

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

**Identifizierung und Charakterisierung des Effektorproteins
CPn1020 von *Chlamydophila pneumoniae***

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

vorgelegt von
TOBIAS POLCH
aus
HANNOVER

GÖTTINGEN 2006

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Groß

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

1	EINLEITUNG	1
1.1	Entdeckung und Taxonomie von Chlamydien	1
1.2	Eigenschaften und Lebenszyklus von Chlamydien	3
1.3	Entdeckung und medizinische Bedeutung von <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	5
1.3.1	Akute Infektionen der Atemwege	6
1.3.2	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i> und chronische Erkrankungen	7
1.4	Interaktionen von Chlamydien mit der Wirtszelle	9
1.5	Das Typ-III-Sekretionssystem von Chlamydien	11
1.6	Ziele der Arbeit	15
2	MATERIAL	16
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	18
2.3.1	Molekulargewichtsmarker	18
2.3.2	Antikörper	18
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	20
2.5	Standardlösungen und Puffer	20
2.6	Reaktionssets (Kits) und Enzyme	21
2.6.1	Kits	21
2.6.2	Enzyme	22
2.7	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	22
2.7.1	Chemikalien	22
2.7.2	Verbrauchsmaterialien	22
2.7.3	Geräte	23
3	METHODEN	24
3.1	Zellkultur	24
3.1.1	Kultivierung von HEp-2-Wirtszellen	24
3.1.2	Kultivierung von <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	24
3.1.3	Konzentrationsbestimmung von <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	25
3.2	Anzucht und Manipulation von Bakterien und Hefen	25
3.2.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	25
3.2.2	Präparation chemisch kompetenter <i>Escherichia-coli</i> -Zellen	25

3.2.3	Transformation von <i>Escherichia-coli</i> -Zellen	26
3.2.4	Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
3.2.5	Transformation von <i>Saccharomyces-cerevisiae</i> -Zellen	26
3.3	Molekularbiologische Methoden	27
3.3.1	Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren	27
3.3.1.1	Isolierung von genomischer DNA aus <i>Chlamydomophila pneumoniae</i>	27
3.3.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	27
3.3.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
3.3.1.4	Isolierung von Gesamt-RNA aus HEp-2-/ <i>Chlamydomophila-pneumoniae</i> -Zellkultur	28
3.3.1.5	Sequenzierung von DNA	28
3.3.1.6	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	29
3.3.1.7	Agarosegelelektrophorese	29
3.3.1.8	Extraktion von DNA aus präparativem Agarosegel	30
3.3.2	Amplifizierung von Nukleinsäuren	30
3.3.2.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	30
3.3.2.2	Semiquantitative RT-PCR	32
3.3.3	Enzymatische Modifikation von DNA	33
3.3.3.1	Restriktion	33
3.3.3.2	Ligation	33
3.4	Proteinbiochemische Methoden	34
3.4.1	Herstellung und Aufreinigung rekombinanter His-Tag-Fusionsproteine	34
3.4.1.1	Prinzip des QiaExpressionist-Systems	34
3.4.1.2	Expression des rekombinanten Proteins	34
3.4.1.3	Proteinaufreinigung	35
3.4.2	Proteinextraktion aus HEp-2-/ <i>Chlamydomophila-pneumoniae</i> -Zellkultur	36
3.4.3	Proteinextraktion aus Hefezellen	36
3.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
3.4.5	Coomassie-Färbung	38
3.4.6	Proteinisolierung aus präparativem SDS-Polyacrylamid-Gel	38
3.4.7	Western-Blot	39
3.4.7.1	Proteintransfer auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen	39
3.4.7.2	Immundetektion	40
3.4.8	(TCA)-Proteinfällung	41
3.4.9	Proteinkonzentrationsbestimmung	41
3.4.10	Immunisierung von Kaninchen zur Antikörpergewinnung	41
3.4.11	Affinitätsaufreinigung von Antiseren	42
3.5	Immunfluoreszenztest	42
3.6	Das Yeast-Two-Hybrid-System	43
3.6.1	Genbank-Amplifizierung	45
3.6.2	Tests auf Autoaktivierung der Reportergene	45
3.6.3	Genbanktransformation	46
3.6.4	Yeast Mating	47

4	ERGEBNISSE	48
4.1	Eigenschaften von <i>cpn1020</i>	48
4.1.1	Hydrophobizitätsmuster	48
4.1.2	Homologievergleich	49
4.2	Transkription von <i>cpn1020</i>	49
4.3	Herstellung von rekombinantem CPn1020 und Generierung von Antiserum	51
4.3.1	Klonierung und Expression des N-Terminus von CPn1020	51
4.3.2	Reinigung des rekombinanten Proteins CPn1020	53
4.3.3	Gewinnung von Antiserum gegen CPn1020	54
4.4	Nachweis von CPn1020 in infizierten HEp-2-Zellen	56
4.5	Lokalisation von CPn1020 in infizierten HEp-2-Zellen	57
4.6	Untersuchung von Patientenseren auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen CPn1020	59
4.7	Untersuchung von CPn1020 im Yeast-Two-Hybrid-System	60
4.7.1	Klonierung und Expression von CPn1020 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	61
4.7.2	Tests auf Autoaktivierung der Reportergene	62
4.7.3	Genbanktransformationen	62
4.7.4	Ausschluss falsch-positiver Klone	67
5	DISKUSSION	69
6	ZUSAMMENFASSUNG	81
7	LITERATURVERZEICHNIS	82

ABKÜRZUNGEN

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AD	(Transkriptions-) Aktivierende Domäne
<i>ADE2</i>	Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase-Gen aus <i>S. cerevisiae</i>
amp ^r	Ampicillin-Resistenz
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
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>
Cy3	Indocarbocyanin
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 ²)
<i>GAL4</i>	Gen des Transkriptionsfaktors Gal4 aus <i>S. cerevisiae</i>
H ₂ O	destilliertes Wasser
<i>HIS3</i>	Imidazolglycerolphosphat-Dehydratase-Gen aus <i>S. cerevisiae</i>
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
kan ^r	Kanamycin-Resistenz
Kb	kilo-Basenpaare
kDa	kilo-Dalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
LB	Luria Bertani
<i>LEU2</i>	β-Isopropyl-Dehydrogenase-Gen aus <i>S. cerevisiae</i>
<i>MEL1</i>	α-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
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol

pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
rCPn1020	rekombinant hergestelltes CPn1020
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>Thermophilus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA (-Puffer)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<i>TRP1</i>	N-(5'-Phosphoribosyl)-Anthranilat-Isomerase-Gen aus <i>S. cerevisiae</i>
U	definierte Einheit der Enzymaktivität (Unit)
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uraciltriphosphat
UV	Ultraviolett
X- α -Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl α -D-galactopyranoside
z.B.	zum Beispiel
Ø	Durchmesser

Nukleoside

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymidin

Aminosäuren

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

Dekadische Vorsilben

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

SI-Einheiten

$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius	Temperatur
g	Gramm	Masse
l	Liter	Volumen
m	Meter	Länge
min	Minute	Zeit
s	Sekunde	Zeit
h	Stunde	Zeit
d	Tag	Zeit
mol	Mol	Stoffmenge, 1 Mol = $6,022 \times 10^{23}$ Teile eines Stoffes
M	molar	Konzentration, M = Mol / Liter
V	Volt	Spannung

1 EINLEITUNG

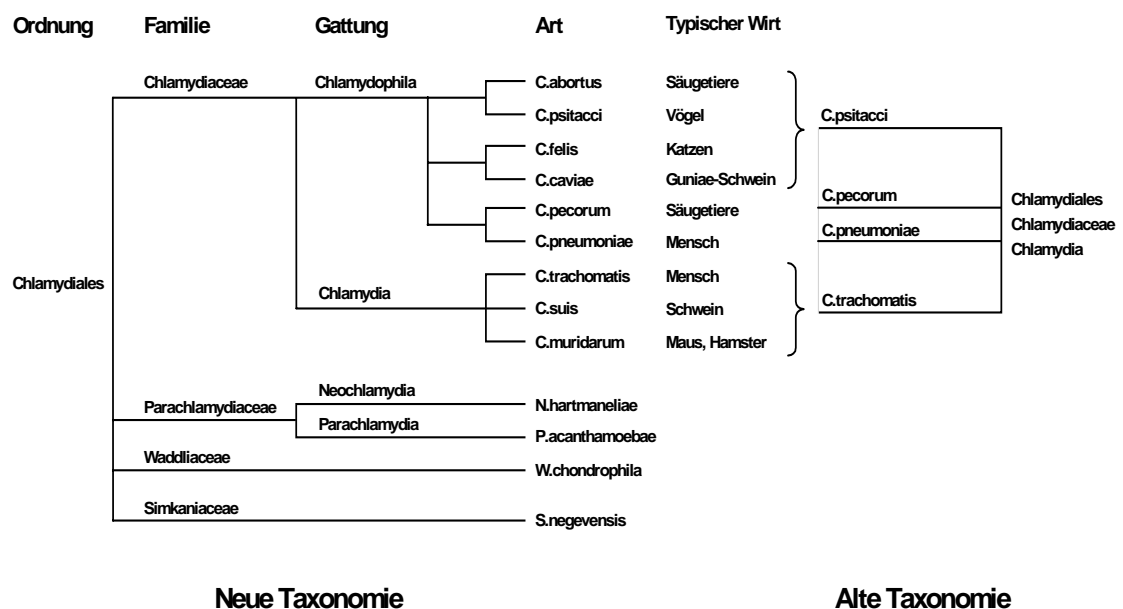
1.1 Entdeckung und Taxonomie von Chlamydien

Anfang des 20. Jahrhunderts wurden Chlamydien erstmals erwähnt, mikroskopisch beobachtet und mit einer menschlichen Erkrankung in Verbindung gebracht. 1907 beschrieben Ludwig Halberstaedter und Stanislaus von Prowazek die erfolgreiche Infektion von Orang-Utan-Augen mit einem Abstrich eines an einem Trachom erkrankten menschlichen Auges [HALBERSTAEDTER & PROWAZEK, 1907]. In Giemsa-gefärbten konjunktivalen Epithelzellen erkannten sie intrazytoplasmatische Vakuolen, die eine Vielzahl von kleinen und größeren Partikeln enthielten, die sie richtigerweise für die ursächliche Pathologie des Trachoms hielten. Sie nannten die neu entdeckten Erreger *Chlamydozoa*, gebildet aus dem griechischen Wort *Chlamys*, Mantel, nach der für sie sichtbaren Partikel-Umhüllung. Im Laufe der Zeit fand man ähnliche Einschlüsse auch in anderen epithelialen Zellen, z.B. von Neugeborenen mit Nicht-Gonokokken-Einschlusskonjunktivitis sowie in Gebärmutterhälsen von deren Müttern, und auch bei männlichen Patienten mit Nicht-Gonokokken-Urethritis. Aufgrund der Tatsache, dass der Erreger für Bakterien normalerweise undurchlässige Filter passieren konnte und nicht angezüchtet werden konnte, ging man davon aus, dass es sich um ein Virus handelte.

1929-1930 kam es zu weiter Verbreitung einer bis dahin unbekanntes atypischen und oft schwer verlaufenden Pneumonie, die durch Psittaciden (Papageien und Sittiche) übertragen und Psittakose genannt wurde. Man entdeckte sehr kleine, in der Giemsa-Färbung basophile Partikel und wies die ätiologische Beziehung dieser Partikel zur Psittakose nach. Außerdem wurde erstmals der charakteristische Entwicklungszyklus des nach Samuel Bedson obligat intrazellulären Parasiten mit bakteriellen Eigenschaften beschrieben [BEDSON & BLAND, 1932]. Die Tatsache, dass es sich bei Chlamydien tatsächlich um Prokaryonten handelte, wurde aber erst 1965 deutlich, als man mittels neuer Zellkulturtechniken und der Elektronenmikroskopie auf das Vorhandensein von Ribosomen und Zellwandstrukturen schließen konnte [ANDERSON et al., 1965].

Zunächst wurden Chlamydien dann taxonomisch zusammen mit Rickettsien, ebenfalls obligat intrazellulären Bakterien, gruppiert, bevor 1966 die Gattung

Chlamydia eingeführt wurde. Über Jahre allerdings war *Chlamydiales* die einzige Ordnung, die nur eine Familie (*Chlamydiaceae*) und eine Gattung (*Chlamydia*) beinhaltete. Das änderte sich erst Ende der 80er Jahre, als durch neue molekularbiologische Methoden, wie z.B. DNA-DNA-Reassoziaton und DNA-Sequenzanalysen, neue Arten entdeckt wurden, darunter auch *Chlamydia pneumoniae* [GRAYSTON et al., 1989]. Man fand Chlamydien bei einer Vielzahl von Tieren und beim Menschen auch in bis dahin als unbetroffen geltenden Geweben (z.B. in Gelenken, in atheromatösen Plaques, im Gehirn) und brachte sie mit Krankheiten ungeklärter Ätiologie in Verbindung (z.B. Arthritis, koronare Herzerkrankung, Multiple Sklerose). 1999 wurde auf der Grundlage von Genomanalysen, vor allem des 16S- und des 23S-rRNA-Gens, eine neue Taxonomie der Ordnung *Chlamydiales* vorgestellt, die auch evolutionsbiologische Erkenntnisse einbezog [EVERETT et al., 1999] (Abb. 1). Diese teilte die Familie *Chlamydiaceae* in zwei Gattungen, nämlich *Chlamydia* (3 Arten, darunter *C. trachomatis*) und *Chlamydophila* (6 Arten, darunter *C. pneumoniae* und *C. psittaci*). Des Weiteren kamen drei neue nicht-*Chlamydophilaceae*-Familien hinzu, nämlich die *Parachlamydiaceae*, *Waddliaceae* und *Simkaniaceae*.



Neue Taxonomie

Alte Taxonomie

Abb. 1: Links: Neue Taxonomie der Ordnung *Chlamydiales* nach der Reklassifikation von 1999 [EVERETT et al., 1999]. Rechts: Alte Taxonomie.

Diagramm modifiziert nach BUSH und EVERETT [2001, S. 204].

1.2 Eigenschaften und Lebenszyklus von Chlamydien

Alle Chlamydien-Arten sind obligat intrazellulär, unbeweglich und besitzen eine Zellwand, deren Aufbau bis auf den wesentlich geringeren Gehalt an Peptidoglykan grundsätzlich der anderer gramnegativer Bakterien entspricht, inklusive eines familienspezifischen Lipopolysaccharid (LPS)-Antigens. Entgegen früherer Vorstellungen, dass Chlamydien obligat auf den Metabolismus eukaryontischer Zellen als Nukleotidquelle, z.B. von ATP, angewiesen, also so genannte Energieparasiten sind, geht man heute davon aus, dass Chlamydien ATP selbst generieren können, einen Teil ihres ATP-Bedarfs aber, wenn nötig, über den Metabolismus der Wirtszelle decken [STEPHENS et al., 1998; KALMAN et al., 1999]. Neben genetischen Unterschieden innerhalb der Familie *Chlamydiaceae* produzieren *Chlamydophila* spp. im Gegensatz zu *Chlamydia* spp. kein nachweisbares Glykogen [KUO et al., 1986] und besitzen nur ein ribosomales Operon (*Chlamydia* spp. zwei). Das Genom ist mit $1,2 \times 10^6$ Basenpaaren und 1.073 Protein-kodierenden Sequenzen (*C. pneumoniae*) relativ klein [KALMAN et al., 1999]. Es beträgt damit nur etwa ein Viertel der Genomgröße von anderen Bakterien wie *Escherichia coli* ($4,6 \times 10^6$ bp) und liegt nur wenig über der von Mykoplasmen ($0,6-0,8 \times 10^6$ bp), den Bakterien mit dem kleinsten bekannten Genom.

Als intrazelluläre Parasiten benötigen Chlamydien eine Reihe essenzieller Fähigkeiten. Sie müssen in eine geeignete Wirtszelle eindringen, sich dort von der Immunabwehr des Wirtes ungehindert vermehren, die Zelle wieder verlassen und extrazellulär bis zu einer erneuten Infektion überleben können.

Im Rahmen ihrer Evolution haben sich Chlamydien an diese Anforderungen durch den Erwerb eines einzigartigen Entwicklungszyklus adaptiert, der erstmalig 1932 lichtmikroskopisch beschrieben wurde [BEDSON & BLAND, 1932]. Dieser wird von zwei unterschiedlichen Zustandsformen des Erregers repräsentiert, nämlich einer extrazellulär lebensfähigen infektiösen Form, dem Elementarkörper (EK), und einer obligat intrazellulären replikativen Form, dem Retikularkörper (RK). Der metabolisch weitestgehend inaktive EK ist mit einem Durchmesser von $0,2-0,6 \mu\text{m}$ relativ klein, besitzt eine widerstandsfähige Zellwand und stellt eine sporenähnliche Zustandsform des Erregers dar, der das Überleben des Bakteriums in unwirtlicher Umgebung, also extrazellulär, über einen ausreichenden Zeitraum sichern und in

Wirtszellen eindringen kann. Dort findet dann innerhalb der ersten zwei Stunden nach Infektionsbeginn die Konversion des EK in den metabolisch aktiven RK statt, der mit bis zu $1,5\ \mu\text{m}$ im Durchmesser deutlich größer ist, eine dünnere und permeablere Zellwand besitzt und über binäre Teilungen die intrazelluläre Vermehrung des Erregers sichert. Diese Konversion geht neben dem Verlust der Infektiösität und einer starken Größenzunahme (ungefähr 30-facher Volumengewinn) mit einer Dekondensation der beim EK mit Hilfe von zwei Histon-ähnlichen Proteinen stark verdichteten DNA einher [KAUL & WENMAN, 1998].

Der durch diesen Dimorphismus charakterisierte Lebenszyklus findet in einer besonderen zellulären Nische statt: Chlamydien werden durch aktive Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen und befinden sich von diesem Zeitpunkt an in einer mit Wirtszellmembran umhüllten Vakuole im Zytoplasma, dem so genannten Einschlusskörper. Diese rundlichen, lichtmikroskopisch nachweisbaren Vesikel dehnen sich im Zuge der Vermehrung der RK aus und können im Fall einer Mehrfachinfektion miteinander fusionieren. Ungefähr 18 Stunden nach Eintritt in die Zelle beginnt die Redifferenzierung der Retikular- in Elementarkörper, die dann je nach Art und Wachstumsbedingungen die Wirtszelle nach 48 bis 72 Stunden durch Lyse oder Exozytose wieder verlassen (Abb. 2).

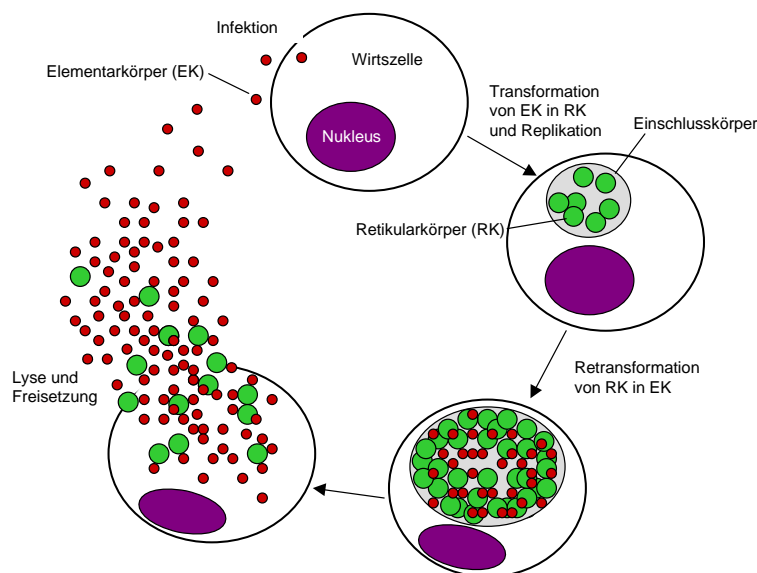


Abb. 2: Entwicklungszyklus von *C. pneumoniae*. Der gesamte Entwicklungszyklus, von Infektion durch den Elementarkörper (EK) über Transformation in Retikularkörper, Replikation, Retransformation in EK, Zellaustritt und erneute Infektion dauert zwischen 36 und 72 h. Schema adaptiert nach EVERETT [2000, S. 110].

1.3 Entdeckung und medizinische Bedeutung von *Chlamydophila pneumoniae*

Chlamydophila pneumoniae wurde erstmals 1965 aus einer kindlichen Bindehaut isoliert und als Stamm TW-183 bezeichnet [GRAYSTON, 1965]. Nachdem bemerkt wurde, dass es sich weder um *C. trachomatis* noch um *C. psittaci* handelte, wurde dieser Stamm kurzerhand als „atypisches Isolat“ von *C. psittaci* eingeordnet. Der erste Stamm aus dem respiratorischen Trakt (AR-39) wurde 1983 isoliert und es wurde festgestellt, dass es sich bei TW-183 und AR-39 um die gleiche Erregerart handelte. Daraufhin wurden diese Stämme 1986 als „TWAR“-Isolate zusammengefasst [GRAYSTON et al., 1986], 1989 als neue Chlamydien-Art deklariert und *Chlamydia pneumoniae* genannt [GRAYSTON et al., 1989]. 1999 wurde das komplette Genom entschlüsselt [KALMAN et al., 1999] und es erfolgte die neue taxonomische Einteilung und Umbenennung des Erregers in *Chlamydophila pneumoniae* [EVERETT et al., 1999].

Chlamydophila pneumoniae ist ein weltweit sehr häufig auftretender Erreger, vor allem von Atemwegsinfektionen. Nachdem vorerst vermutet wurde, dass *C. pneumoniae* ein humanspezifischer Krankheitserreger ist, weiß man heute, dass auch Koalas, Pferde und bestimmte Frosch- und Reptilienarten infiziert werden können [BODETTI et al., 2002]. Seroepidemiologische Studien zeigen, dass der überwiegende Teil der erwachsenen Bevölkerung in seinem Leben Kontakt mit dem Erreger hat. Dabei steigt die Seropositivität von sehr niedrigen Raten bei Kleinkindern mit zunehmendem Lebensalter rapide an und erreicht ca. 50 % bei 20-jährigen und bis zu 75 % bei älteren Menschen [KUO et al., 1995b]. Dies korreliert mit Erkenntnissen über die Inzidenz von akuten *C. pneumoniae*-Infektionen, die ein Maximum von 6 bis 9 % bei Kindern zwischen 5 und 14 Jahren besitzt, während die Inzidenz bei über 19-jährigen nur noch 1,5 % beträgt [ALDOUS et al., 1992]. Dabei lassen sich geschlechtsspezifisch bei Männern ebenso wie in tropischen, weniger entwickelten Ländern höhere Seroprävalenzen finden. Diese hohen Prävalenzen legen die Vermutung nahe, dass es bei praktisch allen Menschen im Laufe des Lebens zu einer Infektion kommt und auch Reinfektionen auftreten [GRAYSTON, 1992]. Ein Großteil dieser Infektionen (wahrscheinlich über 90 %) verläuft

asymptomatisch [KLEEMOLA et al., 1988]. So konnte der Erreger bei bis zu 4,7 % gesunder, asymptomatischer Studienteilnehmer aus dem Nasopharynx direkt nachgewiesen werden [GNARPE et al., 1991; MIYASHITA et al., 2001]. Weiterhin wurden sowohl persistierende Infektionen [HYMAN et al., 1991; HAMMERSCHLAG et al., 1992], als auch ein zuweilen epidemiehaftes Auftreten des Erregers beschrieben [KLEEMOLA et al., 1988; KARVONEN et al., 1993; TROY et al., 1997].

Diagnostiziert wird eine akute Infektion über eine deutliche Serokonversion [FILE & TAN, 1997], z.B. einen vierfachen IgG-Anstieg. Stehen keine Vergleichsdaten zur Verfügung, können auch hohe Antikörpertiter alleine auf eine akute Infektion hinweisen, z.B. ein IgM-Titer über 16 E/ml oder ein IgG-Titer über 512 E/ml. Zusätzlich stehen als diagnostische Mittel die Kultivierung und Isolierung des Erregers und der Antigennachweis mit geeigneten Antikörpern oder PCR zur Verfügung. Aufgrund der beschriebenen hohen Seroprävalenz, den oft asymptomatischen Verläufen und der Möglichkeit der chronisch persistierenden Infektion kann es allerdings im Einzelfall schwierig sein, mit den vorhandenen diagnostischen Mitteln zwischen einer akuten, ätiologisch relevanten Infektion und einer sekundären Besiedlung zu differenzieren.

Die Infektion findet höchstwahrscheinlich durch eine Übertragung von Mensch zu Mensch über die Atemwege statt, wobei von einer relativ geringen Kontagiosität ausgegangen wird. Als Infektionsquelle spielen aufgrund der hohen Prävalenzraten asymptomatische Träger eine wichtige Rolle [GRAYSTON, 1992].

1.3.1 Akute Infektionen der Atemwege

C. pneumoniae verursacht eine Reihe von Atemwegsinfektionen. Pneumonie und Bronchitis sind darunter die beiden Hauptmanifestationen der akuten *C. pneumoniae*-Infektion, daneben kommen Pharyngitis, Sinusitis und Otitis media häufig vor.

Eine Vielzahl von Studien hat den Zusammenhang von ambulant erworbener Pneumonie und Infektion mit *C. pneumoniae* untersucht. Dabei kann bei durchschnittlich 10 % der Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie eine *C. pneumoniae*-Infektion nachgewiesen werden [GRAYSTON, 1992]. Es handelt sich dabei meist um den dritt- oder vierthäufigsten Erreger und bei bis zu 40 % der Patienten liegt eine Koinfektion mit einem anderen Keim, meist mit *Streptococcus*

pneumoniae, vor [FANG et al., 1990; KAUPPINEN et al., 1995]. Legt man eine jährliche Pneumonie-Inzidenz von 12 auf 1.000 Menschen zu Grunde, ergibt sich eine durchschnittliche Inzidenz für die *C. pneumoniae*-Pneumonie von 1,2 auf 1.000 Menschen pro Jahr, mit ansteigenden Werten bei älteren Menschen.

Neben Atemwegsinfektionen wurden auch andere Manifestationen der akuten *C. pneumoniae*-Infektion beschrieben, darunter Fälle von Endokarditis [NORTON et al., 1995], Myokarditis [WESSLEN et al., 1992], Meningitis [SUNDELOF et al., 1993], Enzephalitis [FRYDEN et al., 1989] und dem Guillain-Barré-Syndrom [HAIDL et al., 1992].

1.3.2 *Chlamydomphila pneumoniae* und chronische Erkrankungen

Chlamydomphila pneumoniae wird seit seiner Entdeckung mit den verschiedensten, in ihrer Ätiologie bisher nicht vollständig aufgeklärten, chronischen Krankheiten in Verbindung gebracht, wobei die Hauptaufmerksamkeit seit jeher auf Seiten der Atherosklerose bzw. deren Hauptmanifestationen Koronare Herzkrankheit (KHK) und Apoplex liegt. Aber auch Asthma, die chronisch-obstruktive Lungenkrankheit (COPD), Multiple Sklerose (MS), Alzheimer-Demenz, das kutane T-Zell-Lymphom (CTCL) und andere chronische Erkrankungen werden immer wieder genannt. Die Studien beschäftigten sich dabei hauptsächlich mit folgenden Punkten:

- Nachweis von *C. pneumoniae* im pathologisch veränderten Gewebe
- Assoziation zwischen Erregernachweis und Krankheit
- Assoziation zwischen *C. pneumoniae*-Antikörpernachweis und Erkrankung
- Therapeutischer und prophylaktischer Nutzen von Antibiotika.

Es gilt als gesichert, dass *C. pneumoniae* in atheromatösen Plaques und Gefäßen von KHK- und Schlaganfallpatienten gefunden werden kann. Dies gelang zuerst 1992 [SHOR et al.] und wurde daraufhin durch eine Vielzahl von Studien bestätigt [KUO et al., 1995a; MAAS et al., 1997; PETERSEN et al., 1998]. Ebenso konnte der Erreger im Liquor von MS- [SRIRAM et al., 1999; LAYH-SCHMITT et al., 2000], im Hirngewebe von Alzheimer- [BALIN et al., 1998] und in der Haut von CTCL-Patienten [ABRAMS et al., 2001] nachgewiesen werden. Fraglich blieb bisher allerdings, ob die Gegenwart von *C. pneumoniae* ursächlich für die Entstehung dieser Krankheiten ist,

oder ob es nur, eventuell zusammen mit anderen Erregern, zu einer sekundären Besiedlung des entzündlich veränderten Gewebes kommt, z.B. durch Anaphylaxie und Einwanderung von Makrophagen mit internalisierten Chlamydien.

Der kausale Zusammenhang zwischen dem Nachweis von *C. pneumoniae* im krankhaften Gewebe und Erkrankung konnte bisher nicht bewiesen werden. So wurde der Erreger auch in Gefäßen gefunden, die normalerweise nicht von Atherosklerose betroffen sind [TAYLOR-ROBINSON et al., 2002]; außerdem gibt es Untersuchungen, die *C. pneumoniae* im atherosklerotischen Gewebe gar nicht nachweisen konnten [WEISS et al., 1996; DAUS et al., 1998; PATERSON et al., 1998]. Auch konnte ein direkter Zusammenhang zwischen Infektion und thromboembolischem Ereignis bei Schlaganfallpatienten nicht eindeutig gezeigt werden [GIBBS et al., 2000]. Zwar fand man den Erreger im Liquor von MS-Patienten [LAYH-SCHMITT et al., 2000], aber eben auch bei Patienten mit anderen neurologischen Krankheiten, bei denen ätiologisch eine Infektion keine Rolle spielt [GIEFFERS et al., 2001b].

Die Assoziation zwischen *C. pneumoniae*-spezifischen Antikörpern und KHK wurde von 1988 an [SAIKKU et al., 1988] in einer Vielzahl von Studien diskutiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch Funnel-plot-Analysen (bei denen das Studienergebnis im Hinblick auf die Studienpräzision bewertet wird) gezeigt wurde, dass in 17 von 33 Studien eine solche Assoziation nicht deutlich nachgewiesen werden konnte, dass ein Großteil der Studien mit nicht ermittelter Assoziation wahrscheinlich nicht publiziert wurde und dass die Studien mit der höchsten statistischen Präzision (z.B. durch hohe Teilnehmerzahl, doppel-blind randomisierte Kontrollgruppen, prospektiven Studienansatz etc.) eher keine signifikante Korrelation zeigten [EGGER et al., 1997]. Ähnlich verhält es sich bei serologischen Studien zu Asthma und COPD.

Die Frage, ob sich eine gegen *C. pneumoniae* gerichtete Antibiotika-Therapie, mit Tetrazyklinen, Makroliden oder Chinolonen, positiv in Hinblick auf die Entwicklung einer KHK auswirkt, konnte bislang noch nicht abschließend beantwortet werden. Nach anfänglich sehr verheißungsvollen Ergebnissen [GUPTA et al., 1997; STONE et al., 2002] konnte durch größere, zum Teil epidemiologische Studien ein signifikanter Effekt bislang nicht eindeutig gezeigt werden [MUHLESTEIN et al., 2000; DUNNE,

2000; LUCHSINGER et al., 2001; CERCEK et al., 2003]. Entsprechend konnte auch ein positiver Effekt von Antibiotika auf das Schlaganfallrisiko [LUCHSINGER et al., 2001] oder auf die Entwicklung von Asthma [RICHELDI et al., 2005] nicht bewiesen werden. Erschwert wird die Beantwortung der Fragestellung dadurch, dass aufgrund statistischer Limitationen ein möglicherweise vorhandener sehr kleiner Effekt auch durch die größte der durchgeführten Studien nicht bewiesen werden könnte. Außerdem steht eine verlässliche, vollständige Therapie einer chronisch persistierenden *C. pneumoniae*-Infektion, z.B. in Monozyten, bislang nicht zur Verfügung [GIEFFERS et al., 2001a].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es eher unwahrscheinlich ist, dass *C. pneumoniae* die Ursache dieser zahlreichen chronischen, sehr unterschiedlichen Krankheiten ist. So gibt es z.B. keinen Zusammenhang zwischen der Seroprävalenz von *C. pneumoniae* (die weltweit ungefähr gleich hoch ist) und der KHK-Mortalität (die von Staat zu Staat sehr verschieden sein kann). Es ist wohl eher davon auszugehen, dass der Erreger im Zuge des Krankheitsprozesses das entzündlich geschädigte Gewebe besiedelt. Entscheidend ist aber dann die Frage, ob die Anwesenheit von *C. pneumoniae* im Gewebe einen Risiko- oder Stressfaktor darstellt, der sich - wie stark auch immer - negativ auf das Krankheitsgeschehen auswirkt, und ob man dieses Risiko reduzieren könnte, z.B. durch eine gezielte antichlamydiale Therapie. Diese Frage konnte bislang für keine der angesprochenen Krankheiten abschließend geklärt werden.

1.4 Interaktionen von Chlamydien mit der Wirtszelle

Während des gesamten chlamydialen Entwicklungszyklus finden Interaktionen zwischen Bakterium und Wirtszelle statt, die Überleben und Vermehrung des Erregers sicherstellen [WYRICK, 2000].

Bereits der Eintritt der Elementarkörper in die Wirtszelle geht auf Einflüsse der bakteriellen Zelle auf den Wirtszellmetabolismus zurück; so findet durch Anheftung von *C. pneumoniae*-Elementarkörpern an die Wirtszellmembran die Induktion verschiedener Signaltransduktionskaskaden, darunter Tyrosin-Phosphorylierungen und eine Aktin-Mobilisation, in der Wirtszelle statt [COOMBES & MAHONY, 2002].

Diese führen bereits 15 min nach Anheftung zu einer vermehrten Ausbildung von Mikrovilli an der Wirtszelloberfläche [CARABEO et al., 2002], an deren Basis es aufgrund geringerer elektrostatischer Gegenkräfte leichter zum Kontakt von EK und Wirtszellmembran kommt. Die rezeptorvermittelte Endozytose des Erregers wird im Anschluss an die Aktivierung des Zytoskeletts 30-120 min nach Anheftung beobachtet [COOMBES & MAHONY, 2002]. Nach Endozytose befindet sich der Elementarkörper als Wirtszellmembran-umhüllte Vakuole im Zytosol. Die normalerweise über Fusionsprozesse stattfindende Konversion dieser Vakuole zum Endosom und Lysosom und nachfolgender Inaktivierung des Pathogens findet allerdings bei internalisierten Chlamydien nicht statt, wodurch ein Überleben der Bakterien in der Wirtszelle möglich wird [FRIIS, 1972]. Es konnte gezeigt werden, dass chlamydiale Proteine für diese Inhibierung verantwortlich sind. Diese sind schon zum Zeitpunkt der Infektion in der Zellwand der EK lokalisiert und sichern damit das Überleben des Erregers in den ersten Stunden nach Eintritt in die Wirtszelle, bevor die chlamydiale Proteinsynthese diese Inhibierung aufrechterhält [HACKSTADT, 1998; SCIDMORE et al., 2003].

Bei *C. trachomatis* wurde beobachtet, dass zwei Stunden nach Endozytose des Elementarkörpers in die Wirtszelle eine Translokation der Vesikel in Richtung des Golgi-Apparates stattfindet [SCIDMORE et al., 1996b]. Hierbei scheint wiederum das Zytoskelett des Wirtes involviert zu sein [CLAUSEN et al., 1997]. In der Nähe des Golgi-Apparates beginnen die Einschlusskörper damit, von dort sezernierte Sphingomyelin- und Cholesterin-enthaltende Vesikel aufzunehmen, was auch bei *C. pneumoniae*, aber bis jetzt bei keinem anderen intrazellulär vorkommenden Erreger beobachtet werden konnte [HACKSTADT et al., 1996; SCIDMORE et al., 1996a; WOLF & HACKSTADT, 2001; CARABEO et al., 2003]. Diese Vorgänge bedürfen der aktiven Modifikation der Einschlusskörpermembran durch chlamydiale Genprodukte, da sie durch eine Blockade der bakteriellen Proteinsynthese inhibiert werden konnten [SCIDMORE et al., 1996b, CARABEO et al., 2003]. Die Aufnahme dieser Lipide ist ein für den Erreger essenzieller Prozess, der es ihm ermöglicht, den im Zuge der Ausdehnung des Einschlusskörpers notwendigen Membranbedarf zu decken [VAN OOIJ et al., 2000]. Zugleich erscheint der Einschlusskörper durch diese Maskierung als eigenes Sekretionsvesikel, was wiederum der Fusion mit Lysosomen

entgegenwirkt.

Neben diesen initialen Eingriffen kommt es im Zuge der fortlaufenden Entwicklung im Einschlusskörper noch zu einer Vielzahl weiterer Interaktionen von chlamydialen Proteinen mit Stoffwechselprozessen der Wirtszelle. So fand man z.B. bei *C. trachomatis* einen in das Wirtszellzytosol sezernierten Protease-ähnlichen Faktor (CPAF), der über einen Abbau von Transkriptionsfaktoren die Antigenpräsentation durch MHC I und II herabreguliert [ZHONG et al., 2001, FAN et al., 2002]. Ein homologer Faktor mit gleicher Funktion fand sich auch bei *C. pneumoniae* (CPAFcp), der ebenfalls ins Zytosol sezerniert wird und der die Entwicklung einer persistierenden Infektion begünstigen könnte [FAN et al., 2002].

Auch können Chlamydien aktiv die Apoptose infizierter Zellen beeinflussen. So fand man einerseits ein konserviertes chlamydiales Protein (CADD), das vor allem spät im Entwicklungszyklus exprimiert wird und Apoptose-aktivierend wirkt [STENNER-LIEWEN et al., 2002]. Andererseits existieren mehrere Studien, die eine Inhibierung der Apoptose von mit *C. pneumoniae* infizierten Zellen nachgewiesen haben [WAHL et al., 2001; CARRATELLI et al., 2002; AIRENNE et al., 2002].

1.5 Das Typ-III-Sekretionssystem von Chlamydien

Nachdem deutlich wurde, dass Chlamydien durch Eigensynthese von Proteinen aktiv und direkt in Stoffwechselprozesse der Wirtszelle eingreifen, um eigenes Überleben und Vermehrung im Einschlusskörper zu sichern, stellt sich die Frage, wie die in der bakteriellen Zelle gebildeten Effektoren die eigene Zellwand und die umgebende Einschlusskörpermembran überwinden, um in das Zytosol der Wirtszelle zu gelangen. Allein die Einschlusskörpermembran verhindert den Durchtritt von Molekülen, die größer als 520 Da sind [HEINZEN & HACKSTADT, 1997]. Nur kleinere Moleküle wie z.B. Aminosäuren und Nukleotide, die ein Molekulargewicht in der Größenordnung von 100-300 Da besitzen, könnten über freie Diffusion in den Einschlusskörper gelangen, von wo sie für chlamydiale Transporter verfügbar wären [GRIESHABER et al., 2002]. Einen Weg für größere Moleküle, wie z.B. Proteine, diese Barriere zu überwinden liefert das Typ-III-Sekretionssystem. Dieses Sekretionssystem findet sich bei einer Vielzahl von gramnegativen Bakterien, darunter den Gattungen *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*

und *Bordetella* [WINSTANLEY & HART, 2001] und ermöglicht es diesen, Effektorproteine in die Membran und das Zytoplasma der Wirtszelle zu sezernieren [HUECK, 1998].

Der Sekretionsapparat wird aus bis zu 20 Strukturproteinen gebildet, die die innere Membran, den periplasmatischen Spalt, die Peptidoglykanschicht und die äußere Membran der bakteriellen Zellwand überspannen und im aktiven Zustand außen in eine nadelähnliche Struktur, den Translokator, übergehen [GALÁN & COLLMER, 1999] (Abb.3).

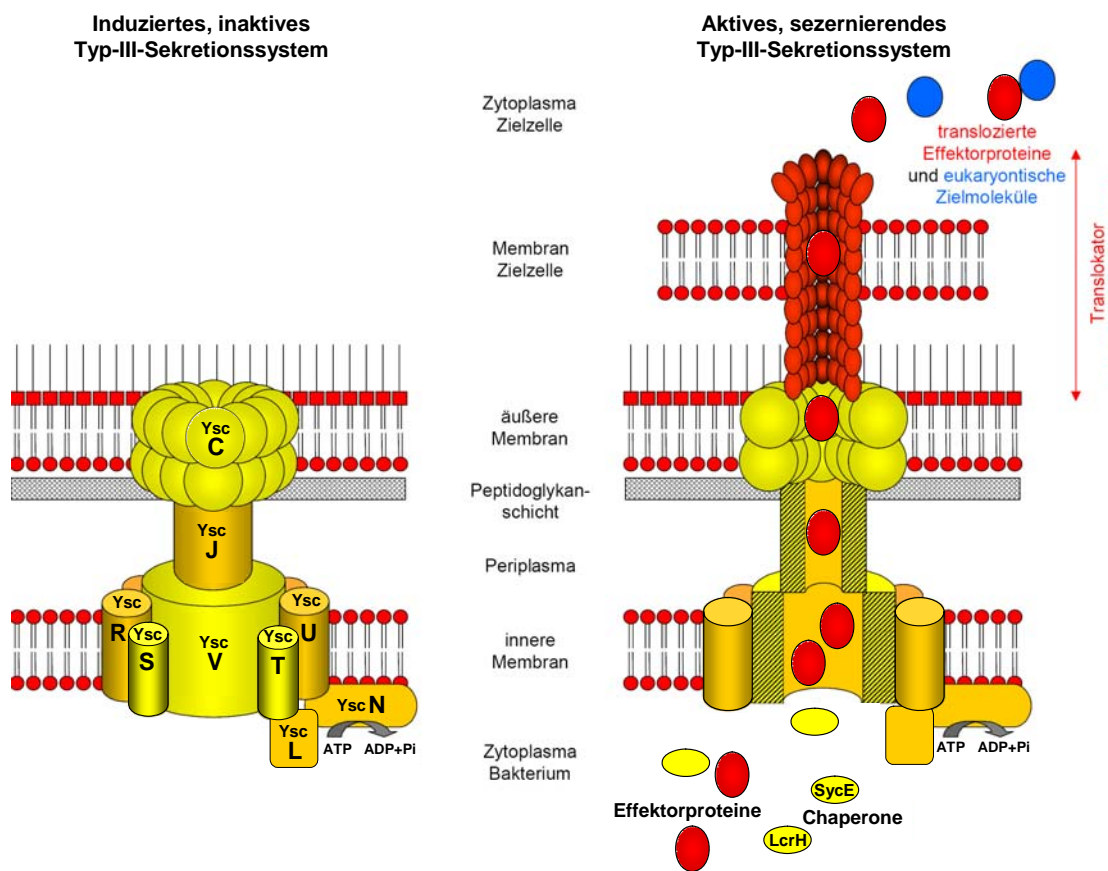


Abb. 3: Arbeitsmodell des chlamydialen Typ-III-Sekretionssystems, basierend auf Homologien zu Proteinen von *Yersinia* spp. Im aktiven Zustand durchqueren Proteine den Sekretionsapparat und werden, zum Teil mit spezifischen Chaperonen (z.B. SycE und LcrH), über den Translokator in die Zielzelle exportiert. Auf Wirtszellseite reguliert LcrE den Durchtritt sezernierter Faktoren (nicht gezeigt). Die Energie für diesen Prozess liefert die membranständige ATPase YscN in Interaktion mit YscL. Schema modifiziert nach RAPPL [2001, S. 19] sowie FIELDS KA & HACKSTADT [2000, S. 1050].

Nach der kompletten Entschlüsselung der chlamydialen Genome fand man auch bei allen *Chlamydiaceae*-Arten Gene, die für dieses Sekretionssystem kodieren [STEPHENS et al., 1998; KALMAN et al., 1999; READ et al., 2000]. Typ-III-Sekretionssysteme zeichnen sich dadurch aus, dass der Sekretionsvorgang im Gegensatz zu anderen bakteriellen Sekretionssystemen über den direkten Kontakt des Bakteriums mit der Membran der Zielzelle erfolgt [GALÁN & COLLMER, 1999]. Im Fall von *Chlamydia* also extrazellulär bei Kontakt von EK mit der Wirtszell- und intrazellulär bei Kontakt von EK oder RK mit der Einschlusskörpermembran, woran sich der Export und die Sekretion der Proteine ins Wirtszellzytosol oder deren Einbau in die Einschlusskörpermembran anschließt [HSIA et al., 1997]. Weiterhin benötigen die meisten der Typ-III-sezernierten Effektoren die Hilfe anderer Proteine, so genannter Chaperone, für eine erfolgreiche Sekretion. Typ-III-sezernierten Proteinen fehlt ein erkennbares Signalpeptid für andere Sekretionswege; die Art und Weise, wie Proteine vom Typ-III-Sekretionsapparat erkannt werden, ist bis jetzt unbekannt. Elektronenmikroskopisch konnten Strukturen, die diese Sekretionsapparate repräsentieren, auf der Oberfläche von EK und RK beobachtet werden, und zwar jeweils an Stellen des Kontaktes zwischen Bakterium und Wirtszellmembran [ROCKEY & MATSUMOTO, 1999]. Es gilt als gesichert, dass sowohl chlamydiale Elementar- als auch Retikularkörper ein Typ-III-Sekretionssystem aufweisen [FIELDS KA et al., 2003].

Auch bei *C. pneumoniae* fanden sich diese entsprechende Strukturen [MIYASHITA et al., 1993] sowie bislang 13 Gene, die Homologien zu Strukturproteinen bekannter Typ-III-Sekretionssysteme anderer Arten aufweisen und deren Transkription bis auf eines (*yscU*) nachgewiesen werden konnte [SLEPENKIN et al., 2003]. Allerdings sind diese Gene im Gegensatz zu allen anderen gramnegativen Bakterien bei *Chlamydia* nicht zusammen gruppiert, sondern liegen über das gesamte Chromosom verstreut in mindestens vier verschiedenen Subclustern vor [SUBTIL et al., 2000]. Auch weisen diese nicht den sonst typischen um 10 % geringeren G/C-Gehalt im Vergleich zum Gesamtgenom auf, da sich das gesamte chlamydiale Genom durch diesen geringen G/C-Gehalt auszeichnet [STEPHENS et al., 1998; KALMAN et al., 1999]. Diese Besonderheiten machen es schwierig, Typ-III-sezernierte chlamydiale Proteine zu identifizieren, zumal diese - anders als die Strukturproteine des Sekretionsapparates -

sehr geringe Homologien zu den Effektoren anderer Arten aufweisen. Kandidaten zeichnen sich durch ihre Lokalisation in einem der beschriebenen Subcluster, die Nähe zu möglichen Chaperonen und das Fehlen eines Signalpeptides eines anderen Sekretionsweges aus.

Einer dieser möglicherweise Typ-III-sezernierten Effektoren ist das hypothetische Protein CPn1020 (nach dem orthologen Gen von *C. trachomatis* auch CT861 genannt), das kein erkennbares Signalpeptid besitzt und dessen Gen sich an *lcrH-2* anschließt (Abb. 4).

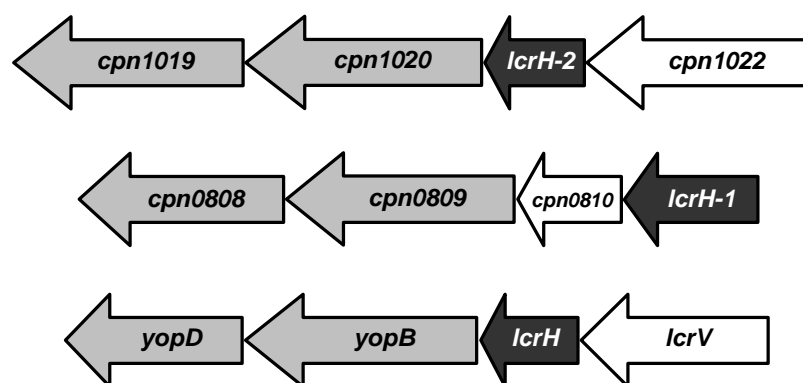


Abb. 4: Subcluster der hypothetischen Chaperone *lcrH-1* und *lcrH-2* von *C. pneumoniae* (obere Zeilen) und von *lcrH* von *Yersinia enterocolitica* (untere Zeile). Die Gene von *cpn1019/cpn1020* und *cpn0808/cpn0809* zeigen Ähnlichkeiten zu den Typ-III-sezernierten Translokatoren *yopD* und *yopB* von *Yersinia spp.*

LcrH-2 ist neben *lcrH-1* eines der beiden homologen Gene zu *lcrH*, das auch bei anderen Organismen vorkommt, dort allerdings nur singular. In *Yersinia spp.* kodiert *lcrH* (= *syncD*) für das Chaperon der Translokatoren YopB und YopD, die Typ-III-sezerniert werden und über eine Porenbildung in der Wirtszellmembran ihrerseits am Export anderer Effektoren beteiligt sind [NEYT & CORNELIS, 1999]. Bei *C. pneumoniae* wird *lcrH-2* im Entwicklungszyklus sehr früh (schon nach 1,5 Stunden) und *lcrH-1* spät (erst nach über 24 Stunden) exprimiert [SLEPENKIN et al., 2003]. CPn1020 zeigt keine Homologien zu YopB/YopD, wohl aber Ähnlichkeiten deren Größe und Hydrophobizitätsmuster betreffend [SUBTIL et al., 2000].

Es konnte bereits für verschiedene chlamydiale Proteine die Sekretion über das Typ-III-Sekretionssystem demonstriert werden:

Die so genannten Inc-Proteine, deren N-Termini von dem heterologen Typ-III-System in *Shigella flexneri* erkannt und sezerniert wurden, sind für Chlamydien spezifisch und werden nach Translokation in die Einschlusskörpermembran eingelagert [SUBTIL et al., 2001; LUGERT et al., 2004]. IncA von *C. trachomatis* interagiert in einem Yeast-Two-Hybrid-Screen mit sich selbst und ist damit wahrscheinlich für die Fusion von Einschlusskörpern in mehrfach infizierten Zellen verantwortlich [HACKSTADT et al., 1999]. Ebenfalls mit der Yeast-Two-Hybrid-Methode wurde ein eukaryontischer Interaktionspartner von IncG gefunden, nämlich mit 14-3-3 β ein Protein, das in eine Vielzahl von Signaltransduktionsprozessen involviert ist [SCIDMORE & HACKSTADT, 2001].

CopN von *C. trachomatis* wird in *Yersinia enterocolitica* Typ-III sezerniert [FIELDS KA & HACKSTADT, 2000]. Das zu CopN homologe YopN reguliert in *Yersinia* spp. die Öffnung des Sekretionsapparates und ermöglicht darüber den Durchtritt von Effektoren [RAMAMURTHI & SCHNEEWIND, 2002].

Das in *Yersinia pseudotuberculosis* Typ-III sezernierte Tarp-Protein (= translocated actin-recruiting phosphoprotein, CT456) von *C. trachomatis* induziert nach Sekretion in das Zytosol der Wirtszellseite mittels Tyrosin-Phosphorylierung eine Aktin-Mobilisation und fördert so die rezeptorvermittelte Endozytose der extrazellulären Elementarkörper [CLIFTON et al., 2004].

1.6 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch Analyse der Transkription, Expression und Lokalisation in *C. pneumoniae*-infizierten menschlichen Epithelzellen das hypothetische Protein CPn1020 zu identifizieren und charakterisieren, sowie über die Verwendung eines Yeast-Two-Hybrid-Systems Hinweise auf die Funktion dieses Proteins zu erlangen. Weiterhin sollten durch eine Untersuchung der Immunogenität von CPn1020 die Möglichkeiten der Einbeziehung dieses Proteins in die Diagnostik von *C. pneumoniae*-Infektionen geprüft werden.

2 MATERIAL

2.1 Organismen / Zelllinien

Zelllinie		
HEp-2 Humane Epithelzellen, ATCC: CCL-23		
Mikroorganismen	Stamm	Referenz
<i>Chlamydomophila pneumoniae</i>	AR-39	GRAYSTON et al., 1986
<i>Escherichia coli</i>	DH5- α	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

Plasmid	Relevante Merkmale	Referenz
pQE-30	T5/lacO-Promoter, 6xHis-Tag, amp ^r	Qiagen
pGBKT7	<i>GAL4</i> DNA-BD, <i>TRP1</i> , kan ^r , c-Myc epitope	LOURET et al., 1997
pGBKT7-53	murines p53 in pGBKT7	Clontech
pACT2	<i>GAL4</i> AD, <i>LEU2</i> , amp ^r	LI et al., 1994
pGADT7	<i>GAL4</i> AD, <i>LEU2</i> , amp ^r , HA epitope	CHIEN et al., 1991
pGADT7-T	SV 40 large T-Antigen in pGADT7	Clontech
pCL1	komplettes wild-typ <i>GAL4</i> Gen, <i>LEU2</i> , amp ^r	FIELDS S & SONG, 1989

2.2.2 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')
16S 1	GTC AAG TCA GCA TGG CCC TT
16S 2	CCC AGT CAT CAG CCT CAC CT
Cpn1020 A	TTT GTT TTT GAT TGG AAT CC
Cpn1020 B	CGG AGA AAA CTT CAG AGA AG
pQE-30 5' Seq	CCC GAA AAG TGC CAC CTG
pQE-30 3' Seq	GTT CTG AGG TCA TTA CTG G
Cpn1020 F	NNN NNN GGA TCC ATG TCC TCT TGG TTA TCT
Cpn1020 R	NNN NNN AAG CTT GCT TGG AGG AGG AAT TAC
YTH 1	NNN NNN GAA TTC TCC TCT TGG TTA TCT CAA GCA
YTH 2	NNN NNN CTG CAG GCT TGG AGG AGG AAT TAC AGG
YTH 3	NNN NNN GAA TTC ATA GGA GTG TTT ACA TTG AGC
YTH 4	NNN NNN CTG CAG TTA TCC TCT TAA GGA GTG GAG
YTH Seq 1	GAA GGC TCT TGC AAA AAT TT
Lib 5'-Seq	TAA CCC ATA CGA TGT TCC
Lib 3'-Seq	AGG CAA AAC GAT GTA TAA ATG
T7 5'-Seq	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC
BD 3'-Seq	TTT TCG TTT TAA AAC CTA AGA G

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 Ladder	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

2.3 Proteine

2.3.1 Molekulargewichtsmarker

Pre-Stained Protein Marker	New England Biolabs (Schwalbach)
----------------------------	----------------------------------

2.3.2 Antikörper

Monoklonale Antikörper	
Maus-anti-His-Tag-IgG	Qiagen (Hilden)
Maus-anti-c-Myc	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Maus-anti- <i>C. pneumoniae</i>	Acris (Hiddenhausen)
Polyklonale 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

EMEM (Earles modified Eagle Medium) mit 2 mM L-Glutamin und 1x nicht-essenziellen Aminosäuren	Biochrom (Berlin)
---	-------------------

2.4.2 Nährmedien für Bakterien

LB (Luria Bertani)-Medium, pH 7,0	
1 % Trypton	Becton Dickinson (Heidelberg)
0,5 % Hefeextrakt	Becton Dickinson (Heidelberg)
0,5 % NaCl	Merck (Darmstadt)
Für Platten zusätzlich 1,5 % Agar	Merck (Darmstadt)

2.4.3 Nährmedien für Hefen

YPDA-Vollmedium (pH 6,5)	
2 % Pepton	Merck (Darmstadt)
1 % Hefeextrakt	Becton Dickinson (Heidelberg)
2 % Glucose	Merck (Darmstadt)
0,003 % Adenin-Hemisulfat	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Für Platten zusätzlich 2 % Agar	Merck (Darmstadt)
SD-Selektivmedium (pH 5,8)	
0,67 % Hefestickstoff	Merck (Darmstadt)
10 % 10x Dropout-Lösung	siehe unten
2 % Glucose	Merck (Darmstadt)
Für Platten zusätzlich 2 % Agar	Merck (Darmstadt)
10x Dropout (DO)-Lösungen	
<u>10x -Leu/-Trp DO-Lösung</u>	
6,4 g/l -Leucin/-Tryptophan- Dropout-Supplement	Clontech (Heidelberg)
<u>10x -Ade/-His/-Leu/-Trp DO</u>	
5,0 g/l -Adenin/-Histidin/-Leucin/-Tryptophan- Dropout-Supplement	Clontech (Heidelberg)

2.4.4 Zusätze

Antibiotika	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin (Sigma-Aldrich)	50 mg/ml	100 µg/ml
Gentamicin (Biochrom)	10 mg/ml	25 µg/ml
Kanamycin (Sigma-Aldrich)	50 mg/ml	50 µg/ml
Vancomycin (Sigma-Aldrich)	125 mg/ml	50 µg/ml
Amphotericin B (Biochrom)	250 µg/ml	2,5 µg/ml
Sonstige Zusätze		
L-Glutamin (Biochrom)	200 mM	2 mM
Nicht-essenzielle Aminosäuren (Biochrom)	100x	1x
Cycloheximid (Sigma-Aldrich)	50 µg/ml	1 µg/ml
FCS (Biochrom)	100 %	10 %
X-α-gal (Clontech), in DMF	20 mg/ml	20 µg/ml

2.5 Standardlösungen und Puffer

EDTA (Versen)	1 % in PBS ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺
1x PBS	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 4 mM Na ₂ HPO ₄
1x TE	10 mM Tris, 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 free DNase Set	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 Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
Genomische-DNA Isolation	
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen (Hilden)
DNA-Elution aus Agarose-Gelen	
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
DNA-Aufreinigung	
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Protein-Elution aus Polyacrylamidgelen	
Biotrap Starterkit	Schleicher & Schuell (Dassel)
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 im Text nicht anders erwähnt, von den Firmen Boehringer (Mannheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Calbiochem (Bad Soden) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Alle Lösungen wurden soweit nicht anders angegeben generell in doppelt destilliertem Wasser angesetzt.

2.7.2 Verbrauchsmaterialien

Alle Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Nunc (Roskilde, Dänemark), Falcon, Becton-Dickinson (beide Heidelberg), Corning/Costar (Bodenheim), Greiner (Frickenhausen), Braun-Melsungen (Melsungen).

2.7.3 Geräte

Gerät	Modell, Hersteller
Brutschränke	Heraeus (Hanau)
Fluoreszenzmikroskop	DM R, Leica (Heidelberg)
Geldokumentationsanlage	BioDoc II, Biometra (Göttingen)
Gelelektrophoresekammern	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	<ul style="list-style-type: none"> • BP 221 S, Sartorius (Göttingen) • LP 6200 S, Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Zellkulturmikroskop	DM IL, Leica (Heidelberg)
Zentrifugen	<ul style="list-style-type: none"> • 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 **Zellkultur**

3.1.1 **Kultivierung von HEp-2-Wirtszellen**

Als Wirtszelllinie zur Kultivierung der Chlamydien wurden ausschließlich humane Larynxkarzinom-Epitheloidzellen (HEp-2-Zellen) verwendet. Diese wurden in 125-cm²-Zellkulturflaschen in EMEM mit 2 mM L-Glutamin, 1x nicht-essenziellen Aminosäuren, 10 % FCS (hitzeinaktiviert), 25 µg/ml Gentamicin, 50 µg/ml Vancomycin und 2,5 µg/ml Amphotericin B kultiviert. Die Zellen wurden bei 37°C, 5 % CO₂ und 99 % Luftfeuchtigkeit bebrütet. Bei Erreichen einer konfluenten Zelldichte wurde mit 1 % EDTA gewaschen und mit 2 ml 0,25 % Trypsin (in PBS ohne Ca²⁺, Mg²⁺) bis zur vollständigen Zellablösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (1300 g, 5 min, 20°C) und in komplettem Kulturmedium in subkonfluenter Zelldichte neu ausgesät.

3.1.2 **Kultivierung von *Chlamydomphila pneumoniae***

Chlamydomphila pneumoniae wurde in HEp-2-Wirtszellen vermehrt. Dazu wurden bereits mit HEp-2-Zellen konfluent bewachsene 6-Napfplatten mit je 1 ml Chlamydien-Suspension pro Napf überschichtet und bei 2000 g und 35°C für 45 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand ersetzt durch Serum-freies EMEM, komplementiert durch 2 mM L-Glutamin, 1x nicht-essenzielle Aminosäuren, 25 µg/ml Gentamicin, 50 µg/ml Vancomycin, 2,5 µg/ml Amphotericin B und 1 µg/ml Cycloheximid. 72 h nach der Infektion wurde der Zellrasen abgeschabt, samt Medium mit einer Kanüle (Ø = 0,90 mm) aufgenommen, die Wirtszellen mittels Passage durch eine zweite Kanüle (Ø = 0,45 mm) lysiert und bei 800 g und 35°C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand zur erneuten Infektion von HEp-2-Zellen verwendet bzw. mit 10 % FCS versetzt bei – 70°C eingefroren.

3.1.3 Konzentrationsbestimmung von *Chlamydophila pneumoniae*

Pro Napf einer 24-Napfplatte wurden je 2×10^5 HEp-2-Zellen eingesät. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungsstufen (1:1, 1:10, 1:100 und 1:200, je 300 μ l) der Chlamydien-Suspension aufzentrifugiert. Die Fixierung erfolgte nach 52 bis 56 h mit Methanol (-20°C , 500 μ l, 1 min). Danach wurde mit gefilterter, 1:10 verdünnter Giemsa-Lösung (300 μ l) für 30 min angefärbt, drei Mal mit Wasser gespült und die Zahl der Einschlusskörper pro 100 HEp-2-Zellen ermittelt.

3.2 Anzucht und Manipulation von Bakterien und Hefen

3.2.1 Anzucht von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte bei 37°C über Nacht und in Gegenwart geeigneter Antibiotika entweder auf LB-Agarplatten im Brutschrank oder in LB-Flüssigmedium im Schüttler bei 250 U/min.

3.2.2 Präparation chemisch kompetenter *Escherichia-coli*-Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte durch eine Behandlung mit RbCl [nach HANAHAN, 1983]. Ausgehend von einer Einzelkolonie oder einem gefrorenen Aliquot von *E. coli*-Zellen wurde eine Übernachtskultur von 5 ml angesetzt. 4 ml dieser Kultur wurden am nächsten Morgen mit 100 ml vorgewärmtem LB-Medium versetzt, und die Bakterien nach dem Erreichen einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,4 bis 0,5 durch Zentrifugation bei 3300 g und 4°C für 10 min sedimentiert. Die Zellpellets wurden mit je 40 ml eiskaltem Tfb1 resuspendiert und 5 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 4 ml eiskaltem Tfb2 aufgenommen und Aliquots von 100 μ l bei -70°C gelagert.

Tfb1 (pH 5,8)

30 mM KAc, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl_2 , 50 mM MnCl_2 , 15 % Glycerin

Tfb2 (pH 6,5)

10 mM MOPS, 75 mM CaCl_2 , 10 mM RbCl, 15 % Glycerin

3.2.3 Transformation von *Escherichia-coli*-Zellen

Zur Transformation von *E. coli* [modifiziert nach HANAHAN, 1983] wurden chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend mit 1 (Plasmid-DNA) bis 100 ng (Ligationsansatz) DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Hitzebehandlung für 45 s bei 42°C wurden die Zellen weitere 2 min auf Eis gehalten und nach Zugabe von 900 µl LB-Medium 60 min bei 37°C und 250 U/min inkubiert. Zur Selektion der transformierten Bakterien wurden unterschiedliche Mengen der Bakterienkultur in Anwesenheit eines geeigneten Selektionsmarkers auf LB-Agarplatten ausplattiert, bzw. LB-Flüssigmedium beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.4 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Anzucht von *S. cerevisiae* erfolgte stets bei 30°C bis zum Erreichen der gewünschten Zelldichte bei 250 U/min im Schüttelinkubator oder nach dem Ausstreichen mit einer abgeflamten Öse oder einem sterilen Drigalski-Spatel auf Agarplatten, jeweils in Gegenwart von YPDA-Vollmedium oder geeignetem SD-Mangelmedium.

3.2.5 Transformation von *Saccharomyces-cerevisiae*-Zellen

Die Hefezelltransformationen im Rahmen der Yeast-Two-Hybrid-Versuche erfolgte als simultane Kotransformation mittels der Lithium-Acetat Methode [modifiziert nach ITO et al., 1983; SCHIESTL & GIETZ, 1989; HILL et al., 1991; GIETZ et al., 1992]. Hefezellen wurden mit Lithiumacetat (LiAc), der zu transformierenden Plasmid-DNA, einem Überschuss an Carrier-DNA und Polyethylen (PEG) inkubiert und in Anwesenheit von Dimethylsulfoxid (DMSO) einem Hitzeschock ausgesetzt, wodurch DNA in die Hefezellen eindringen kann. Anschließend wurden die Zellen auf Platten mit entsprechenden Selektionsmedien ausgestrichen.

Für die Transformation der Genbank wurden einige 2 bis 3 mm große Hefezellkolonien für 16 - 18 h in 150 ml YPDA inkubiert, ein Teil davon anschließend in 1 l YPDA auf eine OD_{600nm} von 0,2 - 0,3 verdünnt und für weitere 3 - 5 h inkubiert, bis eine OD_{600nm} von 0,4 - 0,6 erreicht war. Daraufhin wurden die

Zellen bei 1000 g für 5 min bei Raumtemperatur sedimentiert, mit H₂O gewaschen, erneut zentrifugiert und in 8 ml 100 mM LiAc (in TE-Puffer) resuspendiert. Anschließend wurden bei Kotransformation 850 µg Köder-, 500 µg Genbankplasmid (im 2:1-molaren Verhältnis von Köder- zu Genbankplasmid), 20 mg Heringsperma Carrier-DNA (Clontech) und 60 ml PEG/LiAc-Lösung zu den kompetenten Hefezellen gegeben, der Transformationsansatz 1 min gemischt und 30 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden 7 ml DMSO addiert, vorsichtig gemischt, die Zellen für 15 min bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation und Resuspension in 10 ml YPDA wurden je 200 µl auf große (Ø = 130 mm) und je 100 µl auf kleine (Ø = 90 mm) Platten des entsprechenden Selektionsmediums ausgestrichen.

Für Vor- und Kontrollversuche wurden entsprechende Transformationen in kleinerem Maßstab durchgeführt.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

3.3.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Genomische DNA von *C. reinhardtii* wurde aus dem abzentrifugierten Chlamydien-Überstand nach Zellyse durch Proteinase K mit dem QIAamp DNA Mini Kit nach den Angaben des Herstellers isoliert.

3.3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit den Qiagen-Plasmid-Kits für Mini- und Maxi-Präparation nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierbei wurden die Bakterien in Gegenwart von RNase alkalisch lysiert und die Lysate durch Zentrifugation von Proteinen und genomischer DNA getrennt. Die klaren Lysate wurden daraufhin auf Säulen gegeben und die Plasmid-DNA an die Silika-Membran der Säulen gebunden. Weitere Verunreinigungen wurden durch Waschschriffe entfernt und die reine Plasmid-DNA in entsprechenden Puffervolumina aufgenommen.

3.3.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* erfolgte mittels des QIAprep Spin Miniprep Kits. Um aufgrund der im Vergleich zu *E. coli* widerstandsfähigeren Zellwand der Hefen eine ausreichende Lyse zu gewährleisten, wurde diese vorher enzymatisch angedaut. Hierfür wurden die abzentrifugierten Hefezellen in 50 µl TE-Puffer resuspendiert und mit 50 U Lyticase (in 10 µl) für eine Stunde bei 37°C und 900 U/min im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden 20 µl 10 % SDS zugegeben, eine Minute gevortext und die Proben für 30 min bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen und nochmaligen Vortexen wurde das QIAprep Spin Miniprep-Protokoll nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und die isolierte und aufgereinigte Plasmid-DNA in 50 µl Puffer eluiert.

3.3.1.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus HEp-2-/*Chlamydomonas reinhardtii*-Zellkultur

Die Gesamt-RNA von mit *C. pneumoniae* infizierten HEp-2-Zellen wurde mittels des RNeasy Mini Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Hierfür wurde der Zellrasen abgeschabt, in Lysepuffer (RLT) aufgenommen und mit einer QIAshredder-Säule homogenisiert. Das Homogenat wurde mit 70 % Ethanol versetzt und die RNA mittels Zentrifugation an die Matrix einer RNeasy-Säule gebunden. Eventuell kontaminierende DNA, die in anschließenden RT-PCR Reaktionen stören würde, wurde durch einen DNase-Verdau direkt auf der Säule mittels des RNase-freien DNase-Sets (Qiagen) eliminiert. Nach mehreren Waschschritten wurde die RNA mit RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert.

3.3.1.5 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Neben 5 pmol Primer betrug die eingesetzte DNA-Menge für PCR-Produkte 40 - 200 ng und für Plasmide ca. 600 ng.

3.3.1.6 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Gemäß dem Lambert-Beer-Gesetz ist die Konzentration einer Lösung direkt proportional zu ihrer Extinktion. Diese Relation macht man sich bei der spektralphotometrischen Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren zu Nutze [SAMBROOK et al., 1989]. Von einer Verdünnung der gereinigten Nukleinsäure (die gemessenen Extinktionswerte sollten im Bereich von 0,1 - 1,0 liegen, um eine ausreichende Genauigkeit zu gewährleisten) wurde im Spektralphotometer die Absorption bei 260 nm (Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren) und bei 280 nm (Absorptionsspektrum von Proteinen) bestimmt. Die Messung erfolgte in 100- μ l-Quarz-Küvetten.

Es gilt folgende Relation zwischen gemessener Extinktion und Konzentration der Nukleinsäure:

- dsDNA: $1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ mg/ml}$
- ssDNA: $1 \text{ OD}_{260} = 33 \text{ mg/ml}$
- RNA: $1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ mg/ml}$

Um ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäurelösung zu erhalten, kann der Quotient $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ gebildet werden. Optimale Werte liegen für RNA bei 1,9 - 2,0 und für DNA bei 1,8.

Im Normalfall waren nur Nukleinsäurekonzentrationen von mehr als 0,1 mg/ml mit hinreichender Genauigkeit photometrisch messbar. Die Konzentration geringerer DNA-Mengen konnte durch Ethidiumbromid-Färbung bestimmt werden. Die Konzentration des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids ist direkt proportional zur Konzentration der DNA. Die auf dem UV-Schirm vom Ethidiumbromid emittierte Fluoreszenzstrahlung stellt somit ein Maß für die DNA-Menge dar. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde durch den Vergleich mit einem DNA-Standard bekannter Konzentration abgeschätzt.

3.3.1.7 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese [SAMBROOK et al., 1989] wird benutzt, um DNA-Fragmente im elektrischen Feld ihrer Größe nach aufzutrennen.

0,8 - 2 % Agarose wurde in TAE-Puffer in einer Mikrowelle aufgekocht, nach dem Abkühlen auf etwa 60°C 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben und das Gel zum Abkühlen in eine mit einem Kamm bestückte Flachgelapparatur gegossen. Nach Erstarren wurde das Gel in einer Gelkammer mit TAE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. Die DNA-Proben wurden mit 6x Auftragspuffer versetzt und zusammen mit einem DNA-Längenstandard auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 5 - 10 V/cm in der Flachgelapparatur. Durch die Interkalierung des Ethidiumbromids in die DNA konnte diese unter UV-Anregung sichtbar gemacht und fotografiert werden. Die Nachweisgrenze liegt dabei bei etwa 20 ng pro Bande.

TAE-Puffer

40 mM Tris, 1 % Essigsäure, 1 mM EDTA (pH 8,0)

6x Auftragspuffer

MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

3.3.1.8 Extraktion von DNA aus präparativem Agarosegel

DNA wurde durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, die entsprechende DNA-Bande auf einem Transilluminator unter UV-Licht (70 % der normalen Intensität, um DNA-Schäden zu vermeiden) mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAEX II Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Dazu wurde das ausgeschnittene Agarosegelfragment in den Puffern QX1 und QIAEX II (Qiagen) bei 50°C gelöst, die Agarose und der restliche Puffer durch Waschen an einer Silika-Matrix entfernt und die DNA in H₂O eluiert.

3.3.2 Amplifizierung von Nukleinsäuren

3.3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der PCR [modifiziert nach MULLIS & FALOONA, 1987] wird mit Hilfe einer DNA-Polymerase und zweier gegenläufiger Primer ein dazwischen liegender DNA-Abschnitt selektiv amplifiziert. Durch Denaturierung und anschließende Renaturierung wird den Primern die Bindung an deren komplementären Sequenzen

auf dem Matrizenstrang ermöglicht. Ausgehend von diesen Primern katalysiert eine hitzestabile DNA-Polymerase (im Rahmen dieser Arbeit die *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus*) die Synthese des komplementären Strangs, der in folgenden Zyklen ebenfalls als Matrize für die Bindung der spezifischen Primer und DNA-Polymerisation dient. Durch Wiederholung des beschriebenen Zyklus kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung des DNA-Abschnitts zwischen den beiden Primern.

Standard-PCR-Reaktionsansatz

	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
Matrizen-DNA	variabel	20-200 ng / Reaktion
5` - / 3`-Primer	1 µl	50 µM
Desoxyribonukleotide (Roche)	0,4 µl	800 µM
10x <i>Taq</i> -Puffer (Roche)	5 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	0,2 µl	1 U
H ₂ O	ad 50 µl	

Nach Zugabe aller Reagenzien wurden die Reaktionsgefäße kurz an zentrifugiert und in den bereits auf 95 °C vorgeheizten Block der PCR-Maschine mit beheizbarem Deckel (100°C) gestellt.

Thermocycler-Reaktion (*variable Werte im Ergebnisteil jeweils angegeben*)

Initiale PCR-Aktivierung	5 min	95°C
3-Schritt Zyklus		
Denaturierung	30 s	94°C
Annealing	1 min	50 - 68°C
Elongation	15 s – 2 min	72°C
Zyklenzahl	25 - 40	
Finale Elongation	10 min	72°C

Die PCR-Produkte wurden anschließend elektrophoretisch analysiert oder mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits aufgereinigt und umgepuffert.

3.3.2.2 Semiquantitative RT-PCR

Unter RT-PCR versteht man die Kombination aus der Umschreibung von mRNA in komplementäre DNA (cDNA) mittels Reverser Transkriptase, einer aus RNA-Viren stammenden DNA-Polymerase, und einer sich anschließenden PCR-Reaktion, in der die entstandene cDNA spezifisch amplifiziert wird.

Semiquantitativ wird diese RT-PCR, wenn verschiedene RNA-Pools, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnenen wurden, untereinander durch Vergleich der Expression eines konstitutiv exprimierten Gens normiert werden. Die so eingestellten RNA-Pools können bei Verwendung der gleichen RNA-Mengen, die für das konstitutiv exprimierte Gen gleich starke Signale ergeben, hinsichtlich der Expression verschiedener Gene miteinander verglichen werden. Zur Angleichung der RNA-Proben wurde das *16S*-Gen von *C. pneumoniae* verwendet. Nach einer RT-PCR von *16S* mit jeweils 100 ng Gesamt-RNA wurden die Proben in eine Ethidiumbromid-Agarosegelelektrophorese eingesetzt und die Intensitätsstärken der Nukleinsäurebanden mit dem Programm ScanPack 3.0 (Biometra) ermittelt. Für die RT-PCR-Reaktion wurde der OneStep-RT-PCR Kit (Qiagen) benutzt.

RT-PCR-Reaktionsansatz

	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
Gesamt-RNA	1 µl	100 ng / Reaktion
5` - / 3`-Primer	1 µl	50 µM
Desoxyribonukleotide	2 µl	1,6 mM
5x Reverse Transkriptase-Puffer	10 µl	1x (2,5 mM MgCl ₂)
5x Q-Solution	10 µl	1x
RT-PCR Enzym-Mix	2 µl	
H ₂ O, RNase-frei	ad 50 µl	

Thermocycler-Programm (*variable Werte im Ergebnisteil jeweils angegeben*)

Reverse Transkription	30 min	50°C
Initiale PCR-Aktivierung	15 min	95°C
3-Schritt Zyklus		
Denaturierung	1 min	94°C
Annealing	1 min	50 - 68°C
Elongation	15 s – 2 min	72°C
Zyklenzahl	25 - 40	
Finale Elongation	10 min	72°C

3.3.3 Enzymatische Modifikation von DNA

3.3.3.1 Restriktion

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Basenpaarsequenzen und spalten die Phosphodiester-Bindungen doppelsträngiger DNA. Zur Restriktion von DNA [SAMBROOK et al., 1989] wurden die Enzyme gemäß den Herstellerangaben bei optimalen Puffer- und Temperaturbedingungen eingesetzt. Die Volumina der Ansätze wurden so gewählt, dass die Endkonzentration an Glycerin nicht mehr als 5 % betrug. Da die meisten Enzyme in einem Puffer mit 50 % Glycerin gelagert werden, entsprach der maximale Anteil an Enzym 10 % des Endvolumens.

3.3.3.2 Ligation

Die Ligation zweier doppelsträngiger DNA-Enden erfolgte mit dem Quick Ligation Kit (New England Biolabs). Hierfür wurden in einem Endvolumen von 20 µl etwa 50 ng des restringierten Plasmids (= Vektor) mit einem 5-fach molaren Überschuss des zu integrierenden DNA-Fragments (= Insert), 10 µl 2x Quick Ligation Puffer und 1 µl Quick T4 DNA Ligase für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Herstellung und Aufreinigung rekombinanter His-Tag-Fusionsproteine

3.4.1.1 Prinzip des QiaExpressionist-Systems

QiaExpressionist (Qiagen) ist ein System zur Klonierung, Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine in *E. coli*. Die DNA-Sequenz, die für das gewünschte Protein kodiert, wurde mittels PCR amplifiziert und in die multiple Klonierungsstelle des Expressionsvektors pQE-30 eingefügt.

Auf dem Vektor befindet sich ein starker Phage-T5-Promotor mit zwei lac-Operon-Sequenzen, ein eigenes ATG-Start-Codon mit einem Marker aus sechs Histidin-Resten („Tag“), eine multiple Klonierungsstelle und anschließenden Stopp-Codons in allen Leserahmen. Die lac-Operons dienen der effizienten Repression des T5-Promotors. Ein lac-Repressor-Protein bindet an die lac-Operon-Sequenzen und verhindert so die Transkription am T5-Promotor. Setzt man IPTG hinzu, kommt es zu einer Konformationsänderung und Ablösung des Repressorproteins, so dass eine Transkription am T5 Promoter stattfinden kann und das rekombinante Protein daraufhin translatiert wird. Der Histidin-Marker am N-Terminus dient der Aufreinigung und des späteren Nachweises der Proteine. Sechs aufeinander folgende Histidin-Moleküle bilden eine Struktur aus, die spezifisch an Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) bindet, was man zur Aufreinigung der Proteine nutzt. Ni-NTA-Agarose (Ni-NTA gekoppelt an Sepharose) dient dabei als Matrix, wodurch sich das rekombinante Protein aus *E. coli*-Lysat isolieren lässt. Mittels Antikörpern, die spezifisch den His-Marker erkennen, lassen sich die so aufgereinigten Proteine im Western-Blot nachweisen. In dieser Arbeit wurde ein rekombinantes His-Tag-Fusionsprotein aus der hydrophilen N-terminalen Hälfte von CPn1020 in pQE-30 kloniert, in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt.

3.4.1.2 Expression des rekombinanten Proteins

Zur Expression des His-Tag-Fusionsproteins wurde über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C eine Vorkultur des den entsprechenden Expressionsvektor tragenden

E. coli-Stammes in LB-Selektionsmedium angelegt. Am nächsten Tag wurden die Bakterien 1:100 in Selektionsmedium verdünnt und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von $OD_{600nm} = 0,6$ inkubiert. Das Kulturvolumen entsprach bei Kontroll- und Vorversuchen 20 ml, bei Versuchen im großen Maßstab zwecks Gewinnung größerer Mengen des rekombinanten Proteins 1 l. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 mM) induziert und die Zellen nach weiteren 4 h Inkubation abzentrifugiert.

Zum Aufschluss der Zellen und Proteinextraktion wurden die Sedimente in 40 ml Lysepuffer (im kleinen Maßstab 500 μ l) resuspendiert und 20 min auf Eis in der Gegenwart von Lysozym (Endkonzentration 200 μ g/ml) und TritonX-100 (Endkonzentration 1 %) lysiert. Anschließend wurde das Lysat für eine Stunde in der Ultrazentrifuge bei 150.000 g und 4°C zentrifugiert, der (lösliche) Überstand abgenommen und die unlösliche Fraktion in 8 M Harnstoff bei 95°C aufgekocht. Die verschiedenen Fraktionen konnten nun aufgereinigt, bzw. mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert werden.

Lysepuffer (pH 8,0)

50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol

3.4.1.3 Proteinaufreinigung

Nach Proteinexpression in 1 l Kulturvolumen, Zellaufschluss und Ultrazentrifugation wurde der Überstand mit 1,5 ml Ni-NTA (Qiagen) über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde dann das an die Ni-NTA-Matrix gebundene Fusionsprotein über einer Säule mit 30–70 ml Waschpuffer gewaschen und in 1,5 ml Elutionspuffer gelöst.

Waschpuffer (pH 8,0)

50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 15 bzw. 30 mM Imidazol

Elutionspuffer (pH 8,0)

50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol

3.4.2 **Proteinextraktion aus HEp-2-/*Chlamydomonas-pneumoniae*-Zellkultur**

Mit *C. pneumoniae* infizierte HEp-2-Zellen wurden mit einem Spatel vom Boden der Kulturflasche abgelöst, samt Medium mit einer Kanüle ($\varnothing = 0,90$ mm) aufgenommen, mittels Passage durch eine zweite Kanüle ($\varnothing = 0,45$ mm) lysiert, für 10 min mit 830 g zentrifugiert und das Sediment bei -20°C eingefroren.

3.4.3 **Proteinextraktion aus Hefezellen**

Die Proteinextraktion aus Hefezellen erfolgte über einen Harnstoff/SDS-vermittelten Zellwandaufschluss [modifiziert nach PRINTEN & SPRAGUE, 1994]. Eine dicht bewachsene 5 ml Hefe-Übernachtskultur wurde nach Zugabe von 50 ml YPDA bis zum Erreichen einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,4 - 0,6 bei 30°C unter Schütteln inkubiert und nach Zugabe von sterilem Eis für 5 min mit 1000 g bei 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet mit eiskaltem Wasser gewaschen, die erneut abzentrifugierten Zellen sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

Zur Proteinextraktion wurde das Zellpellet in 400 μl Aufschlusspuffer und 10 μl β -Mercaptoethanol resuspendiert, ca. 300 μl Glasperlen hinzugefügt und für 10 min bei 70°C inkubiert. Danach wurde 1 min gevortext und der Überstand nach Zentrifugation (16.000 g, 5 min, 4°C) auf Eis gestellt. Der zweite Überstand wurde nach 5 minütigem Aufkochen des Pellets bei 99°C , einminütigem Vortexen und erneuter Abzentrifugation gewonnen, mit dem ersten Überstand vereinigt und zur Analyse in einer SDS-PAGE eingesetzt.

Aufschlusspuffer

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

Glasperlen

425-600 μm , Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

3.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteingemischen wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE [LAEMMLI, 1970] unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Im Proteinauftragspuffer enthaltenes Dithiothreitol löst über eine Aufspaltung von Disulfidbrücken vorhandene Sekundärstrukturen auf und bewirkt zusammen mit dem Detergens Natrium-Dodecylsulfat (SDS) die Dissoziation und Solubilisierung komplexer Proteinmoleküle. SDS lagert sich an Proteine in einem festen Massenverhältnis (etwa ein Molekül SDS pro zwei Aminosäurereste) an. Im elektrischen Feld wandern die vom SDS umgebenen und somit pro Masseneinheit konstant negativ geladenen Proteine in Richtung Anode, wodurch es zur Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes kommt.

Für die Herstellung der 0,75 mm dicken Gelsysteme wurde in einer vertikalen Gelapparatur zunächst ein Trenngel mit 12 - 15 % Acrylamid (AA) gegossen und dieses zwecks Ausbildung einer geraden Lauffront mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Acrylamids und Entfernung des Alkohols wurde ein Sammelgel (4,4 % AA) auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt. Die Proteinproben wurden mit Proteinauftragspuffer im Verhältnis 1:4 gemischt, 5 min auf 99°C erhitzt, nach vollständiger Polymerisation des Geles mit einem Molekulargewichtsmarker aufgetragen und in Laemmli-Laufpuffer bei 25 mA für ca. 90 min aufgetrennt, bis die Bromphenolblaufront aus dem Gel herauslief.

Trenngel

12-15 % AA, 0,2 % SDS, 375 mM Tris (pH 8,8), 0,04 % APS, 0,2 % TEMED

Sammelgel

4,4 % AA, 0,2 % SDS, 125 mM Tris (pH 6,8), 0,05 % APS, 0,4 % TEMED,
0,004 % Bromphenolblau

4x Proteinauftragspuffer

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

Laemmli-Laufpuffer

25 mM Tris, (pH 8,3), 0,2 M Glycin, 0,1 % SDS

3.4.5 Coomassie-Färbung

Um Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen unspezifisch sichtbar zu machen, wurden diese im Anschluss an die Elektrophorese eine Stunde bei Raumtemperatur in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und danach so lange mit Entfärbelösung gewaschen, bis der Hintergrund von Farbrückständen befreit war. Anschließend wurde das Gel zwischen zwei angefeuchteten Einmachfolien in einen Rahmen gespannt und für ein bis zwei Tage getrocknet.

Coomassie-Färbelösung

30 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,025 % Coomassie Brilliant Blue

Entfärbelösung

30 % Methanol, 10 % Essigsäure

3.4.6 Proteinisolierung aus präparativem SDS-Polyacrylamid-Gel

Um eine Proteinbande aus einem SDS-Polyacrylamidgel zu isolieren, wurde das Gel nach elektrophoretischer Auftrennung kurz mit Coomassie-Färbelösung und Entfärbelösung inkubiert, so dass die entsprechende Proteinbande mit einem Skalpell herausgeschnitten werden konnte. Anschließend wurde das Protein mit Hilfe des S&S Biotrap Starter Kits (Schleicher & Schuell) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Der Kit arbeitet mit einer mit Elutionspuffer gefüllten Elektrophoresekammer, in der zwei unterschiedlich permeable Membranen eine Elutionskammer bilden, vor deren kathodenzugewandter Seite die herausgeschnittenen Gelstücke platziert werden. Nach Anlegen einer Spannung von 100 V über Nacht wandern die Proteine aus dem Gel in Richtung der Anode durch die für Bestandteile des Geles undurchlässige erste Membran hindurch in die Elutionskammer. Diese Kammer wird anodenwärts von einer zweiten Membran begrenzt, welche wiederum für die Proteine impermeabel ist. Nach 12 - 16 h wurde für 30 s bei 200 V umgepolt, um die Proteine von der zweiten Membran zu lösen, und die Elutionskammer mit dem darin befindlichen Protein entleert.

Elutionspuffer

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,025 % SDS

3.4.7 Western-Blot

Ein Western-Blot wird dazu verwendet, Proteine spezifisch nachzuweisen. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte der Nachweis des rekombinant hergestellten CPn1020-His-Tag-Fusionsproteins, des nativen CPn1020 in infizierten HEP-2-Zellen und von gegen CPn1020 gerichteten Antikörpern in menschlichen Seren.

Ein Western-Blot gliedert sich in den Transfer von mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen auf eine Membran und die anschließende Detektion mit spezifischen Antikörpern.

3.4.7.1 Proteintransfer auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch Semi-Dry-Blotting [modifiziert nach KYHSE-ANDERSEN, 1984] elektrophoretisch auf Polyvinyliden-Difluorid (PVDF)-Membranen übertragen.

Die Transfereinheit war luftblasenfrei wie folgt aufgebaut:

- Graphitelektrode (Anode), angefeuchtet mit H₂O
- 6 Filterpapiere, äquilibriert in: 0,3 M Tris-HCl (pH 10,4), 20 % Methanol
- 3 Filterpapiere, äquilibriert in: 25 mM Tris-HCl (pH 10,4), 20 % Methanol
- PVDF-Membran, äquilibriert in 100 % Methanol
- SDS-PA-Elektrophorese-Gel
- 9 Filterpapiere, äquilibriert in: 40 mM Aminocaprinsäure (pH 7,6), 20 % Methanol
- Graphitelektrode (Kathode), angefeuchtet mit H₂O.

Die Proteine wurden mit 0,8 mA/cm² Transferfläche für 90 min auf die PVDF-Membran übertragen.

PVDF-Membran

Hybond-P, Amersham Buehler (Braunschweig)

3.4.7.2 Immundetektion

Um Proteine mittels einer Immunfärbung spezifisch nachzuweisen, wurde die PVDF-Membran mit den darauf transferierten Proteinen zunächst für 30 min bei Raumtemperatur mit Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

Anschließend erfolgte die Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper (in Waschpuffer verdünnt) bzw. über Nacht bei 4 °C mit polyklonalem Antiserum. Nach 3-maligem Waschen mit Waschpuffer wurde eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem geeigneten, gegen den Primärantikörper gerichteten, alkalische-Phosphatase (AP)-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert und erneut drei Mal gewaschen. Die Membran wurde bis zur Entwicklung spezifischer Signale mit AP-Substratlösung inkubiert, die Färbereaktion durch Waschen mit H₂O gestoppt und die Membran getrocknet.

Waschpuffer

PBS, 0,1 % TritonX-100

Blockierlösung

5 % Magermilchpulver, 0,02 % NaN₃ in PBS

AP-Substratlösung

9 ml Substratpuffer, 1 ml NBT-Lösung, 0,1 ml BCIP-Lösung

Substratpuffer

2 % Diethanolamin, 98 µM MgCl₂ in 0,9 % NaCl

NBT-Lösung

1 mg/ml 4-Nitroblautetrazoliumchlorid in H₂O

BCIP-Lösung

5 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat in Dimethylformamid

3.4.8 Trichloressigsäure (TCA)-Proteinfällung

Nach Zugabe von TCA (Endkonzentration 10 %) wurde der Ansatz 1 h auf Eis inkubiert und die Proteine anschließend mit 30.000 g für 30 min bei 4 °C sedimentiert. Das Pellet wurde mit eiskaltem Aceton gewaschen, getrocknet und in einem geeigneten Volumen PBS aufgenommen.

3.4.9 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration [modifiziert nach LOWRY et al., 1951] wurde mit dem BCA Protein-Assay-Kit unter Zuhilfenahme einer mit BSA erstellten Eichgeraden nach den Angaben des Herstellers ermittelt.

3.4.10 Immunisierung von Kaninchen zur Antikörpergewinnung

Um Antiserum gegen CPn1020 zu gewinnen, wurde ein Kaninchen (New Zealand White Rabbit) mit dem aufgereinigten His-Tag-Fusionsprotein immunisiert. Eine Ampulle Adjuvans ABM-S (Antibody-Multiplier spezial) wurde mit 200 µg aufgereinigtem Protein in 2 ml PBS nach den Angaben des Herstellers rekonstituiert und im Abstand von zwei Wochen je 1 ml dieser Emulsion subkutan an mehreren Stellen auf dem Rücken injiziert. Nach weiteren 2 Wochen erfolgte eine dritte Immunisierung mit 1 ml ABM-N (Antibody-Multiplier normal) in PBS, in welches 100 µg des rekombinanten CPn1020 gelöst wurden. Nach weiteren zwei Wochen wurden – wie schon vor der ersten Immunisierung - 8 ml Blut aus der Ohrarterie des Kaninchens abgenommen, über Nacht bei 4°C koaguliert, zwei Mal mit 3.300 g zentrifugiert, 1:1 mit Glycerin versetzt und bei - 20°C gelagert.

Anschließend konnte das vor und nach der Immunisierung gewonnene Serum hinsichtlich des Immunisierungserfolges mit einem Western-Blot untersucht werden.

Kaninchen

New Zealand White Rabbit, Charles-River (Sulzfeld)

ABM-S, ABM-N

Linaris (Bettingen)

3.4.11 Affinitätsaufreinigung von Antiseren

Zur Erhöhung der Spezifität des Kaninchenantisera wurde eine Affinitätsaufreinigung an durch SDS-PAGE aufgetrennten HEp-2-Lysaten durchgeführt. Das HEp-2-Lysat wurde gewonnen, indem mit HEp-2-Zellen konfluent bewachsene Kulturflaschen mit EDTA gespült, die Zellen unter Zuhilfenahme eines Spatels in insgesamt 17,5 ml Lysepuffer aufgenommen und 30 min im Überkopfschüttler inkubiert wurden. Anschließend wurde Proteinauftragspuffer (siehe SDS-PAGE) zugefügt, der Ansatz für 30 min bei 99°C aufgeköcht und davon 500 µl (darin ca. 270 µg HEp-2-Gesamtprotein) pro SDS-PAGE eingesetzt.

Die aufgetrennten HEp-2-Proteine wurden dann auf eine PVDF-Membran transferiert (siehe Western-Blot), die Membran mit 10 ml 1:100 verdünntem Antiserum 8 - 16 h bei 4°C inkubiert und orientierend mit AP-konjugiertem Ziegenanti-Kaninchen-Antikörper und anschließender AP-Farbreaktion detektiert. Dieser Vorgang wurde daraufhin an weiteren proteinbeladenen Membranen wiederholt, um die Konzentration unspezifisch bindender Antikörper zu verringern.

Lysepuffer

1 % TritonX-100 in PBS

3.5 Immunfluoreszenztest

Um CPn1020 auf Einzelzellebene nachweisen und lokalisieren zu können, wurde 2, 8, 24, 48, 55 und 72 h nach Infektionsbeginn ein Immunfluoreszenztest durchgeführt. Dazu wurden HEp-2-Zellen auf runde Deckgläschen (Durchmesser 13 mm) in 24-Napfplatten ausgesät.

Nach Adhärenz und konfluentem Wachstum der Zellen erfolgte die Infektion mit Chlamydien-Suspension. Zum jeweiligen Zeitpunkt erfolgte ein Waschschrift mit PBS, um Reste des Mediums und extrazelluläre Chlamydien zu entfernen. Anschließend wurde bei Raumtemperatur mit 4 % Paraformaldehyd in PBS für 10 min fixiert und danach die Zellen mit 0,25 % TritonX-100 in PBS für 15 min permeabilisiert. Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden mit Blockierlösung zur Reduktion unspezifischer Antikörperbindung über Nacht bei 4°C blockiert. Die primären Antikörper wurden in PBS mit 1 % BSA verdünnt und die

Ansätze anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 10 min wurden die Zellen mit einem an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörper (in PBS verdünnt mit 1 % BSA) für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und erneut drei Mal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Deckgläschen kurz in entmineralisiertes Wasser getaucht, um eine Kristallisation des PBS zu verhindern, und mit 10 µl Mowiol pro Deckgläschen auf Objektträger gebracht. Nach dem Trocknen über Nacht bei 4°C konnten die fertigen Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

Blockierlösung

1 % BSA, 0,02 % NaN₃, in PBS

Mowiol

2,4 g Mowiol (4-88), 6,0 g Glycerin, 6 ml H₂O, 12 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5)

bei 4°C rühren bis klare Lösung entsteht

Inkubation bei 50°C, 10 min

Zentrifugation für 15 min, 5000 g

Aufbewahrung des Überstandes bei -20°C

3.6 Das Yeast-Two-Hybrid-System

Mit dem Yeast-Two-Hybrid-System können physikalische Protein-Protein-Interaktionen in Hefezellen *in vivo* nachgewiesen werden [FIELDS S & SONG, 1989; CHIEN et al., 1991]. Man kann hiermit entweder die Wechselwirkungen von zwei bekannten Proteinen charakterisieren oder, wie in dieser Arbeit, eine cDNA-Genbank auf Interaktionspartner mit einem zu untersuchenden Köderprotein untersuchen.

Möglich gemacht wird dies, indem die genetischen Informationen für die DNA-bindende und die transkriptionsaktivierende Untereinheit eines Transkriptionsfaktors auf zwei verschiedene Plasmide verteilt und zusammen mit den zu untersuchenden Köder- bzw. Genbankproteinen als unabhängige Fusionsproteine exprimiert werden. Erst wenn es zu einer physikalischen Interaktion und damit zu räumlicher Annäherung der beiden Fusionsproteine und folglich auch der beiden Transkriptionsfaktor-Untereinheiten kommt (wie bei den als Positivkontrollen

eingesetzten Plasmiden pGADT7-T und pGBKT7-53, deren exprimierte Fusionsproteine interagieren), findet die Transkription der Reportergene statt, die dann über entsprechende Selektionsmarker sichtbar gemacht werden kann.

Das benutzte MATCHMAKER Two-Hybrid System 3 (Clontech) arbeitet mit dem GAL4-Transkriptionssystem. In Hefen bindet das GAL4-Protein an entsprechende Promotoren und aktiviert so die Transkription verschiedener für den Galaktose-Metabolismus essenzieller Gene [GUTHRIE & FINK, 1991]. Im benutzten *S. cerevisiae*-Stamm AH109 ist das *GAL4*-Gen deletiert. Dessen DNA-bindender Bereich findet sich stattdessen auf dem Vektor pGBKT7 wieder, in den das Gen des zu untersuchenden Proteins CPn1020 inseriert wurde. Der aktivierende Bereich wiederum liegt auf dem Vektor pACT2, der verschiedene Inserts einer cDNA-Genbank aus menschlichen HeLa-Zellen beinhaltet. Als Selektionsmarker für diese beiden Plasmide dienen *TRP1* bzw. *LEU2*, da AH109 für Tryptophan und Leucin auxotroph ist, auf Medium ohne diese beiden Aminosäuren also nur in Anwesenheit beider Plasmide wachsen kann. Das *LEU2*-Gen kodiert für die β -Isopropylmalat-Dehydrogenase, welches für die Synthese von α -Ketoisocaproat, einer unmittelbaren Leucin-Vorstufe, notwendig ist, *TRP1* kodiert für ein Enzym der Tryptophan-Synthese (Phosphoribosylanthranilat-Isomerase). Die Reportergene unter der Kontrolle von *GAL4* sind *HIS3*, *ADE2* und *MEL1*. Nur Klone, die über Interaktion und Annäherung der beiden Transkriptionsfaktor-Untereinheiten die Reportergene *HIS3* und *ADE2* exprimieren, können aufgrund der zusätzlichen Auxotrophie von AH109 für Histidin und Adenin in Medien wachsen, denen beide Nährstoffe fehlen. *HIS3* und *ADE2* kodieren ebenfalls für Enzyme der Aminosäuresynthese, nämlich Imidazolglycerolphosphat-Dehydrogenase (Histidin) und Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase (Adenin).

MEL1-positive Klone sezernieren zusätzlich das Enzym α -Galaktosidase, das die Spaltung von Melibiose in Galaktose und Glucose katalysiert und im Medium enthaltenes X- α -Gal hydrolysiert, wodurch positive Kolonien eine blaue Farbe annehmen.

3.6.1 Genbank-Amplifizierung

Um während der Vervielfältigung der cDNA-Genbank zu verhindern, dass es zu einem ungleichmäßigen Wachstum der individuellen Klone mit eventuellem Wachstumsnachteil instabilerer Klone und negativen Auswirkungen auf die Zusammensetzung des Präparationsproduktes kommt, wurde eine so genannte semi-solid-Amplifizierung durchgeführt. Hierfür wurden $10,5 \times 10^6$ primäre Transformanden der cDNA-Genbank in 2 l semi-solid-Agarmedium (mit 200 µg/ml Ampicillin) inokuliert und nach einer Stunde im Eiswasserbad für 44 h mit gelockertem Deckel bei 30°C ohne Schütteln inkubiert. Nach Zellernte wurde die Plasmidpräparation mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

cDNA-Genbank

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

mRNA-Quelle:	HeLa (Humane Zervix-Karzinom)
Kloniervektor:	pACT2
Anzahl der unabhängigen Klone:	$3,5 \times 10^6$
Durchschnittliche cDNA-Größe:	2,0 kb

Semi-solid-Agarmedium

2 % Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg
1 % Hefeextrakt	Becton Dickinson, Heidelberg
1 % NaCl	
0,3 % Seaprep-Agarose	BMA (Rockland, USA)

3.6.2 Tests auf Autoaktivierung der Reportergene

Vor einer Genbank-Transformation sollte sichergestellt werden, dass die Fusionsproteine nicht autonom die Transkription der Reportergene aktivieren, wie es z.B. von untersuchten Transkriptionsfaktoren beschrieben wurde.

Zu diesem Zweck wurde sowohl der *cpn1020*-tragende Ködervektor pGBKT7, als auch verschiedene cDNA-Inserts beinhaltendes pACT2 unabhängig in *S. cerevisiae*

AH109 transformiert und die Aktivierung von *MEL1* auf X- α -Gal enthaltenen Tryptophan- bzw. Leucin-Mangelplatten untersucht.

3.6.3 Genbanktransformation

Die Anzucht und das genaue Vorgehen bei Transformation von *S. cerevisiae* wurden bereits in Kapitel 3.2 beschrieben.

Im Rahmen der Durchführung einer Genbanktransformation mit dem Yeast-Two-Hybrid-System zwecks Testung einer Genbank auf Interaktionspartner mit einem bekannten Protein können darüber hinaus verschiedene Strategien gewählt werden, die die zeitliche Abfolge der Transformation und die Stringenz der Selektion betreffen. Die Transformationsform kann entweder als simultane Kotransformation mit beiden Plasmiden in einem Ansatz durchgeführt werden oder aber als sequenzielle, hintereinander geschaltete Transformation mit zwischenzeitlicher Zellselektion nach Einführung nur eines Plasmides. Die Transformationseffizienz liegt bei sequenzieller Transformation höher, da in der Genbanktransformation nur ein und nicht beide Plasmide erfolgreich eingeführt werden müssen.

Die Selektionsstringenz wird bestimmt durch die Selektivität des Mangelmediums, auf dem die Hefezellen nach Transformation ausplattiert werden. Die Stringenz reicht dabei von niedrig (3-fach-Mangelplatten, denen neben Leucin und Tryptophan nur Histidin fehlt) über mittel (4-fach-Mangelplatten, es fehlt zusätzlich Adenin) bis hoch (4-fach-Mangelplatten, die zusätzlich X- α -Gal enthalten und damit die sofortige farbliche Selektion positiver Klone ermöglichen). Bei Transformationen mit niedriger oder mittlerer Stringenz müssen gewachsene Kolonien anschließend auf Platten der nächst höheren Stringenz überführt werden. Niedrige Stringenz selektiert lediglich auf eine erfolgreiche Kotransformation, mittlere Stringenz lässt auch ein Koloniewachstum von Klonen mit schwachen Wechselwirkungen zu. Beide Methoden beinhalten daher das Risiko der größeren Anzahl falsch-positiver Klone und sind aufgrund der notwendigen Überführung einer womöglich großen Anzahl von Kolonien sehr aufwendig. Eine hohe Stringenz ist leichter durchführbar, es können allerdings schwache Interaktionspartner übersehen werden.

3.6.4 Yeast Mating

Yeast Mating ist eine zur Kotransformation alternative Methode, um zwei unterschiedliche Plasmide in eine Hefezelle zu transferieren [FINLEY & BRENT, 1994; HARPER et al., 1993]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Yeast Mating dazu benutzt, die durch einen Genbankscreen ermittelten Interaktionskandidaten hinsichtlich möglicher falsch-positiver Reaktionen zu untersuchen. Hierzu wurde jeder positiv getestete Genbankklon in drei Ansätzen mit dem Ködervektor und darin enthaltenen und jeweils variierenden Inserts in Hefezellen überführt. Je ein Ansatz beinhaltete ein Plasmid mit *cpn1020* als Insert, stellte also das ursprüngliche Köderplasmid und somit eine Reproduktion und Positivkontrolle des Genbankscreens dar, ein zweiter Ansatz enthielt ein Kontroll-Gen ungleich *cpn1020* (*lam*) und ein dritter Ansatz das Plasmid ohne Insert. Die beiden letztgenannten Ansätze stellten folglich Negativkontrollen dar. Nur Klone, die unter den Genbankscreen-Bedingungen wuchsen, nach Austausch bzw. Eliminierung des untersuchten *cpn1020* aber nicht, wurden als tatsächlich positiv gewertet.

Zur Durchführung des Yeast Mating wurde der *S. cerevisiae*-Stamm AH109 mit den positiv getesteten Plasmiden transformiert, die zuvor zwecks Verbesserung der Reinheit nach Transformation in *E. coli* amplifiziert und erneut isoliert wurden. Die transformierten Hefezellen wurden dann auf SD/-Leu-Platten selektioniert. Ein zweiter *S. cerevisiae*-Stamm, Y187, wurde jeweils mit dem BD-Vektor ohne Insert, mit dem *cpn1020*-Gen und mit dem *lam*-Gen transformiert und auf SD/-Trp-Platten inkubiert. Der eigentliche Mating-Ansatz bestand in der Beimpfung von je 0,5 ml YPDA-Medium mit einer AH109-Kolonie und jeweils einem der drei Y187-Klone. Anschließend wurde der jeweilige Ansatz gründlich resuspendiert, bei 30°C ca. 20 Stunden bei 200 rpm inkubiert und 100 µl auf SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His/X-α-Gal-Platten ausgestrichen. Ein Wachstum mit Blaufärbung zeigte positive Klone an.

4 ERGEBNISSE

4.1 Eigenschaften von *cpn1020*

1999 wurde das komplette Genom von *C. pneumoniae* entschlüsselt und veröffentlicht [KALMAN et al., 1999]. Es konnten 1.073 wahrscheinlich proteinkodierende Sequenzen identifiziert werden, darunter auch *cpn1020*. Der offene Leserahmen von *cpn1020* kodiert für 510 Aminosäuren, was einer errechneten Molekularmasse von 58 kDa entspricht. Am N-Terminus konnte mithilfe der im Internet zur Verfügung stehenden Anwendungen PSORT (<http://www.psort.org>) und SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) keine Sequenz ausgemacht werden, die für ein Signalpeptid kodiert [BENDTSEN et al., 2004; GARDY et al., 2005]. Der Guanin-/Cytosin-Gehalt des Genes ist mit 39 % dem des gesamten Genoms (40 %) praktisch identisch.

4.1.1 Hydrophobizitätsmuster

Mit dem Algorithmus ProtScale (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>) wurde ein theoretisches Hydrophobizitätsmuster nach der Aminosäureskalierung von KYTE & DOOLITTLE [1982] errechnet. Nach diesem Algorithmus besitzt CPn1020 eine hydrophile erste (N-Terminus) und eine hydrophobe zweite Hälfte (C-Terminus) (*Abb. 5 links*). Die drei hydrophoben „Peaks“ könnten dabei mögliche Transmembrandomänen repräsentieren. Diese Prognose wurde auch von dem Programm DAS (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>) unterstützt, das eine Aminosäuresequenz auf mögliche Transmembranregionen untersucht (*Abb. 5 rechts*).

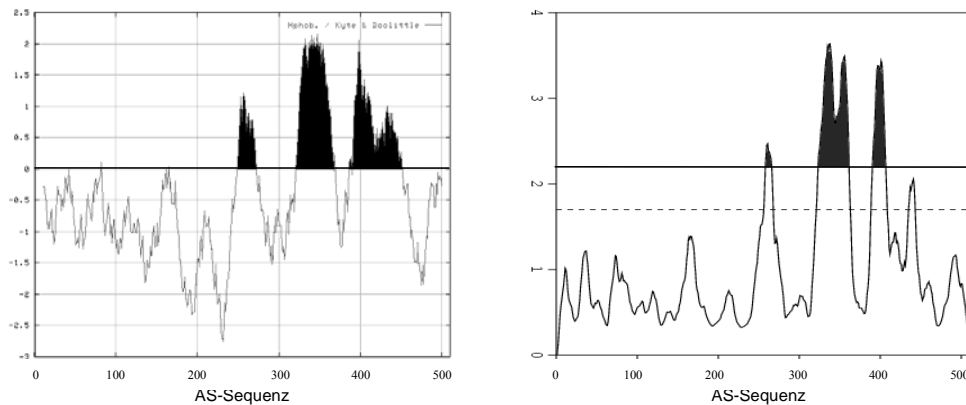


Abb. 5: Links: Hydrophobizitätsmuster von CPn1020, erstellt durch ProtScale (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>) mit der Hydrophatie-Aminosäureskalierung nach KYTE & DOOLITTLE [1982]. Positive Werte weisen auf höhere Hydrophobizität hin. Rechts: Darstellung möglicher Transmembranregionen, erstellt durch DAS (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>). Die „Peaks“ oberhalb der Grenzwerte weisen auf 3 oder 4 mögliche Transmembranregionen hin.

4.1.2 Homologievergleich

Ein Homologievergleich auf Proteinebene wurde mit der Datenbank BLAST des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) durchgeführt [ALTSCHUL et al., 1997]. Dieser lieferte größte Ähnlichkeit mit dem Membranprotein CAB708 von *Chlamydomophila abortus* und dem hypothetischen Protein CCA00741 von *Chlamydomophila caviae* mit jeweils 39 % Identität, sowie mit den hypothetischen Proteinen CT861 von *Chlamydia trachomatis* (33 % Identität) und TC0251 von *Chlamydia muridarum* (32 % Identität). Ansonsten fanden sich keine nennenswerten Homologien zu anderen bekannten Proteinen.

4.2 Transkription von *cpn1020*

Um die Transkription von *cpn1020* nachzuweisen und festzustellen, wann diese sich im Entwicklungszyklus von *C. pneumoniae* vollzieht, wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt (Abb. 6). Ein konfluent bewachsener HEP-2-Zellrasen wurde mit einer *C. pneumoniae*-Suspension infiziert und die Gesamt-RNA jeweils 2 h, 8 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Infektionsbeginn isoliert. Als Negativkontrolle dienten nicht-infizierte HEP-2-Zellen, deren RNA nach 24 h isoliert wurde. Um zu bestimmen, wie hoch die Konzentration von infektiösen Chlamydien in der

Suspension war, wurden weitere HEp-2-Zellen mit verschiedenen Verdünnungsstufen der Suspension infiziert und nach 52-56 h eine Giemsa-Färbung durchgeführt.

Um eine durch die Proliferation der Chlamydien während des Versuchszeitraums bedingte vermehrte Transkription zu berücksichtigen, wurden die in die Analyse durch Gelelektrophorese eingesetzten cDNA-Mengen anhand der Transkriptionsstärken der konstitutiv exprimierten bakteriellen *16S*-Sequenz normiert. Die RNA-Menge der gewonnenen Proben wurde dafür spektralphotometrisch bestimmt und jeweils 100 ng für eine entsprechende 16S-spezifische RT-PCR eingesetzt.

Die RT-PCR-Ansätze liefen unter folgenden Bedingungen:

	<i>16S</i>	<i>cpn1020</i>
5`-Primer	16S 1	Cpn1020 A
3`-Primer	16S 2	Cpn1020 B
Annealing-Temperatur	60° C	50° C
Extensionsdauer	15 s	15 s
Zyklenzahl	16	40

Im Vergleich zum konstitutiv transkribierten *16S*-Gen wurde *cpn1020* unter den gewählten Bedingungen bereits zwei, besonders stark aber 8 bis 24 Stunden nach Infektionsbeginn transkribiert. Allerdings war die Transkription insgesamt sehr viel schwächer als die des *16S*-Gens, da für den Nachweis eine um 24 Zyklen verlängerte PCR durchgeführt werden musste. Die Ergebnisse waren dabei unabhängig von dem jeweils ermittelten Verhältnis von infektiösen Elementarkörpern zu HEp-2-Wirtszellen, dieses lag zwischen 6:1 und 14:1.

Um auszuschließen, dass die RNA-Proben mit DNA kontaminiert waren, wurde außerdem eine PCR mit den 16S-Primern unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Diese ergab außer der mitgeführten Positivkontrolle (isolierte Gesamt-DNA aus *C. pneumoniae*) erwartungsgemäß keine Signale (nicht gezeigt).

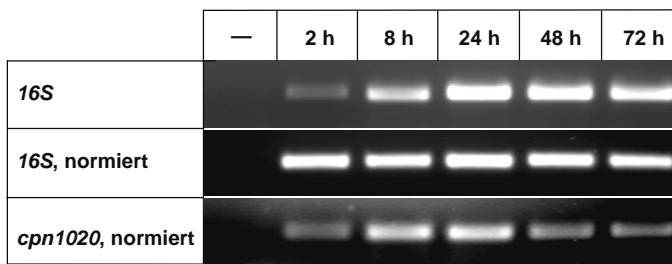


Abb. 6: Analyse der Transkription von 16S mittels RT-PCR und semiquantitativer RT-PCR von 16S und cpn1020 während des Entwicklungszyklus von *C.pneumoniae*, 2 h bis 72 h nach Infektionsbeginn von HEp-2-Zellen. Als Negativkontrolle (–) dienten nicht-infizierte Zellen. Eine Kontroll-PCR ohne Reverse Transkriptase lieferte keine Signale.

4.3 Herstellung von rekombinantem CPn1020 und Generierung von Antiserum

Die Herstellung des rekombinanten CPn1020 erfolgte, um ein entsprechendes CPn1020-spezifisches Antiserum zu generieren. Dieses sollte anschließend über Western-Blot-Analysen und einen Immunfluoreszenztest Aufschlüsse über die Expression und zelluläre Lokalisation des nativen CPn1020 in infizierten HEp-2-Zellen geben.

4.3.1 Klonierung und Expression des N-Terminus von CPn1020

Die die hydrophile N-terminale Hälfte von CPn1020 kodierende Sequenz wurde in den Expressionsvektor pQE-30 kloniert. Hierfür wurde diese Sequenz mittels PCR aus isolierter genomischer DNA von *C. pneumoniae* amplifiziert (50°C Annealing-Temperatur, 1 min Extension, 40 Zyklen). Die verwendeten Primer Cpn1020 F und Cpn1020 R wurden so gewählt, dass das resultierende Amplikon am 5'-Ende eine BamHI- und am 3'-Ende eine HindIII-Schnittstelle besaß. Das PCR-Produkt, mit einer inklusive der Restriktionsstellen erwarteten Größe von 795 bp, konnte durch eine Agarosegelelektrophorese nachgewiesen werden, wurde aufgereinigt und anschließend mit BamHI und HindIII geschnitten. Der Vektor pQE-30 wurde ebenfalls mit diesen beiden Restriktionsenzymen verdaut, die entsprechende DNA-Bande aus dem Agarosegel herausgeschnitten und aufgereinigt.

Nach Ligation des geschnittenen Inserts mit dem linearisierten Vektor und

Transformation von kompetenten *E. coli* DH5- α -Zellen erfolgte die Selektion auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten. Anschließend wurde die Plasmid-DNA von 20 Klonen isoliert und nach Restriktion mit BamHI und HindIII auf erfolgreiche Insertion des PCR-Fragmentes untersucht (Abb. 7).

Bei drei der 20 gewachsenen Klone konnte neben der bei allen vorhandenen pQE-30-Bande (3400 bp) eine DNA-Bande in der Höhe von ca. 800 bp detektiert werden, was der erwarteten Fragmentgröße von *cpn1020* entsprach.

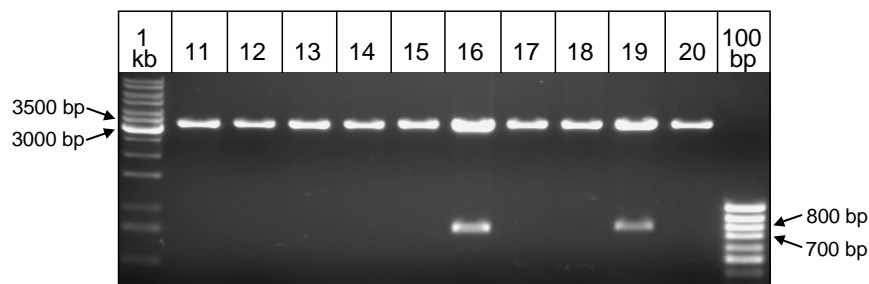


Abb. 7: Plasmidpräparation und anschließender Restriktionsverdau mit BamHI und HindIII (Plasmide #11-20). Bei allen Plasmiden konnte der restringierte Vektor pQE-30 (3400 bp) nachgewiesen werden, bei #16 und #19 zusätzlich eine Bande bei ca. 800 bp, was der Größe des integrierten *cpn1020* (771 bp) entsprach und eine erfolgreiche Klonierung anzeigte.

Um nachzuweisen, dass das integrierte PCR-Fragment im gewünschten Leserahmen lag und keine Mutationen aufwies, wurde die DNA der drei Insert-tragenden Klone mit den Primern pQE-30 5'-Seq und pQE-30 3'-Seq sequenziert. Bei den drei Klonen lagen die Inserts im gewünschten Leserahmen und wiesen keinerlei Mutationen auf.

Zum Nachweis der Expression des His-Tag-Fusionsproteins in *E. coli* wurde bei den drei Insert-haltigen Klonen die Proteinexpression in einem Kulturvolumen von 20 ml durch 0,5 mM IPTG induziert. Nach Lyse der Bakterien wurden gleiche Proteinmengen der löslichen Fraktion mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt, elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen und mit den Antikörpern Maus-anti-His-Tag (1:2500) und AP-konjugiertem Ziege-anti-Maus IgG (1:2500) detektiert. Als Negativkontrolle dienten nicht-transformierte *E. coli*-Zellen.

Bei den drei Transformanden war ein deutliches Antikörper-reaktives Protein mit der

erwarteten Molekularmasse zu erkennen. Die Negativkontrolle zeigte wie erwartet kein Signal. Dadurch konnte demonstriert werden, dass CPn1020 in *E. coli* exprimiert wurde und sich in der löslichen Fraktion der Lysate befand.

4.3.2 Reinigung des rekombinanten Proteins CPn1020

Da das rekombinante Protein CPn1020 in der löslichen Fraktion der *E. coli*-Lysate nachweisbar war, wurde die Proteinaufreinigung unter nativen, nicht-denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Die Expression erfolgte in einem Kulturvolumen von 1 l über 4 h nach Induktion mit 0,5 mM IPTG. Anschließend wurden die Bakterien mit Lysozym lysiert, die Lysate zentrifugiert und das rekombinante Protein im Überstand über Nacht mit 1,5 ml Ni-NTA inkubiert. Zur Aufreinigung wurde das an die Ni-NTA-Matrix gebundene Protein über einer Säule mit zwei mal 30 ml Waschpuffer (darin 15 bzw. 20 mM Imidazol) gewaschen. Aliquots aller bei der Proteinaufreinigung gewonnener Fraktionen wurden in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und sowohl mit Coomassie angefärbt, als auch einer Western-Blot-Analyse mit spezifischem Nachweis des His-Tag-Fusionsproteins durch anti-His-Tag-Antikörper (1:2500) unterzogen (Abb. 8).

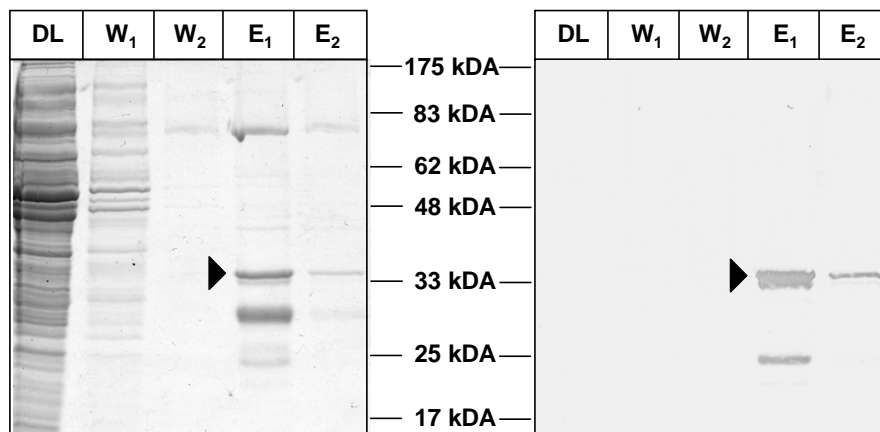


Abb. 8: Coomassie-Färbung (links) und Western-Blot (rechts) des aufgereinigten, rekombinanten CPn1020. Dargestellt sind die Durchlauf- (DL), Wasch- (W) und Eluatfraktionen (E). Das rekombinante Protein (►) besaß eine errechnete Proteingröße von 35 kDa und befand sich ausschließlich in den Eluatfraktionen E₁ und E₂.

In den Durchlauf- und Waschfraktionen fand sich kaum rekombinantes Protein, welches allerdings mit der ersten Eluatfraktion fast vollständig von der Säule gelöst werden konnte. Es traten neben Abbauprodukten des Zielproteins auch zwei weitere Proteine (ca. 76 und 29 kDa) im Eluat auf, die nicht mit dem His-spezifischen Antikörper reagierten.

Um diese potenziellen Proteinkontaminationen zu beseitigen, wurde die erste Eluatfraktion (E_1) mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Zielbande herausgeschnitten, das Protein mittels der S&S Biotrap aus dem SDS-Polyacrylamidgel extrahiert und nach erneuter gelelektrophoretischer Auftrennung einer kleinen Probe mittels Coomassie-Färbung und Western-Blot analysiert (Abb. 9).

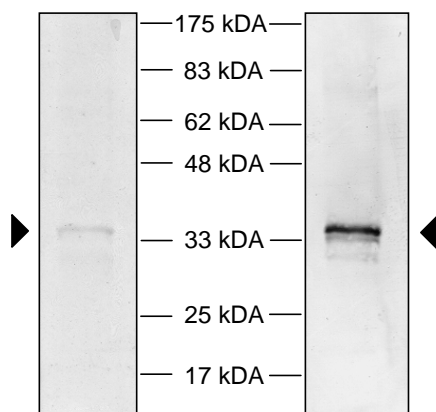


Abb. 9: Aufgereinigtes rCPn1020 nach Extraktion aus SDS-PA-Gel. Analyse des Proteineluats mit Coomassie-Färbung (links) und Western-Blot mit anti-His-Tag Antikörper (rechts). Es zeigte sich eine deutliche, mit anti-His-Tag detektierbare Proteinbande bei ca. 35 kDa (▶), die das gewünschte rCPn1020 repräsentierte.

Die Proteinsuspension enthielt jetzt fast ausschließlich rekombinantes CPn1020. Da über dieses Protokoll nur eine relativ kleine Menge des rekombinanten CPn1020 isoliert werden konnte, wurde der geschilderte Ablauf von Proteinexpression und Aufreinigung noch vier mal wiederholt, bis eine für die Immunisierung von Kaninchen ausreichende Menge rekombinanten Proteins (300 μ g) zur Verfügung stand.

4.3.3 Gewinnung von Antiserum gegen CPn1020

Um ein Antiserum gegen CPn1020 zu gewinnen, wurden einem Kaninchen im Abstand von jeweils 14 Tagen drei Mal 100 μ g des aufgereinigten rekombinanten Proteins subkutan injiziert. Vor dieser Immunisierung wurde ein Präimmenserum abgenommen, um später mögliche unspezifische Kreuzreaktionen auszuschließen. Weitere zwei Wochen nach der letzten Immunisierung erfolgten die Abnahme des Postimmenserums und die Austestung dieses Serums bezüglich des Immunisierungs-

erfolges. Hierfür wurden 100 ng rekombinantes Protein pro cm Lauffläche eines SDS-PA-Geles elektrophoretisch aufgetrennt, auf PVDF-Membran transferiert, die Membran in 2-3 mm breite Streifen geschnitten, mit verschiedenen Verdünnungsstufen des Prä- und Postimmunserums inkubiert und die Antigen-Antikörperreaktion mit AP-konjugiertem Ziege-anti-Kaninchen-IgG (1:2500) nachgewiesen (Abb. 10). Als Positivkontrolle dienten monoklonale Maus-Antikörper (1:2500), die spezifisch gegen den mit dem rekombinanten CPn1020 zusammen exprimierten His-Marker gerichtet waren und mit AP-konjugiertem Ziege-anti-Maus-IgG (1:2500) detektiert wurden.

Während das Präimmunserum keinerlei Reaktivität mit dem rekombinanten CPn1020 zeigte, konnte bereits mit einer 1:10.000-Verdünnung des Postimmunserums ein Signal beobachtet werden, das mit ansteigender Konzentration des Antiserums an Deutlichkeit gewann.

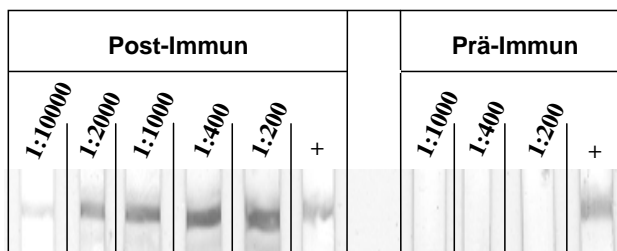


Abb. 10: Erfolg der Immunisierung des Kaninchens mit dem rekombinanten CPn1020. Serum wurde vor und nach Immunisierung in verschiedenen Verdünnungen im Western-Blot mit rCPn1020 eingesetzt. Als Positivkontrolle (+) diente monoklonales Maus-anti-His-Tag.

Um die Nachweisgrenze des generierten Anti-CPn1020-Serums zu ermitteln, wurden unterschiedliche Mengen des rekombinanten CPn1020 in einen Western-Blot eingesetzt und mit 1:200 verdünntem Antiserum inkubiert (Abb. 11). Dabei konnte eine deutliche Detektion von 200, 100, 30 und 10 ng rCPn1020 beobachtet werden. Mit dem 1:200-verdünnten Antiserum gegen CPn1020 konnten also bereits 10 ng des rekombinanten CPn1020 deutlich nachgewiesen werden.

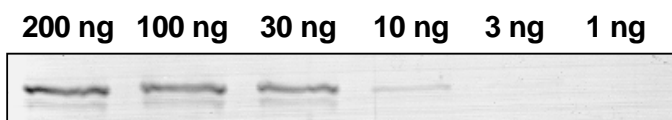


Abb. 11: Nachweisgrenze von CPn1020 im Western-Blot. Angegebene Mengen von rCPn1020 wurden mit anti-CPn1020-Serum getestet.

4.4 Nachweis von CPn1020 in infizierten HEp-2-Zellen

Um CPn1020 in mit *C. pneumoniae* infizierten HEp-2-Zellen nachzuweisen, wurden 2 h, 8 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Infektionsbeginn Gesamtproteine isoliert. Eine Proteinmenge korrespondierend zu etwa 3×10^5 HEp-2-Zellen wurde in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit 1:200 verdünntem, affinitätsaufgereinigtem anti-CPn1020-Serum im Western-Blot getestet (Abb. 12).

Es konnte 24 h, 48 h und 72 h nach Infektionsbeginn eine reaktive Proteinbande in der erwarteten Höhe zwischen 50 und 60 kDa detektiert werden, wobei die aufgrund der Aminosäuresequenz errechnete Molekularmasse von CPn1020 58 kDa betrug. Nach 8 h war nur eine sehr schwache reaktive Proteinbande zu erkennen; zu früheren Zeitpunkten konnte dagegen kein spezifisches Signal nachgewiesen werden. Weiterhin fanden sich - mit Ausnahme zweier höhermolekularer Proteine hauptsächlich nach 8 h - fast keine anderen Signale, was auf eine hohe Spezifität des Antiserums nach Affinitätsaufreinigung schließen ließ.

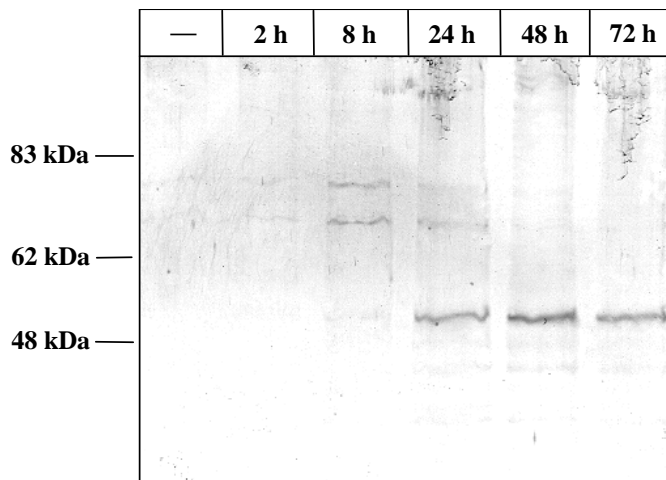


Abb. 12: Expression von nativem CPn1020 (◄) in infizierten HEp-2-Zellen, 2 h bis 72 h nach Infektionsbeginn, dargestellt im Western-Blot. Als Negativ-Kontrolle (—) dienten nicht-infizierte HEp-2-Zellen.

4.5 Lokalisation von CPn1020 in infizierten HEp-2-Zellen

Mit Hilfe des generierten Antiserums sollte in Immunfluoreszenztests die Lokalisation von CPn1020 in *C. pneumoniae*-infizierten HEp-2-Zellen untersucht werden. Für diesen Zweck wurden die infizierten Zellen 2 h, 8 h, 24 h, 48 h, 58 h und 72 h nach Infektionsbeginn fixiert, permeabilisiert und mit dem hergestellten Kaninchen-anti-CPn1020-Serum (1:50) inkubiert. Als Zweitantikörper diente DTAF-konjugiertes Esel-anti-Kaninchen-Serum (1:500). Zur Darstellung des bakteriellen Einschlusskörpers wurden die Ansätze zusätzlich mit monoklonalem Maus-anti-*C. pneumoniae* (1:200) und Cy3-konjugiertem Ziege-anti-Maus-Serum als Sekundärantikörper (1:200) gefärbt. Als Negativkontrollen dienten nicht-infizierte Zellen im gleichen Präparat.

Durch Auswertung mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops und Überlagerung der Färbungen mit Bildern normaler Durchlichtmikroskopie konnte CPn1020 hauptsächlich im Grenzbereich zwischen Einschlusskörper und Wirtszellzytosol lokalisiert werden (Abb. 13). Der Einschlusskörper und die darin enthaltenen Elementar- bzw. Retikularkörper wurden mit anti-*C. pneumoniae*-Antikörper deutlich dargestellt, mit anti-CPn1020 hingegen kaum angefärbt. Im Bereich der Einschlusskörpermembran sowie des angrenzenden Zytoplasmas der Wirtszelle fand sich hingegen eine reproduzierbare charakteristische Anfärbung mit dem hergestellten anti-CPn1020-Serum, die mit wachsender Entfernung zum Einschlusskörper schwächer wurde und relativ scharf begrenzt zu sein schien. Der Zellkern der Wirtszelle sowie Zytoplasmateile mit größerer Entfernung zum Einschlusskörper ließen sich nicht anfärben. Nicht-infizierte Zellen zeigten für beide verwendeten Antiseren kein Signal. Die in Abb. 13 gezeigten Immunfluoreszenztests wurden 58 h nach Infektionsbeginn durchgeführt. Zwei bis acht Stunden nach Infektionsbeginn konnte hingegen keine CPn1020-spezifische Reaktion und nach 24 h nur ein schwaches Signal im sehr kleinen Einschlusskörper beobachtet werden (Bilder nicht gezeigt). Die Färbung der nach 48 h fixierten Zellkulturen erbrachte nur hinsichtlich der etwas kleineren Einschlusskörper Unterschiede zu den gezeigten Tests nach 58 h, nicht hingegen, was die Lokalisation von CPn1020 betraf (Abb. 13). 72 h nach Infektionsbeginn war bereits ein großer Teil der Wirtszellen lysiert.

Die Färbungen untermauerten die These, dass CPn1020 in das Zytosol der Wirtszelle sezerniert wird, wo es mit steigender Entfernung vom Einschlusskörper und relativ scharf begrenzt an Konzentration abnimmt.

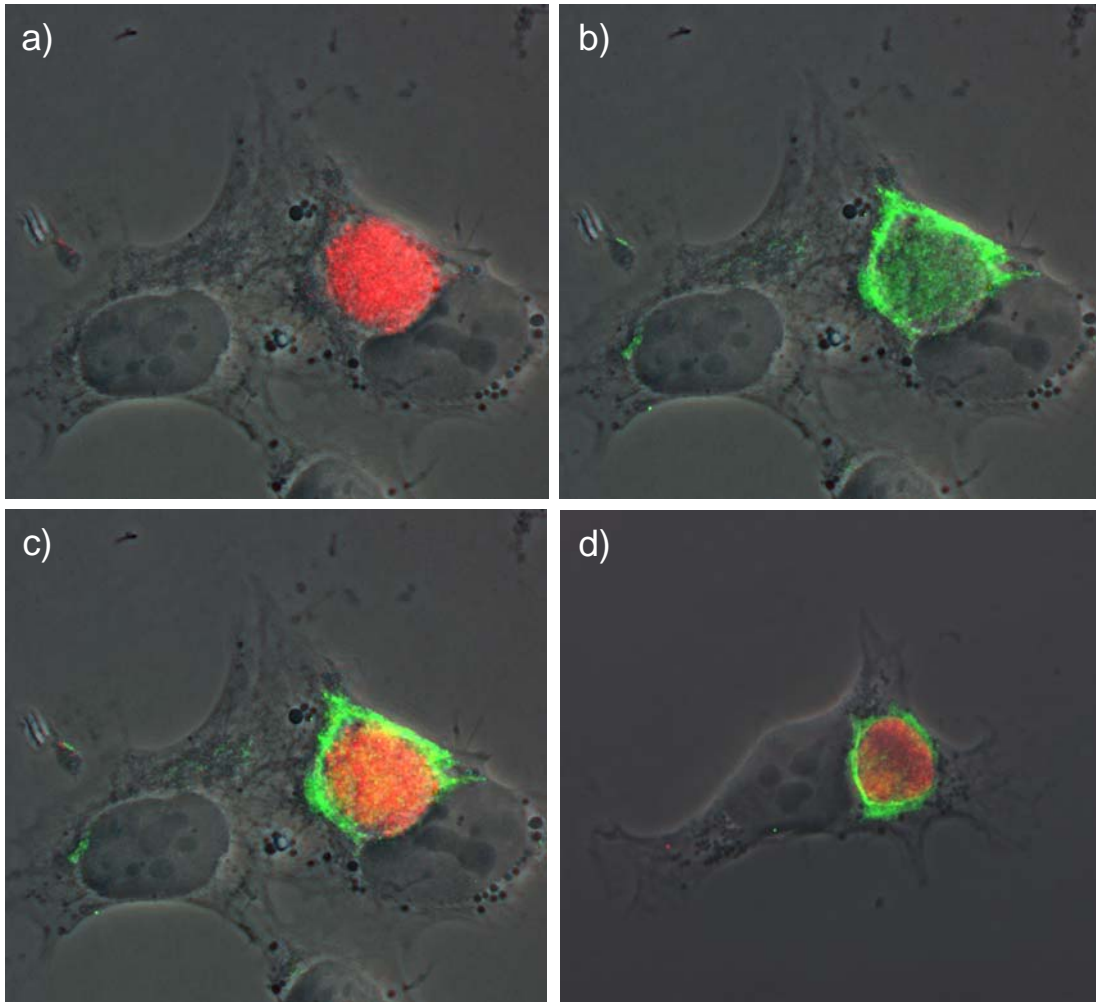


Abb. 13: Immunfluoreszenztests mit *C. pneumoniae*-infizierten HEp-2-Zellen, jeweils in Überlagerung mit Bildern normaler Durchlichtmikroskopie.

a) - c) Identischer Bildausschnitt von zwei HEp-2-Zellen, 58 h nach Infektionsbeginn. Linke Zelle nicht infiziert (= interne Negativkontrolle), rechte Zelle infiziert und mit Einschlusskörper

a) Einschlusskörper-Anfärbung mit anti-*C. pneumoniae*-Serum (Sekundärantikörper Cy3-konjugiert)

b) CPn1020-Anfärbung mit anti-CPn1020-Serum (Sekundärantikörper DTAF-konjugiert)

c) Überlagerung von a) und b)

d) Überlagerungsbild einer infizierten Zelle mit Einschlusskörper, 48 h nach Infektionsbeginn

Es zeigt sich eine deutliche Anfärbung mit anti-CPn1020 im Bereich der Einschlusskörpermembran sowie des angrenzenden Zytosols der HEp-2-Zelle. Weiter entfernt liegende Zytosolanteile und Kern der Wirtszelle zeigen keine Signale für anti-*C. pneumoniae* und anti-CPn1020, ebenso wenig wie die nicht-infizierte Zelle.

4.6 Untersuchung von Patientenseren auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen CPn1020

In einer orientierenden Untersuchung sollte geklärt werden, ob im Serum von Menschen, die vermeintlichen Kontakt mit *C. pneumoniae* hatten, Antikörper gegen CPn1020 gefunden werden können. Dies wäre ein Hinweis darauf, dass CPn1020 während einer Infektion tatsächlich *in vivo* exprimiert wird und dem menschlichen Immunsystem zugänglich ist.

Es wurden 23 Seren von Patienten untersucht, die in einer PCR-Untersuchung auf *Chlamydomphila pneumoniae* getestet und freundlicherweise von Prof. Maaß, Lübeck, zur Verfügung gestellt wurden. Für die serologischen Tests wurden Western-Blots mit dem rekombinanten CPn1020 (100 ng pro cm Lauffläche) und den zu testenden Patientenseren (1:100 verdünnt) durchgeführt. Die Immundetektion erfolgte mit AP-konjugierten, gegen humanes IgG, IgA bzw. IgM gerichteten Antikörpern. Eine Positivkontrolle mit anti-CPn1020-Serum (1:200) wurde mitgeführt.

Neben dieser Positivkontrolle zeigten einige Seren eine deutliche Reaktivität unterschiedlicher Intensität als Zeichen für das Vorhandensein von rCPn1020-spezifischen Antikörpern. Für die verschiedenen Immunglobulin-Klassen ergab sich dabei für die eingesetzten Seren kein einheitliches Bild. Am häufigsten reagierten Antikörper der Immunglobulinklasse G, seltener waren IgM- und IgA-Antikörper nachweisbar.

PCR-positive Seren (n = 10)			PCR-negative Seren (n = 13)		
	positiv	negativ		positiv	negativ
IgG	7	3	IgG	7	6
IgM	6	4	IgM	3	10
IgA	5	5	IgA	3	10

Tab. 1: Ergebnisse der Western-Blot-Analysen von 10 mittels PCR positiv und 13 negativ getesteten Patientenseren auf IgG-, IgM- und IgA-Antikörper gegen das rekombinante CPn1020.

Auf Grundlage der PCR-Untersuchungen als Referenz wurden unter dem Vorbehalt der kleinen Fallzahlen Sensitivität, Spezifität, positiv und negativ prädiktiver Wert

für den Nachweis von IgG-, IgM- bzw. IgA-Antikörpern gegen rCPn1020 in diesem Test näherungsweise bestimmt.

	IgG	IgM	IgA
Sensitivität	70 %	60 %	50 %
Spezifität	46 %	77 %	77 %
Positiv prädiktiver Wert	50 %	67 %	63 %
Negativ prädiktiver Wert	67 %	71 %	67 %

Tab. 2: Sensitivität, Spezifität, positiv und negativ prädiktiver Wert des Nachweises von CPn1020-spezifischen Antikörpern im Western-Blot. Als Referenz diente der PCR-Nachweis von *C. pneumoniae*-spezifischer DNA.

Es wurde damit demonstriert, dass das menschliche Immunsystem Antikörper gegen CPn1020 bildet. CPn1020 könnte also prinzipiell auch in der Verbesserung der Diagnostik einer *C. pneumoniae*-Infektion einen Beitrag leisten.

4.7 Untersuchung von CPn1020 im Yeast-Two-Hybrid-System

Da im Laufe dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass *cpn1020* in *C. pneumoniae* transkribiert und exprimiert wird und die zelluläre Lokalisation des Proteins eine Sekretion in das Zytosol der Wirtszelle vermuten lässt, sollte mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-Systems eine HeLa-cDNA-Genbank auf potenzielle Interaktionspartner von CPn1020 untersucht werden, um Hinweise auf dessen Funktion zu erlangen. Hierfür wurde das „Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3“ (Clontech) benutzt. Dieses arbeitet in *Saccharomyces cerevisiae* mit dem GAL4-Transkriptionssystem, bei dem die DNA-bindende (BD) und Transkriptions-aktivierende Domäne (AD) des GAL4-Transkriptionsfaktors als unabhängige Fusionsproteine mit CPn1020 bzw. den verschiedenen HeLa-cDNA-Genbankproteinen exprimiert werden. Kommt es zu einer Interaktion zwischen CPn1020 und einem HeLa-cDNA-Genbankprotein, findet die Expression der Reportergene *HIS3*, *ADE2* und *MEL1* statt, wodurch ein Wachstum auf entsprechenden Mangelmedien mit farblicher Selektion positiver Klone möglich wird.

4.7.1 Klonierung und Expression von CPn1020 in *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Klonierung von *cpn1020* in den Vektor pGBKT7 wurde der gesamte Leserahmen von *cpn1020* mittels PCR amplifiziert (68°C Annealing-Temperatur, 1 min Extension, 30 Zyklen). Als Ursprungsmatrize diente isolierte genomische DNA von *C. pneumoniae*. Die hierfür verwendeten Primer YTH 1 und YTH 2 besaßen jeweils eine synthetische EcoRI- bzw. PstI-Schnittstelle. Das Amplifikat hatte inklusive der Restriktionsstellen eine erwartete Größe von 1554 bp und wurde durch eine Agarosegelelektrophorese nachgewiesen. Anschließend wurden Insert und Vektor mit EcoRI und PstI restringiert und aufgereinigt. Nach Ligation wurden kompetente *E. coli* DH5- α -Zellen transformiert und die Bakterien auf Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen.

Die erfolgreiche Insertion von *cpn1020* in pGBKT7 wurde bei 28 Klonen durch einen Restriktionsverdau präparierter Plasmid-DNA mit EcoRI und PstI untersucht (Abb. 15). Bei allen Plasmiden konnte eine Bande in Höhe von ca. 7000 bp beobachtet werden, welche den restringierten Vektor pGBKT7 (7278 bp) repräsentierte. Bei sieben Klonen zeigte sich darüber hinaus eine Bande in Höhe von ca. 1500 bp, die eine erfolgreiche Integration von *cpn1020* (1536 bp) in pGBKT7 anzeigte.

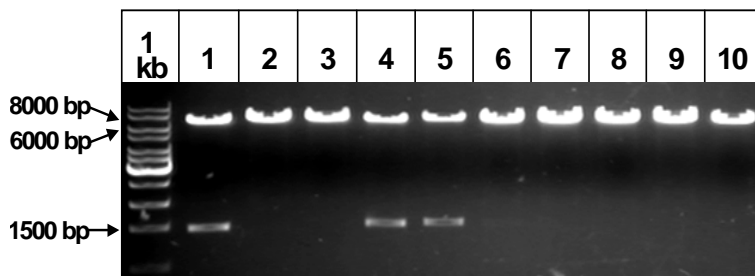


Abb. 15: Restriktionsverdau der präparierten Plasmide #1-10 mit EcoRI und PstI.

Mittels Sequenzierung wurde ein Plasmid identifiziert, das keinerlei Mutationen und den richtigen Leserahmen aufwies. Dieses Plasmid wurde für die Transformation von *S. cerevisiae* verwendet.

Um nachzuweisen, dass das Fusionsprotein aus CPn1020 und der GAL4-DNA-bindenden Domäne (GAL4-BD) in *S. cerevisiae* exprimiert wurde, erfolgte ein Western-Blot mit einem Antikörper, der gegen das „c-Myc-Tag“-Epitop gerichtet ist

(Abb. 16). Hierbei konnte ein Protein mit einer Molekularmasse von ca. 75 kDa detektiert werden, während die Negativkontrolle - bestehend aus nichttransformierten Hefezellen - kein Signal zeigte. Da die errechnete Molekularmasse des exprimierten GAL4-BD-CPn1020 Fusionsproteins 78 kDa betrug, konnte somit gezeigt werden, dass das Fusionsprotein in *S. cerevisiae* exprimiert wurde.

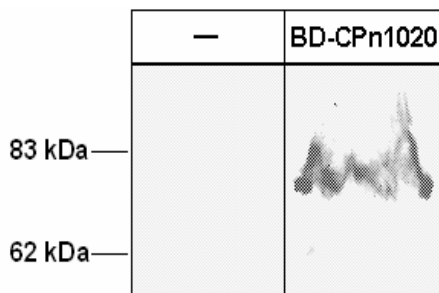


Abb. 16: Expression des Fusionsproteins von CPn1020 und GAL4-DNA-bindender Domäne (BD-CPn1020) nach Klonierung von *cpn1020* in *pGBKT7* und Transformation von *S. cerevisiae*. Western-Blot mit Maus-anti-c-Myc (1:500) und AP-konjugiertem Ziege-anti-Maus-Serum (1:2500). Als Negativkontrolle (-) dienen nicht-transformierte Hefezellen.

4.7.2 Tests auf Autoaktivierung der Reportergene

Die *GAL4-BD-cpn1020*- und *GAL4-AD-HeLa-cDNA*-Genbank-Konstrukte wurden unabhängig in *S. cerevisiae* transfiziert und die Klone anschließend auf SD/-Trp/X- α -Gal- bzw. SD/-Leu/X- α -Gal-Platten ausgestrichen. Eine Autoaktivierung sollte durch das *MEL1*-Reportergen über eine Blaufärbung der Kolonien sichtbar gemacht werden. Als Positivkontrolle der *MEL1*-Aktivierung diente *pCL1*, als Negativkontrolle *pGADT7-T*, ausgestrichen jeweils auf SD/-Leu/X- α -Gal-Platten. Bis auf die Positivkontrolle zeigte keine der gewachsenen Kolonien eine Blaufärbung, eine autonome Aktivierung des Reportergenes *MEL1* durch *pGBKT7-CPn1020* bzw. *cDNA*-Genbank-tragendes *pACT2* konnte also ausgeschlossen und die Konstrukte damit in einem großen Genbanktransformationstest eingesetzt werden.

4.7.3 Genbanktransformationen

Im Rahmen der Suche nach Interaktionspartnern der *HeLa-cDNA*-Genbank mit dem *C. pneumoniae*-Protein CPn1020 wurden drei große Genbank-Tests durchgeführt.

Der erste Test erfolgte als sequenzielle Transformation mit niedriger Stringenz. Im großen Transformationsansatz wurden Hefezellen eingesetzt, die bereits das

cpn1020-tragende Köderplasmid beinhalteten und zusätzlich mit den HeLa-cDNA-Genbank tragenden Plasmiden transfiziert wurden. Nach Transformation wurden die Zellen auf 3-fach-Mangelagarplatten (im Medium fehlend: Tryptophan, Leucin und Histidin) ausgestrichen und inkubiert. Die Transformationseffizienz betrug 3×10^4 cfu/ μ g DNA, somit wurden 3×10^6 Klone getestet.

50 Kolonien mit der deutlichsten Blaufärbung wurden erneut kultiviert und die Plasmid-DNA nach enzymatischer Zellwandlyse mit dem Qiagen Spin Miniprep Kit isoliert. Zur Kontrolle, ob wirklich alle gewachsenen Zellen das *cpn1020*-tragende Köderplasmid und ein AD-Plasmid mit einem cDNA-Genbank-Insert beinhalteten, wurden die jeweiligen Inserts per PCR mit den Primern BD 3'-Seq / T7 5'-Seq (BD-Plasmid) sowie Lib 5'-Seq / Lib 3'-Seq (AD-Plasmid) amplifiziert. Die anschließende Elektrophorese zeigte für jeden untersuchten Klon eine Bande der erwarteten Größe des *cpn1020*-Inserts aus dem BD-Plasmid (theoretische Größe: 1756 bp) und jeweils ein cDNA-Genbank-Fragment variierender Größe (zwischen 500 und 4000 bp) aus dem AD-Plasmid (Abb. 17).

AD-Plasmide mit nachgewiesenen HeLa-cDNA-Genbank-Inserts wurden dann mit den gleichen Primern (Lib 5'-Seq und Lib 3'-Seq) sequenziert. Von den 50 sequenzierten Inserts konnten mittels Homologievergleich auf Proteinebene 17 Sequenzen 15 verschiedenen humanen Proteinen im korrekten Leserahmen zugeordnet werden. Zwei Proteine, die Cytochrom C Oxidase (Subunit I), und das hypothetische Protein E21G4 wurden doppelt gefunden. Die restlichen Sequenzen lagen außerhalb des richtigen Leserahmens oder zeigten keine Übereinstimmungen mit bekannten menschlichen Proteinen und mussten daher als falsch-positiv gewertet werden.

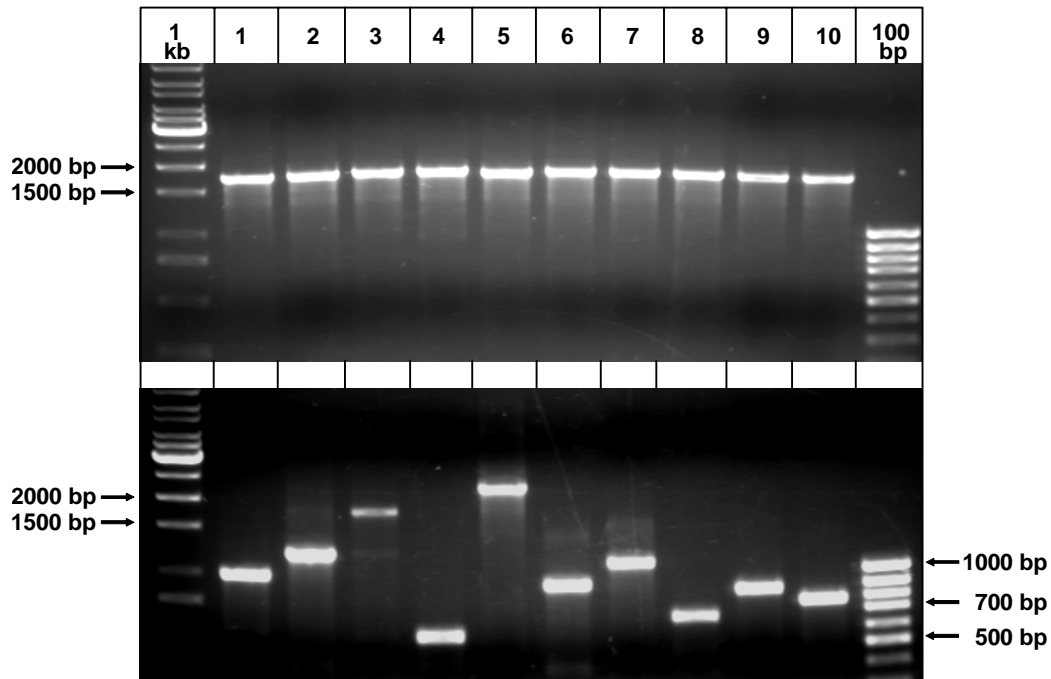


Abb. 17: Oben: PCR der BD-Plasmid-Inserts, die für jeden Klon ein Produkt der erwarteten Größe von *cpn1020* (1756 bp) zeigt. Unten: PCR der HeLa-cDNA-Genbank-Fragmente unterschiedlicher Größe aus dem AD-Plasmid derselben zehn Klone. Alle zehn Kolonien enthielten somit im BD-Plasmid das *cpn1020*-Gen in voller Größe sowie im AD-Plasmid jeweils ein Gen aus der HeLa-cDNA-Genbank.

Aufgrund der hohen Anzahl gewachsener Kolonien, die überwiegend als falsch-positiv erachtet werden mussten, wurde im folgenden zweiten Test eine Kotransformation durchgeführt und die Stringenz angehoben, indem direkt auf 4-fach-Mangelmedium (im Agar fehlend: Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenosin) ausplattiert, also gleich auf die Aktivierung von zwei Reportergenen (*HIS3* und *ADE2*) getestet wurde. Die Transformationseffizienz war um 20 % geringer als im ersten Versuch, so dass nur 6×10^5 Klone getestet wurden. Es wuchsen 121 Kolonien, von denen 13 nach Überführung auf X- α -Gal-haltige Platten eine deutlichere Blaufärbung als die restlichen zeigten (Abb. 18) und wie oben beschrieben präpariert und sequenziert wurden.



Abb. 18: Exemplarische Agarplatte aus der zweiten cDNA-Genbank-Transformation mit 4-fach-Mangelmedium (SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade) ohne X- α -Gal. Auf dieser Platte sind acht deutliche Kolonien erkennbar (102-109), die anschließend auf X- α -Gal-haltige Agarplatten umgesetzt wurden.

Die Unterschiede hinsichtlich der Intensitäten der Blaufärbungen waren größer als im ersten Versuch, aber weiterhin nicht optimal. Nach Sequenzierung und dem Ausschluss fehlerhafter Proteine oder unzuordbarer Sequenzen konnten im zweiten Test letztendlich drei unterschiedliche mögliche Interaktionsproteine ermittelt werden:

- LGALS1 = Lectin, Galactoside-binding, soluble 1
- NME7 = Nucleoside Diphosphate Kinase 7
- TMSB10 = Thymosin beta 10

Im dritten Test wurde die Stringenz maximal angehoben, indem der Transformationsansatz auf X- α -Gal-haltigen 4-fach-Mangelplatten ausgestrichen und direkt auf die Aktivierung aller drei Reportergene selektioniert wurde. Die Transformationseffizienz war vergleichbar mit der des zweiten Versuches, es wurden 5×10^5 Klone getestet. Die Unterscheidung in positive und negative Kolonien fiel in diesem Versuch wesentlich leichter (*Abb. 19*).

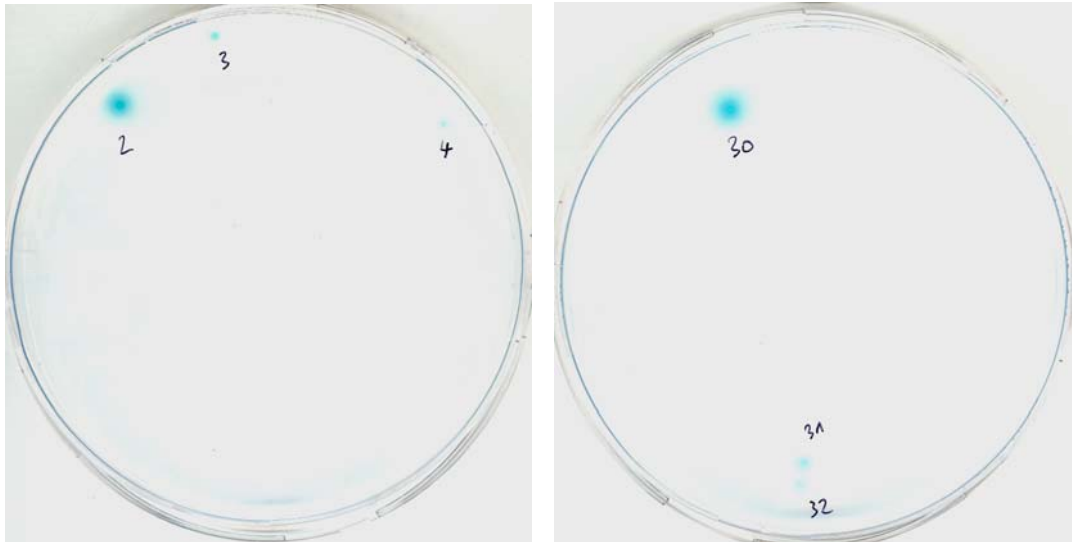


Abb. 19: Zwei Agarplatten des dritten Genbank-Tests mit hoher Stringenz und direkter Selektion auf Aktivierung von *HIS3*, *ADE2* und *MEL1* (4-fach-Mangelplatten, Medium: *SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/+X- α -Gal*). Gewachsene Kolonien wurden mit Nummern versehen.

Es wuchsen 20 kräftig blaugefärbte Kolonien; schwächer oder nicht gefärbte Kolonien (siehe *Abb. 19*) wurden nicht weiter untersucht.

Bei sechs der 20 Kolonien konnte kein Genbank-Insert isoliert werden. Nach Sequenzierung der restlichen 14 Inserts und dem Ausschluss fehlerhafter Sequenzen, die außerhalb des richtigen Leserahmens lagen oder deren Zuordnung in Datenbanken nicht möglich war, blieben sieben verschiedene Proteine als mögliche Interaktionskandidaten bestehen:

- NPAT = Nuclear Protein, Ataxia-Teleangiectasia Locus
- MTCO1 = Cytochrome C Oxidase, Subunit 1
- PCBP1 = Poly(rC) Binding Protein 1
- SS18 = Synovial Sarcoma Translocation, Chromosome 18
- HNRPA2B1 = Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein A2/B1
- TAF9 = TATA-Box Binding-Protein Associated Factor
- FLJ22347 = Hypothetical Protein FLJ22347

Die drei durchgeführten Genbank-Tests fasst *Tabelle 3* zusammen.

	Test 1	Test 2	Test 3
Transformationsform	sequenziell	simultan	simultan
Stringenz	niedrig	mittel	hoch
Anzahl der getesteten Klone	3×10^6	6×10^5	5×10^5
Positive Klone			
- auf 3-fach-Mangelplatten	>1000		
- auf 4-fach-Mangelplatten	95	121	
- auf 4-fach-Mangelplatten + X- α -Gal	50-90	13	20
davon erfolgreich sequenziert	50	12	14
davon mit Homologie zu humanen Proteinen	17	3	7

Tab. 3: Übersicht über Transformationsform, Stringenz und Anzahl der getesteten und positiven Klone der drei durchgeführten Genbank-Tests im Yeast-Two-Hybrid-System auf der Suche nach zellulären Interaktionspartnern von CPn1020. Die letzte Zeile gibt die Zuordnung einer Sequenz zu einem bekannten menschlichen Protein im korrekten Leserahmen wieder.

4.7.4 Ausschluss falsch-positiver Klone

Die hohe Anzahl verschiedener positiver Klone in den drei Genbank-Screenings legte die Vermutung nahe, dass es sich bei einem Großteil um falsch-positive Ergebnisse handelte, was als limitierender Faktor des Yeast-Two-Hybrid-Systems bekannt ist [BARTEL et al., 1993]. Um dieses zu überprüfen, wurden mit der Technik des Yeast Matings verschiedene Kontrollversuche mit den ermittelten Klonen durchgeführt. Dabei wurde untersucht, ob die positiven Klone die Reportergene auch durch Interaktion mit dem GAL4-BD-Fusionsprodukt ohne *cpn1020*-Insert bzw. mit einem anderen inserierten Gen (*lam*) aktivierten und damit als falsch-positiv gewertet werden mussten. Eingesetzt wurden die zehn ermittelten Kandidaten des zweiten und dritten Genbanktests.

Die aus Hefezellen gewonnenen Plasmide wurden in *E. coli* vermehrt und erneut präpariert. Nach Transformation der Hefestämme wurden die Zellen nach Ausstreichen auf 4-fach-Mangelmedium inklusive X- α -Gal inkubiert und erneut auf Aktivierung von *HIS3*, *ADE2* und *MEL1* getestet. Alle Kandidaten zeigten in Anwesenheit des *cpn1020*-tragenden Plasmides, also der Positivkontrolle, durch ein

Wachstum mit Blaufärbung eine Aktivierung der Reportergene inklusive *MEL1* an. Alle Klone reagierten jedoch auch mit der Negativkontrolle oder ohne Insert, also anscheinend schon allein mit der DNA-bindenden Domäne der Transkriptionsfaktoruntereinheit von GAL4.

Ein eindeutig positiver Klon konnte nach diesen Kontrollversuchen folglich nicht mehr benannt werden.

5 DISKUSSION

Wie viele andere gramnegative Bakterien besitzen auch die obligat intrazellulär lebenden Chlamydien ein Typ-III-Sekretionssystem, das es diesen ermöglicht, Effektorproteine in die Wirtszelle zu sezernieren [HSIA et al., 1997]. Diese modulieren wahrscheinlich den Wirtsmetabolismus, um Überleben und Vermehrung der internalisierten Erreger zu gewährleisten. Bakterielle Effektorproteine stellen somit bedeutende Pathogenitätsfaktoren dar. Als mögliche Angriffspunkte dieser Effektoren kommen Prozesse in Betracht, deren Beeinflussungen durch eine Chlamydien-Infektion bereits bekannt sind:

- Tyrosin-Phosphorylierungen und Aktin-Mobilisation vermitteln die rezeptorvermittelte Endozytose der extrazellulären Elementarkörper in die Wirtszelle [COOMBES & MAHONY, 2002; CARABEO et al., 2002]. Dieser Prozess wird bei *C. trachomatis* auf Wirtszellseite durch Phosphorylierung des von extra- nach intrazellulär Typ-III-sezernierten Tarp-Proteins (CT456, homolog zu CPn0572) induziert [CLIFTON et al., 2004].
- Bislang unbekanntes chlamydiales Proteine ermöglichen die Aufnahme Sphingomyelin- und Cholesterin-enhaltender Vesikel [SCIDMORE et al., 1996a; CARABEO et al., 2003] und verhindern damit eine lysosomale Inaktivierung [HACKSTADT, 1998, SCIDMORE et al., 2003].
- Der in das Wirtszellzytosol sezernierte Protease-ähnliche Faktor von *C. trachomatis* (CPAF) und *C. pneumoniae* (CPAFcp = CPn1016) reguliert über einen Abbau von Transkriptionsfaktoren die Antigenpräsentation durch MHC I und II herab [ZHONG et al., 2001; FAN et al., 2002].
- Das konservierte chlamydiale Protein CADD wirkt Apoptose-aktivierend [STENNER-LIEWEN et al., 2002]; andererseits existieren mehrere Studien, die eine Inhibierung der Apoptose von *C. pneumoniae*-infizierten Zellen nachgewiesen haben [WAHL et al., 2001; CARRATELLI et al., 2002; AIRENNE et al., 2002].

Auch *C. pneumoniae* transkribiert die konstituierenden Strukturproteine des Typ-III-Sekretionssystems [SLEPENKIN et al., 2003]. Über sezernierte Effektoren ist allerdings bisher wenig bekannt.

Ein potenzieller Typ-III-sezernierter Effektor ist das in dieser Arbeit untersuchte Protein CPn1020, dessen offener Leserahmen sich an *lcrH-2* (= *cpn1021*) anschließt. *LcrH-2* ist neben *lcrH-1* eines der beiden homologen Gene zu *lcrH* (= *sycD*), das bei *Yersinia* spp. für das Chaperon der Translokatoren YopB und YopD kodiert. Diese werden Typ-III-sezerniert und sind über eine Porenbildung in der Wirtszellmembran ihrerseits am Export anderer Effektoren beteiligt [NEYT & CORNELIS, 1999]. CPn1020 zeigt neben mäßigen Homologien zu Proteinen anderer chlamydialer Arten (jeweils 39 % Identität mit dem Membranprotein CAB708 von *Chlamydophila abortus* und dem hypothetischen Protein CCA00741 von *Chlamydophila caviae*, Funktion bei beiden unbekannt) keine nennenswerten Ähnlichkeiten zu anderen bekannten Proteinen, insbesondere nicht zu YopB und YopD. Allerdings besitzt es Analogien zu letztgenannten hinsichtlich Größe und Hydrophobizitätsmuster [SUBTIL et al., 2000]. Es konnte gezeigt werden, dass der Amino-Terminus von CPn1020 von dem heterologen Typ-III-Sekretionssystem von *Shigella flexneri* erkannt und sezerniert wird. Dieser Umstand wird als Hinweis dafür gesehen, dass eine Sekretion von CPn1020 über dieses System *in vivo* stattfindet. Eine weitere Charakterisierung des vollständigen Proteins erfolgte in der Arbeit von SUBTIL und Mitarbeitern indes nicht, da aufgrund der Lage von CPn1020 eine Translokatorfunktion postuliert wurde, welche für eine erfolgreiche Sekretion wahrscheinlich die Anwesenheit eines Chaperons benötigen würde [SUBTIL et al., 2005]. In einem bakteriellen Two-Hybrid-System in *E. coli*, bei dem *LcrH-2* als Köderprotein auf Interaktionen mit Genprodukten von verschiedenen im chlamydialen Chromosom in dessen Nähe liegenden offenen Leserahmen unbekannter Funktionen, darunter auch *cpn1020* und *cpn1022*, untersucht wurde, zeigte sich allerdings keine Wechselwirkung zwischen CPn1020 und dem putativen Chaperon *LcrH-2* [SLEPENKIN et al., 2005].

In dieser Arbeit wurde die Transkription von *cpn1020* in *C. pneumoniae*-infizierten humanen Epithelzellen mittels semiquantitativer RT-PCR von 100 ng Gesamt-RNA zu verschiedenen Zeiten des Entwicklungszyklus untersucht. Die *cpn1020*-RNA konnte bereits zum ersten Messzeitpunkt, zwei Stunden nach Infektionsbeginn, und darauf folgend während des gesamten chlamydialen Entwicklungszyklus nachgewiesen werden. Ein Transkriptionsmaximum fand sich 8 bis 24 Stunden nach Beginn der Infektion. Somit wurde demonstriert, dass *cpn1020* bereits in der Frühphase der Entwicklung der internalisierten Chlamydien transkribiert wird.

Ein ähnliches Transkriptionsmuster zeigt das im Chromosom unmittelbar benachbarte putative Chaperon *lcrH-2*, dessen RNA bereits ab 1,5 Stunden nach Infektionsbeginn nachgewiesen wurde, mit ebenfalls schwächerer Transkription nach der 48. Stunde des Entwicklungszyklus. Auch von einem Teil der Gene des Typ-III-Strukturapparates (*yscC*, *yscS*, *yscL* und *yscJ*) und der Typ-III-sezernierten Einschlusskörper-Membranproteine IncA, IncB und IncC konnte zu vergleichbaren Zeitpunkten mRNA detektiert werden [SLEPENKIN et al., 2003; LUGERT et al., 2004]. Alle weiteren bislang untersuchten Gene des Typ-III-Sekretionssystems von *C. pneumoniae* werden erst in der mittleren oder späten Phase des Entwicklungszyklus transkribiert: Die Strukturkomponenten *yscV* und *yscR* sowie die ATPase *yscN* ab der 8. bis 12. Stunde, weitere konstituierende Proteine wie *yscT*, das Chaperon *lcrH-1* und der hypothetische Effektor *cpn0809* nicht früher als 24 Stunden nach Beginn der Infektion. RNA eines weiteren Chaperons, *sycE*, und des sekretionsregulierenden *lcrE* wurde von LUGERT et al. bereits ab der 8. Stunde, von SLEPENKIN et al. erst nach der 24. Stunde des Zyklus nachgewiesen. Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen konnte bei *C. trachomatis* eine Transkription von Strukturkomponenten des Sekretionsapparates wie auch von *lcrH-2* erstmals nach 12 Stunden gezeigt werden [FIELDS KA et al., 2003].

Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass es eine zeitabhängige Regulation der Transkription von Genen des Typ-III-Sekretionssystems gibt, die sowohl die konstituierenden Bestandteile des Sekretionsapparates, als auch potenzielle Chaperone und vermutete Effektoren umfasst. Dieser Umstand könnte mit unterschiedlichen Funktionen der jeweiligen Genprodukte im chlamydialen Entwicklungszyklus korrelieren. CPn1020 scheint dabei aufgrund seiner

Transkriptionskinetik eine Rolle im Rahmen des frühen Infektionsprozesses zu spielen.

Im Gegensatz zur semiquantitativ durchgeführten RT-PCR, bei der die Signalstärken im Verhältnis zum konstitutiv transkribierten *16S*-Gen normiert wurden, um damit Aussagen über das Transkriptionsverhalten einer einzelnen chlamydialen Zelle treffen zu können, wurde auf Proteinebene ein nicht-normierter Western-Blot mit Gesamtprotein aus *C. pneumoniae*-infizierten Zellen durchgeführt.

Mit Hilfe eines im Rahmen dieser Arbeit generierten CPn1020-Antiserums wurde demonstriert, dass neben der Transkription auch eine Translation der mRNA von *cpn1020* stattfindet. Die Expression von CPn1020 konnte 24 Stunden nach Beginn der Infektion deutlich detektiert werden; acht Stunden nach Infektionsstart fand sich dagegen nur ein sehr schwaches Signal. Da im Western-Blot eine konstante Anzahl infizierter HEp-2-Zellen eingesetzt wurde, nahm die Signalstärke aufgrund der sich vermehrenden Bakterien im Laufe der Entwicklung zu. Eine frühere Expression ist aufgrund der Nachweisgrenze des Antiserums in Bezug auf CPn1020 allerdings nicht auszuschließen. In einem mit rekombinantem CPn1020 durchgeführten Western-Blot konnten mit dem CPn1020-Antiserum in der auch sonst verwendeten Verdünnung (1:200) 10 ng des Proteins sehr deutlich, 3 ng nur noch schwach und 1 ng nicht mehr nachgewiesen werden. Dass CPn1020 tatsächlich aber bereits 2 Stunden nach Infektionsbeginn exprimiert wird, kann anhand der vorgestellten Ergebnisse der RT-PCR angenommen werden.

Um Hinweise auf die intrazelluläre Lokalisation von CPn1020 zu bekommen, wurden mit dem generierten Antiserum Immunfluoreszenztests mit infizierten HEp-2-Zellen durchgeführt. Reaktive Signale fanden sich am kräftigsten im Bereich der Einschlusskörpermembran sowie des angrenzenden Zytoplasms, wobei die Anfärbung eindeutig über die Membran des Einschlusskörpers hinaus in das Zytoplasma der Wirtszelle überging und dort mit relativ scharfer Begrenzung an Intensität verlor. Der Einschlusskörper selbst ließ sich mit dem verwendeten Antiserum nur sehr schwach, weiter entfernt liegende Zytoplasmbereiche und der Wirtszellkern gar nicht anfärben. Ebenso wenig zeigten sich in nicht-infizierten Zellen reaktive Signale, was für eine hohe Spezifität des Antiserums spricht.

Bis jetzt konnten bei *C. pneumoniae* nur sehr wenige bakterielle Proteine im Zytosol der Wirtszelle lokalisiert werden. Dazu zählen:

- Der sezernierte Protease-ähnliche Faktor CPAFcp (= CPn1016), der über den Abbau des Transkriptionsfaktors RFX5 die MHC-Klasse I- und II-vermittelte Antigenrepräsentation hemmt [FAN et al., 2002; SHAW et al., 2002]. Der Sekretionsweg von CPAFcp ist unklar, verläuft aber wahrscheinlich Leadersequenz-abhängig und damit nicht Typ-III-vermittelt.
- CPn0796, das über einen Autotransporter-Mechanismus sezerniert wird [VANDAHL et al., 2005].
- Das wahrscheinlich Typ-III-sezernierte CPn0809 [LUGERT et al., 2004; SUBTIL et al., 2005].
- Das zu CPn0705 homologe und Typ-III-sezernierte CCA00037 von *C. caviae* [SUBTIL et al., 2005].

Die Funktion der letztgenannten Proteine ist bisher unklar. Daneben wurde für eine Reihe Typ-III-assoziiierter chlamydialer Proteine eine Lokalisation im Einschlusskörper selbst bzw. in dessen Membran gezeigt. Dazu gehören bei *C. pneumoniae* die sezernierten Einschlusskörper-Membranproteine IncA, IncB und IncC, die ATPase des Sekretionsapparates YscN und das den Export von Effektoren regulierende LcrE [FIELDS KA & HACKSTADT, 2000; BROWN et al., 2002; LUGERT et al., 2004]. Die intrazelluläre Lokalisation von CPn1020 legt damit die Vermutung nahe, dass tatsächlich eine Sekretion ins Wirtszellzytosol stattfindet. Dass CPn1020 auch in vom Einschlusskörper entfernt liegenden Zytosolbereichen zu finden ist, kann nicht ausgeschlossen werden, sofern es dort unterhalb der Nachweisgrenze des generierten Antiserums vorliegt. Eine Konzentrationsabnahme des Proteins in zunehmender Entfernung zum Einschlusskörper könnte am Verdünnungseffekt im Verteilungsraum Zytosol oder an einer Bindung von CPn1020 an bestimmte Kompartimente oder Faktoren der Wirtszelle in Nähe des Einschlusskörpers liegen. Diese Vermutung wird durch die Tatsache gestützt, dass es zu einer relativ scharf abgegrenzten Anfärbung des Einschlusskörper-nahen Zytosols mit dem CPn1020-Antiserum kam.

Eine Struktur, die diesem Anfärbeverhalten entsprechen und damit einen Angriffspunkt von CPn1020 darstellen könnte, ist das Zytoskelett der Wirtszelle, zumal eine Aktivierung des Zytoskelett durch chlamydiale Effektoren im Rahmen der Endozytose der Erreger und Translokation der Einschlusskörper in Richtung des Golgi-Apparates bekannt ist.

Ob CPn1020 wirklich aktiv sezerniert wird und ob dieser Vorgang über ein Typ-III-Sekretionssystem abläuft, kann mit dieser Arbeit bisher nicht eindeutig beantwortet werden, es bestehen lediglich starke Indizien hierfür. Hierzu zählen:

- die Lokalisation im Genom in Nähe zu dem putativen Chaperon *LcrH-2* mit qualitativ vergleichbarer Transkription
- das Fehlen eines erkennbaren Signalpeptides
- die Ähnlichkeit zu den Typ-III-sezernierten Proteinen YopB und YopD hinsichtlich Lage im Chromosom, Größe und Hydrophobizitätsmuster
- die Lokalisation des Proteins im Zytosol infizierter HEp-2-Zellen
- die Erkennung und Sekretion des Amino-Terminus durch das Typ-III-System von *Shigella flexneri*.

Da bis zum heutigen Zeitpunkt keine Methoden zur genetischen Manipulation von Chlamydien verfügbar sind, kann die Frage einer Typ-III-Sekretion bestimmter Proteine bis jetzt nur in heterologen Systemen, z.B. von *Yersinia* oder *Shigella* spp., untersucht werden.

Neben dem hypothetischen Chaperon *lcrH-2*, dessen offener Leserahmen sich direkt an *cpn1020* anschließt und ein ähnliches Transkriptionsmuster zeigt, besitzt *C. pneumoniae* mit *lcrH-1* (= *cpn0811*) ein zweites Homologon zum bei anderen Bakterien nur singulär vorkommenden *lcrH*. Das Gen *lcrH-1* wird mit 24 Stunden nach Infektionsbeginn im Gegensatz zu *lcrH-2* erst spät im Entwicklungszyklus exprimiert und zeigt ebenfalls ein korrespondierendes Transkriptionsmuster zu dem im selben Subcluster liegenden putativen Effektor *cpn0809* [LUGERT et al., 2004].

Wahrscheinlich besitzt *C. pneumoniae* also zwei Kopien des Chaperon-Genes *lcrH*, die auf zwei verschiedene Subcluster verteilt sind. In unmittelbarer Nachbarschaft zu diesen befinden sich die offenen Leserahmen *cpn0808* und *cpn0809* (in Nachbarschaft zu *lcrH-1* = *cpn0811*) sowie *cpn1019* und *cpn1020* (in Nachbarschaft zu *lcrH-2* = *cpn1021*), die neben ihrer Lokalisation aufgrund eines fehlenden Signalpeptides und der Ähnlichkeit zu YopB und YopD als Typ-III-sezernierte Effektorproteine in Betracht kommen und deren Funktion bis jetzt unklar ist [SUBTIL et al., 2000]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das zu CPn0808 homologe CopD (= CT579) von *C. trachomatis* in *Salmonella enterica* mittels des Typ-III-Sekretionssystems SPI-2 ins Zytosol der Wirtszelle befördert wird [HO & STARNBACH, 2005]. Außerdem wurden die Amino-Termini der Produkte von *cpn0808*, *cpn0809*, *cpn1019* und *cpn1020* von dem heterologen Typ-III-Sekretionssystem von *Shigella flexneri* erkannt und sezerniert [SUBTIL et al., 2005]. Die Proteine beider Subcluster werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert: *lcrH-2* und *cpn1020* bereits in den ersten Stunden, *lcrH-1* und *cpn0809* erst ab der 24. Stunde des Entwicklungszyklus [SLEPENKIN et al., 2003; LUGERT et al., 2004]. Damit könnten Chlamydien bei einem einfachen Satz an Strukturproteinen ein zweiphasiges Typ-III-Effektorensystem unterhalten, eventuell korrespondierend mit den zwei unterschiedlichen Zustandsformen des Erregers, (i) dem infektiösen Elementarkörper, dessen Hauptfunktion die Infektion potenzieller Wirtszellen ist, und (ii) dem metabolisch aktiven Retikularkörper, der über parasitäre Nutzung des Wirtszellmetabolismus die bakterielle Vermehrung bis zur erneuten Freisetzung der Erreger gewährleistet.

Eine zeitabhängige Regulation verschiedener Bestandteile des Typ-III-Sekretionssystems ist nicht unbekannt. *Salmonella enterica* besitzt beispielsweise zwei komplette Sätze von Proteinen des Sekretionsapparates, von denen der eine, SPI1, früh aktiviert wird und für die Invasion intestinaler Zellen notwendig ist, während der andere, SPI2, die Entwicklung einer systemischen Infektion ermöglicht [WINSTANLEY & HART, 2001].

Man könnte also annehmen, dass LcrH-2 die Rolle des Chaperons für CPn1020 übernimmt, sollte dieses tatsächlich Typ-III-vermittelt sezerniert werden. In einem bakteriellen Two-Hybrid-System zeigten sich allerdings *in vivo* keine Interaktionen zwischen CPn1020 und LcrH-2. Stattdessen interagierte LcrH-2 in diesem System

mit LcrE (= CPn0324) [SLEPENKIN et al., 2005]. Das zu LcrE homologe YopN reguliert in *Yersinia* spp. die Öffnung des Sekretionsapparates über eigene Freisetzung nach Kontakt mit der Wirtszellmembran oder nach einem Abfall der intrazellulären Kalzium-Konzentration und ermöglicht somit die Ausschleusung von Effektoren [RAMAMURTHI & SCHNEEWIND, 2002]. Die Funktion von LcrE bei Chlamydien ist bislang unklar. In *C. trachomatis* konnte aber bereits demonstriert werden, dass das homologe CopN in *Yersinia* spp. über ein Typ-III-System sezerniert wird [FIELDS KA & HACKSTADT, 2000]. Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass LcrE in *C. pneumoniae* zum Teil im Einschlusskörper, vor allem aber in dessen Membran zu finden ist [LUGERT et al., 2004]; ein Befund, der gut mit der Funktion von LcrE als regulatorischer Bestandteil des Sekretionsapparates vereinbar ist. Die von SLEPENKIN et al. [2005] nachgewiesene Interaktion des Chaperons LcrH-2 mit LcrE könnte also einen initialen Prozess repräsentieren, bei dem das Chaperon LcrH-2 die sekretionsregulierende Funktion von LcrE ermöglicht und steuert, und woran sich dann die Passage anderer Faktoren durch den Apparat anschließt.

Dabei ist zu beachten, dass LcrH-2, wie für so genannte Klasse-2-Chaperone von Translokatoren charakteristisch, durchaus mit mehr als einem Protein interagieren kann [PAGE & PARSOT, 2002], die Chaperon-Funktion für andere potenzielle Effektoren wie z.B. CPn1020 also nicht ausgeschlossen ist, auch wenn diese von SLEPENKIN und Mitarbeitern nicht detektiert werden konnte. Eine Sekretion und Funktion von CPn1020 als Effektor und Virulenzfaktor im Zytosol infizierter Zellen ist aber selbstverständlich auch ohne Chaperon denkbar.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CPn1020 in das Zytosol infizierter Wirtszellen sezerniert wird. Über die Funktion dieses Proteins ist allerdings nichts bekannt. Es besteht die Möglichkeit, dass CPn1020 ein sezerniertes Effektorprotein darstellt, das mit Stoffwechselprozessen der Wirtszelle interagiert, wie es bereits für einige andere Typ-III-sezernierte chlamydiale Proteine (z.B. Tarp und CopN) demonstriert werden konnte. Um Hinweise auf die Funktion von CPn1020 zu erlangen, wurde in dieser Arbeit mit dem Yeast-Two-Hybrid-System eine menschliche HeLa-cDNA-Genbank auf der Suche nach zellulären Interaktionspartnern von CPn1020 durchmustert. Mit dem gleichen System wurde in *C. trachomatis* das humane Protein 14-3-3- β als Interaktionspartner des Einschlusskörper-Membranproteins IncG gefunden

[SCIDMORE & HACKSTADT, 2001]. 14-3-3- β ist ein Phosphoserin-bindendes Protein, das in eine Vielzahl von Signaltransduktionsprozessen involviert ist und bereits als Interaktionspartner von diversen bakteriellen und viralen Proteinen bekannt war. Ebenfalls in einem Yeast-Two-Hybrid-Test interagierte IncA von *C. trachomatis* mit sich selbst und ist somit möglicherweise für die Fusion von Einschlußkörpern in mehrfach infizierten Zellen verantwortlich [HACKSTADT et al., 1999].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei große Genbankscreenings durchgeführt, um potenzielle zelluläre Interaktionspartner von CPn1020 zu identifizieren. Insgesamt wurden dabei $4,1 \times 10^6$ Klone getestet. Die verwendete HeLa-cDNA-Genbank beinhaltete $3,5 \times 10^6$ unabhängige Klone, so dass jeder Klon statistisch 1,1 Mal getestet wurde. Im Vorfeld der Versuche wurde die Expression des zu untersuchenden Köderproteins CPn1020 in transformierten Hefezellen nachgewiesen und dessen Nicht-Toxizität für die verwendeten Hefestämme gezeigt. Außerdem wurde ausgeschlossen, dass seine Expression alleine zur Aktivierung der Reportergene führte. Es wurden 15 verschiedene potenzielle Interaktionspartner gefunden, zwei davon doppelt. Es ist unwahrscheinlich, dass CPn1020 mit 15 vollkommen unterschiedlichen humanen Proteinen interagiert. Daher ist anzunehmen, dass ein Großteil der ermittelten Kandidaten falsch-positiv getestet worden war. Von diesen 15 Proteinen waren sieben, darunter auch die Cytochrom C Oxidase, mitochondrialen oder ribosomalen Ursprungs und in Two-Hybrid-Systemen als typischerweise falsch-positiv reagierend bekannt [http://www.fccc.edu:80/research/labs/golemis/main_false.html]. In der zweiten und dritten Genbanktransformation wurde daher mit dem Ziel der Reduktion der Anzahl vermeintlich falsch-positiver Klone die Stringenz angehoben, sowie anstatt der sequenziellen Transformation des ersten Tests Kotransformationen durchgeführt. Im zweiten Versuch wurden 13 potenzielle Interaktionspartner identifiziert. Im dritten Genbank-Screening wurde direkt auf die Aktivierung aller drei Reportergene getestet, es mussten demzufolge keine Kolonien umgesetzt werden. Die Bedingungen des dritten Screenings erwiesen sich als optimal hinsichtlich Durchführbarkeit und der Selektion positiver Kolonien. Allerdings lagen die Transformationseffizienzen des zweiten und dritten Tests deutlich unter der des ersten Versuchs, so dass nur 6 bzw. 5×10^5 Klone getestet wurden. Trotz vielfacher Variationen des Protokolls konnte die Trans-

formationseffizienz jedoch nicht gesteigert werden.

Von den Klonen des zweiten und dritten Screenings konnten zehn Sequenzen bekannten humanen Proteinen im richtigen Leserahmen zugeordnet werden. Die restlichen kamen nicht als Interaktionspartner in Frage, da sie im Leserahmen versetzt lagen oder keinem bekannten humanen Protein zugeordnet werden konnten. Drei dieser zehn Proteine waren wiederum mitochondrialen oder ribosomalen Ursprungs und wurden in Two-Hybrid-Versuchen häufig als falsch-positiv bewertet [GOLEMIS et al., 2003]. Die zehn Kandidaten wurden mittels Yeast Mating in verschiedenen Kontrolltransformationen auf falsch-positive Reaktionen getestet. Danach mussten alle als falsch-positiv eingestuft werden, da diese Klone auch in Abwesenheit von CPn1020 die Reportergene aktivierten, bzw. mit CPn1020 keine stärkere Interaktion als mit einer Negativkontrolle zeigten. Dabei konnte es sich nicht um eine Autoaktivierung der Reportergene durch die verwendeten Plasmide allein handeln, da diese im Vorfeld der Versuche ausgeschlossen wurde. Bei den positiven Kandidaten handelte es sich also offensichtlich um Proteine, die über eine unspezifische Interaktion mit dem GAL4-BD-Fusionsprotein die Reportergene aktivierten. Es konnte demnach unter den beschriebenen Bedingungen aus der verwendeten HeLa-cDNA-Genbank unter insgesamt 4.100.000 getesteten Klonen keiner ermittelt werden, der als zweifelsfreier Interaktionspartner mit CPn1020 in Frage kam. Vorausgesetzt, dass die durchgeführten Yeast-Two-Hybrid-Versuche sensitiv genug waren und genügend unabhängige Klone getestet wurden, muss man also den Schluss ziehen, dass kein zelluläres Protein existiert, an das CPn1020 bindet und mit dem Wechselwirkungen stattfinden. Gründe für eine unzureichende Sensitivität der Methode könnten z.B. sein:

- Die Wechselwirkungen zwischen CPn1020 und dem Interaktionspartner sind zu schwach.
- Das exprimierte Fusionsprotein liegt in der Hefezelle, z.B. durch fehlende posttranslationale Modifikationen, nicht in der nativen Sekundär- oder Tertiärstruktur vor oder gelangt nicht in den Zellkern, was zur Aktivierung der Reportergene notwendig wäre.

- Der Interaktionspartner ist in der verwendeten HeLa-cDNA-Genbank nicht enthalten.

Anstatt mit Wirtszellproteinen in Wechselwirkung zu treten, könnte sezerniertes CPn1020 auch Aufgaben im Rahmen des Sekretionsprozesses selbst übernehmen und dabei mit chlamydialen Faktoren interagieren. Um dieses zu prüfen, könnte man CPn1020 auf Interaktionen mit chlamydialen Proteinen testen, ebenfalls durch Two-Hybrid-Screeningverfahren im Test mit einer chlamydialen Genbank oder als gezielte Untersuchung auf Interaktionen mit bestimmten Proteinen, die mit dem Typ-III-Sekretionssystem assoziiert sind, wie es z.B. SLEPENKIN et al. [2005] für LcrH-2 und SycE durchgeführt haben.

Insgesamt muss der Einsatz des Yeast-Two-Hybrid-Systems im Rahmen dieser Arbeit kritisch betrachtet werden. Auf der Suche nach Interaktionspartnern des im Wirtszellzytosol vorliegenden und Typ-III-sezernierten Proteins CPn1020 wurde es als Screeningverfahren eingesetzt, um eine humane HeLa-cDNA-Genbank auf potenzielle Interaktionspartner zu durchmustern. Auf diese Weise benutzt, stellt sich das Yeast Two-Hybrid-System als sehr zeit- und materialaufwendige Methode dar. Im Gegensatz zu seit kurzem zur Verfügung stehenden bakteriellen Two-Hybrid-Systemen benötigen Hefen sehr lange Wachstumszeiten. Wenn mehrere Reportergene aktiviert werden müssen, kann die notwendige Inkubation eines ausgestrichenen Transformationsansatzes 10 bis 14 Tage betragen. Muss anschließend noch, eventuell mehrfach, auf Platten höherer Selektivität umgesetzt werden, verlängert sich die Versuchsdauer schnell um ein Vielfaches. Verwendet man stattdessen ein bakterielles Two-Hybrid-System, lassen sich notwendige Inkubationszeiten und damit die Versuchsdauer wesentlich reduzieren. Daneben stellen einfachere Transformations- und Plasmidpräparationsverfahren Vorteile der Arbeit mit Bakterien gegenüber Hefen dar. Ein weiteres Problem sind die vielen falsch-positiven Klone, die ein Two-Hybrid-Screen ergeben kann. Diese sind als limitierende Faktoren der Methode bekannt und führen zu einem beträchtlichen Zeit- und Materialaufwand.

In einer orientierenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass in menschlichen Seren Antikörper gegen rCPn1020 nachgewiesen werden können. Eingesetzt wurden

Patientenseren, die mittels PCR auf *C. pneumoniae* getestet worden waren. Legt man diesen PCR-Test als Referenz für eine akute oder chronische *C. pneumoniae*-Infektion zu Grunde, ergab sich für den serologischen Nachweis einer Infektion eine Sensitivität von 70 % für die IgG-, 60 % für die IgM- und nur 50 % für die IgA-Detektion. Die Spezifität des IgG-Nachweises betrug dabei nur 46 %, für IgM und IgA immerhin 77 %. Der positiv prädiktive Wert des Tests errechnete sich damit auf nur 50 % für IgG, 67 % für IgM und 63 % für IgA. Ähnlich verhielt es sich mit dem negativ prädiktiven Wert, er betrug 67 % für den IgG- und IgA- und 71 % für den IgM-Nachweis. Für den Einsatz dieses Testes in der Routinediagnostik einer *C. pneumoniae*-Infektion waren die berechneten Testgütekriterien auf der Basis von 23 untersuchten Seren damit nicht hoch genug. Es müssten allerdings deutlich mehr Seren untersucht werden, um eine abschließende Beurteilung der Testqualität erheben zu können. Gleichzeitig kann der *C. pneumoniae*-Antigennachweis mittels PCR nicht als Goldstandard einer *C. pneumoniae*-Infektion gelten; auch hier müssen falsch-positive und falsch-negative Testergebnisse erwartet werden. Für die Verbesserung der diagnostischen Qualität eines Western-Blot-Tests könnte zukünftig der kombinierte Nachweis von Antikörpern gegen CPn1020 und andere chlamydiale Proteine hilfreich sein, um Sensitivität und Spezifität zu erhöhen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Chlamydomphila pneumoniae ist ein bakterieller Erreger akuter Atemwegsinfektionen, der weltweit für etwa 10 % der ambulant erworbenen Pneumonien verantwortlich gemacht wird. Der gesamte Entwicklungszyklus des obligat intrazellulären Pathogens findet innerhalb des Einschlusskörpers statt, einer Vakuole im Zytoplasma infizierter Zellen. Wie viele andere gramnegative Bakterien besitzen Chlamydien ein Typ-III-Sekretionssystem, das es diesen ermöglicht, Effektormoleküle in das Zytosol der Wirtszelle zu befördern, um damit aktiv in deren Stoffwechsel einzugreifen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das putative Typ-III-sezernierte Effektorprotein CPn1020 hinsichtlich Transkription, Expression, zellulärer Lokalisation und möglicher Funktion in infizierten menschlichen Epithelzellen charakterisiert.

Mittels RT-PCR-Analysen konnte gezeigt werden, dass *cpn1020* besonders in der Phase 8 bis 24 Stunden nach Infektion transkribiert wird und damit zu den Genen gehört, die bereits zu Beginn der chlamydialen Infektion eine Rolle spielen. Nach Herstellung von rekombinantem CPn1020 und Generierung eines spezifischen Antiserums wurde die Expression des Proteins in der Wirtszelle 24 Stunden nach Infektionsbeginn nachgewiesen. Mit Hilfe des Antiserums konnte in Immunfluoreszenztests gezeigt werden, dass CPn1020 in der Nähe des Einschlusskörpers im Zytosol infizierter Zellen lokalisiert ist. Aufgrund einer relativ scharfen Abgrenzung zur Zytosolperipherie kommt dabei eventuell eine Interaktion mit dem Zytoskelett der Wirtszelle in Betracht. Die Tatsache, dass in menschlichen Seren Antikörper gegen CPn1020 nachweisbar sind, kann als Indiz dafür gesehen werden, dass CPn1020 trotz intrazellulärer Lage dem Immunsystem zugänglich ist. CPn1020 könnte daher zukünftig einen Beitrag für die Verbesserung der serologischen Diagnostik einer *C. pneumoniae*-Infektion leisten. Um Hinweise auf die Funktion von CPn1020 zu erhalten, wurde mit dem Yeast-Two-Hybrid-System eine humane HeLa-cDNA-Genbank auf Wechselwirkungen mit CPn1020 untersucht. Nach umfangreichen Untersuchungen und Kontrollversuchen konnte dabei kein zelluläres Protein als potenzieller Interaktionspartner identifiziert werden.

7 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

Airenne S, Surcel HM, Tuukkanen J, Leinonen M, Saikku P (2002): *Chlamydia pneumoniae* inhibits apoptosis in human epithelial and monocyte cell lines. Scand J Immunol 55, 390-398

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

Anderson DR, Hopps HE, Barile MF, Bernheim BC (1965): Comparison of the ultrastructure of several rickettsiae, ornithosis virus, and Mycoplasma in tissue culture. J Bacteriol 90, 1387-1404

Balin BJ, Gerard HC, Arking EJ, Appelt DM, 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 P, Chien CT, Sternglanz R, Fields S (1993): Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. Biotechniques 14, 920-924

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

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 *Chlamydomphila pneumoniae* to include reptiles as well as humans, horses, koalas and amphibians. *Syst Appl Microbiol* 25, 146-52
- 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, Grieshaber SS, Fischer E, Hackstadt T (2002):** *Chlamydia trachomatis* induces remodeling of the actin cytoskeleton during attachment and entry into HeLa cells. *Infect Immun* 70, 3793-3803
- Carabeo RA, 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, 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

- 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
- 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
- Daus H, Ozbek C, Saage D, Scheller B, Schieffer H, Pfreundschuh M, Gause A (1998):** Lack of evidence for a pathogenic role of *Chlamydia pneumoniae* and cytomegalovirus infection in coronary atheroma formation. *Cardiology* 90, 83-88
- 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* 181, 572-578
- Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C (1997):** Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ* 315, 629-634
- Elledge SJ, Mulligan JT, Ramer SW, Spottswood M, Davis RW (1991):** λ -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 (2000):** Chlamydia and Chlamydiales: more than meets the eye. *Vet Microbiol* 75, 109-126
- 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, 415-40

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 [correction of factors is required for] major histocompatibility complex antigen expression. *Infect Immun* 70, 345-349

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 S, Song O (1989): A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245–247

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

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

- Galán 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
- Gibbs RG, Sian M, Mitchell AW, Greenhalgh RM, Davies AH, Carey N (2000):** *Chlamydia pneumoniae* does not influence atherosclerotic plaque behavior in patients with established carotid artery stenosis. *Stroke* 31, 2930-2935
- Gieffers J, Fullgraf H, Jahn J, Klinger M, Dalhoff K, Katus HA, Solbach W, Maass M (2001a):** *Chlamydia pneumoniae* infection in circulating human monocytes is refractory to antibiotic treatment. *Circulation* 23, 351-356
- Gieffers J, Pohl D, Treib J, Dittmann R, Stephan C, Klotz K, Hanefeld F, Solbach W, Haass A, Maass M (2001b):** Presence of *Chlamydia pneumoniae* DNA in the cerebral spinal fluid is a common phenomenon in a variety of neurological diseases and not restricted to multiple sclerosis. *Ann Neurol* 49, 585-589
- 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
- Griehaber S, Swanson JA, Hackstadt T (2002):** Determination of the physical environment within the *Chlamydia trachomatis* inclusion using ion-selective radiometric probes. Cell Microbiol 4, 273-283
- 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, 1-932
- Hackstadt T (1998):** The diverse habitats of obligate intracellular parasites. Curr Opin Microbiol 1, 82-87
- Hackstadt T, Rockey DD, Heinzen RA, Scidmore MA (1996):** *Chlamydia trachomatis* interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane. EMBO J 15, 964-977
- 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
- Heinzen RA, Hackstadt T (1997):** The *Chlamydia trachomatis* parasitophorous vacuolar membrane is not passively permeable to low-molecular-weight compounds. Infect Immun 65, 1088-1094
- Hill J, Donald KA, Griffiths DE, Donald G (1991):** DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. Nucleic Acids Res 19, 5791
- Ho TD, Starnbach MN (2005):** The *Salmonella enterica* serovar typhimurium-encoded type III secretion systems can translocate *Chlamydia trachomatis* proteins into the cytosol of host cells. Infect Immun 73, 905-911
- 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
- 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
- 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
- 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, 349-60
- Kaul R, Wenman WM (1998):** Eukaryotic-like histones in *Chlamydia*. *Front Biosci* 3, 300-305
- Kauppinen MT, Herva E, Kujala P, Leinonen M, Saikku P, Syrjala h (1995):** The etiology of community-acquired pneumonia among hospitalized patients during a *Chlamydia pneumoniae* epidemic in Finland. *J Infect Dis* 172 1330-1335
- 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
- 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):** Electroblothing 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 hydrophobic 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 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
- 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 O, Rosebrough N, Farr A, Randall R (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
- 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

- Miyashita N, Kanamoto 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
- 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
- Neyt C, Cornelis GR (1999):** Role of sycD, the chaperone of the *Yersinia* yop translocators yopB and yopD. Mol Microbiol 31, 143-156
- Norton R, Schepetiuk S, Kok TW (1995):** *Chlamydia pneumoniae* pneumonia with endocarditis. Lancet 345, 1376-1377
- Page AL, Parsot C (2002):** Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. Mol Microbiol 46, 1-11
- Paterson DL, Hall J, Rasmussen SJ, Timms P (1998):** Failure to detect *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic plaques of Australian patients. Pathology 30, 169-72
- 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, 138-42
- 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

- Ramamurthi KS, Schneewind O (2002):** Type III protein secretion in *Yersinia* species. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18, 107-133
- Rappl C:** Charakterisierung eines Typ III-Sekretionssystems für Virulenz-proteine aus *Salmonella typhimurium*. Biol. Diss. München 2001
- 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, Shimkets LJ. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA 1999, 403–425
- Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Makela PH, Huttunen JK, Valtonen V (1988):** Serological evidence of an association of a novel *Chlamydia*, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 1988, 2, 983-986
- 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
- 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, 363-374
- 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
- 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, 158-61
- 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 obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia 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
- 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, Delevoye C, Balana ME, Tastevin L, Perrinet S, Dautry-Varsat A (2005):** A directed screen for chlamydial proteins secreted by a type III mechanism identifies a translocated protein and numerous other new candidates. *Mol Microbiol* 56, 1636–1647
- 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
- Taylor-Robinson D, Thomas BJ, Goldin R, Stanbridge R (2002):** *Chlamydia pneumoniae* in infrequently examined blood vessels. *J Clin Pathol* 55, 218-220
- 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

- 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, Kalman L, van Ijzendoorn, Nishijima M, Hanada K, Mostov K, Engel JN (2000):** Host cell-derived sphingolipids are required for the intracellular growth of *Chlamydia trachomatis*. *Cell Microbiol* 2, 627-637
- 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
- Weiss SM, Roblin PM, Gaydos CA, Cummings P, Patton DL, Schulhoff N, Shani J, Frankel R, Penney K, Quinn TC, Hammerschlag MR, Schachter J (1996):** Failure to detect *Chlamydia pneumoniae* in coronary atheromas of patients undergoing atherectomy. *J Infect Dis* 173, 957-962
- 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):** Sphingomyelin trafficking in *Chlamydia pneumoniae*-infected cells. *Cell Microbiol* 3, 145-152
- Wyrick PB (2000):** Intracellular survival by *Chlamydia*. *Cell Microbiol* 2, 275-282
- 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

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen veröffentlicht:

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

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

DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gebührt Prof. Dr. Uwe Groß für die Möglichkeit, in seiner Abteilung in ungemein ansprechender und professioneller Umgebung zu promovieren, sowie für die Bereitstellung des interessanten Themas und die konstruktive Korrektur des Manuskriptes.

Besonders danken möchte ich Dr. Raimond Lugert für die exzellente, unkomplizierte und nette Betreuung zu jedem Zeitpunkt dieser Arbeit.

Martin Kuhns verdanke ich die glückliche Entscheidung für die Bakteriologie und eine hervorragende Zusammenarbeit im Institut und während des gesamten Studiums.

Weiterhin danke ich allen Kollegen und Mitarbeitern der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und sonstigen Arbeitsgruppen des Institutes, die zu der angenehmen Atmosphäre und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

LEBENS LAUF

Am 16. September 1976 wurde ich, Tobias Polch, in Hannover geboren.

Nach Absolvierung von Grundschule und Orientierungsstufe in Burgdorf besuchte ich von 1989 an das Gymnasium Burgdorf, wo ich im Juni 1996 mein Abitur ablegte.

Anschließend leistete ich von Juli 1996 bis Juli 1997 meinen Zivildienst im Niedersächsischen Landesamt für Ökologie in Hannover.

Im Oktober 1997 nahm ich mein Medizinstudium an der Georg-August-Universität in Göttingen auf. Nach Ablegung der ärztlichen Vorprüfung im September 1999 (Note „gut“), des ersten Teils der ärztlichen Prüfung im August 2000 (Note „gut“) und zweiten Teils der ärztlichen Prüfung im März 2004 (Note „gut“) absolvierte ich mein praktisches Jahr in den Kliniken für Kardiologie und Pulmologie, Allgemeinchirurgie sowie Psychiatrie und Psychotherapie am Universitätsklinikum Göttingen. Nachfolgend bestand ich den dritten Teil der ärztlichen Prüfung mit der Note „sehr gut“ und erhielt im Juni 2005 die ärztliche Approbation.

Im August 2002 begann ich in der Abteilung Medizinische Mikrobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Uwe Groß die Arbeit an dieser Promotion.

Seit Oktober 2005 bin ich als Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Molekulare und Klinische Kardiologie der Humboldt-Universität Berlin, Campus Buch, unter der Leitung von Prof. Dr. Rainer Dietz tätig.