

MEM (Eagle) Medium mit Earle's Salzen, komplementiert mit 2 mM L-Glutamin,  $1 \times$  nicht essentiellen Aminosäuren, 2,5 µg/ml Amphotericin, 25 µg/ml Gentamycin, 2,5 µg/ml Vancomycin und 1 µg/ml Cycloheximid.

#### **3.1.1.3 Langzeitlagerung von *Chlamydomphila pneumoniae***

Zur Langzeitlagerung wurde nach 3.1.1.2 gewonnene Chlamydien-Suspension mit 10% FCS versetzt und in Kryoröhrchen bei -80 °C gelagert.

#### **3.1.1.4 Konzentrationsbestimmung von *Chlamydomphila pneumoniae***

Die Konzentrationsbestimmung von *C. pneumoniae* in einer Chlamydien-Suspension erfolgte über Giemsa-Färbung infizierter Zellen und Auszählung der Einschlusskörper. Hierzu wurden  $2 \times 10^5$  HEp-2-Zellen je Napf in eine 24-Napfplatte eingesät und mit 300 µl verschiedener Verdünnungsstufen (unverdünnt, 1:10, 1:100 und 1:200) des Chlamydien-Überstandes infiziert.

48 bis 52 Stunden nach Infektionsbeginn wurden die Zellen mit eiskaltem Methanol (-20 °C) für 10 Minuten fixiert und nach Trocknen an der Luft mit 1:10 verdünnter Giemsa-Lösung für 30 Minuten gefärbt. Nach sich daran anschließenden Waschschrinen 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.

### **3.1.2 Anzucht und Manipulation von Bakterien und Hefen**

#### **3.1.2.1 Anzucht von *Escherichia coli***

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

#### LB-Agarplatten

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

### **3.1.2.2 Herstellung von chemisch kompetenten *Escherichia-coli*-Zellen**

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen mit RbCl [nach HANAHAN, 1983] wurde ausgehend von einer Einzelkolonie oder einem Aliquot einer Dauerkultur der zu transformierenden Zellen eine Übernachtskultur angelegt. Am nächsten Morgen erfolgte eine Expansion der Übernachtskultur in 100 ml LB-Medium. Bei Erreichen einer  $OD_{550\text{ nm}}$  von 0,5 wurden die Zellen fünf Minuten auf Eis gekühlt und anschließend bei 3360 g und 4 °C für fünf Minuten pelletiert. Es erfolgte eine Resuspension des Pellets in 40 ml 4 °C kalter TFB1-Lösung und Inkubation auf Eis für fünf Minuten. Nach erneuter Sedimentierung wurden die Zellen in 4 ml TFB2-Lösung aufgenommen und für weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die nun chemisch kompetenten Zellen konnten zu 100 µl aliquotiert und mit nur geringer Beeinträchtigung der Transformationseffizienz für mehrere Monate bei -80 °C gelagert werden.

#### TFB1

100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM KAc, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% (v/v) Glycerol, pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt, sterilfiltriert, Lagerung bei 4 °C.

#### TFB2

75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 15% (v/v) Glycerol, pH 6,5 mit KOH eingestellt, sterilfiltriert, Lagerung bei 4 °C.

### **3.1.2.3 Transformation chemisch kompetenter *Escherichia-coli*-Zellen**

Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli* DH5α oder One Shot TOP10 mit Plasmid-DNA [modifiziert nach HANAHAN, 1983] wurden die Zellen auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der zu transformierenden Plasmid-DNA erfolgte bei Transformation von One-Shot-TOP10-Zellen eine Inkubation auf Eis für fünf, bei DH5α-Zellen für 30 Minuten. Diese Phase dient der Adsorption der Plasmid-DNA an die Zellmembran. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für One Shot TOP10 von 30 Sekunden, für DH5α von 45 Sekunden Dauer. Dieser Schritt dient der Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zellen. Es schloss sich eine Ruhephase von 2 Minuten auf Eis an. Dann wurde einem One-Shot-TOP10-Transformationsansatz 0,25 ml SOC-Medium, einem DH5α-Transformationsansatz 0,9 ml LB-Medium zugesetzt und die Ansätze für 60 bis 90 Minuten im

Schüttelinkubator bei 37 °C und 200 bis 250 U/min inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Platten mit einem geeigneten Selektionsmarker ausplattiert.

#### **3.1.2.4 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae***

Die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte bei 30 °C in YPDA-Vollmedium im Schüttelinkubator oder im Brutschrank auf YPDA-Agarplatten oder geeigneten SD-Selektionsmediumplatten.

##### YPDA-Vollmedium

2% (w/v) Glucose, 2% (w/v) Pepton, 1% (w/v) Hefeextrakt, 0,003% (w/v) Adenin-Hemisulfat, pH 6,5.

##### YPDA-Agarplatten

2% (w/v) Glucose, 2% (w/v) Pepton, 2% (w/v) Agar, 1% (w/v) Hefeextrakt, 0,003% (w/v) Adenin-Hemisulfat, pH 6,5.

##### SD-Selektionsmediumplatten

10% (v/v) 10× Dropout-Lösung, 2% (w/v) Glucose, 2% (w/v) Agar, 0,67% (w/v) Hefe Stickstoff Basis ohne Aminosäuren, pH 5,8.

##### 10× -Leu/-Trp Dropout-Lösung

6,4 g/l -Leucin/-Tryptophan-Dropout-Supplement, Clontech, Heidelberg.

##### 10× -Ade/-His/-Leu/-Trp Dropout-Lösung

5 g/l -Adenin/-Histidin/-Leucin/-Tryptophan-Dropout-Supplement, Clontech, Heidelberg.

#### **3.1.2.5 Herstellung kompetenter *Saccharomyces-cerevisiae*-Zellen**

Eine Kolonie des zu transformierenden Hefestammes bzw. -klons wurde in 50 bis 150 ml YPDA-Vollmedium oder geeignetem Selektionsmedium über Nacht bei 30 °C und 250 U/min inkubiert. Diese Vorkultur diente dem Beimpfen einer Expansionskultur von 300 ml bei Transformationen im kleinen Maßstab bzw. 1000 ml in Versuchen zum Screening eine cDNA-Genbank. Die Expansionskultur wurde auf eine OD<sub>600 nm</sub> von 0,2 eingestellt und bei 30 °C und 250 U/min kultiviert. Nach Erreichen einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,5 wurden die Zellen für fünf Minuten bei 1000 g pelletiert, in 30 oder 500 ml TE-Puffer gewaschen und schließlich in 1,5 oder 8 ml aus 10× Stammlösungen frisch zubereiteter TE/LiAc-Lösung aufgenommen. Eine Transformation der kompetenten Zellen erfolgte innerhalb einer Stunde nach deren Präparation.

##### TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5.

#### TE/LiAc-Lösung

100 mM Lithiumacetat (LiAc); 0,01 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5.

### **3.1.2.6 Transformation kompetenter *Saccharomyces-cerevisiae*-Zellen**

Die Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode [ITO et al., 1983; modifiziert nach SCHIESTL & GIETZ, 1989; HILL et al., 1991; GIETZ et al., 1992]. Bei der verwendeten Methode erhöht die Anwesenheit alkalischer Kationen die Bereitschaft der Hefezellen zur Aufnahme von Plasmid-DNA. Dieses wird durch den Einsatz von Träger-DNA im Überschuss noch weiter erleichtert.

Zum Screening einer cDNA-Genbank wurden 0,1–0,5 mg der Genbankplasmide mit 0,2–1,0 mg DNA-BD-Plasmid in einem molaren Verhältnis von 2:1 (DNA-BD-Vektor zu AD-Vektor) mit 20 mg Träger-DNA in einem 500-ml-Gefäß gemischt und mit 8 ml der in TE/LiAc-Lösung resuspendierten kompetenten Hefezellen versetzt. Nach gutem Durchmischen wurden 60 ml einer aus Stammlösungen frisch angesetzten PEG/LiAc-Lösung hinzugegeben, gemischt und bei 30 °C unter Schütteln (200 U/min) für 30 min inkubiert. Nach Zugabe von 7 ml DMSO erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 15 min unter gelegentlichem Schwenken. Danach wurden die Zellen für 1–2 min auf Eis gekühlt und anschließend bei 1000 g für 5 min pelletiert. Nach Resuspension in 10 ml YPDA-Medium wurden die Zellen auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

Dem oben beschriebenen Procedere folgend wurden für Transformationen im kleinen Maßstab 0,1 µg Vektor, 0,1 mg Träger-DNA, 0,1 ml kompetente Zellen, 0,6 ml PEG/LiAc-Lösung und 70 µl DMSO eingesetzt. Die Resuspension erfolgte in 0,5 ml TE-Puffer.

#### TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5.

#### PEG/LiAc-Lösung

40% (w/v) PEG 4000, 100 mM LiAc, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA.

#### Träger-DNA

10 mg/ml Desoxyribonukleinsäure-Natriumsalz aus Lachshoden in TE-Puffer.

### **3.1.2.7 Yeast Mating**

Durch Yeast Mating werden zwei Hefestämme mit passendem Paarungstyp (Mat-a und Mat- $\alpha$ ) zu einem diploiden Hefestamm mit den genetischen Eigenschaften beider Stämme vereinigt [HARPER et al., 1993; FINLEY & BRENT, 1994]. Um zwei Plasmide in einen Hefeklon einzuführen, kann Yeast Mating als Alternative zur Kotransformation genutzt werden. Der Vorteil des Yeast Matings ist im Vergleich zu einer Kotransformation eine einfachere Durchführbarkeit.



Sollten Kotransformanden mit zwei Plasmiden mittels Yeast Mating erzeugt werden, so wurde zunächst *S. cerevisiae*-Stamm AH109 (Mat-a) mit dem einen, und *S. cerevisiae*-Stamm Y187 (Mat- $\alpha$ ) mit dem anderen Plasmid transformiert. Nach Anzucht auf geeigneten Selektionsplatten erfolgte das eigentliche Mating: in 0,5 ml YPDA-Medium wurde je eine Kolonie der beiden Hefestämme gründlich resuspendiert und bei 30 °C und 200 U/min für 20 h inkubiert. Schließlich wurde auf Selektionsplatten ausplattiert.

## **3.2 Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1 Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren**

#### **3.2.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus *Chlamydomonas reinhardtii***

Genomische DNA von *C. pneumoniae* wurde unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aus dem abzentrifugierten Chlamydien-Überstand nach Zellyse durch Proteinase K isoliert.

#### **3.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli***

Die Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mittels der Plasmidpräparationskits Mini, Midi und Maxi (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

In Gegenwart von RNase A und SDS wurden die Bakterienzellen im alkalischen Milieu lysiert. Chromosomale DNA, Proteine und SDS ließen sich nach der Lyse abzentrifugieren. Nach Überführung des klaren Überstandes auf der Säule des Qiagen Kits konnte die an die Silikamembran der Säule gebundene Plasmid-DNA in mehreren Waschschritten von weiteren Verunreinigungen gereinigt und schließlich in 50 µl Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) gelöst werden.

#### **3.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae***

Die Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* erfolgte unter Verwendung des Plasmidpräparationskits Mini (Qiagen) nach Lyticaseverdau der im Vergleich zu *E. coli* widerstandsfähigeren Hefe-Zellwände [LING et al., 1995].

Die Hefezellen wurden in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und mit 50 U Lyticase für eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln im Thermoblock inkubiert. Nach Vortexen für 1 min und Zugabe von 20 µl 10%iger SDS-Lösung erfolgte eine Inkubation bei -20 °C für mindestens zwei Stunden. Nach dem Auftauen und nochmaligen Vortexen wurde dem Protokoll des Herstellers analog zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* gefolgt.

#### Lyticase-Lösung

5 U/µl Lyticase in TE-Puffer, Lagerung bei -20 °C.

### **3.2.1.4 Gewinnung von Gesamt-RNA aus *Chlamydomophila-pneumoniae*-infizierten HEp-2-Zellen**

Für Transkriptionsanalysen sollte RNA des Erregers gewonnen werden. Hierzu wurden der Qiashredder und das RNeasy Mini Kit (beides Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Mit *C. pneumoniae* infizierter Zellrasen wurde in Puffer RLT des RNeasy Mini Kits aufgenommen und zur Homogenisierung durch eine QIAshredder-Säule zentrifugiert. Das Homogenisat wurde mit gleichem Teil 70%igen Ethanol versetzt und auf die Säule des RNeasy Mini Kits gegeben. Die RNA war nach Zentrifugation an die Säulen-Matrix gebunden und konnte in mehreren Waschschritten von Verunreinigungen befreit werden. Schließlich wurde die RNA in RNase freiem Wasser eluiert.

Zur Eliminierung von verunreinigender genomischer DNA erfolgte ein DNase-Verdau unter Einsatz von RQ1 RNase freie DNase (Promega) nach Angaben des Herstellers. RNA und DNase wurden in den mitgelieferten DNase-Reaktionspuffer bei 37° für 30 Minuten inkubiert. Danach erfolgte eine Inaktivierung der DNase bei 65 °C für 10 Minuten mittels RQ1 DNase Stop Mix. Die RNA-Proben wurden bei -80 °C gelagert.

### **3.2.1.5 Aufreinigung und Umpufferung von PCR-Produkten**

Sollten PCR-Produkte sequenziert oder kloniert werden, so mussten sie von verbliebenen Primern und Nukleotiden gereinigt und umpuffered werden. Hierzu wurde das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

## 3.2.2 Analyse von Nukleinsäuren

### 3.2.2.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ist die Absorption einer Lösung direkt proportional zur Konzentration der gelösten Substanz. Diese Beziehung wird zur spektralphotometrischen Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren genutzt [SAMBROOK et al., 1989].

Es wurde die Absorption bei 260 nm und 280 nm von geeigneten Verdünnungsstufen aufgereinigter DNA-Proben im Spektralphotometer gemessen. Bei 260 nm liegt das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren und für deren Konzentration in der Lösung gelten nach dem Lambert-Beerschen Gesetz folgende Beziehungen:

dsDNA:  $OD_{260\text{ nm}} = 1 = 50\ \mu\text{g/ml}$

ssDNA:  $OD_{260\text{ nm}} = 1 = 33\ \mu\text{g/ml}$

RNA:  $OD_{260\text{ nm}} = 1 = 40\ \mu\text{g/ml}$

Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt bei 280 nm. Der Quotient  $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  lässt auf die Reinheit der DNA-Probe schließen, er sollte für DNA zwischen 1,7 und 1,9 und für RNA zwischen 1,9 und 2,0 liegen.

Mit der spektralphotometrischen Bestimmung konnten Nukleinsäurekonzentrationen bis zu 0,1 mg/ml mit hinreichender Genauigkeit gemessen werden. Sollte der DNA-Gehalt von Proben geringerer Konzentration bestimmt werden, so konnte er durch Ethidiumbromid-Färbung abgeschätzt werden. Der DNA-Konzentration ist die Konzentration des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids – und damit auch der vom Ethidiumbromid nach Anregung durch UV-Licht emittierten Fluoreszenzstrahlung – direkt proportional. So konnte die Konzentration einer DNA-Lösung durch Vergleich mit einem DNA-Standard bekannter Konzentration abgeschätzt werden.

### 3.2.2.2 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese [SAMBROOK et al., 1989]. Unter Elektrophorese wird die Wanderung elektrisch geladener Teilchen durch einen Trägerstoff in einem elektrischen Feld verstanden. Nukleinsäuren wandern in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode. Werden DNA-Fragmente in ein Agarosegel eingebracht und ein elektrisches Feld angelegt, so hängt die Geschwindigkeit der Fragmente u. a. von ihrer Größe und Ladung, der elektrischen Feldstärke und dem Agarosegehalt und damit der Porengröße des Gels ab.

Zur Herstellung von Agarosegelen wurde 0,8 bis 1,5% (w/v) Agarose in 1× TAE-Puffer aufgekocht, bis eine homogene Lösung entstand. Nach Abkühlen dieser Lösung auf etwa 60 °C wurde 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Die EtBr-Agarose-Lösung wurde dann in eine mit einem Kamm bestückte Flachbettapparatur gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt, die Flachbettapparatur in eine Gelkammer platziert und das Gel mit TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 6× Auftragspuffer versetzt und in die durch den Kamm geformten Taschen des Gels eingebracht. Die Elektrophorese erfolgte bei 5 bis 10 V pro cm Gel in der Flachgelapparatur. Das in die DNA-Fragmente interkalierte Ethidiumbromid konnte durch UV-Anregung sichtbar gemacht und fotografiert werden. Zur vergleichenden Größenbestimmung dienten DNA-Molekulargewichtsstandards.

#### Tris-Acetat-EDTA- (TAE-) Puffer

40 mM Tris-HCl, 1% (v/v) Essigsäure, 1 mM EDTA (pH 8,0).

#### 6× Auftragspuffer

MBI Fermentas, St. Leon-Rot.

### **3.2.2.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen**

Nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Agarosegel wurde die aufzuarbeitende DNA-Bande auf einem Transilluminator unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Präparation und Aufreinigung des DNA-Fragments aus dem Gel erfolgten unter Verwendung des QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Das QIAEX II Gel Extraction Kit nutzt Silika-Partikel, die spezifisch und quantitativ DNA binden können. Die das DNA-Fragment enthaltende Agarose wurde bei 50 °C in einem Puffer gelöst, der das Binden der DNA an die Silika-Partikel ermöglicht. Durch Zentrifugation konnten die Silika-Partikel von der gelösten Agarose getrennt werden. Nach zwei Waschschritten zur Entfernung von verbliebenen Agaroseresten und Salzen wurde die DNA in Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) oder Wasser gelöst.

### **3.2.2.4 Sequenzierung von DNA**

Mit der Sequenzierung von DNA-Proben wurde die externe Firma SeqLab (Göttingen) beauftragt. In einem Gesamtvolumen von 7 µl wurden etwa 600 ng Plasmid-DNA mit 5 pmol des jeweiligen Primers versetzt und von SeqLab sequenziert (*Tab. 1*).

**Tab. 1:** Für Sequenzierungen verwendete Primer.

Name	Sequenz 5'→3'	Zielsequenz
pBAD SEQF	ATGCCATAGCATTTTTATCC	pBAD TOPO forward
pBAD SEQR	GATTTA ATCTGTATCAGG	pBAD TOPO reverse
T7-5'Seq-Y2H	TAATACGACTCACTATAGGGC	pGBKT7 forward
BD-3'Seq-Y2H	TTTTCGTTTTAAACCTA AGAGTC	pGBKT7 reverse
SeqY2HIM	ATTCAGACATTGGGAGAA	Mitte <i>cpn0809</i> forward
HeLaLib-5'Seq	TTACCCATACGATGTTCC	pACT2 forward
HeLaLib-3'Seq	AGGCAAACGATGTATAAATG	pACT2 reverse

### 3.2.3 Amplifikation von Nukleinsäuren

#### 3.2.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR [nach MULLIS & FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1988] ermöglicht die spezifische Vervielfältigung einer als Matrize („Template“) dienenden DNA-Sequenz. Nach Denaturierung der Template-DNA und Anlagerung sequenzspezifischer Oligonukleotide („Primer“) erfolgt die Synthese einer komplementären DNA-Kopie („Elongation“) durch eine thermostabile Polymerase. Eine exponentielle Amplifikation des durch die Primer flankierten DNA-Fragmentes wird durch zyklische Wiederholung von Denaturierung, Primeranlagerung und Synthesephase erreicht. PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung von *Taq*-DNA-Polymerase (Roche) in einem T3 Thermoblock (Biometra) durchgeführt.

#### Standard PCR-Ansatz

Template	1 bis 10 ng DNA oder etwa $10^3$ Genome von <i>C. pneumoniae</i>
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	je 0,2 mM
Primer 1 (50 $\mu$ M)	1 $\mu$ M
Primer 2 (50 $\mu$ M)	1 $\mu$ M
10x <i>Taq</i> -Puffer	5 $\mu$ l
<i>Taq</i> -Polymerase	1 U
H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ l

Auf eine Übersichtung mit Mineralöl konnte verzichtet werden, da der Thermoblock über einen beheizbaren Deckel verfügte. Nach Zugabe aller Reagenzien wurden die Reaktionsgefäße kurz anzentrifugiert und in den auf 95 °C vorgeheizten Thermoblock gestellt.

PCR Standardprotokoll

Initiale Denaturierung	96 °C, 2 min
<i>Beginn Zyklus</i>	
Denaturierung	94 °C, 30 s
Anlagerung der Primer	60 °C, 30 s
Elongation	72 °C, 1 min
<i>Ende Zyklus, Zykluswiederholungen 25–40</i>	
Abschließende Elongation	72 °C, 10 min
Pause	4 °C, ∞

Das Programm wurde je nach Primerkombination, Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes und Art der Template-DNA in Zyklenzahl, Temperatur der Primer-Anlagerungsphase und Elongationszeit abgewandelt (*Tab. 2*).

**Tab. 2:** Variable Bedingungen der durchgeführten PCR-Reaktionen, geordnet nach Anwendungen.

Anwendung	Primer	Zyklen	Anlagerung	Elongation	Produktgröße
RT-PCR <i>16S</i>	16S RTF 16S RTR	16	60 °C, 30 s	72 °C, 15 s	300 bp
RT-PCR <i>cpn0809</i>	C809 RTF C809 RTR	26	53 °C, 30 s	72 °C, 15 s	298 bp
Klonierung <i>cpn0809</i> pBAD TOPO	C809 TOPOF C809 TOPOR	40	50 °C 30 s	72 °C 30 s	756 bp
Klonierung <i>cpn0809</i> pGBKT7	C809 Y2HF C809 Y2HR	40	43 °C 30 s	72 °C 60 s	1478 bp
Amplifizierung Insert Ködervektor	T7-5'Seq-Y2H BD-3'Seq-Y2H	35	57 °C 30 s	72 °C 120 s	1737 bp
Amplifizierung Insert Beutevektor	HeLaLib-5'Seq HeLaLib-3'Seq	35	57 °C 30 s	72 °C 120 s	variabel

### 3.2.3.2 Semiquantitative RT-PCR

Zum Vergleich des relativen Transkriptionslevels eines Gens zu verschiedenen Zeitpunkten z. B. in einem Infektionsversuch eignet sich die semiquantitative RT-PCR. Der RT-PCR dient als Matrize mRNA, die durch Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben wird. Die cDNA wird dann mit einer *Taq*-Polymerase in einer PCR spezifisch amplifiziert. Zur semiquantitativen Auswertung werden die Signale der RT-PCR eines zu untersuchenden Gens mit denen eines konstitutiv exprimierten Gens verglichen. Die Anzahl der Zyklen ist so zu wählen, dass die PCR nicht in den gesättigten Bereich hineinläuft. Die RT-PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung des OneStep RT-PCR Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

HEp-2-Zellen wurden mit *C. pneumoniae* infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektionsbeginn Gesamt-RNA gewonnen. In RT-PCR-Reaktionen wurden anschließend *cpn0809* und konstitutiv transkribierte Bereiche der *16S*-Sequenz amplifiziert. Die Signale der *16S*-RT-PCR

dienten zur Normierung der RT-PCR-Analysen. Hierzu wurden die in der RT-PCR erhaltenen *16S*-Amplifikate gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Intensitätsstärken der Banden mithilfe des Programms ScanPack (Biometra) ermittelt. Die RT-PCR-Signale der verschiedenen Zeitpunkte wurden anhand der Intensitätsstärken auf das RT-PCR-Signal der 48 h nach Infektionsbeginn gewonnen Probe normiert. Unter der Annahme, dass das *16S*-Gen von *C. pneumoniae* konstitutiv exprimiert wird, ermöglichte dieses Vorgehen das Ermitteln von zu einer konstanten Anzahl an Chlamydien korrespondierenden Volumina der RT-PCR-Ansätze. Entsprechende *16S*- und *cpn0809*-cDNA-Mengen wurden anschließend durch Agarosegelelektrophorese analysiert. Durch dieses Vorgehen waren die nun erhaltenen Signale unabhängig von der im Verlauf des Infektionsversuches steigenden (und u. U. wieder fallenden) Zahl der Chlamydien.

#### RT-PCR-Reaktionsansatz

Gesamt-RNA	100 ng RNA
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	je 0,4 mM
Primer 1 (50 µM)	1 µM
Primer 2 (50 µM)	1 µM
5x OneStep RT-PCR-Puffer	10 µl
5x Q-Solution	10 µl
RT-PCR-Enzym-Mix	1 U
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

#### RT-PCR-Standardprogramm

Reverse Transkription	50 °C, 30 min
Initiale PCR-Aktivierung	95 °C, 15 min
<i>Beginn 3-Schritt-Zyklus</i>	
Denaturierung	94 °C, 30 s
Anlagerung der Primer	60 °C, 30 s
Elongation	72 °C, 15 s
<i>Ende Zyklus, Zykluswiederholungen 15–25</i>	
Abschließende Elongation, Anhängen der 5'-A	72 °C, 10 min
Pause	4 °C, ∞

Zyklenzahl und Temperatur der Primer-Anlagerungsphase wurden an die jeweiligen Bedingungen der nachzuweisenden mRNA angepasst (Tab. 3).

**Tab. 3:** Variable Bedingungen der durchgeführten RT-PCR-Reaktionen.

Anwendung	Primer	Zyklen	Anlagerung	Elongation	Produktgröße
RT-PCR <i>16S</i>	16S RTF 16S RTR	16	60 °C, 30 s	72 °C, 15 s	300 bp
RT-PCR <i>cpn0809</i>	C809 RTF C809 RTR	26	53 °C, 30 s	72 °C, 15 s	298 bp

### **3.2.4 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren**

#### **3.2.4.1 Restriktionsendonukleaseverdau von DNA**

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische DNA-Sequenzen (meist Palindrome) und spalten Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäuren durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung. Zur enzymatischen Restriktion [SAMBROOK et al., 1989] von 100 ng bis 1 µg DNA wurden 1 bis 5 U des jeweiligen Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 10 bis 15 µl unter den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen eingesetzt. Anschließend erfolgte eine Analyse durch Agarosegelelektrophorese.

#### **3.2.4.2 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 100 ng linearisierte Vektor-DNA und 1 U SAP in dem vom Hersteller gelieferten Puffer. Inkubiert wurde zur Dephosphorylierung für zehn Minuten bei 37 °C und zur Inaktivierung der SAP für 15 Minuten bei 65 °C. Die dephosphorylierte Vektor-DNA konnte ohne weitere Umpufferung in eine Ligation eingesetzt werden.

#### **3.2.4.3 Ligation von DNA mittels Quick T4 DNA Ligase**

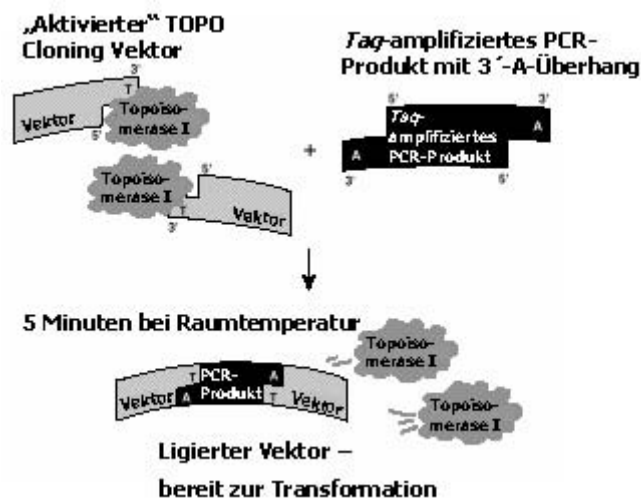
Nach Restriktion von DNA-Insert und Vektor und Dephosphorylisierung der Vektor-DNA erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung von Insert und Vektor zur Aufreinigung aus dem Agarosegel. Je Ligrationsansatz wurden etwa 50 ng Plasmid-DNA und ein 3fach molarer Überschuss der Insert-DNA eingesetzt. Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl unter Einsatz von 2000 U Quick T4 DNA Ligase (NEB) bei Raumtemperatur in 5 Minuten. Im Allgemeinen wurden nach kurzem Abkühlen auf Eis 10 µl des Ligrationsansatzes zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli* eingesetzt.

#### **3.2.4.4 Ligation von PCR-Fragmenten in TOPO-TA-Vektoren**

Zur Expression des rekombinanten CPn0809 in *E. coli* und zur Zwischenklonierung von PCR-Produkten wurden TOPO-TA-Vektoren (Invitrogen) verwendet. Der vom Hersteller linearisiert gelieferte TOPO-TA-Vektor trägt an der Klonierungsstelle an 3'-T-Überhängen kovalent



gebundene Topoisomerase I des Vaccinia Virus. Ein PCR-Produkt mit 3'-A-Überhängen konnte durch die Topoisomerase in die Vektorsequenz ohne vorherige Restriktion eingefügt werden. Bei dieser Ligationsreaktion erfolgte ein Ringschluss der Vektor-DNA und die Topoisomerase wurde freigesetzt (Abb. 5). Hierbei kann das Insert in zwei verschiedenen Orientierungen in den Vektor inseriert werden. Ein Überprüfen der Orientierung erfolgte durch Restriktion mittels Endonukleasen, die den Vektor linearisierten und das Insert asymmetrisch schnitten. In Abhängigkeit der Orientierung ergab der Restriktionsverdau unterschiedlich große DNA-Fragmente.



**Abb. 5:** Prinzip der Klonierung eines PCR-Produkts in einen TOPO-TA-Vektor. Die 3'-A-Überhänge des PCR-Produktes werden über kovalent gebundene Topoisomerase an 3'-T-Überhänge ligiert (Schaubild nach Invitrogen (<http://www.invitrogen.com>)).

Die Ligation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Das PCR-Produkt wurde auf einem EtBR-Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten und aufgereinigt. Zu 4 µl dieses aufgereinigten PCR-Produkts wurden 1 µl der mitgelieferten Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl<sub>2</sub>) und 1 µl TOPO-TA-Plasmid-DNA-Lösung gegeben. Die Salzlösung unterband das Wiederanlagern der Topoisomerase an die Vektor-DNA, denn dieses könnte zur unerwünschten Hydrolyse des Vektors führen. Die Ligation fand bei Raumtemperatur in 5 Minuten statt. Waren die Inserts größer als 1 kbp, so wurde die Inkubationsdauer auf 15 bis 30 Minuten ausgedehnt. Schließlich wurde ein Drittel des Ligationsansatzes in die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* eingesetzt.

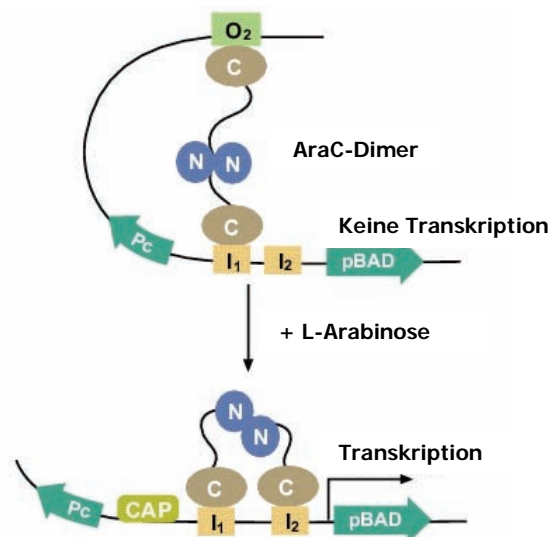
### 3.3 Proteinchemische Methoden

#### 3.3.1 Expression und Reinigung eines rekombinanten His<sub>6</sub>-Tag-Fusionsproteins

##### 3.3.1.1 Prinzip des pBAD-TOPO-Expressionssystems

Zur Herstellung eines rekombinanten His-Tag-Fusionsproteins in *E. coli* wurde der prokaryontische Expressionsvektor pBAD TOPO (Invitrogen) verwendet. Dieser Vektor verfügt u. a. über eine TOPO-TA-Klonierungsstelle, einen araBAD-Promotor und eine für einen His<sub>6</sub>-Tag kodierende Sequenz.

Die in die TOPO-TA-Klonierungsstelle des Vektors inserierte DNA-Sequenz steht unter Kontrolle eines araBAD-Promoters, welcher positiv und negativ durch das plasmidkodierte Protein AraC reguliert wird. AraC liegt als Dimer vor und bindet in Abwesenheit von Arabinose an die O<sub>2</sub>- und I<sub>2</sub>-Bindungsstellen des araBAD-Operons (Abb. 6 oben). Dadurch kommt es zur Ausbildung einer 210 bp umfassenden Schleife und die Transkription wird unterdrückt. L-Arabinose bildet mit AraC-Dimeren einen Komplex. Dieses führt zu einer Konformitätsänderung, der L-Arabinose-AraC-Dimer-Komplex gibt die O<sub>2</sub>-Bindungsstelle frei und bindet an die I<sub>1</sub>- und I<sub>2</sub>-Bindungsstellen. Hierdurch wird die Transkription ermöglicht (Abb. 6 unten).



**Abb. 6:** Regulation des araBAD-Promotors. In Abwesenheit von L-Arabinose bindet dimerisiertes AraC an die Bindungsstellen O<sub>2</sub> und I<sub>2</sub> und unterdrückt die Transkription. L-Arabinose bildet einen Komplex mit AraC-Dimeren und führt zu einer Konformitätsänderung, so dass die Transkription des abwärts gelegenen offenen Leserahmens erfolgt (Schaubild nach Invitrogen (<http://www.invitrogen.com>)).

Die in den Vektor klonierte DNA-Sequenz wird in Fusion mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag exprimiert. Der His<sub>6</sub>-Tag ermöglicht es, das rekombinante Protein über Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose aufzureinigen und mittels anti-His<sub>6</sub>-Tag-Antikörper nachzuweisen.

### **3.3.1.2 Expression des rekombinanten Proteins in *Escherichia coli***

Zur Expression des rekombinanten Proteins 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 10 ml, für die Gewinnung größerer Mengen des rekombinanten Proteins 1000 bis 1400 ml. Bei Erreichen einer OD<sub>550 nm</sub> von 0,5 erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von L-Arabinose. Die Endkonzentration der L-Arabinose betrug in den Vorversuchen 0,0002 bis 0,02% (w/v), in präparativen Expressionsversuchen 0,01% (w/v). In den Vorversuchen wurde für weitere 3,5 bis 6 Stunden, in präparativen Versuchen für 3,5 bis 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurde der Kultur ein aliquot einer OD<sub>550 nm</sub> von 1 entsprechendes Aliquot entnommen und mit einer vor Induktion entnommenen Probe mittels Western Blot und Coomassie-Färbung analysiert. Die restliche Kultur wurde bei 3360 g und 4 °C für 10 Minuten pelletiert und bei -20 °C gelagert.

### **3.3.1.3 Enzymatische Lyse von *Escherichia coli***

Zur Aufarbeitung größerer Mengen des in *E. coli* exprimierten rekombinanten Proteins wurden die Bakterien enzymatisch mit Lysozym lysiert. Hierzu wurden die pelletierten Zellen von 250 ml Kulturvolumen in 10 ml Lysispuffer resuspendiert und in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Nacheinander wurden Lysozym (Endkonzentration 200 µg/ml), Triton X-100 (Endkonzentration 1% (v/v)) und NaCl-Lösung (Endkonzentration 0,2 M) zugegeben. Nach jeder Zugabe erfolgte eine Inkubation auf Eis für 10 Minuten. Schließlich wurden lösliche und unlösliche Fraktion durch Zentrifugation bei 150.000 g und 4 °C für 40 Minuten 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 8 M Harnstofflösung aufgeköcht.

#### Lysispuffer (pH 8,0)

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol.

#### **3.3.1.4 Prinzip der Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose**

Das rekombinante Protein trägt am C-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.  $\text{Ni}^{2+}$  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  $\text{Ni}^{2+}$ -Ion aus und bindet dabei das  $\text{Ni}^{2+}$ -Ion über vier seiner sechs Koordinationsstellen. An die zwei verbleibenden Koordinationsstellen des  $\text{Ni}^{2+}$ -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.

#### **3.3.1.5 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  $\mu\text{l}$  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 20 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution des rekombinanten Proteins erfolgte mit Lösungen ansteigender Imidazolkonzentration von 20 bis 250 mM oder als Stoßelution mit 250mM Imidazolösung. Zur Stoßelution wurde die Ni-NTA-Matrix nach Überführung in einen Eppendorf-Cup in 500  $\mu\text{l}$  Elutionspuffer aufgenommen und für 30 Minuten 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  $\mu\text{l}$  des Durchlaufs und der Waschlösung und 5  $\mu\text{l}$  der Eluatfraktionen mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung bzw. Western Blot.

##### Waschpuffer (pH 8,0)

50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol.

##### Elutionspuffer (pH 8,0)

50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 20 bis 250 mM Imidazol.

### 3.3.2 Analyse von Proteinen

#### 3.3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen zur weiteren Analyse erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [nach 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 Detergens 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 (Prestained Protein Marker, New England Biolabs) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 bis 35 mA in Laemmli-Laufpuffer für etwa 90 Minuten, bis der gewünschte Grad der Auftrennung erreicht wurde.

#### 4× Proteinauftragspuffer

250 mM Tris-HCl (pH 6,8), 4% (w/v) SDS, 40% (v/v) Glycerin, 130 mM Dithiothreitol, 0,004% (w/v) Bromphenolblau.

#### Laemmli-Laufpuffer

25 mM Tris-HCl, (pH 8,3), 0,2 M Glycin, 0,1% (w/v) SDS.

#### Trenngel

12–15% (w/v) Acrylamid (Acrylamid:Bis-Acrylamid 37,5:1), 0,2% (w/v) SDS, 375 mM 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.

### **3.3.2.2 Coomassie-Färbung**

Sollten Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen sichtbar gemacht werden, so wurden sie Coomassie-gefärbt [nach 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.

#### 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.

### 3.3.2.3 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.

#### 3.3.2.3.1 Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran

Zur weiteren Analyse wurden Proteine nach Auftrennung durch SDS-PAGE im halbtrockenen, diskontinuierlichen Elektrobplotverfahren [modifiziert nach KYHSE-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 Elektrobplotverfahren von Biometra (Göttingen) wurde die Transfereinheit wie folgt luftblasenfrei aufgebaut:

1. Graphit-Anode, angefeuchtet mit Bidest
2. 6 Filterpapiere, getränkt in 300 mM Tris-HCl, pH 10,4, 20% (v/v) Methanol
3. 3 Filterpapiere, getränkt in 25 mM Tris-HCl, pH 10,4, 20% (v/v) Methanol
4. PVDF-Membran, in 100% (v/v) Methanol
5. SDS-PA-Gel
6. 9 Filterpapiere, getränkt in 40 mM 6-Aminocapronsäure, pH 7,6, 20% (v/v) Methanol
7. Graphit-Kathode, angefeuchtet mit Bidest

Der Proteintransfer erfolgte bei einem konstanten Stromfluss von 0,8 mA pro 1 cm<sup>2</sup> Transferfläche für 90 Minuten.

#### PVDF-Membran

Hybond-P, Amersham Buehler, Braunschweig.

#### Whatman-Filterpapier

Schleicher & Schüll, Dassel.

### 3.3.2.3.2 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 für eine Stunde mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten, alkalische-Phosphatase-(AP-)konjugierten Sekundärantikörper inkubiert und erneut dreimalig gewaschen. Im Anschluss erfolgte 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 H<sub>2</sub>O gestoppt und die Membran getrocknet.

#### Primärantikörper

Maus-anti-His<sub>6</sub>-Tag, IgG, 1:5000 verdünnt in Waschlösung, Qiagen, Hilden.

Maus-anti-c-Myc-Tag, IgG, 1:5000 verdünnt in Waschlösung, Sigma-Aldrich, Deisenhofen.

Kaninchen-anti-CPn0809, Serum, 1:100 verdünnt in Waschlösung.

#### Sekundärantikörper

Ziege-anti-Maus-IgG, AP-konjugiert, 1:5000 verdünnt in Waschlösung, Dianova, Hamburg.

Ziege-anti-Kaninchen-IgG, AP-konjugiert, 1:5000 verdünnt in Waschlösung, Dianova, Hamburg.

Kaninchen-anti-human-IgG, AP-konjugiert, 1:5000 verdünnt in Waschlösung, Dianova, Hamburg.

Kaninchen-anti-human-IgM, AP-konjugiert, 1:5000 verdünnt in Waschlösung, Dianova, Hamburg.

Kaninchen-anti-human-IgA, AP-konjugiert, 1:5000 verdünnt in Waschlösung, Dianova, Hamburg.

#### Blockierlösung

5% (w/v) Magermilchpulver, 0,02% (w/v) NaN<sub>3</sub> in PBS.

#### Waschlösung

0,1% (v/v) Triton X-100 in PBS.

#### Substratpuffer

2% (v/v) Diethanolamin, 98 µM MgCl<sub>2</sub> in 0,9% (w/v) NaCl.

#### NBT/X-Phosphat-Entwicklungslösung

9 ml Substratpuffer, 1 ml NBT-Lösung, 0,1 ml X-Phosphat-Lösung.



#### NBT-Lösung

1 mg/ml 4-Nitroblautetrazoliumchlorid.

#### X-Phosphat-Lösung

5 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyphosphat (BCIP) in Dimethylformamid.

### **3.3.2.4 Quantitative Proteinbestimmung**

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

### **3.3.2.5 Immunfluoreszenztest**

Der Nachweis von CPn0809 auf Einzelzellebene erfolgte mittels Immunfluoreszenztests (IFT). HEp-2-Zellen wurden auf 13 mm durchmessende Glasplättchen in 24-Napfplatten 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 zehn Minuten 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 10 µl Mowiol je Glasplättchen auf Objektträger gebracht. Nach Trocknen über Nacht bei 4 °C konnten die Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

#### Primärantikörper

Maus-anti-*C.-pneumoniae*, IgG, 1:200 verdünnt in Blockierlösung, Acris, Hiddenhausen.

Kaninchen-anti-rCpn0809, Serum, 1:100 verdünnt in Blockierlösung.

#### Sekundärantikörper

Esel-anti-Kaninchen, DTAF-konjugiert, 1:2000 verdünnt in Blockierlösung, Dianova, Hamburg.

Ziege-anti-Maus, Cy3-konjugiert, 1:2000 verdünnt in Blockierlösung, Dianova, Hamburg.

#### Blockierlösung

1% (w/v) BSA, 0,02% (w/v) NaN<sub>3</sub>, in PBS.

### Mowiol

2,4 g Mowiol (4–88), 6,0 g Glycerin, 6 ml H<sub>2</sub>O, 12 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5)

bei 4 °C rühren bis eine klare Lösung entsteht

Inkubation bei 50 °C, 10 min

Zentrifugation für 15 min, 5000 g

Aufbewahrung des Überstandes bei –20 °C.

### **3.3.2.6 Proteinextraktion aus *Chlamydomonas reinhardtii*-infizierten HEp-2-Zellen**

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

### **3.3.2.7 Proteinextraktion aus *Saccharomyces cerevisiae***

Die Proteinextraktion aus *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte über Harnstoff/SDS-vermittelten Aufschluss der Hefezellwände [modifiziert nach PRINTEN & SPRAGUE, 1994].

Eine dicht bewachsene Übernachtskultur von 5 ml Volumen des jeweiligen Hefeklones wurde nach Zugabe von 50 ml YPDA-Vollmediums bei 30 °C bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von etwa 0,6 expandiert. Nach Zufügen von sterilem Eis erfolgte eine Sedimentierung der Zellen bei 1000 g und 4 °C für 5 min. Das Pellet wurde mit eiskaltem Wasser gewaschen, die Zellen erneut sedimentiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei –70 °C gelagert.

Zur Proteinextraktion wurde das Zellpellet in 400 µl auf 60 °C vorgewärmten und mit 4 µl β-Mercaptoethanol versetzten Aufschlusspuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 300 µl Glasperlen erfolgte eine Inkubation bei 70 °C für 10 min. Die Lösung wurde für 1 min gemischt und für 5 min bei 16 000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf Eis gelagert, das Pellet für 3 bis 5 min bei 100 °C inkubiert, für 1 min gemischt und erneut bei 16 000 g für 5 min zentrifugiert. Der zweite Überstand wurde mit dem ersten vereinigt und bis zu Analyse durch SDS-PAGE und Western Blot bei –70 °C gelagert.

#### Aufschlusspuffer

8 M Harnstoff, 5% (w/v) SDS, 40 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1 mM EDTA, 0,4 mg/ml Bromphenolblau.

#### Glasperlen

Glass beads, 425–600 µm, acid washed, Sigma-Aldrich, Deisenhofen.

### **3.4 Generierung eines polyklonalen Antiserums**

#### **3.4.1 Immunisierung eines Kaninchens zur Gewinnung eines polyklonalen Antiserums**

Zur Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen CPn0809 wurde ein Kaninchen mit dem rekombinanten His<sub>6</sub>-Tag-Fusionsprotein immunisiert.

Ein Fläschchen des Adjuvans ABM-S (Antibody-Multiplier special) wurde nach Angaben des Herstellers mit 250 µg des rekombinanten Proteins in 2 ml PBS rekonstituiert. Im Abstand von zwei Wochen erfolgte eine subkutane Injektion von 1 ml dieser Emulsion an mehreren Applikationsstellen auf dem Rücken des Kaninchens. Nach weiteren zwei Wochen wurde ein Fläschchen ABM-N (Antibody-Multiplier normal) in 1 ml PBS rekonstituiert. 500 µl des Adjuvans wurden mit 70 µg rekombinantem Protein in 500 µl Elutionspuffer versetzt und zur zweiten Nachboosterung eingesetzt.

Sechs Wochen nach Erstimmunisierung erfolgte die Abnahme von 7 ml Blut aus der Ohrarterie des Kaninchens. Zur Koagulation wurde das Blut über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 3360 g und 4 °C für zehn Minuten konnte das Serum abgenommen, 1:1 mit Glycerin versetzt und bei –20 °C gelagert werden.

#### Kaninchen

New Zealand White Rabbit, Charles-River, Sulzfeld.

#### ABM-S, ABM-N

Linaris, Bettingen.

### 3.4.2 Affinitätsreinigung eines polyklonalen Antiserums

Das nach Immunisierung eines Kaninchens mit rekombinanten CPn0809 gewonnene polyklonale Antiserum sollte zum Nachweis von nativen CPn0809 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 wurde das Antiserum an HEp-2-Zelllysate präabsorbiert.

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

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

#### Lysispuffer

1% (v/v) Triton X-100 in PBS.

## 3.5 Das Yeast-Two-Hybrid-System

Um auf die Funktion von CPn0809 in der Wirtszelle schließen zu können, sollten Wirtszellproteine, die mit CPn0809 interagieren, identifiziert werden. Hierzu wurden Yeast-Two-Hybrid-Screening-Versuche unter Verwendung des MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid Systems 3 (Clontech) durchgeführt. Mithilfe eines Yeast-Two-Hybrid-Systems können Wechselwirkungen zweier bekannter Proteine charakterisiert wie auch eine cDNA-Genbank nach Interaktionspartnern eines Köderproteins durchmustert werden [FIELDS S & SONG, 1989; CHIEN et al., 1991; GOLEMIS et al., 2003].

### 3.5.1 Prinzip des Yeast-Two-Hybrid-Systems

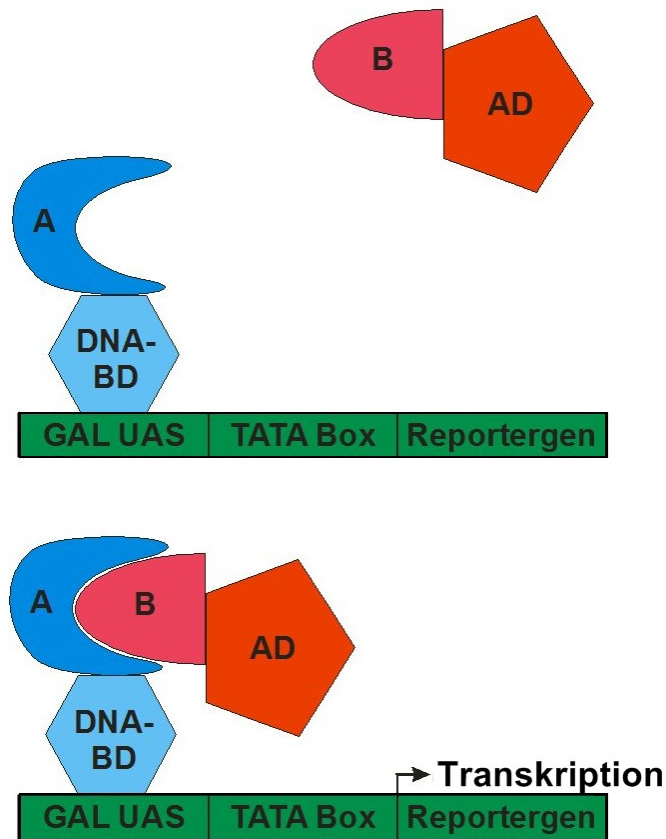
In Hefen kontrollieren zwei regulatorische Proteine, GAL4 und GAL80, die Transkription der für den Galaktose-Stoffwechsel benötigten Gene, wobei GAL4 die Transkription dieser Gene aktiviert und GAL80 selbige hemmt [GUTHRIE & FINK, 1991; HESLOT & GAILLARDIN, 1992]. Im Genom geht diesen Genen, wie auch allen anderen Strukturgenen der Hefen, eine einigermaßen konservierte Sequenz, die TATA-Box, voran. Sie definiert den Ausgangsort der Transkription und sorgt für ein basales Transkriptionsniveau. Zur Kontrolle der Transkription liegen stromaufwärts der TATA-Box cis-aktive Faktoren. Die cis-aktiven Faktoren, auch „upstream activating sequences“ (UAS) genannt, enthalten eine oder mehrere konservierte, palindromische Sequenzen, an die der trans-aktivierende Faktor GAL4 spezifisch binden kann. Bindet GAL4 an die UAS, so wird die Transkription aktiviert.

GAL4 verfügt über eine DNA-bindende und eine transkriptionsaktivierende Domäne. Diese beiden Domänen lassen sich voneinander trennen, ohne dass sie ihre jeweilige Funktion verlieren. Die DNA-bindende Domäne (im folgenden als „DNA-BD“ bezeichnet) und die für die Aktivierung der Transkription verantwortliche Domäne (im folgenden als „AD“ bezeichnet) sind auf zwei verschiedenen Hefeexpressionsvektoren des MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid Systems 3 kodiert. In diese Plasmide werden die DNA-Sequenzen zweier auf Interaktion miteinander zu untersuchender Proteine A und B kloniert, so dass die DNA-BD als Fusionsprotein mit Protein A (bezeichnet als „Köder“) und die AD als Fusionsprotein mit Protein B (als „Beute“ bezeichnet) exprimiert wird. Der DNA-BD-Vektor pGBKT7 wird auch als Ködervektor, das AD-Plasmid pACT2 als Beuteplasmid bezeichnet.

Als Selektionsmarker kodieren der Ködervektor für TRP1, ein Enzym der Tryptophan-Biosynthese, und der Beutevektor für LEU2, ein Enzym der Leucin-Biosynthese. *S. cerevisiae* AH109 ist durch Deletion von *TRP1* und *LEU2* auxotroph für Tryptophan und Leucin. Nach Transformation mit dem Köder- oder Beutevektor kann daher durch Ausplattieren auf Mangelmedium, welches kein Tryptophan bzw. Leucin enthält, auf Transformanten selektioniert werden.

Der modulare Aufbau der Promotoren in Hefen ermöglicht sowohl das Zusammenschalten eines cis-aktiven Faktors eines Gens mit der TATA-Box eines anderen Gens als auch das Verschalten eines Gens mit dem Promotor eines anderen Gens oder mit einem künstlich erzeugten Promotor. Der in dem MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 verwendete *S. cerevisiae*-Stamm AH109 verfügt über vier Reportergenkonstrukte, deren Promotoren cis-aktive Faktoren der für den Galaktose-Stoffwechsel benötigten Gene enthalten. Die Transkription dieser Reportergene steht so unter der Kontrolle von GAL4.

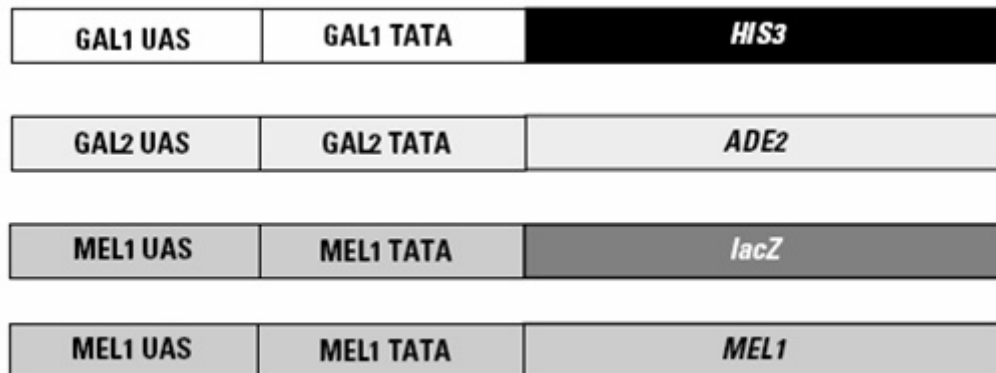
Werden DNA-BD- und AD-Plasmid durch Kotransformation in *S. cerevisiae* AH109 eingebracht, so bindet das DNA-BD-Köderfusionsprotein an die Gal4-abhängigen cis-aktiven Faktoren der Reportergene. Interagiert das Beuteprotein mit dem Köderprotein, so gelangt die GAL4-AD in räumliche Nähe der GAL4-DNA-BD und damit auch in die des Promotors, wodurch die Transkription der Reportergene aktiviert wird (Abb. 7). Um eine Aktivierung der Transkription durch endogenes Gal4 zu unterbinden, sind die Gene *GAL4* und *GAL80* im verwendeten Hefestamm deletiert.



**Abb. 7:** Prinzip des Yeast-Two-Hybrid-Systems. In *S. cerevisiae* wird Protein A („Köder“) als Fusion mit der DNA-bindenden Domäne (DNA-BD) und Protein B („Beute“) in Fusion mit der Transkription aktivierenden Domäne (AD) des regulatorischen Proteins GAL4 exprimiert. Das Köderfusionsprotein bindet über die DNA-BD an die GAL-UAS („upstream activating sequence“) (*oben*). Interagieren Protein A und Protein B miteinander, so gelangt die GAL4-AD-Domäne in räumliche Nähe der GAL4-DNA-BD-Domäne und aktiviert so die Transkription von Reportergenen (*unten*).

Die vier Reportergenkonstrukte von *S. cerevisiae* AH109 kodieren für die Proteine ADE2, HIS3, LacZ und MEL1. ADE2 ist ein Enzym des Adenin-Synthesewegs und HIS3 eines der Histidin-Biosynthese. Bei Aktivierung dieser Reporter durch Interaktion von Köder- und Beuteprotein wird die Auxotrophie von *S. cerevisiae* AH109 für Adenin und Histidin komplementiert. LacZ ist eine  $\beta$ -Galaktosidase und MEL1 eine  $\alpha$ -Galaktosidase. Sie sind in der Lage, X- $\beta$ -Gal bzw. X- $\alpha$ -Gal durch Hydrolyse in einen blauen Farbstoff umzuwandeln. Im Gegensatz zu LacZ wird MEL1 von

den Hefezellen sezerniert, wodurch ein Nachweis der MEL1-Expression auf X- $\alpha$ -Gal enthaltenden Agar möglich wird. Die vier Reportergene stehen unter der Kontrolle dreier verschiedener Promotorkonstrukte, lediglich *MEL1* und *lacZ* verfügen über das gleiche Promotorkonstrukt (Abb. 8). Durch Selektion auf Expression mehrerer Reportergene unter der Kontrolle voneinander verschiedener Promotorkonstrukte kann die Zahl der falsch-positiven Signale in einem Yeast-Two-Hybrid-Screening-Versuch vermindert werden.



**Abb. 8:** Reporter-Konstrukte in *S. cerevisiae* AH109: Die Reportergene *HIS3*, *ADE2* und *MEL1/lacZ* stehen unter der Kontrolle der drei heterologen, GAL4-abhängigen UAS und Promotor-Elemente GAL1, Gal2 und Mel1. *HIS3* und *ADE2* vermitteln Prototrophie für Histidin bzw. Adenin. *MEL1* kodiert für eine  $\alpha$ -, *lacZ* für eine  $\beta$ -Galaktosidase, welche X- $\alpha$ -Gal bzw. X- $\beta$ -Gal zu einem blauen Farbstoff umsetzen.

Statt zwei bekannte Proteine auf Interaktion zu untersuchen, ist es möglich, eine ganze cDNA-Genbank auf Interaktionspartner eines Köderproteins zu durchmustern. Hierzu wird die cDNA-Genbank statt des Beuteprotein-Gens in den AD-Vektor kloniert. Durch Plasmidpräparation und anschließende Sequenzierung lässt sich der Vertreter der cDNA-Genbank identifizieren.

### 3.5.2 Test auf Autoaktivierung der Reportergene durch DNA-BD-Konstrukte

Nach erfolgter Klonierung des auf Interaktionspartner zu untersuchenden Gens in den DNA-BD-Vektor ist es notwendig, eine Aktivierung der Reportergene allein durch das DNA-BD-Köderkonstrukt auszuschließen. Hierzu wurde *S. cerevisiae* AH109 mit dem entsprechenden Konstrukt transformiert und auf verschiedene Selektionsplatten ausplattiert:

Selektionsplatte	Erwarteter Phänotyp
SD/-Trp	Wachstum
SD/-Trp/X- $\alpha$ -Gal	Wachstum, keine Blaufärbung
SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	Kein Wachstum

### 3.5.3 Amplifikation einer cDNA-Genbank in *Escherichia coli*

Um eine Minderrepräsentation im Wachstum benachteiligter Klone zu vermeiden, erfolgte eine Amplifikation der cDNA-Genbank in *E. coli* mittels der Semi-solid-Methode [modifiziert nach KRIEGLER, 1990]. Hierzu wurden 2 l 2× semi-solid LB-Agarmedium mit 200 µg/ml Ampicillin versetzt und mit etwa  $14 \times 10^6$  primären Transformanten der cDNA-Genbank beimpft. Nach einer Inkubation im Eiswasserbad für 1 h zur Gelierung der Agarose erfolgte eine Kultivierung der Zellen bei 30 °C und gelockertem Deckel der Kulturgefäße. Nach 44 h wurden die Zellen abzentrifugiert und in 100 ml 2× LB-Glycerolmedium aufgenommen. Unter Verwendung des Qiagen Maxi Kit erfolgte eine Präparation der Plasmid-DNA nach Angaben des Herstellers.

#### cDNA-Genbank

Human HeLa MATCHMAKER cDNA Genbank in *E. coli* BNN132 (Clontech)

mRNA-Quelle: HeLa (Humane Zervix-Karzinom-Epitheloidzellen, ATCC: CCL-2)

Vektor: pACT2

Anzahl der unabhängigen Klone:  $3,5 \times 10^6$

Durchschnittliche cDNA-Größe: ca. 2,0 kb.

#### 2× semi-solid LB-Agarmedium

2% (w/v) Trypton, 1% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, 0,3% (w/v) Seaprep Agarose (BMA), autoklaviert.

#### 2× LB-Glycerolmedium

12,5% (v/v) Glycerol, 2% (w/v) Trypton, 1% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, autoklaviert.

### 3.5.4 Yeast-Two-Hybrid-Screen einer HeLa-cDNA-Genbank

Zum Durchmustern einer HeLa-cDNA-Genbank wurde *S. cerevisiae* AH109 mit dem Köder- und Beuteplasmid transformiert und auf Aktivierung der Reportergene selektioniert. In verschiedenen Yeast-Two-Hybrid-Versuchen wurde das Vorgehen hinsichtlich Transformationsstrategie und Selektionsstringenz variiert. Transformation und Kultivierung der Hefen wurden im Kapitel 3.1.2 der vorliegenden Arbeit abgehandelt.

In einem Yeast-Two-Hybrid-Screening-Versuch können Köder- und Beuteplasmid entweder durch sequentielle Transformation oder durch Kotransformation eingebracht werden. Vorteil der sequentiellen Transformation ist die im Allgemeinen höhere Transformationseffizienz, die den Einsatz geringerer Mengen an Plasmid-DNA ermöglicht. Nachteil der sequentiellen Transformation ist die mögliche Akkumulation von Klonen, die aus spontanen Deletionen im Köderplasmid hervorgehen, falls das DNA-BD-Konstrukt eine Benachteiligung im Wachstum für



die Hefezellen darstellt. Dieses lässt sich durch eine Kotransformation vermeiden. Weiterer Vorteil ist die im Vergleich zur sequentiellen Transformation einfachere und schnellere Durchführbarkeit.

Bei der sequentiellen Transformation wurde *S. cerevisiae* AH109 zunächst mit dem Ködervektor transformiert. In einem zweiten Schritt erfolgte die Transformation eines das Köderkonstrukt tragenden Klones mit 100 µg Plasmid-DNA der HeLa-cDNA-Genbank. Zur Kotransformation wurden 165–500 µg Beuteplasmid und Köderplasmid im Überschuss (325–850 µg) eingesetzt.

Die Selektionsstringenz wird durch die Selektivität des Mediums, auf dem der Transformationsansatz ausplattiert wird, bestimmt. Sie konnte von niedrig bis hoch variiert werden. Niedrige Selektionsstringenz wird erreicht durch Ausplattieren der Hefezellen nach Transformation mit der cDNA-Genbank auf Mangelmedium für Leucin und Tryptophan (SD/–Leu/–Trp), so dass zunächst lediglich auf eine erfolgreiche Kotransformation mit Köder- und Beuteplasmid selektioniert wird. Für eine mittlere Stringenz wird auf Aktivierung eines Reporters – im Allgemeinen *HIS3* –, für eine hohe auf Aktivierung der Reporter *ADE2*, *HIS3* und *MEL1* selektioniert (Tab. 4). Bei Anwendung der niedrig oder mittel stringenten Selektion müssen die auf den entsprechenden Platten gewachsenen Klone auf Selektionsmedium höherer Stringenz überführt werden, um die Aktivierung aller Reporter zu testen. Die niedrig stringente Selektion besitzt den Vorteil, auch sehr schwache Wechselwirkungen zwischen Proteinen detektieren zu können. Durch die ausschließliche Selektion auf erfolgreiche Kotransformation muss jedoch mit Wachstum sehr vieler Kolonien gerechnet werden. Je höher die Stringenz, desto weniger falsch-positive Interaktionskandidaten sind zu erwarten. Jedoch nimmt mit steigender Stringenz auch die Empfindlichkeit des Yeast-Two-Hybrid-Systems für Proteininteraktionen ab, so dass bei hoher Stringenz die Gefahr besteht, schwache Interaktionen zwischen dem Köder und einem Genbank-Protein nicht mehr detektieren zu können. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Screeningversuchen wurde eine mittlere oder eine hohe Selektionsstringenz eingesetzt.

**Tab. 4:** Übersicht über die anwendbaren Selektionsstringenzen.

Stringenz	niedrig	mittel	hoch
Selektion auf	erfolgreiche Kotransformation	Aktivierung von <i>his3</i>	Aktivierung von <i>ade22</i> , <i>his3</i> , <i>mel1</i>
Selektionsmedium	SD/–Leu/–Trp	SD/–His/–Leu/–Trp	SD/–Ade/–His/–Leu/–Trp/X-α-Gal

### 3.5.5 Ausschluss unspezifischer Aktivierung der Reporter

Bei der Auswertung eines Yeast-Two-Hybrid-Screening-Versuches ist mit falsch-positiven Klonen unter den Interaktionskandidaten zu rechnen. Verschiedene Gruppen falsch-positiver Klone

konnten identifiziert werden [BARTEL et al., 1993a], einige führen zu Aktivierungen der Reportergene, die nicht spezifisch für die Interaktion mit einem bestimmten Köder sind.

Um die Interaktionskandidaten auf eine nicht für das eingesetzte DNA-BD-CPn0809-Konstrukt spezifische Aktivierung der Reportergene zu testen, wurde geprüft, ob die Beutekonstrukte dieser Klone mit anderen Köderkonstrukten zu einer Aktivierung der Reporter führten. In diesen Versuchen wurde ein Ködervektor ohne Insert und ein DNA-BD-LaminC-Konstrukt eingesetzt.

Zur Durchführung dieses Kontrollversuches erfolgte zunächst eine Präparation der Plasmide aus den Interaktionskandidaten. Die gewonnenen Plasmidpräparationen enthielten sowohl den Ködervektor pGBKT7-*cpn0809* als auch das für den Kontrollversuch gewünschte Genbank-Beuteplasmid. Da Plasmidpräparationen aus Hefezellen nicht bezüglich Ausbeute und Reinheitsgrad mit denen aus *E. coli* vergleichbar sind, wurde das Beuteplasmid unter Selektion auf Ampicillinresistenz in *E. coli* propagiert. So konnte zum einen die Kontamination mit chromosomaler DNA und Proteinen der Hefen beseitigt und zum anderen das Köderplasmid eliminiert werden. Dieses gelang aufgrund unterschiedlicher Selektionsmarker: das Beuteplasmid trägt einen Ampicillinresistenzmarker, das Köderplasmid hingegen ein Kanamycinresistenzgen und wurde bei Selektion auf Ampicillin von den *E. coli*-Zellen ausgestoßen. Schließlich erfolgte eine Transformation von *S. cerevisiae* AH109 mit dem amplifizierten und aufgereinigten Beuteplasmid und von *S. cerevisiae* Y187 mit den verschiedenen Köderkonstrukten. Durch Yeast Mating (Kapitel 3.1.2.7) wurden Kotransformanten für das Beuteplasmid und jeweils eines der Köderkonstrukte erzeugt. Die Ansätze wurden zum Test auf Aktivierung der Reporter auf SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- $\alpha$ -Gal ausplattiert. Eine erfolgreiche Verschmelzung der Hefeklone konnte durch Ausplattieren eines Aliquots auf SD/-Leu/-Trp sichergestellt werden.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Eigenschaften von CPn0809

Der offene Leserahmen *cpn0809* umfasst im *Chlamydophila pneumoniae*-Stamm AR39<sup>1</sup> 1467 bp und kodiert für 488 Aminosäuren. Die vorhergesagte Proteingröße beträgt 50 kDa. Der GC-Gehalt von *cpn0809* liegt mit 46% über dem des gesamten Genoms (41%).

Ein Homologievergleich von CPn0809 mittels BLAST-Analyse<sup>2</sup> gegen eine Proteindatenbank [ALTSCHUL et al., 1997] lieferte nennenswerte Ähnlichkeiten zu den Proteinen CCA00954 von *Chlamydophila caviae* GPIC (56% Identität,  $E = 8 \times e^{-142}$ ), CAB923 von *Chlamydophila abortus* (54% Identität,  $E = 2 \times e^{-141}$ ), CT578 von *Chlamydia trachomatis* D/UW-3/CX (53% Identität,  $E = e^{-132}$ ) und TC087 von *Chlamydia muridarum* Nigg (52% Identität,  $E = 2 \times e^{-130}$ ). Auffallend war eine relativ geringe Homologie zu CPn0808 (23% Identität,  $E = 7 \times e^{-12}$ ). Die Funktion dieser hypothetischen Proteine ist nicht bekannt.

Darüber hinaus fanden sich keine nennenswerten Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen.

CPn0809 wurde mithilfe der Anwendungen PSORT<sup>3</sup> und SignalP 3.0 Server<sup>4</sup> auf mögliche Signalpeptide untersucht [BENDTSEN et al., 2004; GARDY et al., 2005]. Es ergab sich kein Anhalt für das Vorhandensein eines Signalpeptides oder einer zu einem Signalpeptid gehörigen Schnittstelle.

Zur Identifizierung möglicher konservierter Domänen wurde die frei zugängliche Anwendung ScanProsite<sup>5</sup> verwendet [GATTIKER et al., 2002; HULO et al., 2004]. Außer einer Alanin-reichen

---

<sup>1</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde die von KALMAN et al. [1999] für *Chlamydophila pneumoniae* CWL029 eingeführte Nomenklatur der Genloci auf den verwendeten Stamm *Chlamydophila pneumoniae* AR39 übertragen. READ et al. [2000] verwendeten bei Veröffentlichung des sequenzierten Genoms von *Chlamydophila pneumoniae* AR39 eine andere Nomenklatur, nach der der zu *cpn0809* homologe offene Leserahmen die Bezeichnung *cp1062* trägt.

<sup>2</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

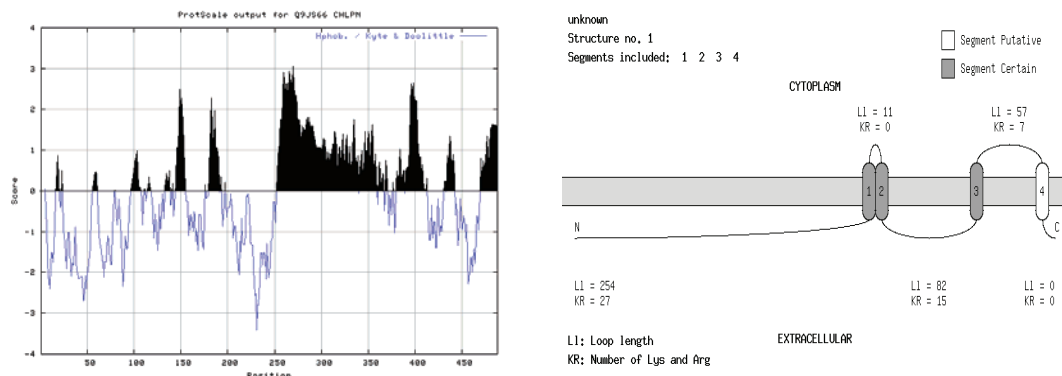
<sup>3</sup> <http://www.psort.org>

<sup>4</sup> <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

<sup>5</sup> <http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>

Region unbekannter Funktion (Aminosäuren 271–357) konnte jedoch keine konservierte Domäne erkannt werden.

Nach Kyte und Doolittle wurde unter Verwendung von ProtScale<sup>6</sup> ein Hydropathie-Plot durchgeführt [KYTE & DOOLITTLE, 1982; GASTEIGER et al., 2005]. Nach diesem Algorithmus weist CPn0809 einen hydrophoben C-Terminus bei relativ hydrophilem N-Terminus auf (*Abb. 9 links*). Die drei bzw. vier Peaks des Hydropathie-Plots in der N-terminalen Hälfte könnten mögliche Transmembrandomänen repräsentieren. Eine Analyse unter Verwendung des von von Heijne entwickelten Algorithmus zur Vorhersage der Struktur von Membranprotein mittels TopPred II<sup>7</sup> [VON HEIJNE, 1992; CLAROS & VON HEIJNE, 1994] stützt diese Prognose (*Abb. 9 rechts*).



**Abb. 9:** *Links:* Hydropathie-Plot für CPn0809 nach KYTE & DOOLITTLE [1982], erstellt mit ProtScale<sup>6</sup>. Positive Werte stehen für Hydrophobizität. *Rechts:* Vorhersage von Transmembranregionen nach VON HEIJNE [1992] mittels TopPred II<sup>7</sup>. Für den Bereich des hydrophoben N-Terminus werden drei bis vier Transmembrandomänen vorhergesagt.

## 4.2 Transkription von *cpn0809* in *Chlamydomonas reinhardtii* AR39

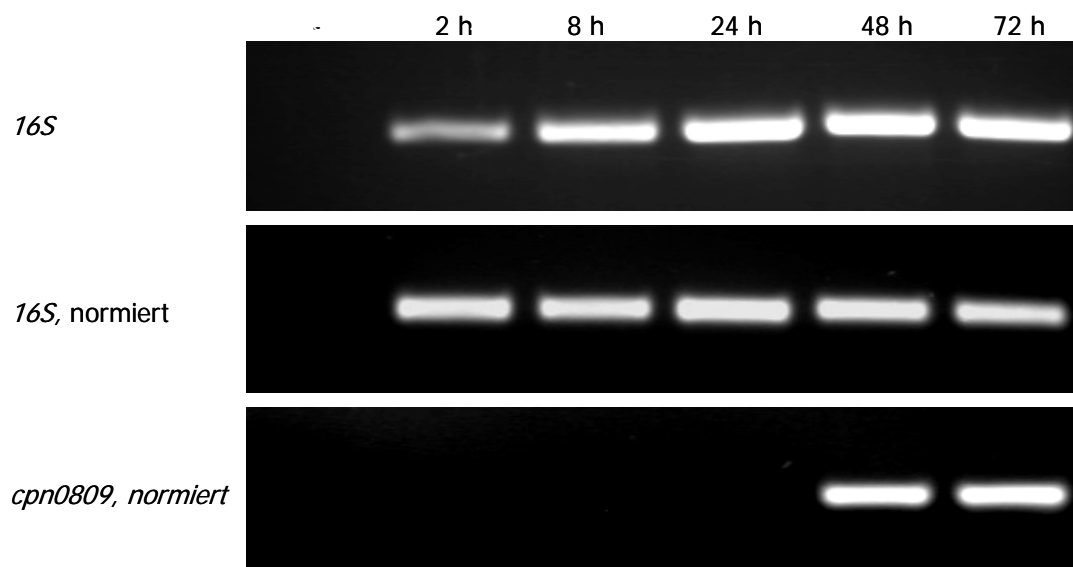
Um nachzuweisen, ob und zu welchen Zeitpunkten des Infektionszyklus der offene Leserahmen *cpn0809* von *Chlamydomonas reinhardtii* AR39 transkribiert wird, wurden semiquantitative RT-PCR-Analysen durchgeführt.

<sup>6</sup> <http://www.expasy.org/tools/protscale.html>

<sup>7</sup> <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>

Gesamt-RNA mit *Chlamydomophila pneumoniae* infizierter HEp-2-Zellen (MOI = 1:1) wurde zu den Zeitpunkten 2 h, 8 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Infektionsbeginn gewonnen und in RT-PCR-Reaktionen eingesetzt. Die auf die reverse Transkription folgende PCR amplifizierte spezifisch ein 298 bp großes Fragment von *cpn0809*. Um eine vermehrte Transkription bedingt durch die Proliferation der Chlamydien während des Versuchszeitraums zu berücksichtigen, wurden die in die Analyse durch Gelelektrophorese eingesetzten cDNA-Mengen anhand der Transkriptionsstärken der konstitutiv exprimierten *16S*-Sequenz normiert. Eine DNA-Kontamination der RNA-Proben konnte durch eine PCR ohne RT-Reaktion ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Wurde im Infektionsversuch die MOI auf 10 gesteigert, so ergab sich in der Transkriptions-Analyse zu den gezeigten Resultaten kein signifikanter Unterschied (Daten nicht gezeigt).

Unter den gewählten Bedingungen konnte getestet werden, dass *cpn0809* nur zum Zeitpunkt 48 h und 72 h nach Infektionsbeginn bei konstanten Signalstärken transkribiert wird (Abb. 10). Die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse von *cpn0809* wurden in drei von einander unabhängigen Versuchen repliziert.



**Abb. 10:** Analyse der Transkription von *cpn0809* in *C. pneumoniae*-AR39-infizierten HEp-2-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten des Entwicklungszyklus mittels semiquantitativer RT-PCR. Die Transkriptionsanalysen wurden dreimal unabhängig von einander repliziert, gezeigt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes. *Oben:* RT-PCR des konstitutiv exprimierten *16S*-Gens. *Mitte:* Normierte Signale der *16S*-RT-PCR. *Unten:* Normierte Signale der RT-PCR für *cpn0809*. Als Negativkontrolle (-) dienten nicht infizierte Zellen.

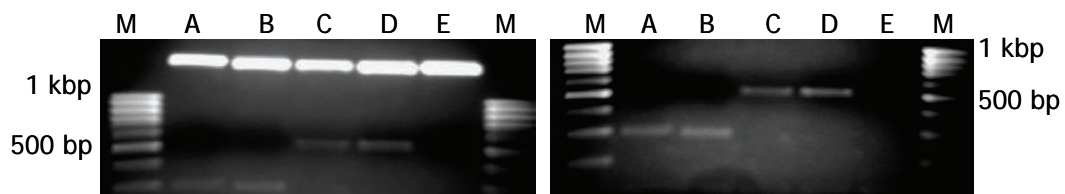
### 4.3 Expression von CPn0809

Um die Expression und die Lokalisation in der Wirtszelle von CPn0809 zeigen zu können, musste ein polyklonales Antiserum generiert werden. Hierzu bedurfte es der Herstellung von rekombinantem CPn0809 und dessen Aufreinigung.

#### 4.3.1 Klonierung eines rekombinanten *cpn0809*-Fragmentes in *Escherichia coli*

Das Gen *cpn0809* trägt im C-terminalen Abschnitt Bereiche, die für mutmaßlich stark hydrophobe Regionen kodieren (Abb. 9). Da stark hydrophobe rekombinante Proteine oftmals toxische Effekte auf die Zellen, in denen sie exprimiert werden, zeigen und sich im Vergleich zu nicht hydrophoben Proteinen erheblich schwieriger aufreinigen lassen, wurde ein den N-Terminus umfassendes Fragment von 252 Aminosäuren Länge in *E. coli* zur Expression gebracht.

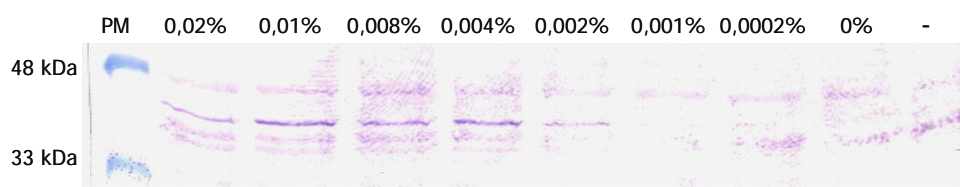
Das zu exprimierende *cpn0809*-Fragment wurde mittels PCR unter Einsatz chromosomaler *Chlamydomophila*-DNA als Matrize amplifiziert und aufgereinigt. Als prokaryontischer Expressionsvektor diente pBAD-TOPO, welcher das direkte Klonieren des 756 bp langen PCR-Produkts über kovalent gebundene Topoisomerase in Fusion mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag ermöglichte. Das Klonieren mithilfe der Topoisomerase machte eine Überprüfung der Orientierung des in den Vektor klonierten DNA-Fragmentes durch Restriktion notwendig, da die Ligation in beiden Orientierungen erfolgen kann. BamHI linearisierte den mit Insert 4,9 kbp großen Vektor und SacI schnitt das DNA-Fragment asymmetrisch, so dass sich je nach Orientierung unterschiedlich große Fragmente ergaben und Konstrukte mit korrekter Orientierung ausgewählt werden konnten (Abb. 11). Eine Sequenzierung der Plasmidkonstrukte diente dem Ausschluss durch die PCR generierter Mutationen und dem Nachweis, dass das klonierte DNA-Fragment im intakten offenen Leserahmen in Fusion mit His<sub>6</sub>-Tag und Startkodon liegt.



**Abb. 11:** Überprüfung der pBAD-TOPO-*cpn0809*-Konstrukte auf die Orientierung der Inserts durch Restriktion. BamHI linearisiert den mit Insert 4,9 kbp großen Vektor, SacI schneidet das klonierte *cpn0809*-Fragment asymmetrisch, so dass bei korrekter Orientierung ein 532 bp (Klon C und D), bei falscher ein 284 bp Fragment (Klon A und B) entsteht. Klon E trägt kein Insert. (M): DNA-Längenstandard (100 bp DNA Ladder).

### 4.3.2 Optimierung der Expression des rekombinanten CPn0809-Fragmentes in *Escherichia coli*

Für die Versuchsreihe zur Testung auf Induzierbarkeit des Fusionsproteins und Optimierung der Expression wurde ein in der Sequenzierung bestätigter Klon ausgewählt. In Kulturvolumina von 10 ml erfolgte die Induktion der Expression unter Verwendung von L-Arabinose-Konzentrationen zwischen 0,02% und 0,0002%. Als Negativkontrollen dienten zum einen eine nicht induzierte Kultur des ausgewählten Klones, zum anderen eine Kultur eines Klones, der den Expressionsvektor ohne Insert trug. Vergleichbare Mengen der Zellysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine unspezifisch durch Färbung nach Coomassie (Daten nicht gezeigt) und spezifisch im Western Blot mit einem gegen das His<sub>6</sub>-Tag gerichteten Antikörper gefärbt (Abb. 12).

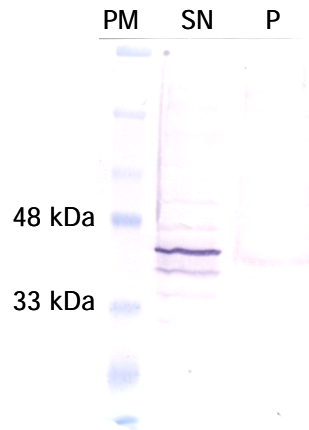


**Abb. 12:** Western-Blot-Analyse des Versuches zur Optimierung der Expression des rekombinanten CPn0809 (vorhergesagte Größe 31 kDa). Die Induktion der Expression erfolgte mit L-Arabinose-Konzentrationen von 0,0002 bis 0,02%. Vergleichbare Mengen der Zellysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Mittels eines anti-His<sub>6</sub>-Tag-Antikörpers konnte im Western Blot in Höhe von etwa 38 kDa eine spezifische Bande detektiert werden, die bei Induktion 0,01% L-Arabinose am kräftigsten war. Negativkontrollen: (0): keine Induktion erfolgt, (-): Expressionsvektor ohne Insert tragender Klon. (PM): Proteingrößenstandard.

Im Western Blot zeigten sich bei Induktion mit L-Arabinose-Konzentrationen zwischen 0,02% und 0,002% in Höhe von etwa 38 kDa spezifische Banden, die in den Proben der Negativkontrollen nicht zu detektieren waren. Die theoretisch vorhergesagte Molekülgröße lag bei 31 kDa. Die Abweichung zwischen der apparenten 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% aufweisen kann. Die Expressionsstärken unterschieden sich für die verschiedenen L-Arabinose-Konzentrationen nur unerheblich. Eine Verlängerung der Inkubationszeit unter Expressionsbedingungen von 3,5 h auf 5 h oder 6 h Stunden führte nicht zu einer höheren Ausbeute (Daten nicht gezeigt), so dass für die weiteren Expressionsversuche eine L-Arabinose-Konzentration von 0,01% und eine Inkubationszeit von 3,5 h gewählt wurde.

Weiterhin galt es zu klären, ob sich das rekombinante Protein nach enzymatischer Lyse der *E. coli*-Zellen in der löslichen oder der unlöslichen Fraktion befand. Rekombinantes CPn0809 wurde in *E. coli* exprimiert, die Zellen durch enzymatische Lyse unter Einsatz von 1% Triton X-100,

200 µg/ml Lysozym und 0,2 M NaCl aufgeschlossen und lösliche von unlöslicher Fraktion durch Ultrazentrifugation getrennt. Nach Aufkochen der unlöslichen Fraktion in 8 M Harnstoff erfolgte eine Auftrennung vergleichbarer Mengen beider Fraktionen durch SDS-Page und die Analyse der Proben im Western Blot (*Abb. 13*) bzw. durch Coomassie-Färbung (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 13:** Enzymatische Lyse der *E. coli*-Zellen und Vergleich der löslichen (SN) und unlöslichen (P) Fraktion. Im Western Blot konnte das rekombinante CPn0809 mit einem anti-His<sub>6</sub>-Tag-Antikörper ausschließlich in der löslichen Fraktion detektiert werden. Darunter zeigte sich eine weitere, schwächere Bande, die durch proteolytische Spaltung des rCPn0809 bedingt sein könnte. (PM): Proteingrößenstandard.

Im Western Blot konnte nur in der löslichen Fraktion eine spezifische Bande in Höhe von 38 kDa detektiert werden, weshalb in den folgenden Versuchen auf die Aufarbeitung der unlöslichen Fraktion verzichtet wurde.

### 4.3.3 Expression und Aufreinigung des rekombinanten CPn0809-Fragmentes in *Escherichia coli*

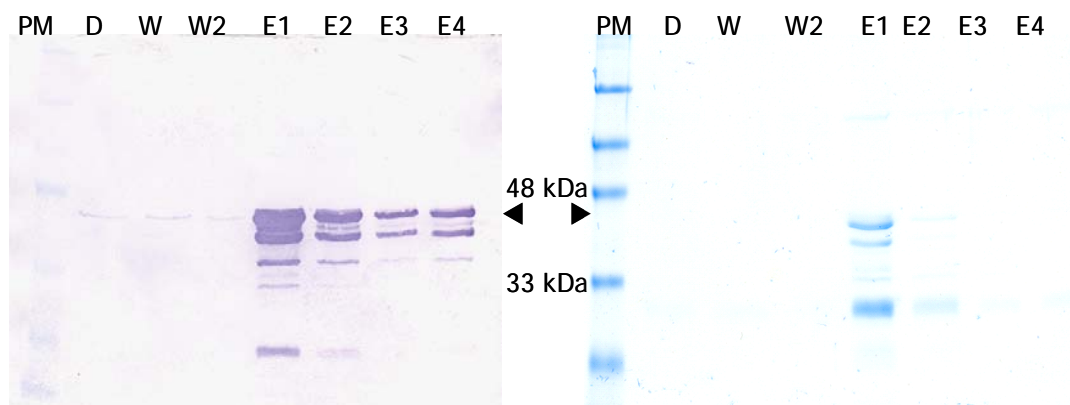
Zur Herstellung größerer Mengen des rekombinanten CPn0809 erfolgte die Expression in Kulturvolumina von 1000 bis 1400 ml bei einer Induktionsdauer von 3,5 bis 4 h. Nach enzymatischer Lyse der *E. coli*-Zellen wurde das Lysat mit Ni-NTA-Suspension versetzt, über Nacht bei 4 °C inkubiert und auf einer Säule mit 10 mM Imidazol-Lösung gewaschen. Die Elution des rekombinanten Proteins erfolgte durch ansteigende Imidazolkonzentrationen von 20 bis 250 mM.

Hierbei zeigte sich, dass das rekombinante Protein in allen Eluatfraktionen detektiert werden konnte. Neben CPn0809 waren allerdings noch weitere Proteine zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Deshalb erfolgte eine weitere Aufreinigung des rekombinanten Proteins.

Die verschiedenen Eluatfraktionen wurden hierzu vereinigt, auf eine Imidazolkonzentration von 10 mM eingestellt und über Nacht erneut an Ni-NTA gekoppelt. Nach Überführen der Suspension



auf eine Säule und mehreren Waschschrritten erfolgte die Elution in Gegenwart von 250 mM Imidazol. Das Eluat wurde in vier Fraktionen in einem Volumen von je 0,5 ml aufgefangen (Abb. 14).



**Abb. 14:** Aufreinigung des rekombinanten CPn0809. Im Western Blot (*links*) konnte das rekombinante CPn0809 (◄) unter Verwendung eines anti-His<sub>6</sub>-Tag-Antikörpers in den Eluatfraktionen (E1 - E4) detektiert werden, nicht jedoch im Durchlauf (D) und in der Waschlösung (W1 und W2). In der Coomassie-Färbung (*rechts*) war neben CPn0809 noch eine weitere Proteinbande zu erkennen. Die niedermolekularen Banden könnten durch eine proteolytische Spaltung des rCPn0809 bedingt sein. (PM): Proteingrößenstandard.

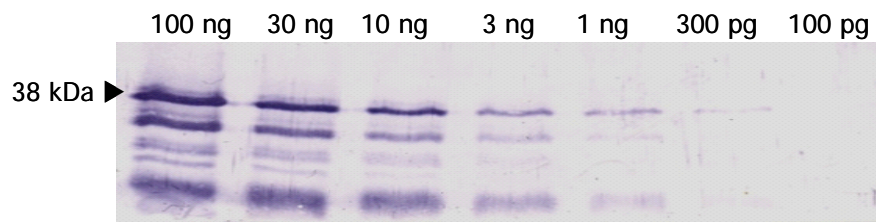
Eine quantitative Abschätzung erfolgte mittels des BCA Protein Assay Kits (Pierce) (Tab. 5).

**Tab. 5:** Konzentration der rCPn0809-Lösungen und Ausbeute der Aufarbeitung.

Eluatfraktion	Proteinkonzentration	Ausbeute
E1	550 µg/ml	225 µg
E2	175 µg/ml	87,5 µg
E3	45 µg/ml	22,5 µg
E4	69 µg/ml	34,5 µg

#### 4.3.4 Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen rCPn0809

Zur Gewinnung eines polyklonalen Antiserums wurde ein Kaninchen mit 100 µg Protein der rCPn0809-Lösung E1 immunisiert. Im Abstand von je zwei Wochen erfolgten insgesamt zwei Nachboosterungen unter Einsatz von 100 µg Protein der rCPn0809-Lösung E1 bzw. 87 µg der Lösung E2. Nach weiteren zwei Wochen wurden 7 ml Blut entnommen und daraus Serum gewonnen. Die Sensitivität des Serums wurde in einem Western Blot mit rekombinantem CPn0809 getestet. Das 1:100 verdünnte polyklonale Antiserum konnte im Western Blot 1 ng rekombinantes CPn0809 gut detektieren. 300 pg des rekombinanten Proteins lieferten lediglich ein schwaches Signal (Abb. 15).



**Abb. 15:** Sensitivität des 1:100 verdünnten polyklonalen anti-CPn0809-Serums im Western Blot. Eingesetzt wurden 100 pg – 100 ng rekombinantes CPn0809. Bis zu 1 ng rCPn0809 konnten noch gut detektiert werden, 300 pg lieferten nur noch ein schwaches Signal. Die niedermolekularen Banden könnten durch proteolytische Spaltung des rCPn0809 bedingt sein.

### 4.3.5 Präabsorption des polyklonalen Kaninchenserums

Das polyklonale Antiserum gegen rCPn0809 sollte für Expressionsanalysen in Western Blots und Immunfluoreszenztests mit *Chlamydomphila pneumoniae* infizierten HEp-2-Zellen eingesetzt werden. In Vorversuchen zeigten sich Kreuzreaktionen des Antiserums mit Wirtszellproteinen (Daten nicht gezeigt). Zur Verminderung der hieraus resultierenden unspezifischen Hintergrundfärbung erfolgte eine Abminderung der kreuzreagierenden Antikörper durch Präabsorption an auf PVDF-Membranen gekoppeltes HEp-2-Zelllysate.

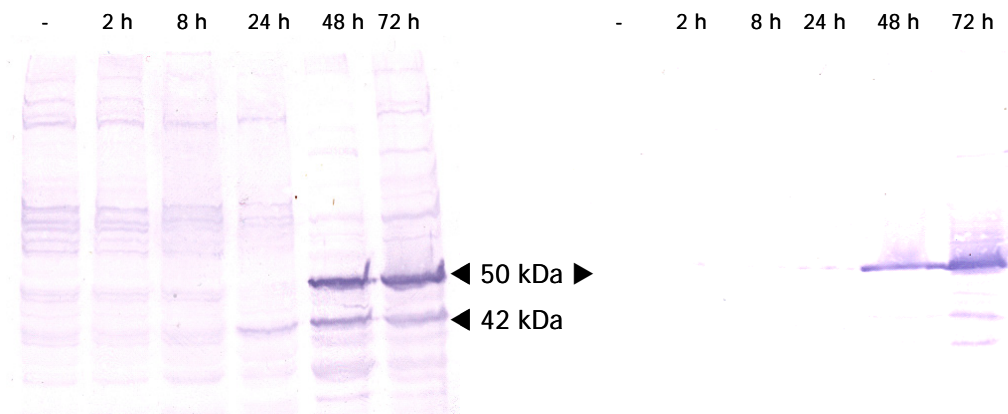
### 4.3.6 Expression von CPn0809 in *Chlamydomphila pneumoniae* AR39

Nach erfolgtem Nachweis der Transkription des für das hypothetische Protein CPn0809 kodierenden Gens sollte auch dessen Expression in *Chlamydomphila pneumoniae* gezeigt werden. Hierzu wurden HEp-2-Zellen mit einer MOI von 1 mit *C. pneumoniae* AR39 infiziert. Zu den Zeitpunkten 2 h, 8 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Infektionsbeginn wurde Gesamt-Protein zur späteren Analyse gewonnen. Nach Lyse der infizierten Wirtszellen wurden lösliche (Überstand) und unlösliche (Pellet) Fraktionen bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur Western-Blot-Analyse wurde eine Proteinmenge, die  $0,4 \times 10^6$  (Pellet) bzw.  $0,2 \times 10^6$  Zellen (Überstand) entsprach, gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot unter Einsatz des 1:100 verdünnten polyklonalen anti-rCPn0809-Serums untersucht. Als Negativkontrolle diente Gesamt-Protein nicht infizierter HEp-2-Zellen. 48 h und 72 h nach Infektionsbeginn konnten sowohl in der löslichen als auch in der unlöslichen Fraktion ein Protein der Größe von etwa 50 kDa detektiert werden (Abb. 16). In der unlöslichen Fraktion zeigte sich ab 24 h nach Infektionsbeginn ein weiteres Protein der Größe von etwa 42 kDa, die sich in der Negativkontrolle nicht präsentierte. Trotz der erfolgten Affinitätsreinigung des Antiserums zeigte sich vor allem in der Western-Blot-Untersuchung der unlöslichen Fraktion eine unspezifische Färbung des Hintergrundes durch

kreuzreagierende Antikörper. Die Ergebnisse der Expressionsanalysen von CPn0809 wurden in drei unabhängigen Versuchen repliziert. Wurde im Infektionsversuch die MOI auf 10 gesteigert, so ergab sich in der Western-Blot-Analyse zu den gezeigten Resultaten kein signifikanter Unterschied (Daten nicht gezeigt).

Die Expression von CPn0809 in mit *Chlamydomphila pneumoniae* AR39 infizierten HEp-2-Zellen konnte also ab 48 h nach Infektionsbeginn gezeigt werden.



**Abb. 16:** Expression von CPn0809 in *Chlamydomphila-pneumoniae*-AR39-infizierten HEp-2-Zellen 2 h bis 72 h nach Infektionsbeginn. Im Western Blot konnte mit anti-rCPn0809-Serum (1:100 verdünnt) CPn0809 (◄) sowohl in der unlöslichen (*links*) als auch in der löslichen (*rechts*) Fraktion 48 h nach Infektionsbeginn detektiert werden. Negativkontrolle (-): nicht infizierte HEp-2-Zellen. Die Expressionsanalysen wurden in drei unabhängigen Versuchen repliziert, gezeigt ist das Ergebnis eines repräsentatives Experimentes.

### 4.3.7 Lokalisation von CPn0809 in *Chlamydomphila-pneumoniae*-infizierten HEp-2-Zellen

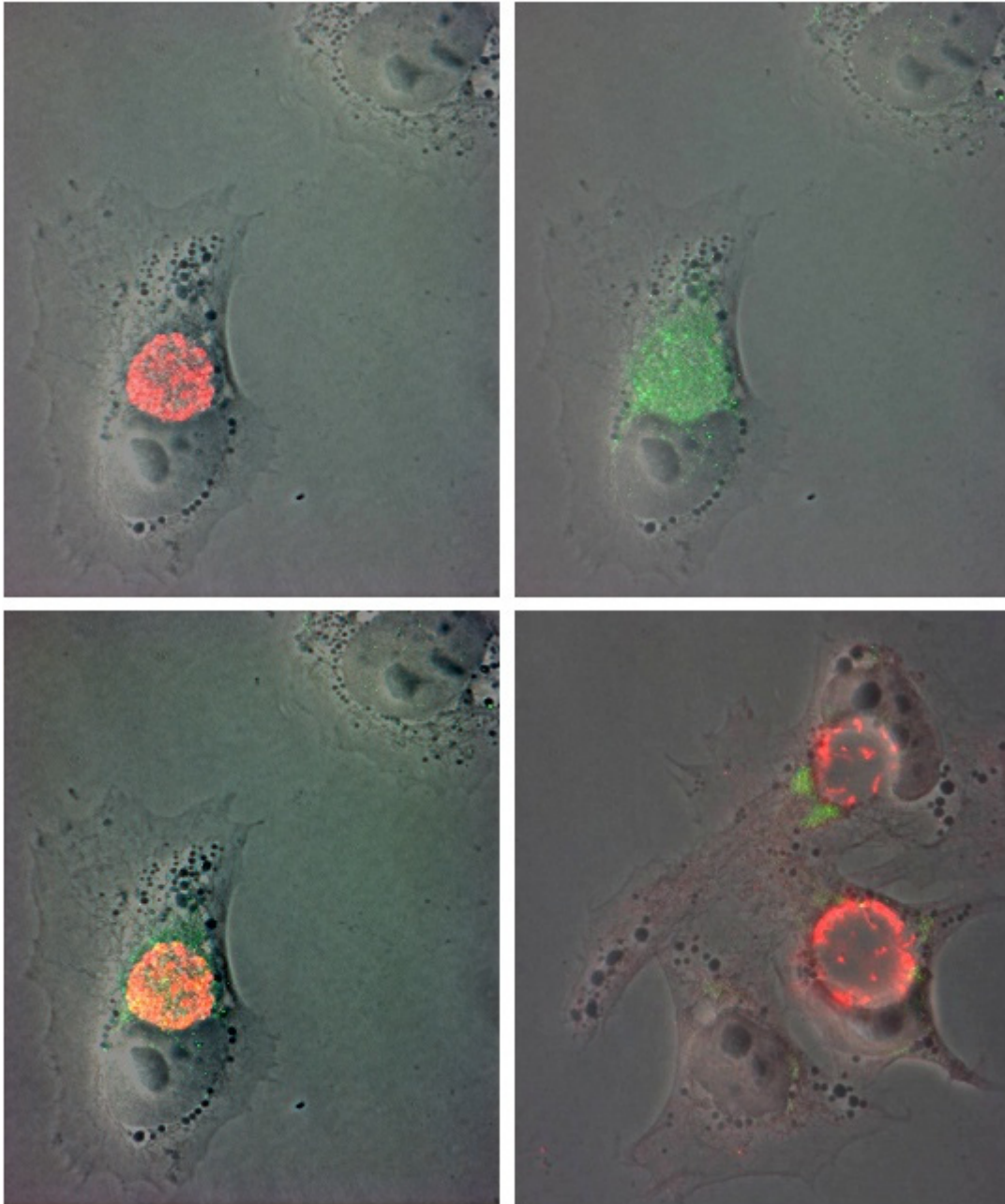
Der Nachweis der Lokalisation von CPn0809 erfolgte mittels Immunfluoreszenztests zu verschiedenen Zeitpunkten des Entwicklungszyklus. Auf Glasplättchen kultivierte HEp-2-Zellen wurden mit *Chlamydomphila pneumoniae* infiziert und bei 35 °C kultiviert. Die Zellen wurden nach 2 h, 8 h, 24 h, 48 h, 58 h und 72 h mit Paraformaldehyd fixiert. Nach Permeabilisierung mit Triton X-100 erfolgte eine Inkubation mit polyklonalem anti-CPn0809-Kaninchenserum (1:100 verdünnt) und einem monoklonalen, gegen *Chlamydomphila pneumoniae* gerichteten Mausantikörper (1:200 verdünnt). Als Sekundärantikörper dienten DTAF-konjugiertes anti-Kaninchen-IgG bzw. Cy3-konjugiertes anti-Maus-IgG, jeweils 1:1000 verdünnt.

Die Auswertung der Immunfluoreszenztests erfolgte mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie und Überlagerung der Fluoreszenzbilder mit Aufnahmen der Phasenkontrastmikroskopie (Abb. 17). Der monoklonale, gegen *Chlamydomphila pneumoniae* gerichtete Antikörper färbte in den 58 h nach Infektionsbeginn durchgeführten

Immunfluoreszenzversuchen deutlich die Einschlusskörper und die darin enthaltenen Chlamydien (*Abb. 17 oben links*). Das anti-CPn0809-Antiserum zeigte im IFT ein spezifisches Signal im Bereich der Inklusion, darüber hinaus aber auch im umgebenen Zytoplasma der Wirtszelle (*Abb. 17 oben rechts*). Dies stellte sich besonders deutlich in der Überlagerung in der Färbung mit dem anti-*C.-pneumoniae*-Antikörper dar (*Abb. 17 unten links*). Die charakteristische und reproduzierbare Signalgebung des Zytoplasmas zeigte sich nur in Umgebung des Einschlusskörpers, weiter entfernt liegende Bereiche des Zytoplasmas waren wie auch uninfizierte Zellen nicht gefärbt.

In den 2 h, 8 h und 24 h nach Infektionsbeginn durchgeführten Immunfluoreszenztests zeigte das anti-CPn0809-Serum kein Signal. 48 h nach Infektionsbeginn konnte CPn0809 lediglich im Zytoplasma von Zellen, die auffällig große oder mehrere Einschlusskörper beinhaltenen, detektiert werden. Auch hier wurde das Signal mit zunehmender Entfernung vom Einschlusskörper schwächer (Daten nicht gezeigt). 72 h nach Infektionsbeginn war die Mehrzahl der Zellen bereits lysiert. In einigen Zellen konnten noch Chlamydien in Einschlusskörpern nachgewiesen werden. Einige dieser späten Einschlusskörper erweckten den Eindruck, nur noch wenige Chlamydien zu enthalten. Im umgebenden Zytoplasma dieser Einschlusskörper zeigte das anti-CPn0809-Serum ein Signal, welches im Vergleich zu den frühen Immunfluoreszenztests schwächer und räumlich eng begrenzter erschien (*Abb. 17 unten rechts*).

Darüber hinaus wurde zur Bestimmung der Lokalisation von CPn0809 in der infizierten Wirtszelle die Immunelektronenmikroskopie eingesetzt. Unter Verwendung des polyklonalen anti-CPn0809-Serums konnte jedoch aufgrund von Kreuzreaktionen mit Wirtszellproteinen die Lokalisation nicht bestimmt werden (Daten nicht gezeigt).



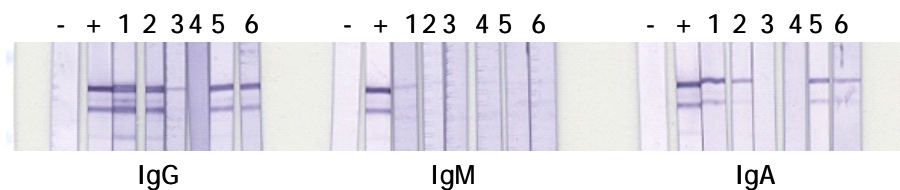
**Abb. 17:** Immunfluoreszenztest *C. pneumoniae*-infizierter HEp-2-Zellen. Gezeigt sind die Überlagerungsbilder der Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie eines identischen Ausschnittes. *Oben und links unten:* 58 h nach Infektionsbeginn. Die zentrale Zelle ist infiziert, oberhalb des Zellkerns ist ein Einschlusskörper lokalisiert. *Links oben:* Färbung des Einschlusskörpers mit anti-*C. pneumoniae*-Antikörper (Sekundäranantikörper Cy-3-konjugiert). *Rechts oben:* Anfärbung von CPn0809 mit anti-CPn0809-Serum (Sekundäranantikörper DTAF-konjugiert) *Links unten:* Überlagerung beider Immunfluoreszenzfärbungen. CPn0809 kann sowohl im Einschlusskörper als auch im umgebenden Zytoplasma detektiert werden. *Rechts unten:* 72 h nach Infektionsbeginn. Die beiden oberen Zellen enthalten große Einschlusskörper, die teilweise entleert wirken. Die untere Zelle ist nicht infiziert. Cpn0809 kann im den Einschlusskörper umgebenden Zytoplasma detektiert werden, das Signal erscheint aber schwächer und räumlich begrenzter als 58 h nach Infektionsbeginn.

## 4.4 Immunogenität von CPn0809

Zur Bestimmung der Immunogenität von CPn0809 wurde getestet, ob sich in Patientenseren Antikörper gegen rCPn0809 detektieren lassen. Dieses wäre ein Hinweis darauf, dass CPn0809 im Verlaufe einer Infektion tatsächlich *in vivo* exprimiert wird und dem menschlichen Immunsystem zugänglich ist. In diesem Falle könnte sich das rekombinante CPn0809 unter Umständen für diagnostische Tests nutzen lassen. Die untersuchten Seren stammten von Patienten, die in einer PCR-Untersuchung auf *Chlamydomphila pneumoniae* getestet und freundlicherweise von Prof. Straube, Jena, und Prof. Maaß, Lübeck, zur Verfügung gestellt wurden.

Für die serologischen Tests wurde rekombinantes CPn0809 (100 ng je cm SDS-Gel) durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf PVDF-Membranen übertragen. Nach Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen erfolgte eine Inkubation mit Patientenserum (1:100 verdünnt) über Nacht. Darauf folgten Waschschrte und eine Immundetektion mit AP-konjugierten, gegen humanes IgG, IgA bzw. IgM gerichteten Antikörpern. Als Positivkontrolle wurde ein gegen den His<sub>6</sub>-Tag gerichteter Antikörper verwendet.

Zunächst wurden Seren von sechs Patienten, die allesamt in der PCR-Untersuchung auf *C. pneumoniae* ein positives Ergebnis zeigten, getestet (Abb. 18). Es fanden sich in vier von sechs Seren IgG- und IgA-Antikörper gegen rCPn0809 (Seren 1, 2, 5 und 6), ein weiteres war fraglich positiv für anti-rCPn0809-IgG (Serum 3). IgM-Antikörper ließen sich in keinem der Seren eindeutig detektieren. Auffallend war die Übereinstimmung im Nachweis von IgG- und IgA-Antikörpern gegen rCPn0809 in vier der sechs Seren.



**Abb. 18:** Testung von sechs Patientenseren im Western Blot auf Antikörper gegen rCPn0809. Die Seren stammten von in einer PCR-Untersuchung auf *C. pneumoniae* positiv getesteten Patienten. Als Sekundärantikörper wurden gegen humanes IgG, IgA bzw. IgM gerichtete und AP-konjugierte Antikörper verwendet. Die niedermolekulare Bande könnte durch proteolytische Spaltung des rCPn0809 bedingt sein. Als Positivkontrolle diente ein monoklonaler anti-His<sub>6</sub>-Tag-Antikörper.

Um eine bessere Aussage über die Verwendbarkeit von rCPn0809 in einem diagnostischen Test treffen zu können, wurden in einem zweiten Versuch 23 Patientenseren getestet. Hiervon stammten zehn von Patienten mit einem positiven und 13 von Patienten mit einem negativen Ergebnis in einer PCR-Untersuchung auf *C. pneumoniae* (Tab. 6).

**Tab. 6:** Testung von 10 Seren von PCR positiven und 13 Seren von PCR negativen Patienten auf anti-rCPn0809-Antikörper.

PCR-Untersuchung positiv (n = 10)		
	positiv	negativ
IgG	8	2
IgM	0	10
IgA	5	5

PCR-Untersuchung negativ (n = 13)		
	positiv	negativ
IgG	8	5
IgM	1	12
IgA	4	9

In Übereinstimmung zum ersten Versuch konnten in der Mehrzahl der Seren in der PCR-Untersuchung positiv getesteter Patienten IgG-Antikörper gegen rCPn0809 nachgewiesen werden. IgA-Antikörper gegen rCPn0809 fanden sich in der Hälfte dieser Seren. Bei Testung der Seren von Patienten mit negativem Ergebnis in der PCR-Untersuchung war die Bestimmung von anti-rCPn0809-IgG-Antikörpern in etwa 62%, die von anti-rCPn0809-IgA-Antikörpern in etwa 31% der Fälle positiv. Der Test auf IgM-Antikörper gegen rCPn0809 war lediglich für ein Serum, welches von einem in der PCR-Untersuchung negativ getesteten Patienten stammte, positiv. Aus dem Ergebnis des zweiten Versuches wurden nach HILGERS et al. [1999] Sensitivität, Spezifität, positiv und negativ prädiktiver Wert für den Nachweis von IgG-, IgM- bzw. IgA-Antikörpern gegen rCPn0809 bestimmt. Hierbei diente die PCR-Untersuchung als Referenz-Test (Tab. 7).

**Tab. 7:** Bestimmung von Sensitivität, Spezifität, positiv und negativ prädiktiver Wert des Tests auf rCPn0809-Antikörper unter Verwendung der PCR-Untersuchung als Referenz.

	IgG	IgM	IgA
Sensitivität	80,0%	0,0%	50,0%
Spezifität	38,5%	92,3%	69,2%
Positiv prädiktiver Wert	50,0%	0,0%	55,6%
Negativ prädiktiver Wert	71,4%	54,5%	64,3%

## 4.5 Yeast-Two-Hybrid-Screening-Versuch

In dieser Arbeit konnte die Expression von CPn0809 in *Chlamydomonas reinhardtii* AR39 nachgewiesen werden. Des Weiteren lässt die gezeigte Lokalisation im Zytoplasma der infizierten Wirtszelle auf eine Sekretion schließen. Um nun Hinweise auf die Funktion des putativen TTSS-Effektors CPn0809 für die Pathogen-Wirt-Beziehung zu erhalten, sollten mögliche Interaktionspartner der Wirtszelle unter Einsatz eines Yeast-Two-Hybrid-Systems identifiziert

werden. Hierzu wurde *cpn0809* in den Ködervektor pGBKT7 des MATCHMAKER GAL4-Yeast-Two-Hybrid-Systems 3 (Clontech) kloniert. Auf der Suche nach einem Wirtszellinteraktionspartner wurde eine kommerzielle humane HeLa-cDNA-Bank, die bereits kloniert in den Beutevektor pACT2 vorlag, durchmustert. HeLa-Zellen sind wie HEp-2-Zellen suszeptibel für *C. pneumoniae* [WONG et al., 1992]. Darüber hinaus stammen HEp-2-Zellen wahrscheinlich von HeLa-Zellen ab [KENNEY, 1993]. Bei dem verwendeten Yeast-Two-Hybrid-System wurde in *Saccharomyces cerevisiae* das Köderkonstrukt als Fusionsprotein mit der DNA-bindenden (DNA-BD-) Domäne, die cDNA-Bank-Inserts in Fusion mit der Transkription aktivierenden (AD-) Domäne des Regulatorproteins GAL4 exprimiert. Kommt es zu einer Interaktion, so wird die AD-Domäne in räumliche Nähe der DNA-BD-Domäne gebracht und die Transkription der Reportergene *ADE2*, *HIS3* und *MEL1* aktiviert.

## **4.5.1 Vorbereitung der Yeast-Two-Hybrid-Screening-Untersuchung**

### **4.5.1.1 Klonierung von *cpn0809* in das Yeast-Two-Hybrid-Köderplasmid**

Zur Klonierung von *cpn0809* wurden spezifische Primer verwendet, die es ermöglichten, das Gen mittels PCR zu amplifizieren und anschließend nach Restriktion mit NcoI und BamHI in die „multiple cloning site“ des Köderplasmides pGBKT7 zu inserieren.

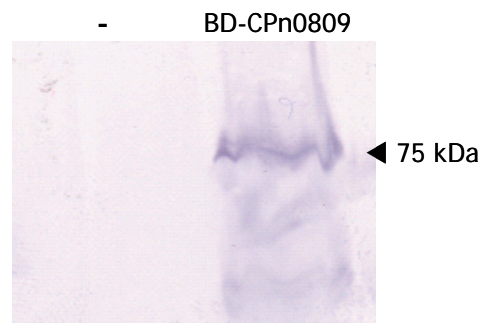
Nach Zwischenklonierung des PCR-Produktes in den Vektor pCR 2.1 TOPO und Endonukleaseverdau dieses Konstruktes mit NcoI und BamHI wurde das *cpn0809*-Fragment in den ebenfalls mit NcoI und BamHI geschnittenen Ködervektor pGBKT7 ligiert. Die nötigen Aufreinigungsschritte von DNA-Fragment bzw. linearisiertem Vektor erfolgten über Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese und anschließender Aufarbeitung der aus dem Gel ausgeschnittenen DNA mittels des QIAEXII Agarose Gel Extraction Kits (Qiagen). Das Konstrukt pGBKT7-*cpn0809* wurde in *E. coli* propagiert und durch Plasmidpräparation isoliert. Eine Sequenzierung schloss Mutationen aus und bestätigte den Erhalt des offenen Leserahmens in Fusion mit der DNA-bindenden Domäne.

### **4.5.1.2 Nachweis der Expression von DNA-BD-CPn0809 in *Saccharomyces cerevisiae***

Für einen erfolgreichen Yeast-Two-Hybrid-Versuch ist es unabdingbar, dass das Köderfusionsprotein tatsächlich in *S. cerevisiae* exprimiert wird. Ebenso wichtig ist die Expression des Beutekonstruktes; dieses lässt sich bei Verwendung einer cDNA-Bank jedoch nicht für den einzelnen Klon zeigen.



*S. cerevisiae*-Stamm AH109 wurde mit pGBKT7-*cpn0809* transformiert und unter Selektionsdruck bei Tryptophanmangel über Nacht kultiviert. Als Negativkontrolle dienten nicht transformierte Hefen des gleichen Stammes. Wie zuvor beschrieben erfolgte ein Harnstoff/SDS-vermittelter Aufschluss der Zellen zur Proteingewinnung, Auftrennen der Zellysate durch SDS-PAGE und Analyse mittels Western Blot. Hierbei wurde als Primärantikörper ein monoklonaler Antikörper gegen einen auf pGBKT7 kodierten und in Fusion mit dem DNA-BD-CPn0809-Protein exprimierten c-Myc-Tag eingesetzt. Die Immundetektion erfolgte mit einem AP-konjugierten Sekundärantikörper und NBT/X-Phosphat. In der Western-Blot-Analyse konnte eine spezifische Bande in Höhe von etwa 75 kDa detektiert werden, welche sich in der Negativkontrolle nicht zeigte (Abb. 19). Die vorhergesagte Größe des DNA-BD-CPn0809-Konstruktes betrug 72 kDa.



**Abb. 19:** Expression des Köderfusionsproteins aus CPn0809 und der DNA-bindenden Domäne von GAL4 in *S. cerevisiae*. Der Nachweis des rekombinanten Proteins erfolgte im Western Blot mit einem anti-c-Myc-Tag-Antikörper. Negativkontrolle (-): nicht transformierte *S. cerevisiae*.

#### 4.5.1.3 Ausschluss der Autoaktivierung von Reportern durch das CPn0809-Köderkonstrukt

Zum Ausschluss der Aktivierung von Reportern für eine erfolgte Interaktion allein durch das Köderkonstrukt DNA-BD-CPn0809 erfolgte eine Transformation von *Saccharomyces-cerevisiae*-Stamm AH109 mit pGBKT7-*cpn0809*. Ausplattiert wurde auf die entsprechenden Mangelplatten für Tryptophan, Adenin und Histidin und auf Tryptophan-Mangelnährboden mit X- $\alpha$ -Gal-Zusatz (Tab. 8). Das Köderkonstrukt DNA-BD-CPn0809 aktivierte die Reporter für eine erfolgte Interaktion nicht und konnte im verwendeten Yeast-Two-Hybrid-System eingesetzt werden.

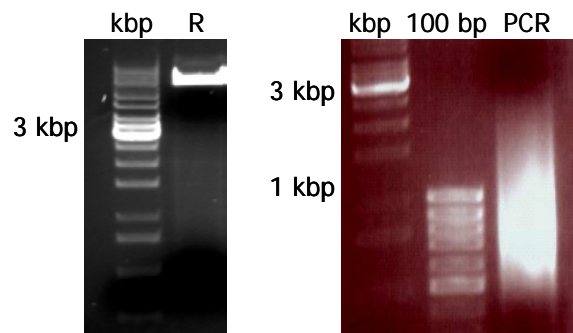
**Tab. 8:** Test auf Autoaktivierung der Reporter durch das Köderkonstrukt: *Saccharomyces cerevisiae* AH109 wurde mit pGBKT7-*cpn0809* transformiert und auf verschiedene Selektionsmedien ausplattiert.

Reporter	Selektionsnährboden	Phänotyp AH109 (pGBKT7- <i>cpn0809</i> )	Erwarteter Phänotyp
<i>TRP1</i>	SD/-Trp	Wachstum	Wachstum
<i>MEL1</i>	SD/-Trp/X- $\alpha$ -Gal	Wachstum, keine Blaufärbung	Wachstum, keine Blaufärbung
<i>ADE2 / HIS3</i>	SD/-Ade/-His/-Trp	Kein Wachstum	Kein Wachstum

#### 4.5.1.4 Amplifikation einer HeLa-cDNA-Genbank in *Escherichia coli*

Der Hersteller lieferte die bereits in den Beutevektor klonierte HeLa-cDNA-Genbank prätransformiert in *E. coli* BNN132 und gab die Zahl der unabhängigen Klone mit  $3,5 \times 10^6$  an. Für den Einsatz in Yeast-Two-Hybrid-Screening-Untersuchungen wurden große Mengen der Genbank-Plasmid-DNA benötigt. Deshalb erfolgte eine Amplifikation der cDNA-Bank in *E. coli* mittels der Semi-solid-Methode bei 30° C Inkubationstemperatur, um eine Minderrepräsentation im Wachstum benachteiligter Klone zu vermeiden [KRIEGLER, 1990]. Die cDNA-Bank tragenden *E. coli*-Zellen wurden in 0,3% SeaPrep Agarose enthaltendem 2× LB-Medium in Gegenwart von Ampicillin bei 30° C für 44 h kultiviert und dem Qiagen Maxi Protokoll zur Plasmidpräparation folgend aufgearbeitet. Als Qualitätskontrolle der amplifizierten und isolierten cDNA-Genbank dienten Analysen mittels Restriktion und PCR.

Durch Restriktion mit XhoI und EcoRI wurden die Genbank-Inserts aus dem Vektor geschnitten. In der Analyse des Restriktionsansatzes mittels Agarosegelelektrophorese konnte der 8,1 kbp große linearisierte Vektor und die cDNA-Inserts als kontinuierliches schwaches Signal zwischen 0,5 und 4 kbp gezeigt werden (*Abb. 20 links*). Durch Einsatz in einer PCR-Reaktion unter Verwendung flankierender Primer (HeLaLib-5'Seq und HeLaLib-3'Seq) konnten die cDNA-Bank-Inserts mit einer nach Angaben des Herstellers durchschnittlichen Größe von 2 kbp amplifiziert werden (*Abb. 20 rechts*).



**Abb. 20:** Analyse der amplifizierten HeLa-cDNA-Genbank. Durch Restriktion (*links*) mittels XhoI und EcoRI konnten die etwa 0,5 – 4 kbp großen Inserts aus dem Vektor (8,1 kbp) geschnitten werden. In der PCR (*rechts*) mit Insert-flankierenden Primern gelang die Amplifikation der Genbank-Inserts, die sich als kontinuierliches Signal zwischen 0,5 und 4 kbp darstellten. (R): Restriktionsansatz, (PCR): PCR-Ansatz, (kbp): 1 kb Ladder DNA-Längenstandard, (100 bp): 100 bp DNA Ladder DNA-Längenstandard.

#### 4.5.2 Yeast-Two-Hybrid-Screening-Untersuchung

Es wurden drei Yeast-Two-Hybrid-Screening-Untersuchungen durchgeführt. Bei Versuch I und III erfolgte eine Kotransformation von *S. cerevisiae* mit Köderplasmid und cDNA-Genbank, bei

Versuch II hingegen eine sequentielle Transformation von das Köderkonstrukt tragenden *S. cerevisiae*-Zellen mit der HeLa-cDNA-Bank.

Jeder unabhängige Klon der cDNA-Bank sollte rechnerisch 1,5 bis 3 Mal in den Screeningversuchen repräsentiert sein. Bei  $3,5 \times 10^6$  unabhängigen Klonen galt es folglich, 5 bis  $11 \times 10^6$  Klone zu screenen. Diese Tatsache machte hohe Transformationseffizienzen und den Einsatz großer Mengen Plasmid-DNA erforderlich. Vorteil der sequentiellen Transformation ist die im Allgemeinen höhere Transformationseffizienz. Sollte das DNA-BD-Fusionsprotein jedoch für die Zelle eine Benachteiligung im Wachstum bedeuten, birgt dieses Vorgehen das Risiko der Akkumulation von Klonen, die aus spontanen Deletionen im Köderplasmid hervorgehen. Ein Vorgehen mittels Kotransformation vermeidet die Anreicherung von spontanen Mutationen und ist einfacher durchzuführen, bringt aber im Allgemeinen eine niedrigere Transformationseffizienz und damit einen größeren Bedarf an einzusetzender Plasmid-DNA mit sich.

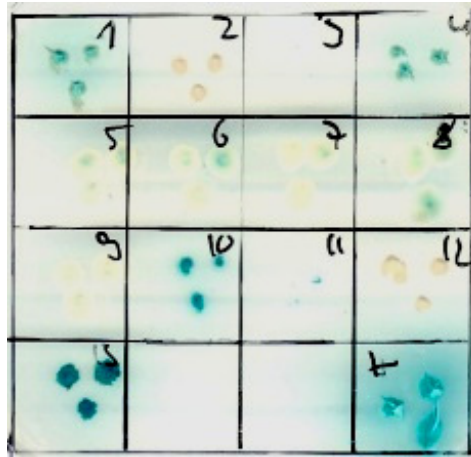
*Saccharomyces-cerevisiae*-Stamm AH109 (Versuch I und III) bzw. AH109 (pGBKT7-*cpn0809*) (Versuch II) wurde nach der PEG/LiAc-Methode unter Einsatz von 100-500 µg Plasmid-DNA der HeLa-cDNA-Bank transformiert. Die erzielten Transformationseffizienzen lagen zwischen  $0,9 \times 10^3$  und  $2,6 \times 10^4$  cfu je µg Plasmid-DNA der cDNA-Bank. Aus Transformationseffizienz und eingesetzter Plasmid-DNA ließ sich die Zahl der gescreenten Klone mit  $9 \times 10^4$  bis  $7,5 \times 10^6$  bestimmen (Tab. 9). Auffallend war die geringe Transformationseffizienz von  $0,9 \times 10^3$  cfu je µg cDNA-Bank Plasmid und damit die geringe Anzahl gescreenter Klone von  $9 \times 10^4$  bei sequentieller Transformation in Versuch II. Nach Angaben des Herstellers hätte die Transformationseffizienz mit etwa  $10^5$  cfu je µg Plasmid deutlich höher als bei simultaner Kotransformation sein sollen.

**Tab. 9:** Übersicht der Yeast-Two-Hybrid-Screening-Versuche. In Versuch I und III erfolgte eine simultane Kotransformation, in Versuch II eine sequentielle Transformation.

Screen	eingesetzte Plasmid-DNA		Transformationseffizienz (in	gescreente
	Ködervektor	cDNA-Bank	cfu/µg Plasmid)	Klone
I	325 µg	165 µg	$2,6 \times 10^4$	$4,3 \times 10^6$
II	sequentiell	100 µg	$0,9 \times 10^3$	$9,0 \times 10^4$
III	850 µg	500 µg	$1,5 \times 10^4$	$7,5 \times 10^6$

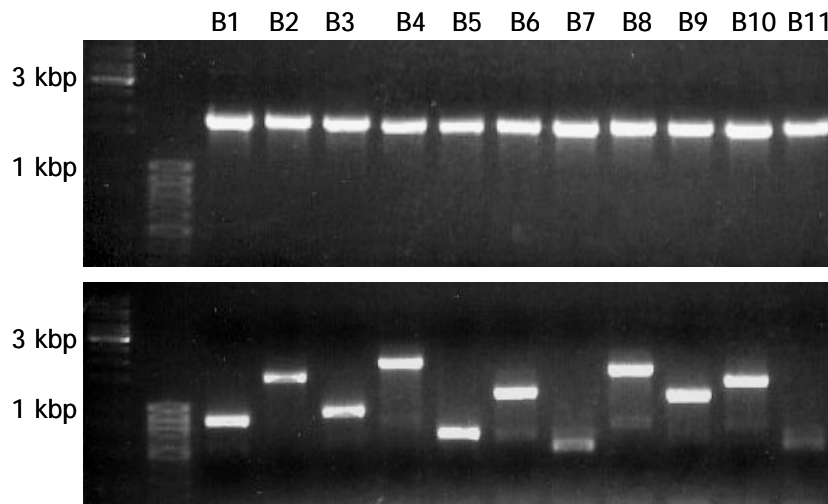
Zum Test auf Aktivierung der Reporter durch Interaktion zwischen Köder- und Beutefusionsprotein wurden die Transformationsansätze auf entsprechende Selektionsmedien ausplattiert. In Versuch I und II erfolgte bei mittlerer Selektionsstringenz zunächst ein Test auf Aktivierung des *HIS3*-Reporters. Kolonien, die in Abwesenheit von Histidin wuchsen, wurden in einem zweiten Schritt auf Aktivierung der *ADE2*- und *MEL1*-Reporter durch Überführen auf entsprechende Selektionsplatten getestet. In Versuch III erfolgte unmittelbar nach Transformation eine hoch stringente Selektion auf alle drei Reporter. Dieses Vorgehen reduzierte die Zahl der falsch-positiven Klone, brachte aber das Risiko mit sich, schwache Interaktionen unter Umständen

nicht detektieren zu können. Klone, die in Abwesenheit von Histidin und Adenin wuchsen und in Gegenwart von X- $\alpha$ -Gal zu einer deutlichen Blaufärbung führten, wurden als Interaktionskandidaten bezeichnet und näher charakterisiert (Abb. 21). Als Positivkontrolle diente in den Screeningversuchen mit pGBKT7-53 und pGADT7-T kotransformierte Zellen des *S. cerevisiae*-Stammes AH109. Hierbei wurde die im Yeast-Two-Hybrid-System detektierbare Interaktion zwischen dem Protein p53 der Maus und dem großen T-Antigen des Virus SV40 genutzt [IWABUCHI et al. 1993; LI B & FIELDS, 1993].



**Abb. 21:** Ausgewählte Klone des III. Screeningversuches auf 4fach-Mangelmedium mit X- $\alpha$ -Gal-Zusatz (SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- $\alpha$ -Gal). Die Klone 1, 4, 10 und 13 zeigen deutliches Wachstum und Blaufärbung. Positivkontrolle (+): *S. cerevisiae* AH109 transformiert mit pGBKT7-53 und pGADT7-T.

Beute- und Köderplasmide der Interaktionskandidaten wurden durch Plasmidpräparation aus den Hefezellen isoliert und die Inserts mittels flankierender Primer (HeLaLib-5'Seq und HeLaLib-3'Seq bzw. T7-5'Seq-Y2H und BD-3'Seq-Y2H) in einer anschließenden PCR-Reaktion amplifiziert. So konnte gezeigt werden, dass die Reporter aktivierenden Klone tatsächlich das Köder- und ein Beuteplasmid trugen. Gleichzeitig konnte eine erste Charakterisierung der Klone aufgrund der Größe der cDNA-Bank-Inserts erfolgen (Abb. 22).



**Abb. 22:** PCR-Analyse der aus den Interaktionskandidaten isolierten Köder- und Beuteplasmide. *Oben:* Amplifikation der Ködervektor-Inserts, die bei den elf exemplarisch gezeigten Klonen in der erwarteten Höhe für *cpn0809* (1737 bp) liegen. *Unten:* Amplifikation der Genbank-Inserts unterschiedlicher Größe.

Die cDNA-Bank-Sequenzen der Interaktionskandidaten konnten durch Ansequenzierung der PCR-Amplifikate und BLAST-Analyse identifiziert werden. Des Weiteren ließ sich anhand der Sequenzen bestimmen, ob der offene Leserahmen des cDNA-Bank-Inserts in Fusion mit der *GAL4-AD*-Sequenz erhalten war. Die mittels PCR amplifizierten Ködervektor-Inserts dreier repräsentativer Klone konnten durch Sequenzierung als *cpn0809* bestätigt werden.

In den drei Screeningversuchen wurden insgesamt 71 Interaktionskandidaten detektiert. Bei 61 gelang die Sequenzierung der cDNA-Bank-Inserts, bei den verbleibenden zehn schlug die Sequenzierung fehl (*Tab. 10*). Diese zehn Interaktionskandidaten zeigten eher schwache Signale in der PCR-Amplifikation der Genbank-Inserts und eine geringer ausgeprägte Fähigkeit zum Wachstum auf dem Selektionsmedium hoher Stringenz.

**Tab. 10:** Übersicht über die Anzahl der Interaktionskandidaten, der erfolgreich sequenzierten Genbank-Inserts und der Genbank-Sequenzen, die eine Übereinstimmung mit einer kodierenden Sequenz (CDS = „coding sequence“) bei Erhalt des offenem Leserahmens zeigten.

Versuch	Interaktionskandidaten	davon sequenziert	davon CDS in erhaltenem Leserahmen
I	11	10	3
II	49	45	7
III	11	6	4
gesamt	71	61	14

Eine BLAST-Analyse der Sequenzen erbrachte nur für 14 der 61 erfolgreich sequenzierten Klone eine Übereinstimmung mit einem bekannten Gen oder einer hypothetischen kodierenden Sequenz (CDS = „coding sequence“) in Fusion mit der *GAL4-AD*-Sequenz bei Erhalt des offenen Leserahmens (*Tab. 11*). Unter diesen Klonen waren FLJ22347 viermal, MURR1 und AHA1 je

zweimal vertreten. Für diese 14 Interaktionskandidaten-Klone wurde zunächst eine Reproduktion der Reporteraktivierung im Yeast-Two-Hybrid-System mittels Versuchen im kleinen Maßstab angestrebt. Gleichzeitig sollte in dieser Versuchsreihe getestet werden, ob die Aktivierung der Reporter spezifisch für das Vorhandensein des DNA-BD-CPn0809-Köders war oder ob diese AD-cDNA-Bank-Konstrukte hierzu auch mit anderen Köderkonstrukten in der Lage waren.

**Tab. 11:** Interaktionskandidaten mit positivem Ergebnis der Sequenzanalyse.

Klon	Genbank-Sequenz
I.1	FLJ22347
I.2	AHA1
I.3	PP2593
II.1	MURR1 = copper metabolism gene
II.2	MURR1 = copper metabolism gene
II.3	IFI35 = IFP35 = interferon inducible protein
II.4	Filamin1 = actin-binding protein 280
II.5	COX3 = Cytochrom-C-Oxidase 3
II.6	BAT1 = ATP dependent RNA helicase
II.7	COX1 = Cytochrom-C-Oxidase 1
III.1	FLJ22347
III.2	AHA1
III.3	FLJ22347
III.4	FLJ22347

Die cDNA-Insert-Sequenzen der übrigen erfolgreich sequenzierten Klone lagen außerhalb bekannter kodierender Sequenzregionen (CDS), waren nicht in Frame mit der AD-Sequenz oder trugen Poly-A-Sequenzen am 5'-Ende des Inserts und wurden in den weiteren Analysen nicht betrachtet.

### 4.5.3 Identifizierung falsch-positiver Interaktionskandidaten

Bei Einsatz eines Yeast-Two-Hybrid-Systems zur Identifizierung von Proteininteraktionen ist damit zu rechnen, dass sich unter den gefundenen Interaktionskandidaten falsch-positive befinden [BARTEL et al., 1993a]. Diese können z.B. mit promotorassoziierten Proteinen oder mit die GAL4-Bindungsstellen flankierenden Sequenzen interagieren und zu Aktivierungen der Reportergene führen, die nicht für einen bestimmten Köder spezifisch sind.

Folglich galt es zur Identifizierung falsch-positiver Interaktionskandidaten zu testen, ob die Reporteraktivierung spezifisch für den CPn0809-Köder war oder ob die Beutekonstrukte der Interaktionskandidaten auch mit anderen Köderkonstrukten die Reporter zu aktivieren vermochten. Als Kontrollen wurde zum einen der Ködervektor ohne Insert, zum anderen ein Konstrukt aus pGBKT7 und *laminC* verwendet. In der Literatur ist beschrieben, dass LaminC mit den meisten

anderen Proteinen weder interagiert noch Komplexe bildet [BARTEL et al., 1993b; YE & WORMAN, 1995]. Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob sich die erfolgte Aktivierung der Reporter in Yeast-Two-Hybrid-Versuchen im kleinen Maßstab reproduzieren lässt, also bei gezielter Transformation von *S. cerevisiae* AH109 mit dem jeweiligen cDNA-Bank-Beuteplasmid und dem *cpn0809*-Ködervektor.

Zur Durchführung dieser Kontrollversuche wurden die in den Screeningversuchen aus *S. cerevisiae* gewonnenen Plasmide zunächst in *E. coli* propagiert und erneut präpariert. Um die Vielzahl der Transformationen mit möglichst wenig Aufwand durchzuführen, wurde *S. cerevisiae* AH109 mit den verschiedenen Genbank-Beuteplasmiden und *S. cerevisiae* Y187 mit den verschiedenen Ködervektoren transformiert. In einem zweiten Schritt wurde in verschiedenen Ansätzen jeder *S. cerevisiae*-AH109-Klon mit jedem *S. cerevisiae*-Y187-Klon verschmolzen. Zum Test auf Aktivierung der Reporter wurde auf 4fach-Mangelplatten mit X- $\alpha$ -Gal-Zusatz ausplattiert.

Fünf der Interaktionskandidaten zeigten eine Aktivierung der Reporter auch in Gegenwart eines Ködervektors ohne Insert, hiervon wiederum drei auch in Gegenwart des LaminC-Köders. Diese Kandidaten vermochten scheinbar direkt mit der DNA-bindenden Domäne von GAL4 zu interagieren oder auf andere Weise die Transkription aller Reporter zu aktivieren und wurden daher als falsch-positiv eingeordnet (Tab. 12). Vier der Kandidaten zeigten weder in Gegenwart der Kontrollköder noch in Gegenwart des CPn0809-Köders eine Aktivierung der Reporter. Sie wurden als negativ eingeordnet. Für keinen der Interaktionskandidaten konnte eine für das CPn0809-Köderplasmid spezifische Aktivierung der Reporter gezeigt werden. Mittels der Yeast-Two-Hybrid-Screening-Untersuchungen ließ sich somit kein Hinweis auf einen CPn0809-Interaktionspartner der Wirtszelle finden.

**Tab. 12:** Ergebnis des Kontrollversuches zum Test der Beutekonstrukte der Interaktionskandidaten auf für den CPn0809-Köder unspezifische Aktivierung der Reporter.

Sequenz	Aktivierung der Reporter <i>ADE2</i> , <i>HIS3</i> , <i>MEL1</i>			Interpretation
	BD ohne Insert	BD-LaminC	BD-CPn0809	
FLJ22347	+	+	+	falsch-positiv
AHA1	+	+	+	falsch-positiv
PP2593	-	-	-	negativ
MURR1	-	-	-	negativ
IFI35	(+)	-	(+)	falsch-positiv
Filamin1	+	-	+	falsch-positiv
COX3	-	-	-	negativ
BAT1	+	+	+	falsch-positiv
COX1	-	-	-	negativ

## 5 DISKUSSION

Es sind eine Reihe von Prozessen in der Wirtszelle bekannt, die durch eine Infektion mit Chlamydien beeinflusst werden, wobei diese Interaktionen in verschiedenen Wirtszelllinien gezeigt wurden:

- Bei der Internalisierung der Elementarkörper ist die Rekrutierung von Aktin durch die Chlamydien ein wichtiger Schritt. Daran scheint das wahrscheinlich Typ-III-sezernierte Protein Tarp zu mindest in HeLa-Zellen maßgeblich beteiligt zu sein [CLIFTON et al., 2004; 2005]. Daneben spielen Tyrosin-Phosphorylierungen eine wichtige Rolle, ohne die keine Aufnahme in HEp-2-Zellen erfolgt [COOMBES & MAHONY, 2002].
- Nach Internalisierung der Elementarkörper wird die Azidifizierung der frühen endosomalen Vakuole verhindert und deren Reifung zu einem späten Endosom und Fusion mit Lysosomen verzögert [FRIIS, 1972; SCHRAMM et al., 1996]. In HeLa-Zellen wird die Fusion des Einschlusskörpers mit Sphingomyelin- und Cholesterin-enthaltenen Vesikeln des exozytotischen Pfades durch bislang unbekannte chlamydiale Faktoren induziert [SCIDMORE et al., 1996a; CARABEO et al., 2003], wodurch die Fusion mit Lysosomen unterbunden wird [HACKSTADT, 1998; SCIDMORE et al., 2003].
- Die Protease-ähnlichen Faktoren CPAF von *Chlamydia trachomatis* bzw. CPAFcp von *Chlamydophila pneumoniae* können den Transkriptionsfaktor RFX5 in HeLa- und HEp-2-Zellen degradieren und so eine Herunterregulierung der Antigenpräsentation durch MHC I und MHC II bewirken [ZONG et al., 2001; FAN et al., 2002; HEUER et al., 2003].
- Einerseits vermögen Chlamydien die Apoptose verschiedener Wirtszellen, darunter HEp-2-Zellen, HeLa-Zellen und die monozytische Zelllinien Mono-Mac6 und THP-1, zu inhibieren [WAHL et al., 2001; CARRATELLI et al., 2002; FISCHER et al., 2004]. Andererseits wird durch das konservierte chlamydiale Protein CADD die Apoptose u. a. in HeLa-Zellen induziert [STENNER-LIEWEN et al., 2002].

Eine Möglichkeit für Chlamydien, über die Membran des Einschlusskörpers in Prozesse der Wirtszelle einzugreifen, ist die Sekretion von Effektorproteinen durch ein Typ-III-Sekretionssystem in das Zytoplasma der Wirtszelle [HSIA et al., 1997]. Für *Chlamydophila pneumoniae* konnte die Transkription und Expression verschiedener den Typ-III-Sekretionsapparat konstituierender Proteine gezeigt werden [SLEPENKIN et al., 2003; LUGERT et al., 2004]. Über die Wirkung der Effektoren ist bislang jedoch wenig bekannt. Als mögliche Angriffspunkte kommen z. B. alle o. g. Prozesse in Frage.



Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die nähere Charakterisierung des putativen Typ-III-sezernierten Effektors CPn0809. Im Genom von *Chlamydophila pneumoniae* ist *cpn0809* in einem Subcluster des Typ-III-Sekretionssystems in enger Nachbarschaft zu *lcrH-1* lokalisiert. Das zu *lcrH-1* homologe *lcrH* kodiert in *Yersinia* spp. für das Chaperon der Typ-III-sezernierten Translokatoren YopB und YopD. YopB und YopD werden zunächst Typ-III-sezerniert und bilden mit LcrV eine Pore in der Plasmamembran der Wirtszelle [NEYT & CORNELIS, 1999; HOLMSTRÖM et al., 2001]. Darüber hinaus besitzt CPn0809 Ähnlichkeiten zu YopB und YopD bezüglich Größe und Hydrophobizitätsprofil, jedoch nicht hinsichtlich der Sequenz. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten gilt CPn0809 als Kandidat für ein Typ-III-sezerniertes Protein. Bezüglich der Sequenz weist CPn0809 lediglich Ähnlichkeiten zu den orthologen Proteinen der anderen Chlamydienspezies auf. Konservierte Domänen oder Motive konnten nicht identifiziert werden, so dass über die Funktion von CPn0809 nur spekuliert werden kann. Denkbar ist aufgrund der beschriebenen Ähnlichkeiten zu YopB und YopD eine Funktion als Translokator. Da aber keine Homologien hinsichtlich der Sequenz zu YopB und YopD bestehen, erscheinen andere Funktionen, z. B. als Effektor des Typ-III-Sekretionssystems, ebenso möglich.

In dieser Arbeit wurde die Transkription von *cpn0809* in mit *Chlamydophila pneumoniae* AR39 infizierten HEp-2-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten des Entwicklungszyklus untersucht. Transkripte von *cpn0809* konnten in semiquantitativen RT-PCR-Analysen unter Einsatz von 100 ng Gesamt-RNA 48 h und 72 h nach Infektionsbeginn, also während des späten Entwicklungszyklus, nachgewiesen werden. Die Transkriptionsstärken während dieses Zeitfensters waren konstant. Zu früheren Zeitpunkten ließ sich keine *cpn0809*-RNA detektieren. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine frühere Transkription unter den gewählten Bedingungen in den RT-PCR-Analysen nicht nachgewiesen werden konnte.

Im Genom ist *cpn0809* in enger Nachbarschaft zu *lcrH-1* (*cpn0811*) und *cpn0808* in einem Subcluster der Gene des Typ-III-Sekretionssystems lokalisiert. Transkripte von *lcrH-1* konnten bereits 24 h nach Infektionsbeginn nachgewiesen werden, wobei die Transkriptionsstärke 48 h nach Infektionsbeginn ein Maximum erreichte und bis zum Ende des Infektionszyklus konstant auf diesem Niveau blieb [SLEPENKIN et al., 2003; LUGERT et al., 2004]. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass der *lcrH-1*-Subcluster (einschließlich *cpn0809*) als Operon unter Kontrolle des Sigmafaktors  $\sigma^{66}$  exprimiert wird [OUELLETTE et al., 2005]. Diese Daten unterstützen die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptionsanalysen.

Die Transkription der für Strukturproteine des Typ-III-Sekretionsapparates kodierenden Gene erfolgt im Allgemeinen ab 8 h bzw. 12 h nach Infektionsbeginn [SLEPENKIN et al., 2003; LUGERT et al., 2004]. Transkripte der putativen ATPase *yscN* und der für die Injektionsnadel des

Apparates kodierenden Gene *yscJ*, *yscL*, *yscR*, *yscS*, und *yscT* konnten ab 8 h mit einem Maximum zwischen 32 h bis 48 h nach Infektionsbeginn gezeigt werden. Eine Ausnahme bildet *yscC*, da die entsprechende mRNA bereits 1,5 h nach Infektionsbeginn nachgewiesen werden konnte. Ein weiterer Subcluster des Typ-III-Sekretionssystems umfasst die Gene *lcrD*, *lcrE*, und *sycE*. LcrD ist mutmaßlich mit der inneren Chlamydienmembran assoziiert und am Aufbau des Sekretionskanals beteiligt. *LcrE* kodiert für CopN, ein mit der Einschlusskörpermembran assoziiertes Protein, welches möglicherweise einen Deckel des Apparates bildet und an der Regulation der Sekretion beteiligt ist. Für SycE wird aufgrund seiner Homologie zu bekannten Chaperonen der Typ-III-Sekretionssysteme anderer gramnegativer Bakterien eine Funktion als Chaperon und Beteiligung an der Sekretion von Effektoren vermutet. Für die Transkription dieser drei Gene finden sich in der Literatur kontroverse Daten. Die von SLEPENKIN et al. [2003] erhobenen Daten legen den Beginn der Transkription dieses Subclusters in einer zeitlichen Sequenz von 12 bis 32 h nach Infektionsbeginn nahe. So konnten RNA von *lcrD* frühestens 12 h, von *lcrE* und von *sycE* 24 h nach Infektionsbeginn nachweisen, wobei das RT-PCR-Signal von *sycE* zu diesem Zeitpunkt deutlich schwächer als das von *lcrE* war und im weiteren Verlauf des Entwicklungszyklus zunahm. LUGERT et al. [2004] konnten Transkripte für alle drei Gene 8 h nach Infektionsbeginn zeigen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Transkription der für Strukturproteine des Typ-III-Sekretionsapparates kodierenden Gene ab etwa 8 h nach Infektionsbeginn einsetzt und ein Maximum in der Phase des exponentiellen Wachstums aufweist.

Diese Daten lassen auf eine zeitliche Regulation der Transkription, die sowohl Effektoren und Chaperone als auch die den Apparat konstituierenden Gene umfasst, schließen. Eine zeitliche Regulation der Transkription von Genen des Typ-III-Sekretionssystems ist auch bei anderen Organismen bekannt. So verfügen Salmonellen über zwei voneinander unabhängige Typ-III-Sekretionsapparate, die auf den *Salmonella*-Pathogenitätsinseln 1 und 2 (SPI-1 und SPI-2) kodiert sind [GALAN, 1996; KUHLE & HENSEL, 2004]. Die auf der SPI-1 kodierten Gene werden früh transkribiert und spielen eine wichtige Rolle beim Eindringen der Salmonellen in die Wirtszelle, wohingegen die auf der SPI-2 kodierten Gene spät transkribiert werden und wichtig für das Überleben der Salmonellen innerhalb der Wirtszelle sind. Bei *Chlamydomphila pneumoniae* könnte die Transkription verschiedener Effektoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit möglicherweise unterschiedlichen Funktionen im Entwicklungszyklus zusammenhängen. Dabei deuten die in dieser Arbeit gewonnenen Daten der Transkriptionsanalyse von *cpn0809* auf eine Funktion im späten Entwicklungszyklus, also der Phase der Rückdifferenzierung der Retikularkörper zu Elementarkörpern, hin.

Nach Analyse der Transkription sollte gezeigt werden, dass die nachgewiesene *cpn0809*-mRNA tatsächlich translatiert wird. Hierzu wurde ein polyklonales Antiserum gegen rekombinantes CPn0809 generiert und in Western-Blot-Analysen mit *Chlamydomphila pneumoniae* AR39 infizierter HEp-2-Zellen eingesetzt.

In den durchgeführten Expressionsanalysen konnten reaktive Proteine mit einer für CPn0809 vorhergesagten Molekülgröße von 50 kDa frühestens 48 h nach Infektionsbeginn nachgewiesen werden, wobei die Expressionsstärke zum Ende des Entwicklungszyklus etwas anstieg. Da jedoch keine semiquantitative Auswertung stattfand, sondern Gesamt-Protein einer definierten Anzahl *C. pneumoniae*-infizierter HEp-2-Zellen in die Expressionsanalysen eingesetzt wurde, könnte der Anstieg der Expressionsstärke auch durch die im Laufe des Entwicklungszyklus wachsende Zahl an Chlamydien bedingt sein.

In den Western Blots zeigte sich neben CPn0809 ein weiteres Protein von etwa 42 kDa, welches in den uninfizierten Zellen nicht detektiert werden konnte. Es bleibt unklar, welches Protein sie bedingte. Möglich ist eine Kreuzreaktion des anti-CPn0809-Serums mit einem chlamydialen Protein, etwa mit CPn0808, zu dem CPn0809 in der BLAST-Analyse eine Identität von 23% aufweist. Denkbar ist auch eine proteolytische Spaltung von CPn0809, wie es auch bei der Aufarbeitung des rekombinanten CPn0809 zu beobachten war. Dagegen spricht, dass das 42 kDa große Protein bereits nach 24 h detektiert werden konnte, wohingegen sich CPn0809 erst nach 48 h nachweisen ließ. Eine Identifizierung der detektierten Proteine könnte durch Ansequenzierung nach präparativer SDS-PA-Gelelektrophorese erfolgen. Da in den Western Blots der Expressionsversuche Zelllysate mit *C. pneumoniae* infizierter HEp-2-Zellen untersucht wurden erschien eine Sequenzierung aufgrund des Hintergrundes nicht erfolgversprechend.

Eine frühere Expression von CPn0809 in einer Menge, die im Western Blot nicht detektiert werden kann, ist nicht auszuschließen. Die Empfindlichkeit des Expressionsnachweises ist u. a. abhängig von der Sensitivität des Antiserums. Das anti-CPn0809-Serum konnte in einem Western Blot 1 ng des rekombinanten CPn0809 sicher, 300 pg noch schwach nachweisen. Da jedoch die Ergebnisse der Analysen mittels RT-PCR- und Western Blot kongruent sind, kann von einer Transkription und Expression von CPn0809 im späten Entwicklungszyklus ab ungefähr 48 h nach Infektionsbeginn ausgegangen werden.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zur Expression von CPn0809 werden durch Daten zur Expression anderer Proteine gestützt. So konnte die Expression von LcrH-1 ebenfalls ab 48 h nach Infektionsbeginn gezeigt werden [LUGERT et al., 2004]. Auch wurde in Elementarkörpern von *C. pneumoniae* CPn0808, dessen Gen ebenfalls im *lcrH-1*-Subcluster lokalisiert ist, nachgewiesen [VANDAHL et al., 2001]. Dieses deutet auf eine Expression von CPn0808 im späten Entwicklungszyklus hin.

Die Bestimmung der Lokalisation von CPn0809 in der Wirtszelle erfolgte durch Immunfluoreszenztests. Bei Verwendung des polyklonalen anti-CPn0809-Serums konnte in den Immunfluoreszenzfärbungen mit *Chlamydomytila pneumoniae* AR39 infizierter HEp-2-Zellen CPn0809 im Einschlusskörper, darüber hinaus aber auch im umgebenden Zytoplasma der Wirtszelle gezeigt werden. Die Lokalisation von CPn0809 kann als Hinweis auf eine Sekretion gedeutet werden.

In bisherigen Untersuchungen konnten nur wenige *C. pneumoniae*-Proteine im Zytoplasma der Wirtszelle nachgewiesen werden:

- CPAFcp: der Protease-ähnliche Faktor degradiert im Zytoplasma der Wirtszelle den Transkriptionsfaktor RFX5 und führt so zu einer Herabregulation der MHC I und II vermittelten Antigenpräsentation [FAN et al., 2002; SHAW et al., 2002]. Die Sekretion erfolgt wahrscheinlich Sec-abhängig. Der Sec-Protein-Translokations-Apparat überspannt die innere Membran der Bakterien und kann Proteine, die eine entsprechende N-terminale Signalsequenz tragen, in das Periplasma transportieren [MORI & ITO, 2001]. Über die äußere Membran der Bakterien kann ein ins Periplasma transloziertes Protein mittels des Typ-II-Sekretionsapparates oder eines Autotransporter-Mechanismus erfolgen [KOSTER et al., 2000].
- CPn0796: ein 38 kDa-Fragment des 65 kDa großen Proteins konnte im Zytoplasma der Wirtszelle identifiziert werden. Die Sekretion erfolgt wahrscheinlich über einen Autotransporter-Mechanismus, da CPn0796 die für Autotransporter charakterischen N-terminale  $\alpha$ -Helix- und C-terminale  $\beta$ -Faltblatt-Domänen besitzt [VANDAHL et al., 2005]. Autotransporter werden zunächst Sec-abhängig ins Periplasma befördert [KOSTER et al., 2000]. Die C-terminale  $\beta$ -Faltblatt-Domäne bildet in der äußeren Membran eine Tonnen-ähnliche Struktur, durch die die N-terminale  $\alpha$ -Helix-Domäne sezerniert wird. Schließlich erfolgt die autokatalytische Abspaltung der sezernierten Domäne.
- CPn1020: der putative Effektor des Typ-III-Sekretionssystems konnte im Zytoplasma der Wirtszelle identifiziert werden [LUGERT et al., 2004]. Für den N-Terminus konnte eine Sekretion durch ein heterologes Typ-III-Sekretionssystem gezeigt werden [SUBTIL et al., 2005].
- CPn0705: ein putativer Effektor des Typ-III-Sekretionssystem. Für das zu CPn0705 homologe CCA00037 von *Chlamydomytila caviae* wurde eine Sekretion durch ein heterologes Typ-III-Sekretionssystem nachgewiesen [SUBTIL et al., 2005].

Darüber hinaus wurde für einige Proteine eine Assoziation mit der Membran des Einschlusskörpers gefunden. Hierzu zählen die nach ihrer Lokalisation benannten und sehr wahrscheinlich Typ-III-sezernierten Einschlusskörper-Membranproteine IncA, IncB und IncC, die putative ATPase des Sekretionsapparates YscN und das wahrscheinlich Typ-III-sezernierte und als Deckel des Sekretionsapparates fungierende CopN [FIELDS KA & HACKSTADT, 2000; BROWN et al., 2002; LUGERT et al., 2004].

Die in dieser Arbeit für CPn0809 gefundene Lokalisation im Zytoplasma der Wirtszelle deutet auf eine Sekretion hin. In *Chlamydia trachomatis* konnte für das zu CPn0809 homologe CT578 mittels Immunfluoreszenzfärbungen eine Assoziation mit der Einschlusskörpermembran nachgewiesen werden, jedoch keine Lokalisation im Zytoplasma der Wirtszelle [FIELDS KA et al., 2005]. Darüber hinaus konnten FIELDS KA et al. [2005] die Sekretion des N-Terminus von CT578 durch den Typ-III-Sekretionsapparat von *Yersinia pseudotuberculosis* zeigen. In *Shigella flexneri* konnte ein Fusionsprotein aus dem N-Terminus von CPn0809 und dem Protein CyA aus *Bordetella pertussis* durch den Typ-III-Sekretionsapparat sezerniert werden [SUBTIL et al., 2005].

SUBTIL et al. [2000] fanden durch Analyse der genomischen Organisation erste Hinweise auf eine Funktion von CPn0809 als Substrat des Typ-III-Sekretionssystems von *Chlamydomonas pneumoniae*. Für eine Typ-III-Sekretion sprechen die Lage von *cpn0809* in einem Subcluster des Typ-III-Sekretionssystems in enger Nachbarschaft des putativen Chaperons *lcrH-1*, die Ähnlichkeiten von CPn0809 bezüglich Größe und Hydrophobizitätsprofil zu den in *Yersinia* spp. Typ-III-sezernierten Translokatoren YopB und YopD und das Fehlen eines Signalpeptides für einen anderen Sekretionsweg. In *Yersinia* spp. werden YopB und YopD zunächst Typ-III-sezerniert und bilden dann mit LcrV eine Pore in der Plasmamembran der Wirtszelle [NEYT & CORNELIS, 1999; HOLMSTRÖM et al., 2001]. Denkbar wäre, dass CPn0809 aufgrund der beschriebenen Ähnlichkeiten eine vergleichbare Aufgabe im chlamydialen Typ-III-Sekretionssystem übernehmen könnte. Da diese Ähnlichkeiten nur Größe und Hydrophobizitätsprofil betreffen, jedoch nicht hinsichtlich der Sequenz bestehen, ist es möglich, dass CPn0809 eine andere Funktion, z. B. als Effektor, besitzt. Im Gegensatz zu den Strukturproteinen weisen Effektoren des Typ-III-Sekretionssystems über die Artgrenzen hinaus nur sehr geringe oder keine Homologien auf.

Die Lokalisation von CPn0809 im Zytoplasma der Wirtszelle ist ein Hinweis auf eine mögliche Rolle als Effektor. Für einen Translokator des Typ-III-Systems wäre in den durchgeführten Immunfluoreszenztests eine Assoziation des Signals mit der Membran des Einschlusskörpers zu erwarten gewesen. Es muss aber darauf hingewiesen werden, dass für das homologe CT578 von *Chlamydia trachomatis* mittels Immunfluoreszenztests und Immunelektronenmikroskopie eine

Assoziation mit der Einschlusskörpermembran, jedoch keine Lokalisation im Zytoplasma der Wirtszelle gezeigt werden konnte [FIELDS KA et al., 2005]. CPn0809 und CT578 zeigen in der BLAST-Analyse eine Identität von 53% ( $E = e^{-132}$ ). Es könnte sein, dass sie verschiedene Funktionen übernehmen. Möglich ist aber auch, dass unterschiedliche polyklonale Antisera, unterschiedliche Versuchsbedingungen oder verschiedene Untersuchungszeitpunkte im Blick auf den Entwicklungszyklus zu verschiedenen Ergebnissen für CPn0809 und CT578 in den Immunfluoreszenztests geführt haben. Für einige Translokatoren des Typ-III-Sekretionssystems anderer Organismen konnte eine Lokalisation im Zytoplasma und neben der Beteiligung am Transport von Effektoren eine zusätzliche Funktion als Effektor gezeigt werden. EspB ist Translokator des Typ-III-Sekretionssystems von *Escherichia coli* und kann ebenfalls im Zytoplasma der Wirtszelle nachgewiesen werden [WOLFF et al, 1998; ROE et al., 2003]. Die Translokatoren SipB aus *Salmonella* [HERSH et al., 1999] und IpaB aus *Shigella* [HILBI et al., 1998] induzieren die Apoptose der Wirtszelle durch Interaktion mit Caspase-1, welche zu dessen Aktivierung führt. In der BLAST-Analyse weisen CPn0809 und SipB mit einem E-Wert von  $e^{-8}$  eine größere Ähnlichkeit auf als CPn0809 und YopB mit einem E-Wert von 0,009. Die sehr geringe Ähnlichkeit von CPn0809 und SipB lässt jedoch nicht auf eine gemeinsame Funktion schließen. Es wäre also auch denkbar, dass CPn0809 die Funktion eines Translokators und die eines Effektors übernimmt.

Salmonellen verfügen über zwei voneinander unabhängige Typ-III-Sekretionsapparate, die auf den *Salmonella*-Pathogenitätsinseln 1 und 2 (SPI-1 und SPI-2) kodiert sind. Die mittels des Typ-III-Sekretionssystems der SPI-1 nach erfolgter Anhaftung in die Wirtszelle sezernierten Proteine bewirken letztendlich die Aufnahme der Salmonellen in die Zelle [GALAN, 1996]. Das auf der SPI-2 kodierte Typ-III-Sekretionssystem dient mit seinen Effektoren dem Überleben und der Vermehrung der Salmonellen in der Wirtszelle [KUHLE & HENSEL, 2004]. Chlamydien verfügen im Gegensatz zu Salmonellen nach heutigem Wissen nur über ein Typ-III-Sekretionssystem. Die Tatsache, dass Chlamydien über zwei Homologe zu *lcrH* verfügen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten transkribiert werden, lässt an ein System denken, dass in zwei verschiedenen Phasen des Entwicklungszyklus unterschiedliche Aufgaben übernimmt.

Bemerkenswert ist, dass die Gene einiger putativer Effektoren wie *cpn1020*, *incA*, *incB* und *incC* transkribiert werden, bevor sich RNA der den Apparat konstituierenden Gene nachweisen lässt. Für *Chlamydia trachomatis* gibt es jedoch Hinweise auf einen Typ-III-Sekretionsapparat in Elementarkörpern, der im frühen Entwicklungszyklus funktionieren könnte [FIELDS KA et al., 2003]. Auch in Elementarkörpern von *C. pneumoniae* konnte der putative Energielieferant des Typ-III-Sekretionssystems YscN nachgewiesen werden [VANDAHL et al., 2001]. Die während des frühen Entwicklungszyklus transkribierten Effektoren wie *cpn1020* könnten durch den

präformierten Sekretionsapparat der Elementarkörper sezerniert und analog denen auf der SPI-2 kodierten Effektoren in *Salmonella* dazu beitragen, die Einschlusskörpermembran und bestimmte Prozesse der Wirtszelle derart zu modifizieren, dass ein Überleben und Vermehren der Chlamydien in der Wirtszelle möglich wird.

Die wie *cpn0809* im späten Entwicklungszyklus, also in der Phase der Rückdifferenzierung der Retikularkörper zu Elementarkörpern, transkribierten putativen Effektoren könnten im Elementarkörper präformiert vorliegen. VANDAHL et al. [2001] konnten CPn0808 in Elementarkörpern nachweisen. Im Genom ist *cpn0808* im gleichen Typ-III-Sekretionssubcluster wie *cpn0809* lokalisiert und es kommt ebenfalls als Effektor in Betracht [SUBTIL et al., 2000]. CPn0809 und CPn0808 könnten möglicherweise eine ähnliche Funktion wie die auf der SPI-1 kodierten Effektoren in *Salmonella* in der sehr frühen Phase der Infektion besitzen. Für *Chlamydia trachomatis* konnte gezeigt werden, dass das im späten Entwicklungszyklus transkribierte und in Elementarkörpern nachweisbare Protein Tarp (CT456) in der Phase der Aufnahme der Elementarkörper in die Wirtszelle an der Rekrutierung von Aktin beteiligt ist [BELLAND et al. 2003; CLIFTON et al., 2004]. Wahrscheinlich wird Tarp über das Typ-III-Sekretionssystem innerhalb von wenigen Minuten nach einer durch Heparansulfat-ähnlicher Proteoglycane vermittelten Anlagerung der Elementarkörper an die Wirtszelle in das Zytoplasma der Zelle sezerniert. Für die Typ-III-Sekretion spricht, dass Tarp durch das heterologe Typ-III-Sekretionssystem von *Yersinia pseudotuberculosis* sezerniert wird. In der Wirtszelle wird Tarp Tyrosin-phosphoryliert und zeitlich und räumlich assoziiert mit der Rekrutierung von Aktin [CLIFTON et al., 2004]. Eine vergleichbare Rolle scheint Tarp bei der Internalisierung der Elementarkörper von *Chlamydophila pneumoniae* und anderen Chlamydienspezies zu spielen, wobei die Rekrutierung von Aktin unabhängig von der Tyrosin-Phosphorylierung, die nur bei *Chlamydia trachomatis* beobachtet wird, ist [CLIFTON et al., 2005]. Für CPn0809 wäre aber wahrscheinlich eher eine Funktion in der sehr späten Phase des Entwicklungszyklus, also in der Phase der Rückdifferenzierung zu Elementarkörpern oder der Freisetzung der Chlamydien aus der Wirtszelle, denkbar.

Die genomische Lokalisation von *cpn0809* in einem Subcluster des Typ-III-Sekretionssystems in enger Nachbarschaft des putativen Chaperons *lcrH-1*, das Fehlen eines Signalpeptides und die Ähnlichkeit in Größe und Hydrophobizitätsmuster zu den Typ-III-sezernierten Translokatoren YopB und YopD von *Yersinia* spp. sprechen für eine Sekretion von CPn0809 über den Typ-III-Sekretionsapparat [SUBTIL et al., 2000]. Über die Funktion von CPn0809 ist bislang nichts bekannt. Aufgrund der Ähnlichkeiten zu YopB und YopD, die nach Transport über den Typ-III-Sekretionsapparat an der Bildung einer Pore in der Plasmamembran der Wirtszelle beteiligt sind und somit die Sekretion von Effektoren in das Zytoplasma der Wirtszelle ermöglichen [NEYT &

CORNELIS, 1999], wäre eine Funktion von CPn0809 als Translokator denkbar. Die in dieser Arbeit gezeigte Lokalisation im Zytoplasma *Chlamydomphila-pneumoniae*-AR39-infizierter HEp-2-Zellen ist jedoch eher ein Hinweis darauf, dass CPn0809 ein Effektor des Typ-III-Sekretionssystems ist, der mit Stoffwechselprozessen der Wirtszelle interagieren könnte. Für einige sezernierte chlamydiale Proteine wie z. B. Tarp, CPAF und IncG konnten bereits Interaktionen mit Wirtszellfaktoren nachgewiesen werden [HACKSTADT et al., 1999; ZHONG et al., 2001; SHAW et al. 2002; CLIFTON et al., 2005].

Die Immunogenität von CPn0809 wurde durch Nachweis von IgG- und IgA-Antikörpern gegen rCPn0809 in vier von sechs Seren von Patienten, die in einer PCR-Untersuchung positiv auf *C. pneumoniae* waren, gezeigt. Auffällig war die Übereinstimmung im Nachweis von IgG- und IgA-Antikörpern, wobei IgM-Antikörper nicht nachgewiesen werden konnten. Dieser Befund lässt sich in das Bild einer Schleimhaut-assoziierten Infektion des Respirationstraktes, wie sie typisch für die (akute) *C. pneumoniae*-Infektion ist, einordnen. Nach diesem positiven ersten Ergebnis wurden in einem zweiten Versuch 23 Seren getestet, wobei zehn von Patienten mit einem positiven und 13 von Patienten mit einem negativen Ergebnis in einer PCR-Untersuchung stammten. Bei Verwendung der PCR-Untersuchung als Referenz war die Sensitivität des IgG-Nachweises mit 80% noch relativ gut, die des IgA-Nachweises betrug hingegen nur 50%. Die Spezifität des IgG-Nachweises war mit 38,5% gering, die des IgA-Nachweises mit 69,2% etwas besser. Der positiv prädikative Wert des IgG- und IgA-Nachweis war mit 50% bzw. 55,5% für die Anwendung als diagnostischer Test zu gering, der negativ prädikative Wert mit 71,4% für den IgG- und 64,3% für den IgA-Nachweis etwas besser. Der Test auf IgM-Antikörper gegen rCpn0809 war im zweiten Versuch lediglich für ein Serum, welches von einem in der PCR-Untersuchung negativ getesteten Patienten stammte, positiv. Hieraus resultiert eine Sensitivität von 0% und weitere Betrachtung der Testgütekriterien erscheint nicht sinnvoll. Für eine abschließende Aussage über die Verwendbarkeit von rCPn0809 in einem diagnostischen Test war die Anzahl der getesteten Seren zu gering. Als Referenz-Test ist die PCR-Untersuchung auf eine Infektion mit *C. pneumoniae* nicht ausreichend, da mit ihr im Gegensatz zu serologischen Tests eine durchgemachte Infektion nicht erkannt werden kann. Für die Anwendung als diagnostischer Test könnte die Kombination von rCPn0809 mit anderen Proteinen erfolversprechend sein. So ließen sich eventuell Sensitivität, Spezifität, positiv und negativ prädiktiver Wert verbessern.

Um mögliche Interaktionspartner der Wirtszelle von Cpn0809 zu identifizieren und so Hinweise auf die Funktion von CPn0809 zu erhalten, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine kommerziell verfügbare HeLa-cDNA-Bank mithilfe eines GAL4-basierten Yeast-Two-Hybrid-Systems durchmustert. Eine aus den in den Infektionsversuchen verwandten HEp-2-Zellen gewonnene



cDNA-Bank war nicht verfügbar. Sowohl HEp-2- als auch HeLa-Zellen sind immortalisierte Epithelzellen und suszeptibel für *C. pneumoniae* [Wong et al., 1992]. Wahrscheinlich sind HEp-2-Zellen aus HeLa-Zellen hervorgegangen [Kenney, 1993]. Mithilfe des gleichen Yeast-Two-Hybrid-Systems konnten SCIDMORE & HACKSTADT [2001] das humane Protein 14-3-3 $\beta$  als Interaktionspartner des mutmaßlich Typ-III-sezernierten Einschlusskörper-Membranproteins IncG aus *Chlamydia trachomatis* identifizieren. 14-3-3 $\beta$  ist als Mitglied der 14-3-3-Proteinfamilie ein dimeres, zytosolisches Phosphoserin-bindendes Protein und an der Regulation verschiedener Zellprozesse wie Apoptose mitogener Signaltransduktion und Kontrolle des Zellzyklus beteiligt [FU et al., 2000]. HACKSTADT et al. [1999] zeigten mit einem ähnlichen, ebenfalls GAL4-basierten Yeast-Two-Hybrid-System die Interaktion des Einschlusskörper-Membranproteins IncA mit sich selbst. Wahrscheinlich ist IncA in *Chlamydia trachomatis* an der Fusion homotypischer Einschlusskörper beteiligt.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Yeast-Two-Hybrid-Versuchen wurde CPn0809 als Köder des Yeast-Two-Hybrid-Systems eingesetzt. Zunächst konnte die Expression des CPn0809-Köderkonstruktes in *Saccharomyces cerevisiae* AH109 gezeigt und eine Autoaktivierung der Reporter durch das Köderkonstrukt ausgeschlossen werden. In drei Yeast-Two-Hybrid-Screening-Versuchen wurden insgesamt  $12 \times 10^6$  Klone getestet. Für Screeningversuche einer Genbank wird gefordert, dass jeder Klon rechnerisch etwa 1,5 bis 3 Mal in dem Test vertreten ist. Bei  $3,5 \times 10^6$  unabhängigen Klonen der HeLa-cDNA-Bank wurde jeder Klon rechnerisch 3,4 Mal getestet und diese Forderung damit erfüllt.

In den drei Screeningversuchen wurden die Selektionsstringenz und die Transformationsstrategie variiert. Bei in Versuch I und II angewandter mittlerer Selektionsstringenz wuchsen bei Selektion auf Aktivierung des *HIS3*-Reportergens weit mehr als 1000 Kolonien, von denen aus Gründen der praktischen Handhabung nicht alle weiter analysiert werden konnten. Es war nahe liegend, dass ein Großteil der gewachsenen Kolonien falsch-positive waren. Nach ihrer Größe wurden etwa 200–300 Kolonien ausgewählt und auf Selektionsmedium höher Stringenz überführt. Zahlreiche Klone mit schwacher Aktivierung des *HIS3*-Reportergens wurden nicht berücksichtigt und die Auswahl nach Koloniegröße ist letzten Endes ein subjektives und willkürliches Verfahren. In Versuch III wurde direkt auf Selektionsmedium hoher Stringenz ausplattiert. Hierdurch konnte die Zahl falsch-positiver Klone deutlich reduziert werden, es bestand aber das Risiko, unter Umständen schwache Interaktionen nicht detektieren zu können.

Die Ergebnisse von Versuch I und III ähnelten sich sehr. Auffallend war, dass keiner der in Versuch II gefundenen Interaktionskandidaten in den anderen Versuchen detektiert wurde. Für zehn der 71 Interaktionskandidaten gelang die Sequenzierung der Genbank-Inserts nicht. Die PCR-Amplifikation der Genbank-Inserts dieser zehn Interaktionskandidaten erbrachte nur eine geringe

Ausbeute, so dass nicht genügend DNA zur Sequenzierung vorgelegen haben könnte. Bedingt könnte dieses durch eine ungenügende Ausbeute der Plasmidpräparation aufgrund mangelhaften Wachstums der Interaktionskandidaten auf dem Selektionsmedium hoher Stringenz bei nur schwacher Aktivierung der Reportergene sein. Jedoch war durch eine größere Expansion auf mehreren Selektionsplatten der entsprechenden Interaktionskandidaten vor Plasmidpräparation oder Einsatz größerer Mengen der Plasmidpräparation in die PCR-Reaktionen keine erfolgreiche Sequenzierung zu erreichen. Zur Identifizierung von falsch-positiven unter den 14 Interaktionskandidaten mit positiven Ergebnis der Sequenzanalyse wurde getestet, ob die in den Screeningversuchen beobachtete Aktivierung der Reportergene spezifisch für das Zusammenspiel von CPn0809-Köderfusionsprotein und dem Beutekonstrukt des Interaktionskandidaten war. Neun der Interaktionskandidaten wurden als falsch-positiv eingeordnet, da sie auch mit den Kontroll-Köderkonstrukten die Reporter des Yeast-Two-Hybrid-Systems zu aktivierten. Bemerkenswert war, dass fünf Interaktionskandidaten weder mit dem CPn0809-Köderfusionsprotein noch mit den Kontroll-Köderkonstrukten eine Aktivierung der Reportergene zeigten und als negativ einzuordnen waren.

Der Einsatz der sequentiellen Transformation von Köder- und Genbankplasmid hatte statt des erhofften positiven Effektes durch eine höhere Transformationseffizienz drei negative Effekte zur Folge: Im Vergleich zu den mit simultaner Kotransformation durchgeführten Versuchen war die Transformationseffizienz deutlich geringer. Die Anzahl der Interaktionskandidaten ohne positives Ergebnis in der Sequenzanalyse und der Interaktionskandidaten, für die eine Aktivierung der Reporter nicht reproduziert werden konnte, war jedoch deutlich höher als bei Anwendung der simultanen Kotransformation.

Mittels des Yeast-Two-Hybrid-Systems konnte unter den eingesetzten Bedingungen nach Testung von etwa  $12 \times 10^6$  Klonen kein Cpn0809-Interaktionskandidat in der HeLa-cDNA-Bank identifiziert werden. Für den erfolglosen Einsatz des Yeast-Two-Hybrid-Systems gibt es mehrere denkbare Gründe, die auf die Methodik oder aber auch auf die Funktion von CPn0809 zurückgehen:

1. Die Interaktion von CPn0809 und seinem Wirtszellpartner könnte schwach oder instabil sein, so dass sie im Yeast-Two-Hybrid-System nicht oder nur bei Selektion mittlerer Stringenz zu detektieren wäre. Hierbei könnten die entsprechenden Kolonien unter der Vielzahl an Kolonien gewesen sein, die aufgrund ihrer kleinen Größe auf eine nur schwache Expression des HIS3-Reporters schließen ließen und nicht weiter beachtet wurden.

2. Das CPn0809-Köderkonstrukt könnte nicht im Nukleus der Hefezellen lokalisiert sein. Das verwandte Yeast-Two-Hybrid-System erlaubte es nicht wie andere erhältliche Systeme, die Lokalisation des Köderkonstruktes im Kern zu verifizieren.
3. Es ist möglich, dass in dem Köder- oder Beutefusionsprotein die entsprechende Interaktionsdomäne verdeckt oder dass das Köder- oder Beuteproteins in der Ausbildung einer für die Interaktion notwendigen Sekundärstruktur beeinträchtigt ist [VAN AELST et al., 1993].
4. Eventuell für eine Interaktion notwendige posttranslationale Modifikationen (wie z. B. Glykosylierung) oder die Ausbildung der richtigen Sekundärstruktur könnten in den Hefezellen nicht möglich sein [FIELDS S & STERNGLANZ, 1994].
5. Es ist denkbar, dass einige Proteininteraktionen nicht mit einem GAL4-basierten, wohl aber mit einem LexA-basierten Yeast-Two-Hybrid-System detektiert werden können [KIM & SHIM, 1999; VAN CRIEKINGE & BEYAERT, 1999]. Dies könnte durch ein unterschiedliches Verhalten der GAL4- bzw. LexA-Fusionsproteine z. B. hinsichtlich ihrer Konformität bedingt werden. Ein LexA-basiertes Yeast-Two-Hybrid-System wurde jedoch nicht eingesetzt.
6. In den Yeast-Two-Hybrid-Versuchen wurde eine HeLa-cDNA-Bank verwandt, wohingegen als Wirtszelle in den Infektionsversuchen HEp-2-Zellen eingesetzt wurden. Es ist möglich, dass der Interaktionspartner von CPn0809 in HeLa-Zellen nicht exprimiert und die entsprechende cDNA deshalb nicht in der verwandten Genbank enthalten ist. HeLa-Zellen sind jedoch wie HEp-2-Zellen suszeptibel für *C. pneumoniae* [WONG et al., 1992]. Darüber hinaus wurden viele der bislang nachgewiesenen Interaktionen von Chlamydien mit Prozessen der Wirtszelle in HeLa-Zellen gezeigt (s. o.).
7. Denkbar ist auch, dass CPn0809 kein Effektor sondern z. B. Translokator des Typ-III-Sekretionssystems ist und mit keinem Wirtszellprotein interagiert. In diesem Falle wäre eine Interaktion mit einem chlamydialen Protein denkbar.

Sollte der Grund für das Scheitern an der Methodik liegen, kämen zur Identifizierung eines Interaktionspartners ein anderes, z. B. ein LexA-basiertes Yeast-Two-Hybrid-System oder eine andere Methode wie z. B. Koimmunoprecipitation oder GST-Pulldownanalysen in Frage. Weiterführend wäre auch die genauere Bestimmung der subzellulären Lokalisation von CPn0809 in der *Chlamydomphila-pneumoniae*-infizierten Wirtszelle, z. B. durch Konfokalmikroskopie oder Immunelektronenmikroskopie. Ließe sich eine Kolo-kalisation mit Strukturen oder Faktoren der Wirtszelle zeigen, könnten hieraus weitere Rückschlüsse auf die Funktion von CPn0809 gezogen werden. Die Expression von CPn0809 in transfizierten Wirtszellen könnte für diese Analysen

hilfreich sein. Darüber hinaus könnten so mittels cDNA-Array und 2D-Gelelektrophorese die Auswirkungen von CPn0809 auf das Transkriptom bzw. Proteom der Wirtszelle untersucht werden. Hieraus könnten sich Anhaltspunkte für die Funktion oder einen Interaktionspartner (z. B. ein Transkriptionsfaktor) ergeben.

Falls CPn0809 mit einem chlamydialen Protein interagieren sollte, könnte dieses unter Umständen mittels eines Yeast-Two-Hybrid-Systems oder aber mittels eines bakteriellen Two-Hybrid Systems, wie es SLEPENKIN et al. [2005] zur Identifizierung einer Interaktion zwischen den chlamydialen Proteinen LcrH-2 und LcrE eingesetzt haben, detektiert werden.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

### 6.1 Deutsch

*Chlamydophila pneumoniae* ist ein obligat intrazelluläres Pathogen, welches weltweit für etwa 10% der ambulant erworbenen Pneumonien verantwortlich gemacht und darüber hinaus mit einigen chronischen Erkrankungen wie Atherosklerose, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung und Asthma in Verbindung gebracht wird. Der gesamte Entwicklungszyklus der Chlamydien findet in der Wirtszelle in einer Vakuole, dem Einschlusskörper, statt. Eine Möglichkeit, um über die Membran des Einschlusskörpers in Prozesse der Wirtszelle einzugreifen, bietet den Chlamydien die Sekretion von Effektoren über das Typ-III-Sekretionssystem. In dieser Arbeit wurde der putative Effektor des Typ-III-Sekretionssystems CPn0809 hinsichtlich Transkription, Expression, Lokalisation in der infizierten Wirtszelle und möglicher Funktion untersucht.

Die Transkription von *cpn0809* konnte in Infektionsversuchen mittels RT-PCR-Analysen zwischen der 24. und 48. Stunde nach Infektionsbeginn, also im späten Entwicklungszyklus, gezeigt werden. Zur Analyse der Expression und Lokalisation wurde ein polyklonales Antiserum gegen rekombinantes CPn0809 generiert. In Western-Blot-Analysen ließ sich die Expression von CPn0809 ebenfalls ab 48 Stunden nach Infektionsbeginn nachweisen. Immunfluoreszenztests *C. pneumoniae*-infizierter Wirtszellen zeigten eine Lokalisation von CPn0809 im Einschlusskörper und darüber hinaus im angrenzenden Zytoplasma der Wirtszelle als Hinweis auf eine Sekretion. Um Hinweise auf die Funktion des putativen Effektors zu erhalten, wurde mittels eines Yeast-Two-Hybrid-Systems eine humane cDNA-Genbank auf Interaktionspartner von CPn0809 durchmustert. Alle bisher identifizierten Interaktionskandidaten stellten sich jedoch in Kontrollversuchen als falsch-positiv heraus.

Darüber hinaus wurde die Immunogenität von CPn0809 untersucht. In Seren von Patienten, die in PCR-Untersuchungen auf *C. pneumoniae* ein positives Ergebnis zeigten, konnten Antikörper gegen rekombinantes CPn0809 nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob sich das generierte rekombinante CPn0809 zur Verbesserung der Diagnostik von Infektionen mit *C. pneumoniae* einsetzen lässt.

## 6.2 English

*Chlamydomphila pneumoniae* is an obligate intracellular pathogen, which is supposed to be responsible for about 10% of community acquired pneumonia cases worldwide and furthermore related to several chronic diseases like atherosclerosis, chronic obstructive pulmonary disease and asthma. The entire developmental cycle of *Chlamydomphila* occurs inside the host cell within a vesicle, termed inclusion body. Secretion of effector proteins via the type III secretion system provides a mechanism, by which *Chlamydomphila* might interfere with host cell processes across the inclusion membrane. The objective of this work was to analyse the putative type III secretion effector CPn0809 in regard to its transcription, expression, localisation within the infected host cell and potential function.

Using RT-PCR assays on infected cells, transcription of *cpn0809* could be detected not before 48 h after infection, i.e. in the late developmental cycle. To analyse the expression and localisation, a polyclonal antiserum was generated against recombinant CPn0809. Expression of CPn0809 was shown 48 h after infection in Western Blot studies, concurring to the transcription data. In immunofluorescence assays, which were carried out on infected host cells, CPn0809 was detected in the inclusion and furthermore in the surrounding cytoplasm, indicating its secretion. To investigate the potential function of the putative effector, a human cDNA library was screened for interaction partners using CPn0809 as bait in a Yeast Two-Hybrid system. However, all found interaction candidates were recognised as false positive.

Furthermore, the immunogenicity of CPn0809 was investigated. Antibodies against recombinant CPn0809 were detected in sera of patients, who were positive in PCR tests for *C. pneumoniae*. Further tests are necessary to determine, whether the generated recombinant CPn0809 could be used for an improvement of diagnostics of infections with *C. pneumoniae*.

## 7 ANHANG

### 7.1 Verzeichnis der Abbildungen

<b>Abb. 1:</b>	Neue und alte Taxonomie der <i>Chlamydiales</i>	3
<b>Abb. 2:</b>	Schematisch dargestellter Entwicklungszyklus der Chlamydien	6
<b>Abb. 3:</b>	Schematischer Aufbau des Typ-III-Sekretionsapparates	13
<b>Abb. 4:</b>	Genomische Organisation des <i>lcrh-1</i> -Subclusters	14
<b>Abb. 5:</b>	Prinzip der Klonierung eines PCR-Produkts in einen TOPO-TA-Vektor	36
<b>Abb. 6:</b>	Regulation des araBAD-Promotors	37
<b>Abb. 7:</b>	Prinzip des Yeast-Two-Hybrid-Systems	49
<b>Abb. 8:</b>	Reportergenkonstrukte in <i>S. cerevisiae</i> AH109	50
<b>Abb. 9:</b>	Hydropathie-Plot für CPn0809 nach KYTE & DOOLITTLE [1982] und Vorhersage von Transmembranregionen nach VON HEIJNE [1992]	55
<b>Abb. 10:</b>	Analyse der Transkription von <i>cpn0809</i>	56
<b>Abb. 11:</b>	Überprüfung der pBAD-TOPO- <i>cpn0809</i> -Konstrukte auf die Orientierung der Inserts	57
<b>Abb. 12:</b>	Optimierung der Expression des rekombinanten CPn0809	58
<b>Abb. 13:</b>	Enzymatische Lyse der <i>E. coli</i> -Zellen und Vergleich der löslichen und unlöslichen Fraktion	59
<b>Abb. 14:</b>	Aufreinigung des rekombinanten CPn0809	60
<b>Abb. 15:</b>	Sensitivität des polyklonalen anti-CPn0809-Serums im Western Blot	61
<b>Abb. 16:</b>	Expression von CPn0809	62
<b>Abb. 17:</b>	Immunfluoreszenztest <i>C. pneumoniae</i> -infizierter HEp-2-Zellen	64
<b>Abb. 18:</b>	Testung von sechs Patientenseren im Western Blot auf Antikörper gegen rCPn0809	65
<b>Abb. 19:</b>	Expression des CPn0809-Köderfusionsproteins	68
<b>Abb. 20:</b>	Analyse der amplifizierten HeLa-cDNA-Genbank	69
<b>Abb. 21:</b>	Ausgewählte Klone des III. Screeningversuches	71
<b>Abb. 22:</b>	PCR-Analyse der aus den Interaktionskandidaten isolierten Köder- und Beuteplasmide	72

## 7.2 Verzeichnis der Tabellen

<b>Tab. 1:</b>	Für Sequenzierungen verwendete Primer	32
<b>Tab. 2:</b>	Variable Bedingungen der durchgeführten PCR-Reaktionen	33
<b>Tab. 3:</b>	Variable Bedingungen der durchgeführten RT-PCR-Reaktionen	34
<b>Tab. 4:</b>	Übersicht über die anwendbaren Selektionsstringenzen	52
<b>Tab. 5:</b>	Konzentration der rCPn0809-Lösungen und Ausbeute der Aufarbeitung	60
<b>Tab. 6:</b>	Testung von 10 Seren von PCR positiven und 13 Seren von PCR negativen Patienten auf anti-rCPn0809-Antikörper	66
<b>Tab. 7:</b>	Sensitivität, Spezifität, positiv und negativ prädiktiver Wert des Tests auf rCPn0809-Antikörper	66
<b>Tab. 8:</b>	Test auf Autoaktivierung der Reporter	68
<b>Tab. 9:</b>	Übersicht der Yeast-Two-Hybrid-Screening-Versuche	70
<b>Tab. 10:</b>	Übersicht über die Interaktionskandidaten	72
<b>Tab. 11:</b>	Interaktionskandidaten mit positivem Ergebnis der Sequenzanalyse	73
<b>Tab. 12:</b>	Ergebnis des Kontrollversuches zum Test der Beutekonstrukte der Interaktionskandidaten auf für den CPn0809-Köder unspezifische Aktivierung der Reporter	74



## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abrams JT, Balin BJ, Vonderheid EC (2001):** Association between Sezary T cell-activating factor, *Chlamydia pneumoniae*, and cutaneous T cell lymphoma. *Ann NY Acad Sci* 941, 69–85.
- Aldous MB, Grayston JT, Wang S, Foy HM (1992):** Seroepidemiology of *Chlamydia pneumoniae* TWAR infection in Seattle families, 1966–1979. *J Infect Dis* 166, 646–649.
- 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.
- 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.
- Bartel PL, Chien C-T, Sternglanz R, Fields S:** Cellular Interactions in Development: A Practical Approach. In: *Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions*. Herausgeber: Hartley DA. Oxford University Press, Oxford, UK 1993a, 153–179.
- Bartel PL, Chien, C-T, Sternglanz R, Fields S (1993b):** Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *BioTechniques* 14, 920–924.
- Bavoil PM, Hsia RC (1998):** Type III secretion in *Chlamydia*: a case of déjà vu? *Mol Microbiol* 28, 860–862.
- 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, Zhong G, Crane DD, Hogan D, Sturdevant D, Sharma J, Beatty WL, Caldwell HD (2003):** Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 8478–8583.
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004):** Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340, 783–795.
- Bodetti TJ, Jacobson E, Wan C, Hafner L, Pospischil A, Rose K, Timms P (2002):** Molecular evidence to support the expansion of the hostrange of *Chlamydoxila pneumoniae* to include reptiles as well as humans, horses, koalas and amphibians. *Syst Appl Microbiol* 25, 146–152.
- Boman J, Hammerschlag MR (2002):** *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis: critical assessment of diagnostic methods and relevance to treatment studies. *Clin Microbiol Rev* 15, 1–20.

- Brown WJ, Skeiky YA, Probst P, Rockey DD (2002):** Chlamydial antigens colocalize within IncA-laden fibers extending from the inclusion membrane into the host cytosol. *Infect Immun* 70, 5860–5864.
- Bush RM, Everett KD (2001):** Molecular Evolution of the *Chlamydiaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 203–220.
- 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 CR, Rizzo A, Catania MR, Galle F, Losi E, Hasty DL, Rossano F (2002):** *Chlamydia pneumoniae* infections prevent the programmed cell death on THP-1 cell line. *FEMS Microbiol Lett* 215, 69–74.
- Cercek B, Shah PK, Noc M, Zahger D, Zeymer U, Matetzky S, Maurer G, Mahrer P (2003):** Effect of short-term treatment with azithromycin on recurrent ischaemic events in patients with acute coronary syndrome in the Azithromycin in Acute Coronary Syndrome (AZACS) trial: a randomised controlled trial. *Lancet* 361, 809–813.
- Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R und Fields S (1991):** The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 9578–9582.
- Claros MG, von Heijne G (1994):** TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Comput Appl Biosci* 10, 685–686.
- Clausen JD, Christiansen G, Holst HU, Birkelund S (1997):** *Chlamydia trachomatis* utilizes the host cell microtubule network during early events of infection. *Mol Microbiol* 25, 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.
- Clifton DR, Dooley CA, Grieshaber SS, Carabeo RA, Fields KA, Hackstadt T (2005):** Tyrosine phosphorylation of the chlamydial effector protein Tarp is species specific and not required for recruitment of actin. *Infect Immun* 73, 3860–3868.
- 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.
- Dowell SF, Peeling RW, Boman J, Carlone GM, Fields BS, Guarner J, Hammerschlag MR, Jackson LA, Kuo CC, Maass M, Messmer TO, Talkington DF, Tondella ML, Zaki SR; *C. pneumoniae* Workshop Participants (2001):** Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays:

recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). *Clin Infect Dis* 33, 492–503.

**Dunne MW (2000):** Rationale and design of a secondary prevention trial of antibiotic use in patients after myocardial infarction: the WIZARD (weekly intervention with zithromax [azithromycin] for atherosclerosis and its related disorders) trial. *J Infect Dis* 18, 572–578.

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

**Elledge SJ, Mulligan JT, Ramer SW, Spottswood M, Davis RW (1991):**  $\lambda$ -YES: A multifunctional cDNA expression vector for the isolation of genes by complementation of yeast and *Escherichia coli* mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 1731–1735.

**Everett KD, Hatch TP (1995):** Architecture of the envelope of *Chlamydia psittaci* 6BC. *J Bacteriol* 177, 877–882.

**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 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.

**Fang GD, Fine M, Orloff J, Arisumi D, Yu VL, Kapoor W, Grayston JT, Wang SP, Kohler R, Muder RR et al. (1990):** New and emerging etiologies for community-acquired pneumonia with implications for therapy. A prospective multicenter study of 359 cases. *Medicine (Baltimore)* 69, 307–316.

**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, Mead DJ, Dooley CA, Hackstadt T (2003):** *Chlamydia trachomatis* type III secretion: evidence for a functional apparatus during early-cycle development. *Mol Microbiol* 48, 671–683.

**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.

**Fields S, Song O (1989):** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245–246.

- Fields S, Sternglanz R (1994):** The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet* 10, 286–292.
- File TM, Tan JS (1997):** Incidence, etiologic pathogens, and diagnostic testing of community-acquired pneumonia. *Curr Opin Pulm Med* 3, 89–97.
- Finley RL Jr, Brent R (1994):** Interaction mating reveals binary and ternary connections between *Drosophila* cell cycle regulators. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 12980–12984.
- 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.
- Fox A, Rogers JC, Gilbert J, Morgan S, Davis CH, Knight S, Wyrick PB (1990):** Muramic acid is not detectable in *Chlamydia psittaci* or *Chlamydia trachomatis* by gas chromatography-mass spectrometry. *Infect Immun* 58, 835–837.
- 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.
- Fryden A, Kihlstrom E, Maller R, Persson K, Romanus V, Ansehn S (1989):** A clinical and epidemiological study of “ornithosis” caused by *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR). *Scand J Infect Dis* 21, 681–691.
- Fu H, Subramanian RR, Masters SC (2000):** 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, 617–647.
- Galan JE (1996):** Molecular genetic bases of Salmonella entry into host cells. *Mol Microbiol* 20, 263–271.
- 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.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A:** *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, University of Hertfordshire, Hatfield, Herts, UK 2005, 571–607.
- Gattiker A, Gasteiger E, Bairoch A (2002):** ScanProsite: a reference implementation of a PROSITE scanning tool. *Appl Bioinformatics* 1, 17–108.
- 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.

- Ghosh P (2004):** Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 771–795.
- Gieffers J, Fullgraf H, Jahn J, Klinger M, Dalhoff K, Katus HA, Solbach W, Maass M (2001):** *Chlamydia pneumoniae* infection in circulating human monocytes is refractory to antibiotic treatment. *Circulation* 23, 351–356.
- Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH (1992):** Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 20, 1425.
- Gnarpe J, Gnarpe H, Sundelof B (1991):** Endemic prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in subjectively healthy persons. *Scand J Infect Dis* 23, 387–388.
- Golemis EA, Serebriiskii I, Finley RL Jr, Kolonin MG, Gyuris J, Brent R:** Analysis of Protein Interactions; Interaction Trap/Two-Hybrid System to Identify Interacting Proteins. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. Herausgeber: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA 2003, 20.0–20.1.
- Grayston JT (1965):** Immunisation against trachoma. *Panam Health Organ Sci Publ* 147, 549.
- Grayston JT (1992):** Infections caused by *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. *Clin Infect Dis* 15, 757–761.
- 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* 17, 161–168.
- Grayston JT, Kuo CC, Campbell LA, Wang SP (1989):** *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* strain TWAR. *Int J Syst Bacteriol* 39, 88.
- 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.
- Guthrie C, Fink GR (1991):** Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. *Methods Enzymol* 194, 3–933.
- Hackstadt T (1998):** The diverse habitats of obligate intracellular parasites. *Curr Opin Microbiol* 1, 82–87.
- Hackstadt T, Scidmore-Carlson MA, Shaw EI, Fischer ER (1999):** The *Chlamydia trachomatis* IncA protein is required for homotypic vesicle fusion. *Cell Microbiol* 1, 119–130.
- Haidl S, Ivarsson S, Bjerre I, Persson K (1992):** Guillain-Barre syndrome after *Chlamydia pneumoniae* infection. *N Engl J Med* 20, 576–577.
- Halberstaedter L, Prowazek SV (1907):** Über Zelleinschlüsse parasitärer Natur beim Trachom. *Arb Kais Gesundheitsamte* 26, 44–47.

- Hammerschlag MR, Chirgwin K, Roblin PM, Gelling M, Dumornay W, Mandel L, Smith P, Schachter J (1992):** Persistent infection with *Chlamydia pneumoniae* following acute respiratory illness. *Clin Infect Dis* 14, 178–182.
- Hanahan D (1983):** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557–580.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993):** The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805–816.
- Heinemann M, Susa M, Simnacher U, Marre R, Essig A (1996):** Growth of *Chlamydia pneumoniae* induces cytokine production and expression of CD14 in a human monocytic cell line. *Infect Immun* 64, 4872–4875.
- Heinemann M, Kern WV, Bunjes D, Marre R, Essig A. (2000):** Severe *Chlamydia pneumoniae* infection in patients with neutropenia: case reports and literature review. *Clin Infect Dis* 31, 181–184.
- Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S, Zychlinsky A (1999):** The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 2396–2401.
- Heslot H, Gaillardin C (Herausgeber):** *Molecular Biology and Genetic Engineering of Yeasts*. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL, USA 1992.
- Heuer D, Brinkmann V, Meyer TF, Szczepek AJ (2003):** Expression and translocation of chlamydial protease during acute and persistent infection of the epithelial HEP-2 cells with *Chlamydomonas (Chlamydia) pneumoniae*. *Cell Microbiol* 5, 315–322.
- Hilbi H, Moss JE, Hersh D, Chen Y, Arondel J, Banerjee S, Flavell RA, Yuan J, Sansonetti PJ, Zychlinsky A (1998):** *Shigella*-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. *J Biol Chem* 273, 32895–32900.
- Hilgers R, Gefeller O, Munzel U:** *Biostatistik für Mediziner. Begleittext zur Vorlesung. (Skripten zur Medizinischen Biometrie.)* Herausgeber: Brunner E. 13. korrigierte Auflage. Fakultät für Medizin, Universität Göttingen, Göttingen 1999.
- Hill J, Donald KA, Griffiths DE (1991):** DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res* 19, 5791.
- Holmström A, Olsson J, Cherepanov P, Maier E, Nordfelth R, Pettersson J, Benz R, Wolf-Watz H, Forsberg A (2001):** LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol Microbiol* 39, 620–632.

- 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.
- Hulo N, Sigrist CJ, Le Saux V, Langendijk-Genevaux PS, Bordoli L, Gattiker A, De Castro E, Bucher P, Bairoch A (2004):** Recent improvements to the PROSITE database. *Nucleic Acids Res* 32, D134–137.
- Hyman CL, Augenbraun MH, Roblin PM, Schachter J, Hammerschlag MR (1991):** Asymptomatic respiratory tract infection with *Chlamydia pneumoniae* TWAR. *J Clin Microbiol* 29, 2082–2083.
- Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983):** Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153, 163–168.
- Iwabuchi K, Li B, Bartel P, Fields S (1993):** Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* 8, 1693–1696.
- James P, Halladay J, Craig EA (1996):** Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425–1436.
- Journet L, Hughes KT, Cornelis GR (2005):** Type III secretion: a secretory pathway serving both motility and virulence (Review). *Mol Membr Biol* 22, 41–50.
- 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.
- Karvonen M, Tuomilehto J, Pitkaniemi J, Saikku P (1993):** The epidemic cycle of *Chlamydia pneumoniae* infection in eastern Finland, 1972–1987. *Epidemiol Infect* 110, 349–360.
- Karvonen M, Tuomilehto J, Pitkaniemi J, Naukkarinen A, Saikku P (1994):** *Chlamydia pneumoniae* IgG antibody prevalence in south-western and eastern Finland in 1982 and 1987. *Int J Epidemiol* 23, 176–184.
- Kaul R, Wenman WM (1998):** Eukaryotic-like histones in *Chlamydia*. *Front Biosci* 3, 300–305.
- Kauppinen M, Saikku P (1995):** Pneumonia due to *Chlamydia pneumoniae*: prevalence, clinical features, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis* 21 Suppl 3, 244–252.
- Kenney GE (1993):** Origin of HEp-2 cells used for culture of chlamydiae. *J Clin Microbiol* 31, 470–471.
- Kim SK, Shim J (1999):** Interaction between F Plasmid Partition Proteins SopA and SopB. *Biochem Biophys Res Commun* 263, 113–117.

- Kleemola M, Saikku P, Visakorpi R, Wang SP, Grayston JT (1988):** Epidemics of pneumonia caused by TWAR, a new *Chlamydia* organism, in military trainees in Finland. *J Infect Dis* 157, 230–236.
- Koster M, Bitter W, Tommassen J (2000):** Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *Int J Med Microbiol* 290, 325–331.
- Kriegler M:** Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual. Stockton Press, New York, NY, USA 1990.
- Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara-Tejero M, Sukhan A, Galan JE, Aizawa SI (1998):** Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* 280, 602–605.
- Kuhle V, Hensel M (2004):** Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cell Mol Life Sci* 61, 2812–2826.
- Kuo CC, Chen HH, Wang SP, Grayston JT (1986):** Identification of a new group of *Chlamydia psittaci* strains called TWAR. *J Clin Microbiol* 24, 1034–1037.
- Kuo CC, Grayston JT, Campbell LA, Goo YA, Wissler RW, Benditt EP (1995a):** *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in coronary arteries of young adults (15–34 years old). *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 6911–6914.
- Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT (1995b):** *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microbiol Rev* 8, 451–461.
- Kyhse-Andersen J (1984):** Electroblotting 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.
- Layh-Schmitt G, Bendl C, Hildt U, Dong-Si T, Juttler E, Schnitzler P, Grond-Ginsbach C, Grau AJ (2000):** Evidence for infection with *Chlamydia pneumoniae* in a subgroup of patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 47, 652–655.
- Li B, Fields S (1993):** Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J* 7, 957–963.



- Li L, Elledge SJ, Peterson CA, Bales ES, Legerski RJ (1994):** Specific association between the human DNA repair proteins XPA and ERCC1. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 5012–5016.
- Lieberman D, Ben-Yaakov M, Lazarovich Z, Porath A, Schlaeffer F, Lieberman D, Leinonen M, Saikku P, Horovitz O, Boldur I (1996):** *Chlamydia pneumoniae* community-acquired pneumonia: a review of 62 hospitalized adult patients. *Infection* 24, 109–114.
- Ling M, Merante F, Robinson BH (1995):** A rapid and reliable DNA preparation method for screening a large number of yeast clones by polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 23, 4924–4925.
- Louret O, Doignon F, Crouzet M (1997):** Stable DNA-Binding Yeast Vector Allowing High Bait Expression for Use in the Two-Hybrid System. *BioTechniques* 23, 816–820.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951):** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265–275.
- Luchsinger JA, Pablos-Mendez A, Knirsch C, Rabinowitz D, Shea S (2001):** Antibiotic use and risk of ischemic stroke in the elderly. *Am J Med* 111, 361–366.
- Luchsinger JA, Pablos-Mendez A, Knirsch C, Rabinowitz D, Shea S (2002):** Relation of antibiotic use to risk of myocardial infarction in the general population. *Am J Cardiol* 89, 18–21.
- 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.
- Maass M, Krause E, Engel PM, Kruger S (1997):** Endovascular presence of *Chlamydia pneumoniae* in patients with hemodynamically effective carotid artery stenosis. *Angiology* 48, 699–706.
- Matsumoto A, Manire GP (1970):** Electron microscopic observations on the fine structure of cell walls of *Chlamydia psittaci*. *J Bacteriol* 104, 1332–1337.
- Matsumoto A, Fujiwara E, Higashi N (1976):** Observations of the surface projections of infectious small cell of *Chlamydia psittaci* in thin sections. *J Electron Microsc* 25, 169–170.
- Miyashita N, Kanakoto Y, Matsumoto A (1993):** The morphology of *Chlamydia pneumoniae*. *J Med Microbiol* 38, 418–425.
- Miyashita N, Niki Y, Nakajima M, Fukano H, Matsushima T (2001):** Prevalence of asymptomatic infection with *Chlamydia pneumoniae* in subjectively healthy adults. *Chest* 119, 1416–1419.
- Mori H, Ito K (2001):** The Sec protein-translocation pathway. *Trends Microbiol* 9, 494500.

- Moulder JW:** Characteristics of *chlamydiae*. *Microbiology of chlamydia*. Herausgeber: Barron A, Turco J. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA 1988, 3–20.
- Moulder JW (1993):** Why is *Chlamydia* sensitive to penicillin in the absence of peptidoglycan? *Infect Agents Dis* 2, 87–99.
- 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.
- Mullis KB, Faloona FA (1987):** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335–350.
- Netea MG, Selzman CH, Kullberg BJ, Galama JM, Weinberg A, Stalenhoef AF, Van der Meer JW, Dinarello CA (2000):** Acellular components of *Chlamydia pneumoniae* stimulate cytokine production in human blood mononuclear cells. *Eur J Immunol* 30, 541–549.
- Neyt C, Cornelis GR (1999):** Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. *Mol Microbiol* 33, 971–981.
- Norton R, Schepetiuk S, Kok TW (1995):** *Chlamydia pneumoniae* pneumonia with endocarditis. *Lancet* 345, 1376–1377.
- Ouellette SP, Abdelrahman YM, Belland RJ, Byrne GI (2005):** The *Chlamydia pneumoniae* Type III Secretion-Related IcrH Gene Clusters Are Developmentally Expressed Operons. *J Bacteriol* 187, 7853–7856.
- Pantoja LG, Miller RD, Ramirez JA, Molestina RE, Summersgill JT (2001):** Characterization of *Chlamydia pneumoniae* in HEp-2 cells treated with gamma interferon. *Infect Immun* 69, 7927–7932.
- Petersen E, Boman J, Persson K, Arnerlov C, Wadell G, Juto P, Eriksson A, Dahlen G, Angquist KA (1998):** *Chlamydia pneumoniae* in human abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 15, 138–142.
- Printen JA, Sprague GF Jr (1994):** Protein-protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade. *Genetics* 138, 609–619.
- Rajalingam K, Al Younes H, Muller A, Meyer TF, Szczeppek AJ, Rudel T (2001):** Epithelial cells infected with *Chlamydia pneumoniae* (*Chlamydia pneumoniae*) are resistant to apoptosis. *Infect Immun* 69, 7880–7888.

- Ramamurthi KS, Schneewind O (2002):** Type III protein secretion in *Yersinia* species. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18, 107–133.
- Raulston JE, Wyrick PB:** *Chlamydia. Encyclopedia of Microbiology*. Herausgeber: Lederberg J. Academic Press, San Diego, California, USA 2000, 1 A–C2.
- 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.
- Richeldi L, Ferrara G, Fabbri LM, Gibson PG (2005):** Macrolides for chronic asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2005, CD002997.
- Rockey DD, Matsumoto A:** The chlamydial developmental cycle. In: *Prokaryotic Development*. Herausgeber: Brun YV, Shinkets LJ. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA 1999, 403–425.
- Rockey DD, Heinzen RA, Hackstadt T (1995):** Cloning and characterization of a *Chlamydia psittaci* gene coding for a protein localized in the inclusion membrane of infected cells. *Mol Microbiol* 15, 617–626.
- Roe AJ, Hoey DE, Gally DL (2003):** Regulation, secretion and activity of type III-secreted proteins of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157. *Biochem Soc Trans* 31, 98–103.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988):** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491.
- 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:** *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, USA 1989.
- Schiestl RH, Gietz RD (1989):** High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* 16, 339–346.
- 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, Hackstadt T (2001):** Mammalian 14-3-3beta associates with the *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane via its interaction with IncG. *Mol Microbiol* 39, 1638–1650.

- Scidmore MA, Fischer ER, Hackstadt T (1996a):** Sphingolipids and glycoproteins are differentially trafficked to the *Chlamydia trachomatis* inclusion. *J Cell Biol* 134, 362–374.
- Scidmore MA, Rockey DD, Fischer ER, Heinzen RA, Hackstadt T (1996b):** Vesicular interactions of the *Chlamydia trachomatis* inclusion are determined by chlamydial early protein synthesis rather than route of entry. *Infect Immun* 64, 5366–5372.
- Scidmore MA, Fischer ER, Hackstadt T (2003):** Restricted fusion of *Chlamydia trachomatis* vesicles with endocytic compartments during the initial stages of infection. *Infect Immun* 71, 973–984.
- Scidmore-Carlson M, Hackstadt T:** *Chlamydia* internalization and intracellular fate. In: *Bacterial Invasion into Eukaryotic Cells. (Subcellular Biochemistry, Volume 33.)* Herausgeber: Oelschlaeger TA, Hacker JH. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, NY, USA 2000, 459–478.
- Shaw AC, Vandahl BB, Larsen MR, Roepstorff P, Gevaert K, Vandekerckhove J, Christiansen G, Birkelund S (2002):** Characterization of a secreted *Chlamydia* protease. *Cell Microbiol* 4, 411–424.
- 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.
- 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.
- Slepenkin A, de la Maza LM, Peterson EM (2005):** Interaction between components of the type III secretion system of *Chlamydiaceae*. *J Bacteriol* 187, 473–479.
- 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.
- 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: *Clamidia trachomatis*. *Science* 282, 754–759.
- Stone AF, Mendall MA, Kaski JC, Edger TM, Risley P, Poloniecki J, Camm AJ, Northfield TC (2002):** Effect of treatment for *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* on markers of inflammation and cardiac events in patients with acute coronary syndromes: South Thames Trial of Antibiotics in Myocardial Infarction and Unstable Angina (STAMINA). *Circulation* 106, 1219–1223.

- Su H, Zhang YX, Li R (1985):** Presence of muramic acid in *Chlamydia trachomatis* proved by liquid chromatography-mass spectrometry. *Kexue Tongbao* 30, 695–699.
- Subtil A, Blocker A, Dautry-Varsat A (2000):** Type III secretion system in *Chlamydia* species: identified members and candidates. *Microbes Infect* 2, 367–369.
- Subtil A, Parsot C, Dautry-Varsat A (2001):** Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery. *Mol Microbiol* 39, 792–800.
- Subtil A, Delevoeye 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.
- Troy CJ, Peeling RW, Ellis AG, Hockin JC, Bennett DA, Murphy MR, Spika JS (1997):** *Chlamydia pneumoniae* as a new source of infectious outbreaks in nursing homes. *JAMA* 277, 1214–1218.
- Van Aelst L, Barr M, Marcus S, Polverino A, Wigler M (1993):** Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 6213–6217.
- Van Criekinge W, Beyaert R (1999):** Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biol Proced Online* 2, 1–38.
- Vandahl BB, Birkelund S, Demol H, Hoorelbeke B, Christiansen G, Vandekerckhove J, Gevaert K (2001):** Proteome analysis of the *Chlamydia pneumoniae* elementary body. *Electrophoresis* 22, 1204–1223.
- Vandahl BB, Stensballe A, Roepstorff P, Christiansen G, Birkelund S (2005):** Secretion of Cpn0796 from *Chlamydia pneumoniae* into the host cell cytoplasm by an autotransporter mechanism. *Cell Microbiol* 7, 825–836.
- Van Ooij C, van Ijzendoorn S, Nishijima M:** 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 1998*, 91–94.
- Von Heijne G (1992):** Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol* 225, 487–494.

- Wahl C, Oswald F, Simnacher U, Weiss S, Marre R, Essig A (2001):** Survival of *Chlamydia pneumoniae*-infected Mono Mac 6 cells is dependent on NF-kappaB binding activity. *Infect Immun* 69, 7039–7045.
- 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.
- Wellinghausen N, Straube E, Maass M, Freidank H, Marre R für die CAPNETZ-Studiengruppe:** *Chlamydia pneumoniae* – Schein oder Sein? Vortrag gehalten auf dem 3. Deutscher Chlamydienworkshop, Jena, 09.03. bis 11.03.2005.
- Wesslen L, Pahlson C, Friman G, Fohlman J, Lindquist O, Johansson C (1992):** Myocarditis caused by *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) and sudden unexpected death in a Swedish elite orienteer. *Lancet* 340, 427–428.
- Winstanley C, Hart CA (2001):** Type III secretion systems and pathogenicity islands. *J Med Microbiol* 50, 116–126.
- Wolf K, Hackstadt T (2001):** Spingomyelin trafficking in *Chlamydia pneumoniae*-infected cells. *Cell Microbiol* 3, 145–152.
- Wolff C, Nisan I, Hanski E, Frankel G, Rosenshine I (1998):** Protein translocation into host epithelial cells by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 28, 143–155.
- Wong KH, Skelton SK, Chan YK (1992):** Efficient culture of *Chlamydia pneumoniae* with cell lines derived from the human respiratory tract. *J Clin Microbiol* 30, 1625–1630.
- Wyrick PB (2000):** Intracellular survival by *Chlamydia*. *Cell Microbiol* 2, 275–282.
- Wyrick PB, Choong J, Davis CH, Knight ST, Royal MO, Maslow AS, Bagnell CR (1989):** Entry of genital *Chlamydia trachomatis* into polarized human epithelial cells. *Infect Immun* 57, 2378–2389.
- Ye Q, Worman HJ (1995):** Protein-protein interactions between human nuclear lamins expressed in yeasts. *Exp Cell Res* 219, 292–298.
- Zhong G, Fan P, Ji H, Dong F, Huang Y (2001):** Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors. *J Exp Med* 193, 935–942.

## **DANKSAGUNG**

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. med. Uwe Groß für die Überlassung des interessanten Themas sowie die Bereitschaft, jederzeit für Anregungen und Diskussion zur Verfügung zu stehen. Ferner danke ich ihm für die schnelle und konstruktive Durchsicht meines Manuskriptes. Darüber hinaus war Uwe Groß auch bei Anliegen unabhängig von meiner Dissertation stets mit seiner Hilfe zur Stelle.

Dr. Raimond Lugert danke ich ganz besonders für seine geduldige und warmherzige Betreuung meiner Arbeit. Besonders hilfreich war seine stetige Ansprechbarkeit auch bei kleineren Problemen. In schwierigen Arbeitsabschnitten verstand er es, für den Erhalt meiner Motivation zu sorgen. Auch danke ich ihm für die sehr zügige Durchsicht meines Manuskriptes und seine sehr konstruktiven Anregungen.

Mein besonderer Dank gebührt Tobias Polch für die tatkräftige und gesellige Unterstützung auch während der schwierigen und frustrierenden Phasen des Forschens und Schreibens. Weiter danke ich Prof. Dr. med. H. Eiffert für die hilfreichen Ratschläge, allen Mitarbeitern der AG *Chlamydophila pneumoniae* wie auch der anderen Arbeitsgruppen des Institutes für ihre Hilfe. Nicht zuletzt gilt mein Dank den Mitarbeitern der Nährbodenküche für das geduldige und sorgfältige Bearbeiten meiner unzähligen Aufträge, den Mitarbeitern der Serologie und Diagnostik, des Tierstalles und Constanze für ihre freundliche und hilfsbereite Unterstützung meiner Arbeit.

Für die Bereitstellung von Patientenseren bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. E. Straube, Jena, und Prof. Dr. med. M. Maaß, Lübeck.

## **LEBENS LAUF**

Am 6. Dezember 1975 wurde ich, Martin Kuhns, als erstes dreier Kinder von Utta Kuhns, geb. Rathmann, und Burghardt Kuhns in Osterode am Harz geboren.

Von 1982 bis 1986 besuchte ich die Grundschule Sösetal in Osterode-Förste. Nach dem Besuch der Orientierungsstufe Dreilinden von 1986 bis 1988 wechselte ich auf das Gymnasium in Osterode am Harz. Dort legte ich 1995 das Abitur ab.

Von August 1995 bis August 1996 leistete ich meinen Zivildienst beim Kreisverband Osterode des Deutschen Roten Kreuzes im Rettungsdienst ab. Im Rahmen dieses Dienstes absolvierte ich die Ausbildung zum Rettungssanitäter.

Im Wintersemester 1996 nahm ich an der Georg-August-Universität Göttingen ein Studium der Physik auf. Zum Wintersemester 1997 wechselte ich zum Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen. Im September 1999 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung. Den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung legte ich im August 2000 mit der Note „gut“, den zweiten Abschnitt im April 2004 mit der Note „gut (1,66)“ ab. Mein Praktisches Jahr absolvierte ich in der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie, der Klinik für Allgemeinchirurgie und der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Universitätsklinikums Göttingen. Den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung absolvierte ich im Juni 2005 mit der Note „sehr gut“.

Seit November 2001 arbeite ich an meiner Promotion in der Abteilung Medizinische Mikrobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. U. Groß.

Seit Dezember 2005 bin ich als Forschungsstipendiat in der Abteilung Molekulare Biologie des Max-Planck-Instituts für Infektionsbiologie in Berlin tätig.