

Aus dem Institut für Neuroanatomie
(Prof. Dr. med. J. Staiger)
im Zentrum Anatomie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Chlamydien und Gonokokken – mehr als
Erreger der weltweit häufigsten sexuell-
übertragbaren Infektionen?

Bindung antibakterieller Antikörper an Proteine des humanen
fetalen Gehirns – Molekulare Identifizierung und funktionelle
Charakterisierung zellulärer Interaktionspartner

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

vorgelegt von

Abdullah Ahmed Almamy

aus

Riad, Saudi-Arabien

Göttingen 2019

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. B. Reuss

Ko-Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Abdul Rahman Asif

Prüfungskommission

Referent Prof. Dr. rer. nat. B. Reuss

Ko-Referent/in:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Chlamydien und Gonokokken – mehr als Erreger der weltweit häufigsten sexuell-übertragbaren Infektionen? Bindung antibakterielle Antikörper an Proteine des humanen fetalen Gehirns – Molekulare Identifizierung und funktionelle Charakterisierung zellulärer Interaktionspartner“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Würzburg, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Infektionskrankheiten durch <i>Neisseria gonorrhoeae</i> und <i>Chlamydia trachomatis</i>	1
1.1.1 Infektionen durch <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1
1.1.2 Infektionen durch <i>Chlamydia trachomatis</i> und andere Chlamydienbakterien	3
1.2 Psychiatrische Krankheiten als Autoimmunkrankheiten	6
1.2.1 Was versteht man unter einer Autoimmunerkrankung?	6
1.2.2 Die Rolle der Infektionskrankheiten bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen	7
1.2.3 Schizophrenie als eine Autoimmunkrankheit	10
1.2.4 Die Neuropsychiatrische Manifestation des Systemischen Lupus Erythematoses (NPSLE)	13
1.3 Ausgewählte Proteine und ihre Rolle als mögliche Antigene bei neuropsychiatrischen Autoimmunerkrankungen	15
1.3.1 SNARE-Proteine und ihre Rolle für die Exocytose	15
1.3.2 Tetraspanin-7 und seine Rolle für die Entwicklung und Plastizität exzitatorischer Synapsen	17
1.3.3 Selenoprotein-H als wichtiger Regulator der zellulären Antwort auf oxidativen Stress	18
1.3.4 Das ribosomale Protein Rps27a und seine mögliche Rolle bei der Entstehung des SLE	19
1.3.5 Entstehung und Wirkung von Autoantikörpern gegen intrazelluläre Proteine	20
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	22

2	Material und Methoden	23
2.1	Methoden zur molekularen Identifikation zellulärer Interaktionspartner antibakterieller Antiseren.....	23
2.1.1	Antikörper und rekombinante Proteine	23
2.1.2	Interaktionsanalyse mittels <i>hEXselect multiprotein array</i> (MPA)	25
2.1.3	Zellbiologische Methoden: Zellkultur und Immunzytochemie	26
2.1.4	<i>Western-Blot</i> -Analyse	28
2.1.5	2D-Gelelektrophorese und <i>Nano-LC-MS/MS</i> -Massenspektrometrie	29
2.2	Methoden zur funktionellen Charakterisierung zellulärer Interaktionspartner	30
2.2.1	Methoden zur Untersuchung der Interaktion zwischen Antiseren gegen <i>Neisseria gonorrhoeae</i> und SNAP23	30
2.2.2	Methoden zur Untersuchung der Interaktion zwischen Antiseren gegen Chlamydien und Rps27a.....	33
3	Ergebnisse und Diskussion	35
3.1	Die Wechselwirkung zwischen Antiseren gegen <i>Neisseria gonorrhoeae</i> und dem SNARE-Komplex-Protein Snap23 führt in SH-SY5Y-Zellen zu einer Beeinträchtigung von Exozytose und Membrantranslokation	35
3.1.1	Nachweis und funktionelle Charakterisierung der Interaktion zwischen Snap23 und α -NG.....	35
3.1.2	Die Bedeutung der Interaktionen zwischen α -NG und Snap23 während der Gehirnentwicklung für die Entstehung schizophrener Psychosen.....	37
3.1.3	Die mögliche Bedeutung einiger weiterer Interaktionspartner von α -NG für die Entstehung neuropsychiatrischer Erkrankungen	38
3.1.4	Interaktionspartner von α -NM und ihre Bedeutung für neuropsychiatrische Erkrankungen	39
3.2	Die Wechselwirkung zwischen Chlamydien-Antiseren und dem ribosomalen Protein Rps27a führt zu einer gestörten Proteinbiosynthese in Zellen des <i>Plexus</i> <i>choroideus</i>	40
3.2.1	Nachweis und funktionelle Charakterisierung der Interaktion zwischen Rps27a und α -CT	40
3.2.2	Die Bedeutung der Interaktion zwischen Rps27a und α -CT für den Neuropsychiatrischen Systemischen <i>Lupus Erythematoses</i> (NPSLE) und weitere Erkrankungen.....	42

3.2.3	Mögliche Bedeutung von Albumin für die Entstehung neuropsychiatrischer Erkrankungen	43
3.3	Kritische Betrachtung der Ergebnisse und möglicher Fehlerquellen.....	43
3.3.1	Methodische Grenzen einer <i>multiprotein-array</i> -Analyse.....	43
3.3.2	Inwiefern spiegeln die hier verwendeten Antiseren aus dem Kaninchen die Situation im menschlichen Immunsystem wider?	44
3.3.3	Kann man von funktionellen <i>In-vitro</i> -Untersuchungen auf die Rolle eines möglichen Autoantikörpers <i>in vivo</i> schließen?.....	45
3.3.4	Wechselwirkung von Antikörpern im Serum mit intrazellulären Proteinen	45
3.3.5	Sind die gefundenen Interaktionsmuster antikörperspezifisch oder bakterienspezifisch?	46
3.3.6	Sind die gefundenen Effekte spezifisch oder durch toxische Effekte des Na-Azids verursacht?	46
4	Zusammenfassung	47
5	Literaturverzeichnis	49
6	Publikationen	65

Abbildungsverzeichnis

Abbildungen in der Dissertation:

Abbildung 1.1: Mikroskopische Aufnahme von <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1
Abbildung 1.2: Mikroskopische Aufnahme von <i>Chlamydia trachomatis</i>	4
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung für mögliche Mechanismen für die Entstehung einer Autoimmunreaktion beeinflusst durch Infektionserregern.....	10
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung <i>Plexus choroideus</i> und zirkulierende Zellen des Immunsystems im zentralen Nervensystems.	15
Abbildung 1.5: Schematischer Darstellung der T-Zell- und Antikörper-vermittelten Autoimmunreaktion.	21

Abbildungen in den Publikationen:

Almamy et al. 2017a:

Abbildung 1: Nachweis der Wechselwirkung von α -NG mit Proteinen des <i>multiprotein arrays</i>	69
Abbildung 2: Nachweis der Wechselwirkung von α -NM mit Proteinen des <i>multiprotein arrays</i>	71
Abbildung 3: Nachweis der spezifischen Interaktion zwischen α -NG und Snap23	73
Abbildung 4: Nachweis des verminderten insulininduzierten Vesikel-Recyclings durch die Interaktion zwischen α -NG und Snap23	74
Abbildung 5: Immunzytochemischer Nachweis der verminderten insulinabhängigen Membranranslokation des Glut-4-Transporters durch die Interaktion zwischen α -NG und Snap23	76
Abbildung 6: Nachweis der verminderten insulinabhängigen Membranranslokation des Glut-4-Transporters durch die Interaktion zwischen α -NG und Snap23 mittels <i>Western-Blot-Analyse-Immunblot</i>	77
Abbildung 7: Nachweis der Hochregulation der mRNA des Glut-4-Transporters durch die Interaktion zwischen α -NG und Snap23	80

Almamy et al. 2017b:

Abbildung 1: Nachweis der Wechselwirkung von α -CT mit Proteinen der <i>multiprotein-Array</i>	86
Abbildung 2: Nachweis der Wechselwirkung von α -CS mit Proteinen der <i>multiprotein-Array</i>	87

Abbildung 3: Nachweis der spezifischen Interaktion zwischen α -CT und Rps27a mittels <i>Western-Blot</i> -Analyse	87
Abbildung 4: Nachweis der Interaktion zwischen α -CT und α -CS und intrazellulären Interaktionspartner mittels Immunzytochemie und <i>Western-Blot</i> -Analyse	88
Abbildung 5: Nachweis der Interaktion zwischen α -CT und Rps27a mittels 2D- Gelelektrophorese	89
Abbildung 6: Nachweis der verminderten Proteinbiosynthese durch die Interaktion zwischen α -CT/ α -CS und Rps27a mittels SUnSET-Methode	89
Abbildung 7: Nachweis der verminderten Proteinbiosynthese durch die Interaktion zwischen α -CT/ α -CS und Rps27a mittels <i>Click-IT-Kit</i>	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Liste der verwendeten primären und sekundären Antikörper	23
Tabelle 2.2: Liste der verwendeten rekombinanten Proteine	24
Tabelle 2.3: Protokoll zur Durchführung des <i>hEXselect-Multiprotein-Array-Experiments</i>	26
Tabelle 2.4: Protokoll zur Durchführung der Immunzytochemie	28
Tabelle 2.5: Liste der verwendeten Primer im Rahmen der RT-PCR.....	32
Tabelle 2.6: Protokoll der PCR	33

Abkürzungsverzeichnis

ACA	<i>anti-cardiolipin antibodies</i>
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
AKT1	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
Ambra1	<i>activating molecule in beclin-1-regulated autophagy</i>
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
ANA	<i>anti-nuclear antibodies</i>
Anti-dsDNA	<i>anti-double-stranded DNA</i>
APC	<i>antigen-presenting cell</i>
APOE	<i>apolipoprotein E</i>
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
CA3	<i>cornu Ammonis region 3</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC/PHIL	<i>Centers for Disease Control/Public Health Image Library</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHRNA7	<i>cholinergic receptor, nicotinic, α7</i>
COMT	<i>catechol-O-methyltransferase</i>
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
DAO	<i>D-amino-acid oxidase</i>
DAOA	<i>D-amino acid oxidase activator</i>
DISC1	<i>disrupted in schizophrenia 1</i>
DMEM-F12	<i>dulbecco's modified eagle's medium F12</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DPF	<i>differential protein fractionation</i>
DRD	<i>dopamine receptor D2</i>
DTNBP1	<i>Dystrobrevin-binding protein 1</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescent</i>
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
Fc- γ	<i>fragment, crystallizable gamma</i>
FCS	<i>fetales Kälbeserum</i>
GAPDH	<i>glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase</i>
GLUT-4	<i>glucose transporter type 4</i>
GPx	<i>glutathione peroxidase</i>
GRM3	<i>glutamate receptor, metabotropic 3</i>
GS	<i>goat serum</i>
GTP	<i>Guanosintriphosphat</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
HTR2A	<i>serotonin receptor 2A</i>
IFN- γ	<i>Interferon gamma</i>

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1RA	<i>interleukin 1 receptor antagonist</i>
KCNN3	<i>potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 3</i>
Keap 1	<i>kelch-like-ECH-associated protein 1</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MDM2-p53	<i>mouse double minute 2 homolog-protein 53 kDa</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MOMP	<i>major outer membrane protein</i>
MPA	<i>multiprotein array</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MTHFR	<i>methylenetetrahydrofolate reductase</i>
NG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
NMDA	<i>N-Methyl-D-aspartic acid</i>
Notch4	<i>neurogenic locus notch homolog 4</i>
NPSLE	neuropsychiatrischer systemischer Lupus erythematoses
NRG1	<i>Neuregulin 1</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PID	<i>pelvic inflammatory disease</i>
PPP3CC	<i>protein phosphatase 3, catalytic subunit, γ isozyme</i>
PRODH	<i>proline dehydrogenase</i>
PRODH	<i>proline dehydrogenase (oxidase) 1</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RGS4	<i>regulator of G-protein signaling 4</i>
Rps27a	<i>ribosomal protein S27a</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i>
Sel	Selenoprotein
SLC6A3	<i>dopamine transporter</i>
SLC6A4	<i>serotonin transporter</i>
SLE	systemischer Lupus erythematoses
Snap23	<i>synaptosomal-associated protein 23</i>
SNARE	<i>Snap receptor</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
STD	<i>sexually transmitted disease</i>
SUnSET	<i>surface sensing of translation</i>
TBE	<i>Tris-HCl, boric acid, ethylene-diaminetetraacetic acid</i>
TBS-TT	<i>Tris-buffered saline with Tween20 and Triton</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Th	<i>T helper cells</i>

TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRIM21	<i>tripartite motif-containing protein 21</i>
TrX	<i>thioredoxin reductase</i>
Tspan7	Tetraspanin-7
UV	<i>ultra-violett</i>
VAMP	<i>vesicle-associated membrane protein</i>
ZDHHC8	<i>Zinc finger, DHHC-type 8</i>
ZNS	Zentralnervensystem
α -CT	Antikörper gegen <i>Chlamydia trachomatis</i>
α -NG	Antikörper gegen <i>Neisseria gonorrhoeae</i>

1 Einleitung

1.1 Infektionskrankheiten durch *Neisseria gonorrhoeae* und *Chlamydia trachomatis*

1.1.1 Infektionen durch *Neisseria gonorrhoeae*

Neisseria gonorrhoeae (NG) wurde durch den deutschen Dermatologen Albert Neisser entdeckt (Neisser 1879; Ligon 2005). Die Erreger der Gonorrhoe (altgriechisch für Samenfluss) sind gramnegative Kokken, die vorwiegend paarweise auftreten, weshalb sie als Diplokokken beschrieben werden, siehe Abbildung 1.1. Bei einer Temperatur von 36 bis 38 °C finden die strikt aeroben Bakterien optimale Bedingungen zum Wachstum. Mithilfe verschiedener Oberflächen- und Membranproteine erfolgt die Anheftung und die Aufnahme in die Epithelzellen. Die Bakterien werden von Mensch zu Mensch nur bei einem direkten Schleimhautkontakt übertragen. Dies findet im Rahmen des Geschlechtsverkehrs (genital, anal oder oral) oder während des Geburtsvorgangs statt (Edwards und Apicella 2004).

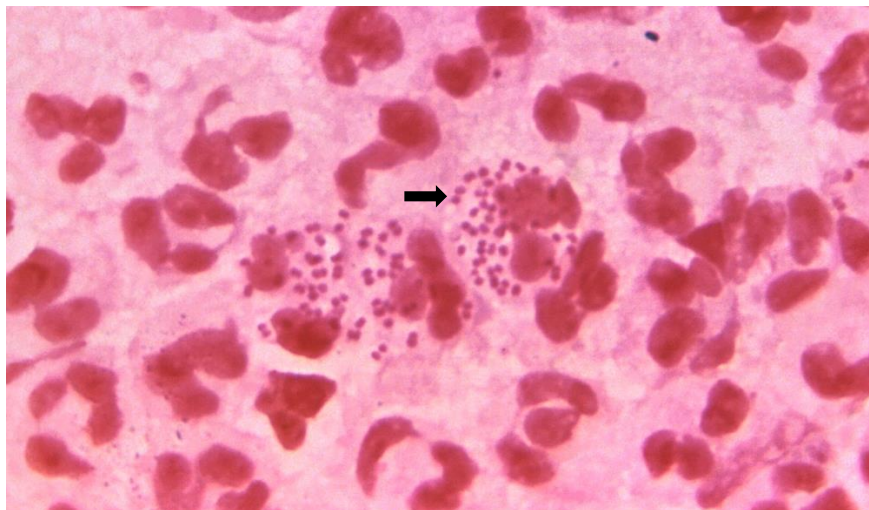


Abbildung 1.1: Mikroskopische Aufnahme eines gramgefärbten Ausstriches aus der Urethra mit intrazellulär lokalisierten Diplokokken (Pfeil) von *Neisseria gonorrhoeae* in polymorphen Leukozyten (CDC / Bill Schwartz 1971). Der Abdruck erfolgt mit freundlicher Genehmigung der CDC/PHIL.

Gonorrhö ist die zweithäufigste gemeldete sexuell übertragbare Krankheit in den Vereinigten Staaten (Centers for Disease Control and Prevention 2018). Weltweit

berichtet die Weltgesundheitsorganisation von 106 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr (World Health Organization 2012). Aufgrund der Aufhebung der Meldepflicht 2001 existieren aktuell kaum epidemiologische Daten zur Einschätzung der Situation in Deutschland. Allerdings bestehen Hinweise auf eine Zunahme der Neuerkrankungen seit 1999. Die Inzidenz der Infektion ist bei Männern, die Sex mit Männern haben, erhöht (Dudareva-Vizule et al. 2014). Die Symptomatik der Krankheit ist abhängig vom Ort der Infektion. Dies hängt wiederum vom Sexualverhalten der betroffenen Personen ab. Bei Frauen kommt es allerdings häufig zu einem asymptomatischen Verlauf. Dies ist entscheidend für die Verbreitung der Gonorrhö (Hook und Handsfield 2008). Bei Männern kommt es vorwiegend zum Befall der Epithelzellen der Urethra. Die Folge ist eine Urethritis mit massivem urethralem Ausfluss und Dysurie. Bei Frauen kommt es bei ähnlichem Befall lediglich zu einer Dysurie. Häufiger betrifft die Infektion die Schleimhaut des Muttermundes und des Zervikalkanals (Mayor et al. 2012). Bei beiden Geschlechtern kann es zu aufsteigenden Infektionen kommen. Beim Mann führt dies zu einer Beteiligung der Prostata, der Harnblase, des Hodens und des Nebenhodens. Bei der Frau kommt es zu einer Beteiligung des Endometriums, der Tuben und der Ovarien. In seltenen Fällen kommt es hier zu einer chronischen Manifestation der Infektion mit chronischen Schmerzen im Unterbauch. Diese chronische Entzündung bezeichnet man als *pelvic inflammatory disease* (PID). Infolgedessen kommt es zu Adhäsionen im Bereich der Tuben. Dadurch kommt es bei den betroffenen Frauen häufig zu einer extrauterinen Schwangerschaft oder sogar zu einer Infertilität. Bei einer Infektion einer schwangeren Frau kann es häufig zu Schwangerschaftskomplikationen wie Frühgeburt oder septischem Abort kommen (Mayor et al. 2012). Bei einer vaginalen Entbindung durch einen infizierten Geburtskanal kann es beim Neugeborenen zu einer *Ophthalmoblennorrhoea neonatorum*, einer Gonokokken-Konjunktivitis, kommen. Eine schwerwiegende Komplikation dieser Infektion ist eine erworbene Erblindung (Ghanem 2010). Daher ist die Durchführung einer Antibiotika-Prophylaxe mit Erythromycin- oder Tetrazyklin-Salbe sehr wichtig (Darling und McDonald 2010). Diagnostisch kann ein Erregernachweis mittels Mikroskopie, Kultur oder PCR (*polymerase chain reaction*) erfolgen. Dafür können Abstriche aus der Urethra, dem Analkanal, dem Pharynx und aus den Konjunktiven gewonnen werden (Mayor et al. 2012). Die Therapie der Wahl der Gonorrhö ist laut der aktuellen Leitlinie der deutschen Gesellschaft für sexuell-übertragbare Krankheiten eine antibiotische Therapie mit einer Kombination aus Ceftriaxon und Azithromycin. Zusätzlich sollten die Sexualpartner mitbehandelt werden, um eine sogenannte Pingpong-Infektion zu vermeiden (Deutsche STI-Gesellschaft 2018). Durch die zunehmenden Resistenzen von Gonokokken gegenüber Antibiotika werden alternative nicht-antibiotische Therapiekonzepte erforscht (Suay-García und Pérez-Gracia 2018). Dazu zählt beispielsweise die intravaginale Applikation von IL12 (Liu et al. 2018) oder Lactobacilli-Bakterien (Foschi et al. 2017). Zusätzlich zeigten neuere

Untersuchungen eine bessere Wirksamkeit von Monocarpin gegenüber der klassischen Antibiotika-Prophylaxe bei Neugeborenen-Konjunktivitis, da *Neisseria gonorrhoeae* keine Resistenzen gegen Monocarpin entwickeln kann (Churchward et al. 2018). In lediglich 0,4 bis 3 % der Fälle kommt es zu einer generalisierten Infektion. Dabei kommt es häufig zu einer akuten Polyarthritits begleitet von Fieber sowie zu vaskulitisbedingten Hauterscheinungen. Die reaktiven Gelenkveränderungen bei der akuten Polyarthritits sind eher eine Folge der Ablagerung von Immunkomplexen als durch eine direkte Besiedelung durch Gonokokken verursacht (Hook und Handsfield 2008). Neben den genannten Schwangerschaftskomplikationen infizierter Frauen konnten mehrere Studien zeigen, dass für die Nachkommen dieser Frauen ein erhöhtes Risiko besteht, an Schizophrenie zu erkranken (Babulas et al. 2006; Sørensen et al. 2009).

1.1.2 Infektionen durch *Chlamydia trachomatis* und andere Chlamydienbakterien

Das Bakterium *Chlamydia trachomatis* gehört zur Familie der *Chlamydiaceae*. Neben *Chlamydia Trachomatis* sind *Chlamydophila psittaci* und *Chlamydophila pneumoniae* ebenfalls humanpathogene Bakterien. Chlamydien sind gramnegative Bakterien, die obligat intrazellulär sind (Ward 1999). Sie wurden erstmalig 1907 durch Stanislaus von Prowazek und Ludwig Halberstädter beschrieben (von Prowazek und Halberstädter 1907). Ihre Zellwand besteht aus einer inneren und einer äußeren Membran und enthält keine Peptidoglykane. In der Zellwand kommen neben Lipopolysacharide auch Proteine wie das *major outer membrane protein* (MOMP), das vom Gen *OMP1* exprimiert wird, vor. Anhand der Varianten in diesem Protein werden verschiedene Serotypen der *Chlamydia trachomatis* nach der Klassifikation von Wang und Grayston in Serotypen A bis L unterschieden (Wang und Grayston 1970). Eine Gemeinsamkeit aller Chlamydienarten ist ihr komplexer Reproduktionszyklus. Dabei unterscheidet man extrazelluläre infektiöse Elementarkörperchen von intrazellulären nicht-infektiösen Retikularkörperchen, siehe Abbildung 1.2. Bei einer Ansteckung heften sich Elementarkörperchen an Rezeptoren der Zielzelle an. Zu diesen Zielzellen gehören unter anderem Epithelzellen des Urogenitaltrakts, des Respirationstrakts oder der Augenbindehaut. Anschließend findet eine Aufnahme der Elementarkörperchen mittels Endozytose statt. Nach ca. 8 Stunden wandeln sich die Elementarkörperchen zu stoffwechselaktiven Retikularkörperchen um. Diese teilen sich und es entsteht ein intrazelluläres Einschlusskörperchen, das von einer Endosomenmembran umgeben ist. Nach ca. 24 bis 36 Stunden wandeln sich die Retikularkörperchen in infektiöse Elementarkörperchen um, die dann entweder durch Exozytose oder durch eine Ruptur der Zelle freigesetzt werden und so andere Zellen befallen können (Ward 1999). Im Rahmen dieses Prozesses werden viele chlamydiale Proteine von der Wirtszelle zu Antigenen verarbeitet und sezerniert. Dadurch wird eine starke Immunantwort ausgelöst. Zu den

verantwortlichen Antigenen gehören neben dem *major outer membrane protein* (MOMP) auch Hitzeschockproteine (HSP10, HSP60 und HSP70) sowie Lipopolysaccharide (LPS). Diese werden mithilfe von dendritischen Zellen und Makrophagen den T-Helferzellen 1 präsentiert. Diese sezernieren Interferon gamma (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor (TNF). Durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie die Interleukine IL-8 und IL-12 werden weitere T- und B-Zellen von benachbarten Lymphknoten angelockt. Zusätzlich werden Fibroblasten zur Produktion von Kollagen stimuliert. Dies führt im Verlauf zu einer narbigen Abheilung der Entzündung, die eine Organdysfunktion verursachen kann (Swanborg et al. 2006).

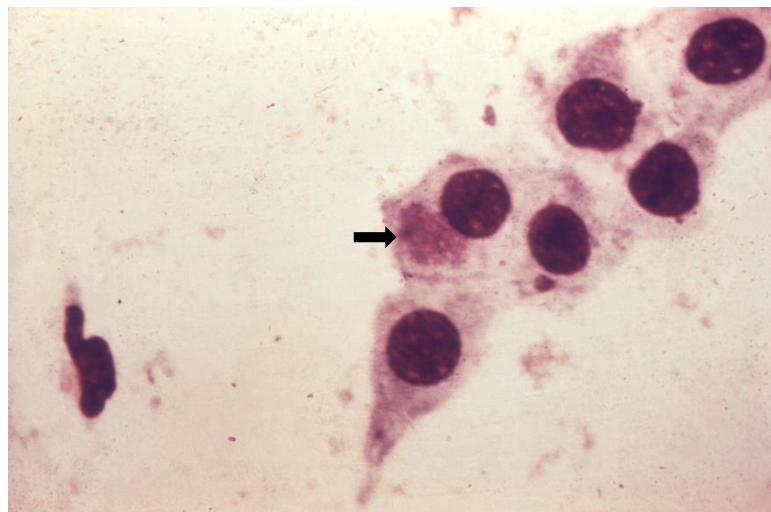


Abbildung 1.2: Mikroskopische Aufnahme eines urethralen Ausstriches mit intrazellulär lokalisierten Elementarkörperchen (Pfeil) von *Chlamydia trachomatis* (CDC / Dr. Wiesner, Dr. Kaufman 1973). Der Abdruck erfolgt mit freundlicher Genehmigung der CDC/PHIL.

Weltweit berichtet die Weltgesundheitsorganisation von 105 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr durch Chlamydien. Somit gehört diese zu den häufigsten Erregern von sexuell übertragbaren Krankheiten (STD engl. für *Sexually Transmitted Disease*, World Health Organization 2012). In den Industriestaaten ist *Chlamydia trachomatis* der häufigste STD-Erreger, gefolgt von Gonokokken (Centers for Disease Control and Prevention 2018). In Abhängigkeit vom Serotyp kommt es zu unterschiedlichen Manifestationen der Krankheit. Die Serotypen A bis C verursachen das in den Tropen endemisch verbreitete Trachom. Davon betroffen sind häufiger Kinder und Jugendliche. Durch einen Befall des Konjunktivalepithels kommt es initial zu einer folliculären Keratokonjunktivitis. Bei wiederholter Infektion oder einer Superinfektion breitet sich die Entzündung aus und es kommt zu einer Granulombildung. Durch die wiederholte narbige Abheilung der Entzündung kommt es zu einem Entropium und einer Eintrübung der Hornhaut, die dann eine Blindheit zur Folge hat (West 2004). Die Serotypen D bis K verursachen eine sexuell übertragbare Infektion des Urogenitaltrakts sowie der Konjunktiva. Sehr häufig kommt es zu einem asymptomatischen Verlauf der Infektion. Dies stellt einen großen Beitrag zur

Verbreitung des Erregers dar. So verläuft die Infektion bei bis zu 80 % der Frauen und bis zu 50 % der Männer symptomlos (Stamm 1999). Bei einem Befall der Zervikalschleimhaut der Frau kommt es lediglich zu einem eitrigem Fluor. Schmerzen werden erst bei einem Befall der Urethra oder der Bartholin-Drüsen berichtet. Sowohl bei Männern als auch bei Frauen kommt es bei einer Urethritis zu Schmerzen und Brennen beim Wasserlassen (Malhotra et al. 2013). Bei beiden Geschlechtern besteht die Gefahr einer aufsteigenden Infektion. So kann es bei betroffenen Frauen zu dem sogenannten Fitz-Hugh-Curtis-Syndrom kommen. Dieses Syndrom besteht aus der Trias: Endometritis, Salpingitis und Perihepatitis (Curtis 1930; Fitz-Hugh 1934). Ähnlich wie bei einer aufsteigenden Gonokokkeninfektion kann es hier auch zu einer Chronifizierung der Infektion und damit zur Ausbildung einer Unterleibsentzündung kommen, der *pelvic inflammatory disease* (PID). Im Rahmen der chronischen Entzündung kommt es häufig zu rezidivierenden narbigen Abheilungen und dadurch zu Verklebungen im Bereich der Eileiter (Malhotra et al. 2013). Dies kann eine extrauterine Schwangerschaft oder eine Sterilität zur Folge haben. Bei betroffenen Männern kann es zu einer sehr schmerzhaften Prostatitis oder Epididymitis kommen. Dadurch kann es ebenso zu einer Sterilität kommen (Paavonen und Eggert-Kruse 1999). Je nach Sexualverhalten kann es auch zu einer Pharyngitis oder Proktitis kommen. Ebenfalls durch die Serotypen D-K verursacht, kann es bei einem Befall der Epithelzellen der Augenbindehaut zu einer Konjunktivitis kommen. Davon sind vor allem Neugeborene nach einer vaginalen Entbindung durch einen infizierten Geburtskanal betroffen (Elwell et al. 2016). Die Serotypen L1 bis L3 verursachen ein Lymphogranuloma venerum. Dabei entsteht an der Infektionsstelle initial eine Primärläsion in Form eines schmerzlosen Bläschens an den Genitalien. Nach 10 bis 30 Tagen kommt es zu einer schmerzhaften Schwellung der inguinalen Lymphknoten. Die Entzündung dieser Lymphknoten heilt narbig ab und kann dadurch Lymphabflussstörungen verursachen. Bei einer Übertragung im Rahmen von Analverkehr kann es zu einer schwerwiegenden ulzerösen Proktitis kommen, die von blutigem Ausfluss, Tenesmen und Fieber begleitet wird. Bei einer chronischen Manifestation können Abszesse und/oder Fisteln entstehen (White 2009; Elwell et al. 2016). Für die Diagnose empfiehlt die deutsche Gesellschaft für sexuell übertragbare Krankheiten den direkten Erregernachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) als die Methode der Wahl, da diese Methode hierfür eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität aufweist (Ossewaarde et al. 1992; Deutsche STI-Gesellschaft 2016). Dafür können Abstriche aus der Urethra, dem Analkanal, dem Pharynx und den Konjunktiven gewonnen werden. Alternativ können Urinproben verwendet werden. Die Serologie stellt eine weitere diagnostische Möglichkeit dar. Allerdings sind die Antikörper gegen *Chlamydia trachomatis* erst nach 6 bis 8 Wochen im Serum nachzuweisen (Deutsche STI-Gesellschaft 2016). Für die Therapie der Infektion kommen laut der aktuellen Leitlinie, je nach Befall und Verlaufsform der

Infektion, verschiedene Antibiotika aus den Gruppen der Tetracykline, der Makrolide und der Chinolone zum Einsatz. Die Dauer der antibiotischen Therapie sollte mindestens 14 Tage betragen. Zusätzlich sollten Sexualpartner mitbehandelt werden, um eine sogenannte Pingpong-Infektion zu vermeiden (Deutsche STI-Gesellschaft 2016).

Zu den häufigsten Komplikationen einer akuten urogenitalen Infektion mit *Chlamydia trachomatis* zählt die reaktive Arthritis. Dabei sind häufig Gelenke der unteren Extremität asymmetrisch betroffen (Zeidler et al. 2004). Darüber hinaus stehen Chlamydien unter Verdacht bestimmte Autoimmunerkrankungen als eine Spätkomplikation auszulösen. Dabei spielen neben molekularer Mimikry andere immunologische Mechanismen, die im Kapitel 1.2.1 erläutert werden, eine große Rolle (Swanborg et al. 2006). Zu diesen Autoimmunerkrankungen gehören die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (Brandén et al. 2007), chronische Arthritis (Bachmaier und Penninger 2005; Swanborg et al. 2006; Carter und Hudson 2017), Sarkoidose (Puolakkainen et al. 1996), Multiple Sklerose (Libbey et al. 2014), Morbus Alzheimer (Holmes und Cotterell 2009) und systemischer Lupus Erythematoses (Fujita et al. 2009). Außerdem konnte in Seren von Patienten mit Schizophrenie eine erhöhte IgG-Antikörper-Konzentration gegen *Chlamydia trachomatis* nachgewiesen werden (Fellerhoff et al. 2007; Park et al. 2012).

1.2 Psychiatrische Krankheiten als Autoimmunkrankheiten

1.2.1 Was versteht man unter einer Autoimmunerkrankung?

Eine Autoimmunerkrankung wird als eine Erkrankung definiert, bei der das Immunsystem fälschlicherweise auf körpereigene Antigene reagiert (Popescu und Kao 2011). Bei einer systemischen Manifestation kommt es zu einer Störung bestimmter Mechanismen, die für die Regulation der Erkennung pathogener Antigene und für die Vermeidung einer Autoimmunreaktion zuständig sind. Außerdem kommt es zu einer überschießenden Entzündungsreaktion ohne jegliche Infektion (Wahren-Herlenius und Dörner 2013). Es gibt mehr als 80 identifizierte Autoimmunerkrankungen (Selgrade et al. 1999). Für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen spielen sowohl genetische Faktoren als auch Umweltfaktoren eine Rolle. Obwohl eine genetische Assoziation für Autoimmunerkrankung als bewiesen gilt, beträgt die Konkordanzrate eineiiger Zwillinge lediglich 20 bis 30 % (Deapen et al. 1992). Daraus resultiert die Annahme, dass es weitere Faktoren, wie beispielsweise Umweltfaktoren, geben muss, die die Auslösung der Erkrankungen in genetisch prädisponierten Patienten hervorrufen. Zu solchen Umweltfaktoren gehören Medikamente, Chemikalien (Chang und Gershwin 2010), Zigarettenkonsum (Nagata et al. 1995; Costenbader et al. 2004), ultraviolette Strahlung (Wahren-Herlenius und Dörner 2013) sowie Infektionserreger (Cooper et al. 1998). Zu den klassischen Beispielen von Autoimmunerkrankungen zählen beispielsweise Diabetes

mellitus Typ 1, Multiple Sklerose, der systemische Lupus erythematodes sowie das rheumatische Fieber. Bei vielen Autoimmunerkrankungen kann es auch zu einer neurologisch-psychiatrischen Manifestation kommen, wie beispielsweise eine neuropsychologische Manifestation beim systemischen Lupus erythematodes (NPSLE) (Popescu und Kao 2011). Zunehmend wird eine autoimmun-entzündliche Komponente auch klassischen psychiatrischen Krankheitsbildern, wie der Schizophrenie, der bipolaren affektiven Störung oder der Depression, zugeordnet (Adams et al. 2012).

1.2.2 Die Rolle der Infektionskrankheiten bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen

1.2.2.1 Bestandteile des Immunsystems und Ablauf einer Immunantwort

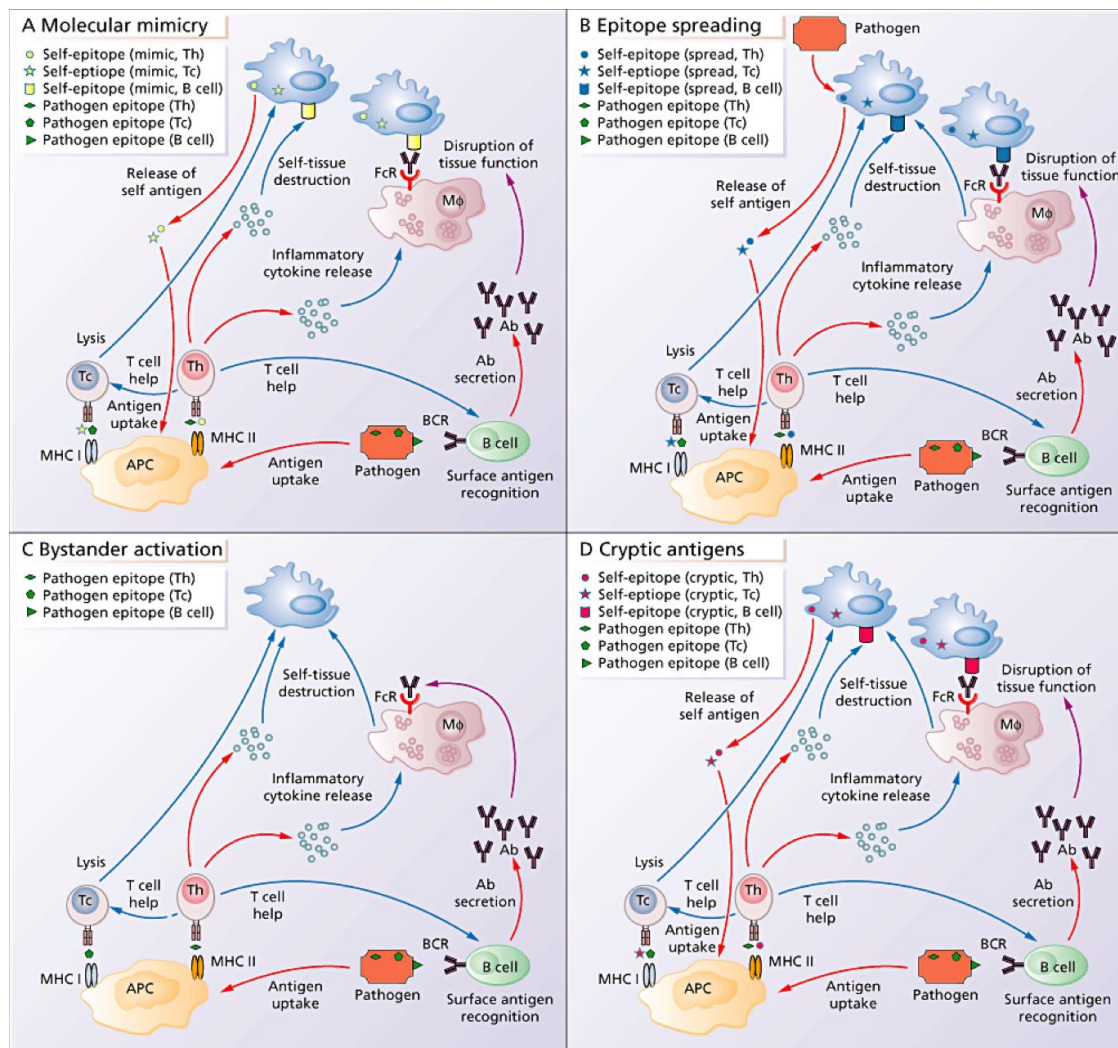
Die Hauptaufgabe des Immunsystems besteht in der Erkennung und Beseitigung pathogener Erreger ohne dabei körpereigenes Gewebe zu schädigen. Dabei kommt es zu einem Zusammenspiel zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Das angeborene Immunsystem erkennt bestimmte molekulare Muster von Krankheitserregern und Toxinen und vermittelt die erste Reaktion auf die Invasion durch Infektionserreger (Chaplin 2010). Neben der physikalischen Barriere gehören Zellen sowie bestimmte Proteine und Moleküle wie Komplementfaktoren und Zytokine zu den Bestandteilen des angeborenen Immunsystems. Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören Granulozyten, Mastzellen und Monozyten. Die Granulozyten werden in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten eingeteilt. Monozyten differenzieren sich nach dem Verlassen der Blutbahn weiter zu Makrophagen oder dendritischen Zellen. Neutrophile Granulozyten sind phagozytierende Zellen, die bei einer Aktivierung Interleukin-8 (IL-8) und Tumornekrosefaktor (TNF) produzieren und so die erste Reaktion auf die Erregerinvasion auslösen (Chaplin 2010). Makrophagen sind ebenso phagozytierende Zellen, die bei einer pro-inflammatorischen Aktivierung durch T-Helferzellen vom Typ 1, Interferon- γ , IL-6, IL-12 und TNF- α produzieren. Alternativ können Makrophagen von T-Helferzellen vom Typ 2 (Th2-Zellen) anti-inflammatorisch aktiviert werden. Dabei produzieren sie anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10, IL-1, IL-1RA und *transforming growth factor* β (TGF- β). Durch die Phagozytose von Erregern können dendritische Zellen mikrobielle Antigene verarbeiten und an ihrer Zelloberfläche präsentieren. Diese Antigene werden von T-Zellrezeptoren gebunden und es kommt zur Aktivierung von T-Zellen. So dienen dendritische Zellen als Bindungsglied zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem (Chaplin 2010; Suvisaari und Mantere 2013). Neben T-Lymphozyten gehören zusätzlich B-Lymphozyten zum erworbenen Immunsystem. T-Lymphozyten werden anhand ihrer immunphänotypischen Oberflächenmerkmale (CD engl. für *Cluster of Differentiation*) in CD8- und CD4-positive T-Lymphozyten eingeteilt. Zu den CD8⁺ T-Zellen gehören cytotoxische T-

Lymphozyten, die intrazelluläre Erreger und Tumorzellen angreifen, sowie regulatorische T-Lymphozyten, die die Immunreaktion herabregulieren und somit für die Immuntoleranz und die Prävention von Autoimmunität von großer Bedeutung sind. Zu den CD4⁺ T-Lymphozyten gehören T-Helferzellen (Th, Chaplin 2010). Diese werden wiederum in Th1, Th2- und Th17-Zellen eingeteilt. Th1-Zellen stimulieren die Immunreaktion durch die Freisetzung von Interferon- γ . Th2-Zellen stimulieren unter anderem die Transformation von B-Zellen zu Plasmazellen durch die Freisetzung von Interleukinen. Th17-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von extrazellulären Erregern und Pilzinfektionen. Die Hauptaufgabe der B-Lymphozyten besteht in der Produktion von Antikörpern, die als Immunglobuline (Ig) bezeichnet werden. Durch die Aktivierung von T-Helferzellen differenzieren sich die B-Lymphozyten weiter zu Plasmazellen oder zu sog. Gedächtnis-B-Zellen, die bei einer Reinfektion mit den gleichen Erregern entsprechende Antikörper produzieren können (Chaplin 2010; Suvisaari und Mantere 2013). Bei einer Infektion werden Antigene von Erregern durch sogenannte antigenpräsentierende Zellen (APC engl. für *Antigene Presenting Cells*), wie bspw. dendritische Zellen, phagozytiert. Anschließend werden diese Antigene zu Peptiden verarbeitet und auf sog. *major histocompatibility complex* (MHC)-Moleküle geladen. Dadurch können diese Antigene T-Zellen präsentiert werden. Mithilfe von T-Zellrezeptoren (TCR engl. für *T Cell Receptor*) werden die MHC-Moleküle gebunden und es kommt zur Aktivierung der jeweiligen T-Zelle. Zytotoxische T-Zellen werden durch MHC-Moleküle der Klasse I aktiviert und führen zu einer Lyse der betroffenen Zelle. T-Helferzellen werden durch MHC-Moleküle der Klasse II aktiviert und aktivieren wiederum Makrophagen, Monozyten und B-Zellen (Ercolini und Miller 2009). Im Rahmen der Immunantwort kann es zu einem immunologischen Angriff auf das eigene Gewebe kommen. Hierbei spricht man von einer Autoimmunreaktion (Popescu und Kao 2011).

1.2.2.2 Mechanismen für die Entstehung einer Autoimmunreaktion durch den Einfluss von Erregern

Für die Entstehung von Autoimmunreaktionen durch den Einfluss von Erregern existieren verschiedene Hypothesen. Ercolini und Miller (2009) beschreiben in Ihrer Übersichtsarbeit vier Mechanismen, durch die autoimmune Zellen aktiviert werden können und somit eine Autoimmunreaktion ausgelöst werden kann, siehe Abbildung 1.3. So kann es im Rahmen einer Immunantwort auf persistierende Erreger zu einer Freisetzung von Antigenen aus geschädigtem körpereigenem Gewebe kommen, die von antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen werden und anschließend eine spezifische Autoimmunreaktion auslösen. Hierbei spricht man von sog. *epitope spreading* (engl. für Epitop-Verbreitung). Die Hypothese der sog. *bystander activation* (engl. für Dabeistehenden-Aktivierung) beschreibt eine nicht-spezifische Aktivierung von

autoimmunen Zellen. Durch die anhaltende Entzündungsreaktion im Rahmen einer aktiven Infektion kommt es zur Schädigung von nicht-infizierten Zellen und zur Gewebsschädigung. Dabei werden körpereigene Antigene freigesetzt, die wiederum autoimmun Zellen aktivieren können (Ercolini und Miller 2009). Die sog. *cryptic antigens* (engl. für kryptische Antigene) sind subdominante Antigene, die dem Immunsystem unter normalen Bedingungen nicht präsentiert werden. Im Rahmen der Entzündungsreaktion kommt es zu einer vermehrten Produktion von Proteasen. Dies führt zu einer vermehrten Aufnahme und Verarbeitung der körpereigenen Epitope durch antigen-präsentierende Zellen des Immunsystems, die wiederum mithilfe solcher Antigene autoimmun Zellen aktivieren können. Außerdem kann durch das sog. *molecular mimicry* (engl. für molekulare Mimikry) eine Aktivierung von autoimmunen Zellen stattfinden. Durch die Ähnlichkeit von Erreger-Antigenen und körpereigenen Antigenen in der Aminosäuresequenz oder in der molekularen Struktur kann es zu einer Wechselreaktion kommen. Diese beschreibt die Erkennung von körpereigenen Antigenen als körperfremd aufgrund einer molekularen Ähnlichkeit. Darauf folgt eine autoimmun Reaktion. Dies führt zu einer Schädigung des jeweiligen Gewebes und zu einer zusätzlichen Freisetzung von körpereigenen Antigenen sowie zu einer vermehrten Aktivierung von autoimmunen Zellen (Ercolini und Miller 2009). Eine der ersten Arbeiten über molekulare Mimikry ist die Arbeit von Zabriskie und Freimer (1966). Sie beschreibt eine molekulare Ähnlichkeit zwischen bakteriellen und humanen Proteinen aufgrund derer es zu einer Wechselwirkung zwischen antibakteriellen Antikörpern und Proteinen der Herzmuskelzellen kommt. Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass bakterielle Infektionen durch den Mechanismus der molekularen Mimikry zu einer Aktivierung autoimmuner B-Zellen führen können und somit die Produktion von autoimmunen Antikörpern induzieren. Mehrere Autoimmunerkrankungen sind mit vorausgegangenen bakteriellen Infektionen assoziiert. Dazu zählen unter anderem die rheumatoide Arthritis, das rheumatische Fieber, die Multiple Sklerose sowie weitere neurologische und psychiatrische Erkrankungen (Oldstone et al. 1999; Li et al. 2013; Berer und Krishnamoorthy 2014).



© 2009 British Society for Immunology

Abbildung 1.3: Schematische Darstellung für mögliche Mechanismen für die Entstehung einer durch Infektionserreger beeinflusste Autoimmunreaktion (Ercolini und Miller 2009). Der Abdruck erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Autoren und des Wiley-Verlags.

1.2.3 Schizophrenie als eine Autoimmunkrankheit

Schizophrenie ist eine neuropsychiatrische Erkrankung, die mit schweren Beeinträchtigungen des Verhaltens und damit der Lebensqualität der betroffenen Patienten und deren Familien einhergeht. Zusammen mit einigen anderen psychischen Erkrankungen wie der Depression und der bipolaren Störung gehört die Schizophrenie zu einer Gruppe neuropsychiatrischer Erkrankungen, die nicht ausschließlich durch psychodynamische Effekte, sondern auch durch Störungen der organischen Hirnfunktion verursacht sind (Harland et al. 2009; Kahn und Sommer 2015). In Übereinstimmung damit wird vermutet, dass es sich bei der Schizophrenie, welche bei etwa 0,5% der Bevölkerung mindestens einmal im Leben diagnostiziert werden kann (Simeone et al. 2015), um eine multifaktorielle Erkrankung handelt.

1.2.3.1 Symptome und mögliche Ursachen der Schizophrenie

Charakteristisch für diese Erkrankung sind einerseits sog. positive Symptome wie Wahnvorstellungen, bizarres Denken und Illusionen, andererseits treten aber mit zunehmender Erkrankungsdauer vor allem negative Symptome wie Antriebslosigkeit, soziale Isolierung und Affektverflachung in den Vordergrund (Tandon et al. 2009).

Den Symptomen der Schizophrenie konnten mittlerweile auch eine ganze Reihe makro- und mikrostruktureller Veränderungen des Gehirns zugeordnet werden, wie z.B. eine Erweiterung der Ventrikel und eine Abnahme der kortikalen Dicke (Harrison 1999). Im Gegensatz dazu konnten die der Erkrankung ursächlich zugrundeliegenden molekularen Mechanismen bislang nur unzureichend geklärt werden. Ein erster Anlauf dazu ergab sich aus der klinischen Tatsache, dass in den Fünfziger- und Sechzigerjahren des vergangenen Jahrhunderts sog. neuroleptisch wirkende Medikamente eine erste effektive medikamentöse Behandlungsmöglichkeit schizophrener Patienten eröffneten. Schon bald stellte sich nämlich heraus, dass die Hauptwirkung dieser Medikamente in einer Inhibition verschiedener aminerg Neurotransmitter-Rezeptoren bestand, von denen wohl der Typ2 Dopamin-Rezeptor der wichtigste zu sein scheint (Boyd und Mailman 2012). Dies Befunde bildeten die Basis für die sog. Dopamin-Hypothese der Schizophrenie, laut derer Veränderungen in Expression und Funktion dopaminerger Neurotransmitter-Rezeptoren für die Krankheitsentstehung ursächlich zu sein scheinen (Meltzer und Stahl 1976).

Neben der Dopamin-Hypothese der Schizophrenie haben sich im Laufe der Zeit noch verschiedene weitere Hypothesen zur Krankheitsentstehung herausgebildet, von denen aber keine in der Lage ist, alle Aspekte der Erkrankung und die beobachteten Wirkungen therapeutischer Maßnahmen zu erklären. Eine dieser Hypothesen ist die sog. neuronale Entwicklungshypothese der Schizophrenie (Murray et al. 1992), die aufgrund verschiedener Befunde postuliert, dass es sich bei der Schizophrenie wohl um eine Erkrankung handelt, deren Beginn schon vor der Geburt und dabei vermutlich bereits im ersten Schwangerschaftsdrittel anzunehmen ist. Weiter postuliert diese Hypothese, dass die Ursachen dieser Erkrankung wohl in Störungen der neuronalen Entwicklung bestehen, welche aufgrund der hieraus resultierenden Veränderungen in der neuronalen Architektur des Gehirns im Laufe des Lebens zusammen mit weiteren Auslösern zum späteren Ausbruch der Krankheitssymptome führen (Murray et al. 1992).

Auf molekularer Ebene spielen als Ursachen der gestörten Gehirnentwicklung, wie sie bei schizophrenen Erkrankungen beobachtet werden kann, wohl auch genetische Veränderungen eine Rolle wie sie in den vergangenen Jahren und Jahrzehnten bei einer langen Reihe von Kandidatengenomen gezeigt werden konnten (Hosák et al. 2012; Giusti-Rodríguez und Sullivan 2013). Solche Genvarianten konnten z.B. für die Gene COMT (Williams et al. 2007), PRODH (Ota et al. 2014) und ZDHHC8 (Mukai et al. 2004)

nachgewiesen werden, die durch Analyse von Varianten in einem bekannten schizophrenierelevanten Chromosomenabschnitt, die 11q-Region auf Chromosom 22, entdeckt wurden (Bassett et al. 1998). Ein anderes bekanntes Schizophrenie-Kandidatengen ist *DISC1*, das seine Klassifizierung als solches der Tatsache verdankt, dass manche seiner Varianten in einer schottischen Familie mit dem häufigen Auftreten schizophrener Psychosen korreliert (Blackwood et al. 2001). Ebenfalls aufgrund von Analysen an bekannten Schizophrenie-relevanten Chromosomenlokalisationen wurden Gene wie *CHRNA7*, *DAO*, *DAOA*, *DTNBP1*, *NOTCH4* und *PPP3CC* identifiziert (Farrell et al. 2015). Aufgrund ihrer Rolle für Schizophrenie-relevante Stoffwechselprozesse wurden Gene wie *AKT1*, *APOE*, *BDNF*, *DRD2*, *DRD3*, *DRD4*, *GRM3*, *HTR2A*, *KCNN3*, *MTHFR*, *RGS4*, *SLC6A3*, *SLC6A4*, *TNF* und *ZDHHC8* als Schizophrenie Kandidaten identifiziert (Farrell et al. 2015). Als weitere Schizophrenie-Kandidaten sind außerdem noch verschiedene synaptische Proteine bekannt, wie *SYT1*, sowie *Snap23* die beide bei prä- bzw. postsynaptischen Übertragungsmechanismen eine Rolle spielen (Hemby et al. 2002; Baker et al. 2018).

1.2.3.2 Zusammenhang zwischen Schizophrenie und Infektionskrankheiten

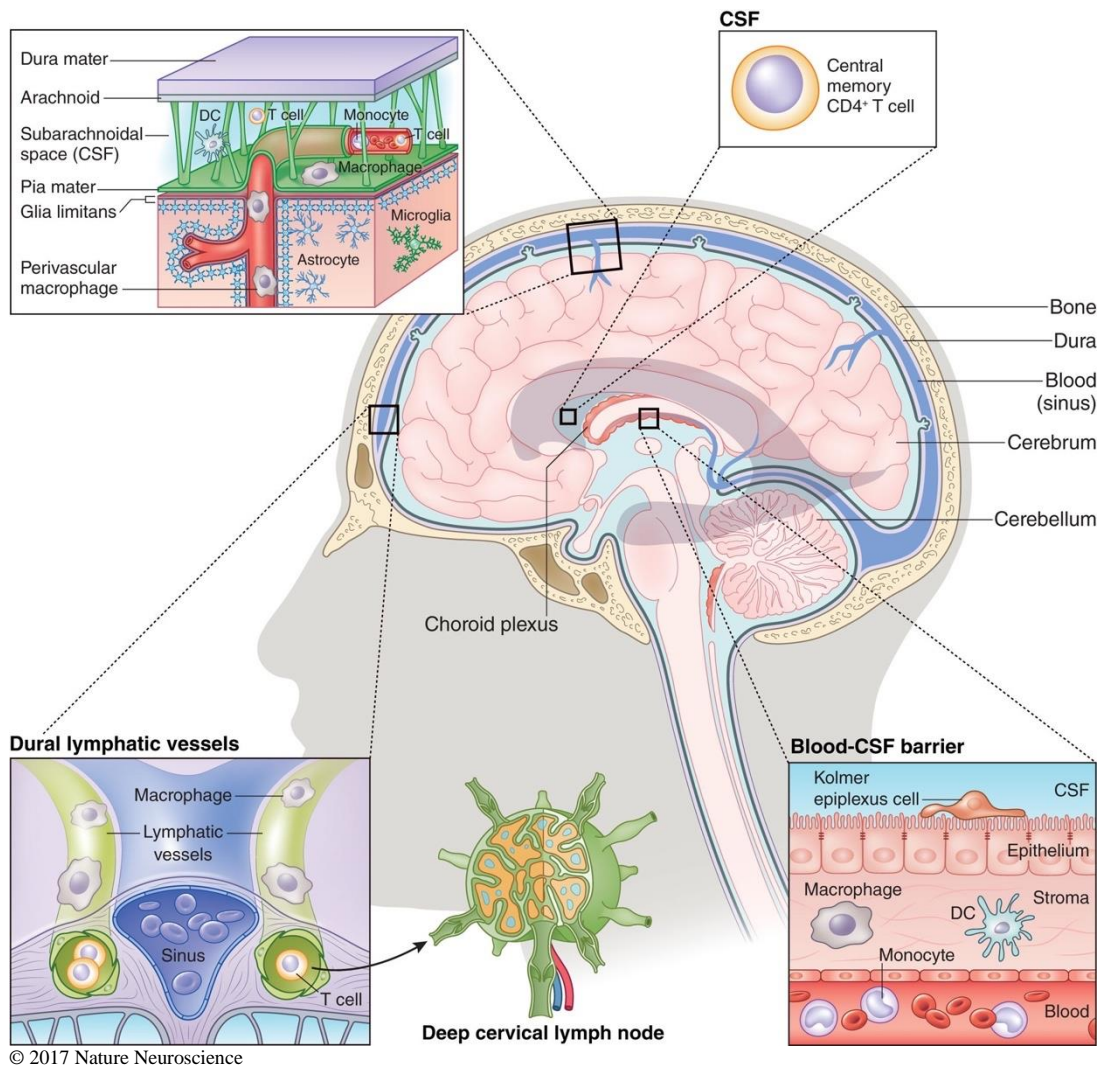
Trotz dieser ersten Erfolge genetischer Studien zeigte sich jedoch, dass es bei betroffenen Patienten keine Korrelation bestimmter Kandidatengene mit dem Auftreten schizophrener Psychosen gibt sondern dass die Zusammenhänge wohl aufgrund zusätzlicher, vermutlich umweltbedingter Ursachen, wesentlich komplexer sind als ursprünglich angenommen (Papiol et al. 2011). Zwei dieser Umweltfaktoren für den Ausbruch der Erkrankung scheinen dabei in pränatalen Infektionen sowie in Komplikationen während des Geburtsvorgangs zu liegen. Zur Klärung der Rolle pränataler Infektionen als mögliche Ursache für die Schizophrenie wurden verschiedene virale Pathogene wie z.B. das Herpes simplex Virus und das Influenza A Virus bereits eingehend untersucht ebenso wie verschiedene eukaryontische Parasiten wie z.B. *Toxoplasma gondii* (Khandaker et al. 2013). Aktuell geraten auch wieder zunehmend bakterielle Infektionen, welche bereits in den Anfängen psychiatrischer Forschung als Ursachen der Schizophrenie in Verdacht standen (Noll 2004; Noll 2007), erneut in den Fokus der wissenschaftlichen Aufmerksamkeit (Khandaker et al. 2013). So konnten populationsgenetische Studien zeigen, dass maternale pränatale Infektionen mit dem Gram-negativen Bakterium *Neisseria gonorrhoeae* (NG) mit einem erhöhten Risiko der Nachkommen einhergeht, später im Leben an einer schizophrenen Psychose zu erkranken. Die Untersuchungen von Babulas et al. (2006) zeigten eine Wahrscheinlichkeitserhöhung von 5,03 mit einem 95 %-Konfidenzintervall von 2.00-12.64. Ebenso konnten die Untersuchungen von Sørensen et al. (2009) eine Wahrscheinlichkeitserhöhung von 3,41 mit einem 95 %-Konfidenzintervall von 1.36–8.57 zeigen. NG ist vor allem als Ursache akuter und subakuter Infektionen des

weiblichen und männlichen Genitaltrakts (Gonorrhoe), sowie als Auslöser der sog. Neugeborenen-Konjunktivitis (MacDonald et al. 2008) bekannt. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass im Serum betroffener Patientinnen NG-spezifische Antikörper auftreten (Hoffman et al. 1979). Da solche Antikörper, insbesondere wenn sie vom IgG-Typ sind, die Plazentabariere überwinden können (Ben-Hur et al. 2005), besteht die Hypothese der vorliegenden Arbeit darin, dass NG-spezifische Antikörper aufgrund von molekularer Mimikry mit bestimmten Antigenen des fetalen Gehirns interagieren können und so eine Störung der neuronalen Differenzierung als Folge einer solchen maternalen Infektion auslösen können (Almamy et al. 2017a).

1.2.4 Die Neuropsychiatrische Manifestation des Systemischen Lupus Erythematoses (NPSLE)

Der systemische *Lupus erythematoses* ist eine systemische Autoimmunerkrankung, bei der es zu einer Schädigung verschiedener körpereigener Gewebe durch das eigene Immunsystem kommt (Danченко et al. 2006). Die Prävalenz der Erkrankung ist stark von der ethnischen Gruppe abhängig und variiert zwischen 20 bis 70 Fälle pro 100.000 Einwohner (Danченко et al. 2006; Lisnevskaja et al. 2014). Das klinische Erscheinungsbild der Krankheit ist abhängig vom betroffenen Gewebe. Häufig ist die Niere von der Autoimmunreaktion betroffen. Durch die Schädigung der Glomeruli kommt es zu einem vermehrten Proteinverlust über den Urin. Dies wird als Proteinurie bezeichnet. Ebenso häufig kommt es zu einer Hautbeteiligung. Je nach Befallsmuster und Dauer der Erkrankung werden verschiedene Unterformen des kutanen Lupus unterschieden. Krankheitstypisch ist eine Rötung im Bereich des Gesichts, ein sog. Schmetterlingserythem. Außerdem können Schleimhäute von der Entzündungsreaktion betroffen sein. Hierbei kommt es zu einer Serositis und/oder einer Bildung von Ulcera. Kommt es zu einer Beteiligung des Nervensystems, dann spricht man von einem neuropsychiatrischen systemischen *Lupus erythematoses* (Lisnevskaja et al. 2014). Eine Leitlinie des *American College of Rheumatology* (ACR) definiert 19 neurologische und psychiatrische Symptome als SLE-assoziiert. Zu den zentralen Symptomen zählen unter anderem Kopfschmerzen, epileptische Anfälle, zerebrovaskuläre Ereignisse sowie Angststörungen und Psychosen. Zu den das periphere Nervensystem betreffenden Symptomen, zählen unter anderem Polyneuropathien, Myasthenia gravis und das Guillain-Barré-Syndrom (Lupus Nomenclature 1999). Mehr als 40 % der Patienten mit dem systemischen *Lupus erythematoses* leiden unter einer neuropsychiatrischen Beteiligung (Meszaros et al. 2012). Die Diagnose des neuropsychiatrischen systemischen *Lupus erythematoses* (NPSLE) ist häufig eine Ausschlussdiagnose (Borchers et al. 2005). Die Ursachen für die Entstehung des systemischen *Lupus erythematoses* sind nicht vollständig geklärt. Man geht von einer multifaktoriellen Genese aus. Dabei spielen die genetische Prädisposition und der Einfluss von Umweltfaktoren eine große Rolle. Die

Genmutationen, die mit SLE assoziiert sind, betreffen unter anderem Gene für das Protein Integrin α M, den Fc- γ -Rezeptor von Immunglobulinen und das TNF- α -induzierte Protein 3 (Guerra et al. 2012). Durch diese Mutationen kommt es zu einer Produktion von Autoantikörpern, wie anti-nukleäre Antikörper (ANA), Anti-Cardiolipin-Antikörper (ACA) und Doppelstrang-DNA-Antikörper (Anti-dsDNA), die wiederum eine systemische inflammatorische Reaktion hervorrufen (Lisnevskaja et al. 2014). Häufig sind zudem anti-ribosomale Antikörper in den Seren von Patienten mit NPSLE nachweisbar. Dabei handelt es sich um Antikörper gegen die ribosomalen Proteine P0, P1 und P2 (Toubi und Shoenfeld 2007). Auto-Antikörper gegen das ribosomale Protein Rps27a konnten in einem SLE-Mausmodell nachgewiesen werden (Gutjahr et al. 2005). Für die neuropsychiatrische Manifestation von SLE spielen mehrere Mechanismen eine Rolle. Durch die Antikörper-induzierte Entzündungsreaktion kann es zu einer Vaskulitis, einer Thrombenbildung oder Hämorrhagien in den betroffenen Gehirnarealen kommen (Vadacca et al. 2006). Außerdem konnten mehrere Studien eine Beteiligung des *Plexus choroideus*, die mit einer funktionellen Beeinträchtigung der Liquorproduktion einhergehen, belegen (Sher und Pertschuk 1974; Gershwin et al. 1975; Duprez et al. 2001; Amaro und Scheinberg 2009). Der *Plexus choroideus* ist in den Gehirnventrikeln lokalisiert und besteht aus spezialisierten Ependymzellen und einem Gefäßgeflecht, siehe Abbildung 1.4. Hier findet eine Ultrafiltration des Blutes statt. Das Resultat dieser Ultrafiltration ist die Produktion des *Liquor cerebrospinalis*, durch den die Zellen des zentralen Nervensystems mit Nährstoffen, Hormonen und Wachstumsfaktoren versorgt werden (Johanson et al. 2011; Damkier et al. 2013). Außerdem besteht eine weitere Aufgabe des *Plexus choroideus* in der Entgiftung und Elimination schädlicher Stoffe aus dem *Liquor cerebrospinalis* (Strazielle und Ghersi-Egea 1999).



© 2017 Nature Neuroscience

Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Aufbaus und der Lokalisation des *Plexus choroideus* sowie zirkulierender Zellen des Immunsystems in den Liquorräumen und im zentralen Nervensystem (Prinz und Priller 2017). Der Abdruck erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Autoren und des Springer Nature-Verlags.

1.3 Ausgewählte Proteine und ihre Rolle als mögliche Antigene bei neuropsychiatrischen Autoimmunerkrankungen

1.3.1 SNARE-Proteine und ihre Rolle für die Exocytose

Unter Exocytose versteht man die aktive Ausschleusung intrazellulärer Stoffe, welche zuvor in Vesikeln gespeichert und durch Fusion mit der Zellmembran freigesetzt werden. Für diesen Vorgang spielt die Interaktion zwischen Vesikel-assoziierten Membranproteinen (VAMPs), wie Synaptobrevin, und Zellmembran-assoziierten Proteinen, wie Syntaxin, eine zentrale Rolle (Lang und Jahn 2008). An neuronalen Synapsen vermitteln sog. SNARE-Komplexproteine, wie Snap25, diese Interaktion durch

Bildung eines Proteinkomplexes, der die Fusion der vesikulären Membran mit der Zellmembran vermittelt (Wang und Tang 2006). In nicht-neuronalen Zellen sowie an der postsynaptischen Membran von Nervenzellen wird diese Funktion von dem Protein Snap23 übernommen, das ebenfalls mit verschiedenen Proteinen des Syntaxin- bzw. Synaptobrevin-Typs interagiert (Suh et al. 2010; Zylbersztejn und Galli 2011). Neben seiner Funktion für die vesikuläre Exozytose spielt Snap23 auch noch zusätzlich eine Rolle beim Einbau integraler Membranbausteine in die Zellmembran, wie z.B. beim Einbau von Rezeptoren und Transportern (Grusovin und Macaulay 2003; Grassi et al. 2015).

Aufgrund seiner Rolle beim Einbau integraler Membranproteine spielt Snap23 wohl auch eine Rolle für die synaptische Übertragung, indem es für die Ausschleusung, den Einbau und die Wiederaufnahme von Neurotransmitter-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran verantwortlich ist (Suh et al. 2010). Übereinstimmend damit ist Snap23 auch im Bereich von Synapsen an den Dornen der Dendriten von Neuronen des Hippocampus stark exprimiert und ein Verlust dieses Proteins kann die Funktion der dort lokalisierten NMDA-Rezeptoren stark beeinträchtigen (Suh et al. 2010). In die gleiche Richtung weist auch die Tatsache, dass Snap23 in postmortalen Gewebeproben des entorhinaler Kortex schizophrener Patienten, besonders in den Interneuron-Sternzellen, verändert ist (Hemby et al. 2002). Snap23 ist ein Transmembranprotein. Autoantikörper, die gegen dieses Protein gerichtet sind, könnten exozytotische Vorgänge in allen exprimierenden Zellen hemmen und dadurch allgemein den Einbau von Membranproteinen stören. Im ZNS könnte sich eine solche Störung dann vor allem an der postsynaptischen Membran bemerkbar machen, die aufgrund dieser Störung einen verminderten Besatz mit Neurotransmitter-Rezeptoren zeigen könnte. Dies könnte sich im Hippocampus z.B. auch auf den Einbau von NMDA-Rezeptoren auswirken, von denen bereits bekannt ist, dass sie für die Entstehung der Schizophrenie eine wichtige Rolle spielen (Olney und Farber 1995; Kayser und Dalmau 2016).

Ein weiterer zellulärer Mechanismus, bei dem die Snap23-abhängige Exozytose eine Rolle spielt, ist die insulinabhängige Membran-Translokation des Glucose-Transporters GLUT-4 (Foster et al. 1999; Kawanishi et al. 2000). GLUT-4 wird vor allem in Fettgewebe gebildet, ist jedoch auch im Gehirn nachweisbar (Kobayashi et al. 1996; El Messari et al. 1998; Strauss et al. 2016). Ist der Insulin-Spiegel im Blut niedrig wird der GLUT-4 Transporter in intrazellulären Vesikeln gespeichert, während er nach einem Anstieg des Insulins in die Plasmamembran eingebaut wird. Dadurch erhöht sich die Aufnahme von Glucose, die durch erleichterte Diffusion entlang ihres Konzentrationsgradienten erfolgt (Gannon et al. 2015). Ein wichtiger Schritt bei der Membran-Translokation ist die Bindung und Fusion der GLUT-4-bestückten Vesikel mit der Zellmembran (Kawaguchi et al. 2010). Da dieser Vorgang bereits in SH-SY5Y-Zellen, eine neuronale Zelllinie aus einem humanen Neuroblastom, gezeigt worden ist

(Benomar et al. 2006), wurde diese Zelllinie in der vorliegenden Arbeit eingesetzt, um einen möglichen Effekt von Antikörpern gegen NG auf die Exozytose von GLUT-4 bei der insulinabhängige Membran-Translokation zu untersuchen (Almamy et al. 2017a).

1.3.2 Tetraspanin-7 und seine Rolle für die Entwicklung und Plastizität exzitatorischer Synapsen

Als Transmembranproteine spielen die Mitglieder der Tetraspanin-Familie eine wichtige Rolle für Morphologie, Beweglichkeit und Signaltransduktion von Zellen des Gehirns, des Immunsystems und in Tumoren (Boucheix et al. 2001; Hemler 2005). Im Gehirn scheint das Tetraspanin Tspan7 eine zentrale Rolle für Gedächtnis und kognitive Funktion zu spielen, wo es in Neuronen des frontalen Cortex, des Bulbus olfactorius, des zerebellären Cortex, des Putamens, sowie der CA3-Region und des Gyrus dentatus als Teile des Hippocampus zu finden ist (Zemni et al. 2000). Die Tatsache, dass die Expression von Tspan7 im Hippocampus nach einer Behandlung mit Kainat deutlich erhöht ist, weist zudem darauf hin, dass dieses Protein eine Rolle für die synaptische Plastizität spielt (Boda et al. 2002). In die gleiche Richtung weist die Tatsache, dass Tspan7 eine Rolle für Transport und Einbau des AMPA Rezeptors in die Zellmembran hippocampaler Neuronen spielt (Bassani et al. 2012).

Bei Erkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS) konnte gezeigt werden, dass aufgrund der Lokalisation von Tspan7 auf dem X-Chromosom, Tspan7 eines der Moleküle darstellt, dessen Mutation bei der Entstehung der sog. X-gekoppelten mentalen Retardierung eine Rolle spielt (Bassani et al. 2012). Daneben ist der Chromosomenbereich, auf dem sich das *TSPAN7*-Gen befindetet, die Region p11.4 des X-Chromosoms, auch als eine Region mit positiver Korrelation zum Ausbruch schizophrener Psychosen bekannt (Dann et al. 1997). Schließlich stellt Tspan7 auch ein mögliches Autoantigen bei Patienten mit Typ I Diabetes dar (Walther et al. 2016). Erst kürzlich konnte zudem in kultivierten striatalen Neuronen gezeigt werden, dass Tspan7 mit dem Typ2 Dopamin-Rezeptor (D2DR) direkt interagiert (Lee et al. 2017) und, dass diese Interaktion für die Steuerung der Membranexposition dieses Rezeptors eine wichtige Rolle spielt. Dabei scheint Tspan7 die Internalisierung des Rezeptors zu fördern, so dass eine verminderte Expression von Tspan7 zu einer vermehrten Membranexposition von D2DR und damit einer erhöhten Dopaminsensitivität der betroffenen Nervenzellen führt (Lee et al. 2017). Dies eröffnet die Möglichkeit, dass Autoantikörper gegen das Tspan7-Protein zu einer erhöhten Dopaminsensitivität im Gehirn betroffener Patienten führen können, vorausgesetzt diese Autoantikörper können die Blut-Hirn-Schranke überwinden, um so Zugang zu neuronalen Synapsen zu haben.

1.3.3 Selenoprotein-H als wichtiger Regulator der zellulären Antwort auf oxidativen Stress

Selenoproteine gehören zu einer Familie überwiegend antioxidierend wirkender Proteine, die durch ihren Gehalt an Selenocystein, einer besonderen Form des Cysteins, die auch als 21. Aminosäure bezeichnet wird, charakterisiert sind (Hatfield et al. 2006; Labunsky et al. 2007). Sie stellen dadurch ein wichtiges Glied im Redox-Stoffwechsel des menschlichen Körpers und dabei insbesondere des Gehirns dar (Kim und Gladyshev 2007). Aufgrund dieser Eigenschaften stellen die Selenoproteine die vorderste Verteidigungslinie gegen oxidativen Stress, insbesondere des ZNS, dar (Pitts et al. 2014). Von daher ist ein Selenmangel auch häufig mit Störungen der Gehirnentwicklung und neurologischen Erkrankungen assoziiert (Chen und Berry 2003). Insbesondere parvalbuminhaltige Interneurone scheinen davon betroffen zu sein (Wirth et al. 2010). Eine veränderte Expression von Selenoproteinen wurde auch bei verschiedenen neurodegenerativen und neuropsychiatrischen Erkrankungen festgestellt, wie beim Morbus Alzheimer (GPx1, GPx4, Thioredoxin Reduktase, SelM, SelP) der Chorea Huntington (GPx6) und der Epilepsie (TrX1, SelT, SelW) (Pillai et al. 2014). Hinweise darauf, dass auch bei schizophrenen Patienten Expression und Funktion von Selenoproteinen verändert sind, beruhen auf der Tatsache, dass bei diesen Patienten sowohl in peripheren Blutzellen als auch in postmortalen Gehirnproben eine erhöhte Expression des Gens *SELENBP1* für das Selen-bindende-Protein gemessen werden kann (Glatt et al. 2005). Diese erhöhte Expression von *SELENBP1* deutet auf eine geringere Verfügbarkeit von Selen und damit von Selenoproteinen im ZNS schizophrener Patienten hin. Zudem scheinen bestimmte Haplotypen des *SELENBP1*-Gens bei schizophrenen Patienten und ihren Familienangehörigen gehäuft aufzutreten (Kanazawa et al. 2009).

Selenoprotein-H (SelH) ist ein vergleichsweise kleines Protein von 14 kDa, das keine Homologien zu bekannten funktionellen Proteindomänen aufweist. Aufgrund partieller Ähnlichkeiten mit Thioredoxin wird vermutet, dass SelH eine Redox-Funktion zukommt. Aufgrund seiner Lokalisation in Zellkern und Nukleolus wird eine Funktion als Redox-sensitives Steuerungsprotein für die nukleäre und nukleoläre RNA-Synthese vermutet (Novoselov et al. 2007). Während SelH in Geweben adulter Mäuse nur schwach exprimiert ist, wird es während der Entwicklung stark exprimiert und konnte auch in verschiedenen humanen Krebszelllinien in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden (Novoselov et al. 2007). Durch Überexpression in hippocampalen HT22-Zellen konnte zudem gezeigt werden, dass es sich bei SelH um einen Redox-sensitiven Transkriptionsfaktor handelt (Panee et al. 2007). Dadurch wird die Expression von Enzymen und Proteinen wie Glutamyl-Cystein-Synthetase und die Glutathion S-Transferasen Alpha2, Alpha4, und Omega1 induziert, deren Funktion in der Abpufferung und dem Abbau reaktiver Sauerstoffspezies besteht (Panee et al. 2007). Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei HT22-Zellen um einen Klon parvalbuminpositiver Neurone

handelt, kann man vermuten, dass durch eine Gonokokkeninfektion induzierte Autoantikörper gegen SelH auch die Vitalität parvalbuminpositiver Interneurone beeinträchtigen können.

1.3.4 Das ribosomale Protein Rps27a und seine mögliche Rolle bei der Entstehung des SLE

Ribosomen sind hochorganisierte intrazellulär vorkommende RNA-Proteinkomplexe, an denen die Synthese von Proteinen abläuft, d.h., dass dort die Translation der auf der Boten-RNS (mRNA) in Form sog. Codons gespeicherten Information in entsprechende Polypeptidketten stattfindet. Ribosomen bestehen jeweils aus einer großen und einer kleinen Untereinheit die bei eukaryoten Zellen einen Sedimentationskoeffizienten von 60 bzw. 40 Svedberg (S) aufweisen und von daher auch als 60 S- bzw. 40 S-Untereinheit bezeichnet werden (Ramakrishnan 2002). Am Beginn der Translation lagern sich dabei zunächst eine große und eine kleine Ribosomen-Untereinheit mit einer mRNA und einer Starter-Transfer-RNA (tRNA) sowie verschiedene Initiationsfaktoren zu einem Initiationskomplex zusammen. Anschließend startet die Proteinbiosynthese unter Verbrauch von GTP (Guanosintriphosphat). Durch ein sog. Stop-Codon auf der mRNA kommt die Translation zum Abschluss, worauf der ribosomale Komplex von der mRNA dissoziiert und in seine Untereinheiten zerfällt (Ramakrishnan 2002). Auch die ribosomalen Untereinheiten sind ihrerseits wieder aus einer größeren Zahl von Einzelproteinen aufgebaut, die mittlerweile vorwiegend anhand einer von Ban et al. (2014) vorgeschlagenen Nomenklatur klassifiziert werden. So handelt es sich bei Rps27a um ein Protein der kleinen (40 S) Untereinheit der eukaryotischen Ribosomen (Redman und Rechsteiner 1989), das bei seiner Synthese zunächst zusammen mit Ubiquitin als Fusionsprotein hergestellt wird, von dem es anschließend durch enzymatische Spaltung freigesetzt wird (Komander et al. 2009).

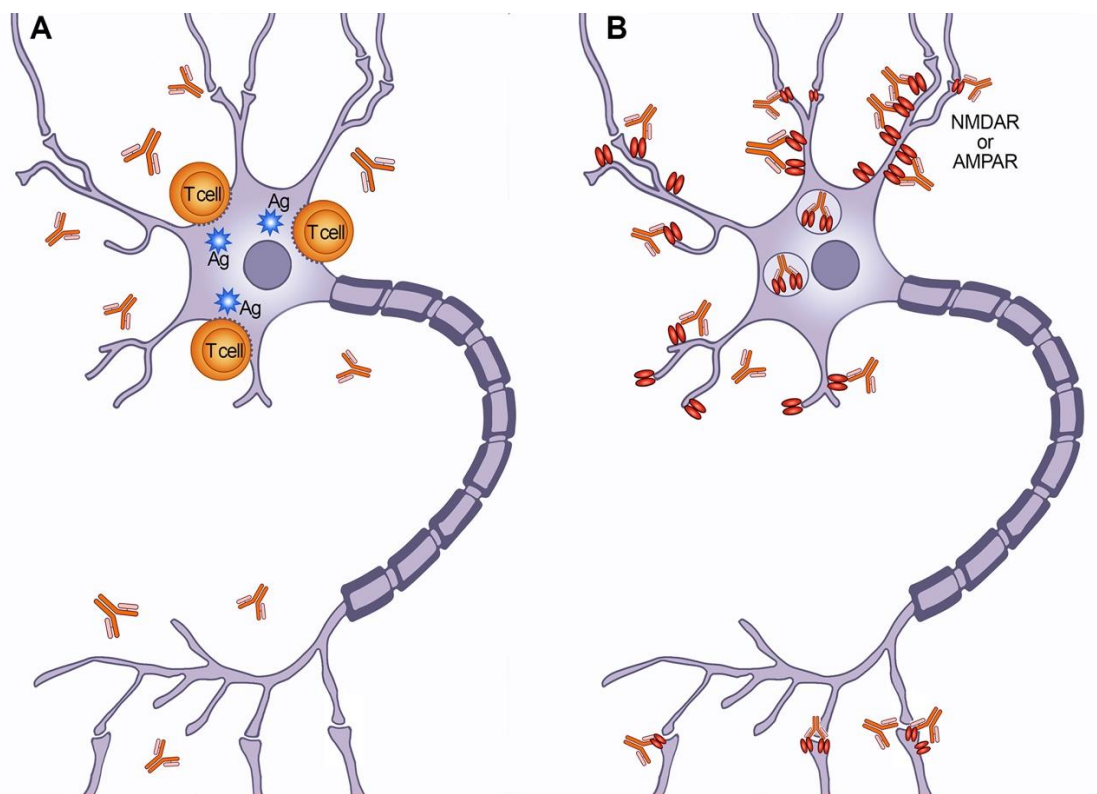
Rps27a ist beim Menschen im RPS27A-Gen auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 (Region 2p16.1) kodiert und kann in den Zellen entsprechend des Zusammenbaus und der Funktion der Ribosomen sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern nachgewiesen werden (Tan et al. 2015). Rps27a hat ein Molekulargewicht von ca. 18 kDa und weist einen Isoelektrischen pH-Wert von 9,82 auf. Beide Werte können jedoch aufgrund mehrerer Phosphorylierungsstellen von diesen Basiswerten abweichen (Ren et al. 2008). Bei Patienten, die an SLE leiden, wurden bereits früher verschiedene Autoantikörper gegen Ubiquitin (Muller et al. 1988), ribosomale Bestandteile, wie z.B. die 60 S Untereinheit, oder gegen ribosomalen P-Proteine gefunden (Caponi et al. 2002; Desbos et al. 2002; Ghirardello et al. 2002). Im Gegensatz dazu traten Autoantikörper gegen das Protein Rps27a bislang nur in einem Tiermodell des SLE und damit in der Maus in Erscheinung (Gutjahr et al. 2005), während der Nachweis bei menschlichen SLE-Patienten und damit der Nachweis einer klinischen Relevanz noch aussteht. Einen

vergleichbaren Syntheseweg zeigt auch das ribosomale Protein Rps30, das deswegen in der vorliegenden Arbeit auch als Kontrollprotein herangezogen wurde (Wool et al. 1995). Ribosomen und damit auch das ribosomale Protein Rps27a sind an der Protein-Synthese beteiligt und Störungen der Ribosomen-Funktion könnten von daher zu Störungen der Proteinsyntheseaktivität in den betroffenen Zellen führen. Aus diesem Grund haben wir mögliche Effekte von Antikörpern gegen CT und CS auf die Funktion der Ribosomen durch eine Wechselwirkung mit dem Protein Rps27a bei der Translation in Zellen des *Plexus choroideus* analysiert (Almamy et al. 2017b).

1.3.5 Entstehung und Wirkung von Autoantikörpern gegen intrazelluläre Proteine

Bei vielen der Proteine, die im Zuge der vorliegenden Arbeit mit dem *hEXselect multiprotein array* detektiert wurden, handelt es sich nicht um Oberflächenantigene, sondern um zytoplasmatische oder nukleäre Proteine. Daraus resultiert die Frage, wie solche Proteine, die normalerweise nicht an der Zelloberfläche erscheinen, überhaupt in der Lage sein sollen eine Immunreaktion auszulösen. Die Tatsache, dass verschiedene bekannte Autoantikörper gegen intrazelluläre Proteine, wie z.B. Enzyme, Ribonucleinproteine oder DNA, gerichtet sind (Iorio und Lennon 2012), deutet darauf hin, dass eine Interaktion zwischen intrazellulären Antigenen und Serum-Antikörpern grundsätzlich möglich sein muss. Diese Interaktion wird u.a. bei Erkrankungen wie der systemischen Sklerose, dem systemischen *Lupus erythematoses* und dem Sjögren-Syndrom beobachtet (Racanelli et al. 2011). Bislang ist allerdings wenig darüber bekannt, wie die Entstehung solcher Autoantikörper ausgelöst werden kann und wie derartige Autoantikörper im Falle einer Erkrankung dann tatsächlich zu ihrem intrazellulären Zielprotein gelangen können. Mögliche Mechanismen für die Entstehung schließen dabei die Bildung apoptotischer Vesikel (Schiller et al. 2008) oder die molekulare Mimikry ein (Oldstone 2014). Eine Aufnahme solcher Antikörper in die Zielzelle scheint, im Zuge einer antiviralen Immunantwort durch Proteine, wie den Antikörper-Rezeptor TRIM21, vonstatten zu gehen (McEwan und James 2015). Im Falle der Aufnahme paraneoplastischer Antikörper in Nervenzellen konnte zudem gezeigt werden, dass für die Aufnahme entsprechender Immunglobuline ein intakter Fc-Teil des IgG-Moleküls notwendig ist (Greenlee et al. 2016).

Abbildung 1.5 zeigt eine schematische Darstellung der T-Zell- und Antikörpervermittelten Autoimmunreaktion gegen neuronale Antigene unterschiedlicher Lokalisation.



© 2017 the American Physiological Society

Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der T-Zell- und antikörpervermittelten Autoimmunreaktion gegen intrazelluläre (A) und oberflächliche (B) Antigene neuronaler Zellen (Dalmau et al. 2017). Der Abdruck erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Autoren und des American Physiological Society-Verlags.

Antigen-spezifische zelluläre und humorale Immunreaktionen gegen Strukturen des Gehirns kommen sehr wahrscheinlich im Laufe eines komplexen vielstufigen Prozesses in Gang. Durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) in sekundären lymphatischen Organen, wie z.B. Lymphknoten werden lösliche oder Zell-gebundene neuronale Antigene oder Epitope aufgenommen und zusammen mit MHC-II Molekülen, $CD4^+$ T-Zellen präsentiert. Dies wiederum erlaubt $CD4^+$ T-Zellen Antigen-präsentierende Zellen zu stimulieren und diese Antigene zusammen mit MHC-I naiven $CD8^+$ T-Zellen zu präsentieren, die dadurch aktiviert werden und zytotoxische Effektoreigenschaften erlangen. Dies stellt die zelluläre Immunantwort dar (Pedemonte et al. 2006; Melzer et al. 2012; Melzer et al. 2013). Parallel dazu werden auch naive B-Zellen, die ihr passendes Antigen binden, aufnehmen und zusammen mit MHC-II an $CD4^+$ T-Zellen präsentieren, aktiviert und entwickeln sich weiter zu antikörpersezernierenden Plasmazellen. Dies stellt die humorale Immunantwort dar. Nach dieser peripheren Aktivierung können sowohl antikörpersezernierenden Plasmazellen als auch zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen zusammen mit $CD4^+$ T-Zellen in das Gehirn einwandern, wo sie ggf. Nervenzellen angreifen und so strukturelle und funktionelle Defizite auslösen können. Dadurch werden beide

Effektorarme des adaptiven Immunsystems aktiviert, unabhängig von der subzellulären Lokalisierung eines neuronalen Antigens oder Epitops (Pedemonte et al. 2006; Melzer et al. 2012; Melzer et al. 2013).

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Bedeutung der Rolle von Infektionserregern als Umweltfaktoren bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen gewinnt in der Forschung immer mehr an Bedeutung. Epidemiologische Untersuchungen konnten eine Assoziation zwischen bakteriellen Infektionen in der Schwangerschaft und einem erhöhten Risiko für die Nachkommen der betroffenen Mütter zeigen, im Laufe des Lebens an psychiatrischen Krankheiten zu erkranken. Dabei kommt eine Störung der neuronalen Entwicklung durch eine autoimmune Reaktion als ein möglicher ätiopathologischer Mechanismus infrage. Die Theorie der molekularen Mimikry liefert einen Erklärungsversuch dafür, wie humane Proteine durch molekulare Ähnlichkeit zu bakteriellen oder viralen Proteinen Antigenität erlangen und dadurch eine Autoimmunreaktion auslösen können. Obwohl bereits für eine kleine Zahl von Autoimmunerkrankungen solche immunogenen Proteine identifiziert werden konnten, ist die große Mehrzahl möglicher Antigene, insbesondere im Hinblick auf die Entstehung neuropsychiatrischer Erkrankungen wie die Schizophrenie, noch weitgehend unbekannt.

Ziel der hier durchgeführten Studien war es erstens, die Wechselwirkungen zwischen antibakteriellen Antikörpern mit möglichen Auto-Antigenen zu identifizieren und zweitens, die Konsequenzen einer solchen Wechselwirkung auf die Zellfunktion zu untersuchen. Für die initiale Identifikation möglicher Auto-Antigene nahm die Untersuchung mit dem *hEXselect multiprotein array* (MPA) eine zentrale Rolle ein. Im Anschluss an die Bestätigung der spezifischen Wechselwirkung mithilfe von *Western-Blot*-Analysen erfolgte die Charakterisierung dieser Wechselwirkung mit unterschiedlichen voneinander unabhängigen funktionellen Tests, die mögliche Auswirkungen einer Antikörperbindung auf die Funktion des jeweiligen Proteins untersuchen sollten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollen neue Erkenntnisse über die Pathogenese und die mögliche autoimmun-entzündliche Komponente psychiatrischer Krankheiten liefern. Die klinische Relevanz dieser Erkenntnisse muss allerdings noch im Rahmen von weiteren Studien überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Methoden zur molekularen Identifikation zellulärer Interaktionspartner antibakterieller Antiseren

Um die Interaktionen zwischen den hier untersuchten Antiseren und deren potentiellen zellulären Interaktionspartnern auf molekularer Ebene nachzuweisen, nahmen zunächst vor allem die Untersuchungen am sog. *hEXselect multiprotein array* (MPA) eine zentrale Rolle ein. Derartige *Protein Arrays* wurden bereits in vorangegangenen Untersuchungen zur Identifikation möglicher Antigene bei Autoimmunerkrankungen, wie des systemischen *Lupus erythematoses*, verwendet (Zhu et al. 2015). Dabei hat sich gezeigt, dass zur Sicherheit alle Ergebnisse, die mit dem MPA erhalten werden, noch durch zusätzliche unabhängige Methoden verifiziert werden müssen. Dies wurde auch in den vorliegenden Studien so gehandhabt.

2.1.1 Antikörper und rekombinante Proteine

Die folgenden Tabellen 2.1 und 2.2 geben Auskunft über die Antikörper und rekombinanten Proteine, die im Rahmen der veröffentlichten Studien verwendet wurden.

Tabelle 2.1: Liste der verwendeten primären und sekundären Antikörper

Primäre Antikörper			
Name	Anbieter	Spezies	Cat. Nr.
anti- <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (α -NG)	Antikoerper-online.de, Aachen, Deutschland	Kaninchen	ABIN285584
anti- <i>Neisseria meningitidis</i> (α -NM)	Antikoerper-online.de, Aachen, Deutschland	Kaninchen	ABIN285585
anti- <i>Toxoplasma gondii</i> (α -TG)	Antikoerper-online.de, Aachen, Deutschland	Kaninchen	ABIN288491
anti-Snap23 (α -Snap23)	Antikoerper-online.de, Aachen, Deutschland	Kaninchen	ABIN1987784
anti-Snap25 (α -Snap25)	Antikoerper-online.de, Aachen, Deutschland	Kaninchen	ABIN3187009
anti-glucose transporter 4 (α -GLUT-4)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	Kaninchen	G4048

Anti- <i>Chlamydia trachomatis</i> (α -CT)	Antikoerper-online.de, Aachen, Deutschland	Kaninchen polyklonal	ABIN285169
Anti- <i>Chlamydia species</i> (α - CS)	Antikoerper-online.de, Aachen, Deutschland	Kaninchen polyklonal	ABIN345968
Anti-Ribosomal Protein S27a (α -RPS27a)	Antikoerper-online.de, Aachen, Deutschland	Maus monoklonal	ABIN562738
Anti-puromycin (α -Pmy) (clone PMY-2A4)	The Developmental Studies Hybridoma Bank at the University of Iowa, Iowa City, USA	Maus monoklonal	AB2619605
Sekundäre Antikörper			
Name	Anbieter	Spezies	Cat. Nr.
Anti-Kaninchen, Peroxidase-gekoppelt	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Gwermany	Ziege IgG, polyklonal	A9169
Anti-Maus, Peroxidase-gekoppelt	Abcam, Cambridge, UK	Ziege IgG, polyklonal	ab6728-1
Anti-Kaninchen, Biotin-gekoppelt	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	Ziege IgG, polyklonal	B8895

Tabelle 2.2: Liste der verwendeten rekombinanten Proteine

Name	Anbieter	Cat. Nr.
recombinant human Snap23 (Snap23)	Antikoerper-online.de, Aachen, Deutschland	ABIN666820
recombinant human Snap25 (Snap25)	Antikoerper-online.de, Aachen, Deutschland	ABIN667088
Recombinant human ribosomal protein S27a (Rps27a)	Antikoerper-online.de, Aachen, Deutschland	ABIN1318790
Recombinant human ribosomal protein S27a (Rps27a)	Acris Antibodies, Herford, Deutschland	TP760193
Recombinant human FAU protein/ ribosomal protein S30 (Rps30)	Antikoerper-online.de, Aachen, Deutschland	ABIN1353688

2.1.2 Interaktionsanalyse mittels *hEXselect multiprotein array* (MPA)

Ausgangspunkt dieses Verfahrens ist eine cDNA-Bank des fetalen humanen Gehirns, deren Klone systematisch isoliert, identifiziert und dann sortiert wurden (Büssow et al. 1998). Von diesen Klonen wird dann in einem kommerziellen Verfahren ein *multiprotein array* hergestellt, indem cDNA-Kopien jedes Klons auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) punktförmig aufgebracht werden, wo sie dann durch ein *E. coli*-Translationssystem *in situ* exprimiert werden (Büssow et al. 1998; Horn et al. 2006). Die cDNAs und damit die Proteinpunkte sind auf der Membran so angeordnet, dass jedes Protein durch zwei sich in enger Nachbarschaft sowie in eindeutig identifizierbarer Position zueinander befindende Punkte (engl. *spots*) repräsentiert wird. Nach einer Antikörperbindung wird so für jedes Protein ein Punktepaar immunreaktiv markiert, das dann anhand seiner Orientierung und unter Zuhilfenahme einer Datenbank identifiziert werden kann. Für den Nachweis muss die Membran dabei wie folgt behandelt werden: Zunächst werden bei erstmaligem Gebrauch die *protein spots* auf der Membran durch eine Inkubation mit 70-prozentigem Ethanol fixiert und anschließend zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Danach wird überschüssiges Proteinmaterial mit einer Waschlösung aus TBS-TT (*Tris-buffered saline*, Zusammensetzung: siehe Tabelle 2.3) durch abwischen mit einem weichen Küchenpapier entfernt. Der weitere Nachweis erfolgt dann entsprechend des Protokolls, das in Tabelle 2.3 beschrieben wird. Gebundene Antikörper werden dann in einer Dunkelkammer, mithilfe einer peroxidaseabhängigen Chemilumineszenz-Reaktion (ECL) durch auflegen eines Röntgenfilms visualisiert. Für die Wiederholung der Experimente kann die Membran durch Inkubation mit einer 0,1-mol/l-Lösung von NaOH in H₂O deion gestrippt und erneut mit einem Antiserum inkubiert werden. Alle Experimente wurden mindestens zweimal mit ungebrauchten *multiprotein arrays* wiederholt.

Tabelle 2.3: Protokoll zur Durchführung des MPA-Experiments.

Schritt	Substrat	Zeit
Waschen	TBS-TT TBS 0.05 % Tween 20 0.5 % Triton X-100	3 x 10 Minuten
Waschen	TBS	2 x 10 Minuten
Blocken	3 % Milchpulver in TBS	2 Stunden
Primärer Antikörper	α -CT, α -CS, α -NM oder α -NG Verdünnung: 1:2000	Über Nacht bei 4 °C
Waschen	TBS-T TBS 0.05 % Tween 20	3 x 10 Minuten
Sekundärer Antikörper, Peroxidase-gekoppelt	Entsprechend primärem Antikörper Verdünnung: 1:10 000	2 Stunden bei Raumtemperatur
Visualisierung	Peroxidase-Substrat 0.1 mol/l Tris-HCl (pH 8.6) 0.25 mg/ml Luminol 0.2 mg/ml <i>p</i> -hydroxycoumaric <i>acid</i> 0.1 % H ₂ O ₂	2-3 Minuten anschließend Entwicklung auf <i>SuperRX</i> <i>medical X-ray film</i> (Fuji, Düsseldorf, Deutschland)
Stripping	NaOH 0,1 mol/l	40 Minuten

2.1.3 Zellbiologische Methoden: Zellkultur und Immunzytochemie

Im Rahmen der veröffentlichten Studien wurden zwei humane Zelllinien verwendet, da bei diesen näherungsweise eine Wechselwirkung mit einem antibakteriellen Antiserum der Situation im Menschen entspricht. Bei diesen Zelllinien handelte es sich zum einen um die HIBCPP-Zellen, die aus einem Papillom des *Plexus choroideus* stammen (Ishiwata et al. 2005), und zum anderen um die SH-SY5Y-Zelllinie, bei der es sich um den Sub-Klon einer vorbestehenden Neuroblastom-Zelllinie handelt (Kohl et al. 1980). Beide Zellarten wurden unter ähnlichen Bedingungen kultiviert. Als Kulturmedium wurde DMEM-F12 (*Dubecco's Modified Eagle's Medium F12*) verwendet. Das Kulturmedium wurde durch 15 % FCS (Fetales Kälberserum), 5 μ g/ml Insulin und Penicillin/Streptomycin ergänzt. Die Inkubation der Zellkulturen fand in einem Brutschrank bei 37 °C in einer befeuchteten Atmosphäre und bei einer CO₂-Konzentration von 5 % statt. Das Kulturmedium wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

Unter mikroskopischer Kontrolle der Zellvermehrung wurden Zellen mittels PBS (*phosphate-buffered saline*) gewaschen und anschließend mittels Inkubation mit Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %) mobilisiert. Danach wurden die Zellen in einer 24-Well-Platte (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) auf sterilen 12 mm Deckgläschen (Menzel, Braunschweig, Deutschland) für immunzytochemische Untersuchungen ausgesät. Alternativ wurden die Zellen in einer 6-Well-Platte (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) für die Durchführung der *Western-Blot*-Analyse ausgesät. Vor den eigentlichen Behandlungen, Antiseren und/oder Insulin, wurden die Zellen für vier Stunden mit einem insulin- und/oder serumfreien Kulturmedium vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µg/ml Antiserum, das vorher mittels Mikrodialyse (*Amicon-Ultra filter units*, Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland) von Natriumazid befreit wurde. Die Dauer der Inkubation mit dem Antiserum betrug zwölf Stunden.

Durch die Immunzytochemie erfolgte die Darstellung der Lokalisation von zellulären Interaktionspartnern mit den untersuchten Antikörpern. Hierbei wurden die primären Antikörper aus Tabelle 2.1 verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde ein biotin-gekoppelter Antikörper verwendet. Die immunzytochemische Färbung erfolgte entsprechend des Protokolls, das in Tabelle 2.4 dargestellt ist. Im Anschluss wurden die gefärbten Zellen mit Deckmedium (DAKO, Glostrup, Denmark) und Deckgläschen (Menzel, Braunschweig, Deutschland) versehen und mit dem Axiophot-Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) fotografiert.

Tabelle 2.4: Protokoll zur Durchführung der Immunzytochemie

Schritt	Substrat	Zeit
Kurzes Waschen	PBS	2 x 10 Sekunden
Fixierung	PFA-PBS 4% Paraformaldehyd in PBS	10 Minuten
Waschen	PBS	3 x 10 Minuten
Permeabilisation	Aceton/Methanol (1:1)	10 Minuten bei -20 °C
Waschen	PBS	3 x 10 Minuten
Blocken	PBS-GS 1:50 Ziegen Serum in PBS	
Primärer Antikörper	Primärer Antikörper 1:50 in PBS-GS	Über Nacht bei 4 °C
Waschen	PBS	3 x 10 Minuten
Sekundärer Antikörper, Biotin-gekoppelt	Entsprechend primärem Antikörper 1:400 in PBS-GS	90 Minuten bei Raumtemperatur
Waschen	PBS	3 x 10 Minuten
Peroxidase-Reaktion	Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) 1:400 in PBS	90 Minuten bei Raumtemperatur
Färbung	DAB Diaminobenzidin H ₂ O ₂	
Waschen	PBS	3 x 10 Minuten

2.1.4 Western-Blot-Analyse

Bei der *Western-Blot*-Analyse handelt es sich um ein etabliertes Verfahren, mithilfe dessen die Interaktion zwischen Antikörpern und Proteinen nachgewiesen wird. Dies erfolgt durch eine Bindung von primären Antikörpern direkt an die jeweiligen Proteine. Die primären Antikörper werden wiederum von sekundären Antikörpern gebunden, wodurch eine Visualisierung der Interaktion ermöglicht wird. Bei diesem Experiment

wurden die primären Antikörper in Tabelle 2.1 verwendet. Als sekundäre Antikörper wurden Peroxidase-gekoppelte Antikörper verwendet. Die Proteinkonzentration der Proben wurde durch ein densitometrisches Verfahren bestimmt (Henkel und Bieger 1994). Als zu untersuchendes Proteinmaterial wurden entweder 5 µg eines entsprechenden Zelllysats, 500 ng eines humanen rekombinanten Proteins (Tabelle 2.2) oder 3 µg eines Proteinisolats der zytoplasmatischen oder der membrangebundenen Zellfraktion verwendet. Diese Proteinproben wurden auf einem 8,5-prozentigen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel (SDS-Polyacrylamid-Gel, Laemmli 1970) mittels Elektrophorese getrennt. Hierbei kam das *Mini Protean Gel System* (Bio-Rad, München, Deutschland) zum Einsatz. Anschließend wurde ein *transfer blot* auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran; Roth, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Vor der Inkubation mit dem primären Antikörper wurde mittels einer Blocklösung (3 % Milchpulver in TBS-T) eine unspezifische Antikörper-Bindung verhindert. Die Inkubation mit der Blocklösung fand für eine Stunde bei 4 °C statt. Die PVDF-Membran mit den transferierten Proteinen wurde dann gewaschen und anschließend mit den jeweiligen primären Antikörpern (Verdünnung 1:2000 in 0,1 % in Milchpulver TBS-T, siehe Tabelle 2.3) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde die PVDF-Membran mit den Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern (Verdünnung 1:10.000 in 0,1 % Milchpulver in TBS-T, siehe Tabelle 2.3) bei Raumtemperatur für 90 Minuten inkubiert. Zur Visualisierung der Interaktion wurden die PVDF-Membranen mit dem Peroxidase-Substrat (Tabelle 2.3) für 2-3 Minuten inkubiert. Anschließend wurde ein Röntgenfilm in der Dunkelkammer auf die Membran aufgelegt (*SuperRX medical X-ray film* Fuji, Düsseldorf, Deutschland). Für einen erneuten spezifischen Proteinnachweis und eine Untersuchung der Interaktion zwischen den Antisera und Proteinen wurden die gekoppelten Antikörper durch ein sog. *Stripping*-Verfahren entfernt. Hierfür wurde die PVDF-Membran mit 0,1 mol/l NaOH für 15 Minuten inkubiert. Danach wurde die Membran mit Milchpulver-Lösung geblockt und anschließend mit einem neuen primären Antikörper inkubiert. Alle Experimente wurden jeweils mindestens dreimal durchgeführt.

2.1.5 2D-Gelelektrophorese und Nano-LC-MS/MS-Massenspektrometrie

Die 2D-Gelelektrophorese ist ein der *Western-Blot*-Analyse ähnliches Verfahren, bei der die Auftrennung der Proteine jedoch nicht nur anhand der Molekülgröße, sondern zudem anhand ihres jeweiligen isoelektrischen Punktes erfolgt. Die Auftrennung durch die sog. isoelektrische Fokussierung (IEF) in der 1. Dimension wurde dabei in einem 5 x 80 mm großen Trenngelstreifen durchgeführt, der sich aus einem 5 % Polyacrylamid-Gel zusammensetzte, das zusätzlich 2,4 % Ampholyte (pH 3,5-10) und 50 % Harnstoff enthielt. Die Ampholyte sorgen dabei für die Ausbildung eines pH-Gradienten, entlang dessen sich die Proteine dann entsprechend ihres isoelektrischen Punktes auftrennen

lassen. 30 µg eines Zellysats wurden dabei auf das Gel aufgetragen. Anschließend erfolgte die isoelektrische Fokussierung (IEF) zunächst für 30 Minuten unter einer Spannung von 150 V und dann für 2 ½ Stunden unter einer Spannung von 200 V. Nach der Äquilibration des Gelstreifens durch Inkubation mit dem *electrophoresis sample buffer* für 30 Minuten wurde dieser quer auf einem 8,5-prozentigen SDS-Polyacrylamid-Elektrophoresegel platziert. Nun wurde die Trennung der Proteine aus dem IEF-Gel nach deren Molekulargewicht durchgeführt. In einem nächsten Schritt wurde mit dem so erhaltenen Proteingel ein *transfer blot* durchgeführt wodurch die Proteine, wie bei einer einfachen *Western-Blot-Analyse*, auf eine PVDF-Membran übertragen wurden. Mit dieser Membran wurden dann wie in 2.1.4 beschrieben, Inkubationen mit primären und sekundären Antikörpern durchgeführt sowie anschließend deren Visualisierung mittels ECL-Reaktion und Auflegen eines Röntgenfilms in der Dunkelkammer. Durch Projektion der Signale der exponierten Röntgenfilme auf die Transfermembran konnten dann die Stellen mit einer Antikörper-Interaktion lokalisiert werden. Die entsprechenden Stellen wurden ausgeschnitten und für die Analyse durch eine kombinierte Flüssigchromatografie mit Massenspektrometrie vorbereitet. Letztere Untersuchungen wurden im Labor der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Abdul Rahman Asif am Institut für klinische Chemie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

2.2 Methoden zur funktionellen Charakterisierung zellulärer Interaktionspartner

Im Anschluss an die Identifikation zellulärer Interaktionspartner antibakterieller Antiseren wurden diese Interaktionen durch die nachfolgend beschriebenen Methoden funktionell charakterisiert, um zu klären, ob diese Interaktionen die entsprechenden zelluläre Prozesse beeinträchtigen können. Dafür wurden bereits bekannte funktionelle Effekte eines jeweiligen Proteins ausgewählt, anhand derer dann dessen Funktion analysiert wurde. Dadurch konnte geklärt werden, inwiefern diese Funktion durch die Interaktion mit dem jeweiligen antibakteriellen Antiserum beeinträchtigt wurde.

2.2.1 Methoden zur Untersuchung der Interaktion zwischen Antiseren gegen *Neisseria gonorrhoeae* und SNAP23

2.2.1.1 Assay für die Untersuchung des *Recyclings* von Membranvesikeln

Snap23 spielt eine wichtige Rolle bei Exozytose und Endozytose sowie bei der Translokation von zellulären Proteinen an die Zellmembran (Grusovin und Macaulay 2003; Lang und Jahn 2008; Zylbersztejn und Galli 2011; Grassi et al. 2015). Zur Untersuchung und Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen α -NG und Snap23 wurde eine Methode angewandt, mit der die Aktivität der Endo- und Exozytose

untersucht werden kann. Diese Methode basiert auf der Tatsache, dass der fluoreszierende Farbstoff FM1-43 beim Vesikelumsatz im Zuge von Exo- und Endozytose in die Membran aufgenommener Vesikel eingebaut wird und dieser Einbau unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann. Dadurch kann die Endozytose- und Exozytoseaktivität unter Einfluss von Insulin, das als Reiz für Exozytose fungiert, ermittelt werden.

Für diese Untersuchungen wurden die Zellen jeweils initial für 12 Stunden mit den entsprechenden Antiseren inkubiert. Anschließend fand eine Inkubation für 10 Minuten mit 10 µmol/l FM1-43 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) mit oder ohne 1 µmol/l Insulin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) statt. Unmittelbar danach wurden die Zellen kurz mit PBS gewaschen, um unspezifisch verbleibendes FM1-43 zu eliminieren, das gebundene FM1-43 wurde mithilfe eines Axiophot-Mikroskops mit einer Epifluoreszenzeinrichtung (Zeiss, Jena, Deutschland) visualisiert und mittels einer Digitalkamera (Axiocam, Zeiss, Jena, Deutschland) dokumentiert.

2.2.1.2 Differentielle Proteinfractionierung (DPF)

Eine andere zelluläre Funktion, bei der Snap23 eine Rolle spielt, ist die hormonabhängige Translokation Vesikel-gebundener Transporter an die Zellmembran, wie sie u.a. in Abhängigkeit von Insulin für den Glucose-Transporter GLUT-4 bekannt ist. Diese Translokation kann durch die sog. differentielle Proteinfractionierung (DPF) untersucht werden, mit der Proteine in der Zellmembran von Proteinen in der Zelle getrennt werden können (Ramsby et al. 1994; Zabel und Klose 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde mittels dieser Technik der Gehalt des Glucose-Transporters GLUT-4 in der membranösen Proteinfraction semiquantitativ mit demjenigen der zellulären Fraction unter An- oder Abwesenheit von Insulin verglichen. Für diese Untersuchung wurden SH-SY5Y-Zellen benutzt. Die Zellen wurden in einer 6-Well-Platte (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) nahezu bis zur Konfluenz kultiviert und dann über Nacht in serumfreiem Medium mit den antibakteriellen Antiseren vorbehandelt. Unmittelbar vor dem Ernten der Zellen erfolgte eine Stimulierung mit Insulin. Nach einem kurzen Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mithilfe eines Extraktionspuffers (50 mmol/l Tris-HCl, pH 8.0; 10 mmol/l EDTA; 2 mmol/l EGTA; 5 % β-mercaptoethanol) homogenisiert. Anschließend wurde der Zellaufschluss in ein 1,5-ml *Eppendorf-Cup* überführt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Hiernach wurde dieses für 10 Minuten bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mit den zytoplasmatischen Proteinen in ein weiteres *Eppendorf-Cup* überführt und mit 15-prozentigem Trichlorethansäure auf Eis für 15 Minuten inkubiert, während das ursprüngliche Gefäß mit dem Pellet ebenfalls auf Eis gestellt und dort bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt wurde. Der Überstand wurde nun für 10 Minuten bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert und der nun entstandene Überstand verworfen. Dieses Pellet wurde mit 80-prozentigem Aceton gewaschen und

luftgetrocknet sowie anschließend mit 5x Laemmli-Puffer resuspendiert. Das entstandene Proteinhomogenat wurde für die nachfolgende *Western-Blot*-Analyse als Probe der Zellproteine verwendet. Nun wurde das Pellet mit den Membranproteinen aus der ersten Zentrifugationsrunde mit dem Extraktionspuffer zweimal gewaschen und anschließend ebenfalls mit 5x Laemmli-Puffer resuspendiert. Für beide Fraktionen wurden die Proteinkonzentration densitometrisch bestimmt (Henkel und Bieger 1994) und für die *Western-Blot*-Analyse jeweils 3 µg des entsprechenden Proteinhomogenats auf das Gel aufgetragen. Das weitere experimentelle Vorgehen erfolgte entsprechend der Beschreibung in 2.1.4.

2.2.1.3 RNA-Isolierung und semiquantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Bei diesem Experiment sollte untersucht werden, ob eine Vorbehandlung mit den Antiseren eine sog. Hochregulation der mRNA von Snap23 und GLUT-4 in SH-SY5Y-Zellen als eine Art Kompensationsmechanismus auslöst. Dies erfolgte mithilfe einer semiquantitativen RT-PCR-Analyse. Die Durchführung des Experiments erfolgte entsprechend folgender Beschreibung.

Als erstes wurden die Zellen für 12 Stunden mit 10 µg/ml Antiserum gegen *Neisseria gonorrhoeae* oder *Neisseria meningitidis* inkubiert. Kontrollzellen wurden ohne Antiserum inkubiert. Anschließend wurde die RNA der SH-SY5Y-Zellen mittels eines kommerziellen Kits isoliert (*high pure RNA isolation kit*, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Ebenfalls wurde die umgekehrte Transkription der RNA in cDNA mittels eines kommerziellen Kits (*transcriptor high fidelity cDNA synthesis kit*, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Sowohl die RNA-Isolation als auch die reverse Transkription (*reverse transcription*) wurden nach den Anweisungen des Hersteller-Protokolls durchgeführt.

Insgesamt wurden dann jeweils 2,5 µl der gewonnenen cDNA-Lösung für die Polymerase-kettenreaktion eingesetzt. Die dabei verwendeten Primer sind in Tabelle 2.5 aufgelistet. Dabei diente das *GAPDH*-Gen (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), ein sogenanntes *housekeeping*-Gen, zur quantitativen Normierung der mRNA-Regulation.

Tabelle 2.5: Liste der verwendeten Primer im Rahmen der RT-PCR

Zielgen	forward primer	reverse primer
SNAP23	5' ccgcatagaagaaggcttga 3'	5' ctgttggtgcagccttgc 3'
GLUT-4	5' actctccacgctctgggtat 3'	5' gtaaccggggctgctatt 3'
GAPDH	5' ctttgcgtgccagccg 3'	5' ggatctcgtcctggaagatgg3'

Für die Amplifikation der cDNA wurde ein *PCR-Cycler (Mastercycler personal*, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) eingesetzt. Dieser führte die in der Tabelle 2.6 erläuterten Schritte durch. Abschließend wurden die Proben bis zur Entnahme bei 4 °C im *Cycler* aufbewahrt. Von jeder Probe wurden dann je 10 µl mit 2 µl 6x *loading dye* inkubiert und anschließend erfolgte die elektrophoretische Trennung auf einem zwei Prozentigen Agarose-Gel in TBE-Puffer (Tris-HCl 89 mmol/l, *boric acid* 89 mmol/l, *ethylene-diaminetetraacetic acid* (EDTA) 2 mmol/l). Nach einer 15-minütigen Inkubation mit Ethidiumbromid (2 µg/ml in Wasser) wurde das Gel für 45 min in Wasser entfärbt. Für die visuelle Darstellung und Dokumentation der PCR-Bänder wurde ein UV-Transilluminator mit einer Dunkelkammer und einem *BioCapt V10 video gel documentation system* (Vilber-Lourmat, Marne La Vallée, France) eingesetzt.

Tabelle 2.6: Protokoll der PCR

Schritt	Temperatur	Dauer
Aktivierung	94 °C	2 Minuten
Denaturierung	94 °C	30 Sekunden
<i>Annealing</i>	56 °C	45 Sekunden
Elongation	72 °C	30 Sekunden
Finale Elongation	72 °C	2 Minuten

2.2.2 Methoden zur Untersuchung der Interaktion zwischen Antiseren gegen Chlamydien und Rps27a

Das Protein Rps27a erfüllt in der Zelle mehrere Funktionen, bei denen man zwischen ribosomalen und nicht-ribosomalen Funktionen unterscheiden kann. Als Bestandteil von Ribosomen beteiligt sich Rps27a an der Translation und damit an der Proteinsynthese. Zur Untersuchung und Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen α -CT und α -CS und Rps27a wurden die nachfolgend beschriebenen Methoden eingesetzt. Dabei sollte vor allem festgestellt werden, ob diese Interaktion einen Einfluss auf die Proteinbiosynthese hat.

2.2.2.1 Surface sensing of translation (SUnSET)

Die *SUnSET*-Methode wurde von Schmidt et al. (2009) etabliert. Dabei handelt es sich um eine nicht radioaktive Methode zum Nachweis der Protein-Translation, bei der die neu gebildeten Proteine durch das Antibiotikum Puromycin in sehr geringen Konzentrationen markiert werden. Dies resultiert aus dem antibiotischen Wirkmechanismus des Puromycins, der darin besteht, dass Puromycin während der Translation in das neugebildete Protein eingebaut wird und dadurch zu einem

Translationsstopp führt (Nathans 1964). Das entstandene Gemisch Puromycin-markierter Proteinfragmente wird anschließend mittels *Western-Blot*-Analyse aufgetrennt und geblottet und das Puromycin mithilfe eines spezifischen Antikörpers in den neu-synthetisierten Polypeptiden detektiert. Dadurch können Veränderungen in der Proteinbiosynthese-Aktivität indirekt sichtbar gemacht werden. Diese Versuche wurden an HIBCPP-Zellkulturen durchgeführt, die nach einer Vorbehandlung mit den jeweiligen Antiseren noch für 30 Minuten mit 20 µg/ml Puromycin inkubiert und dann mit 5x Laemmli-Puffer homogenisiert wurden. Mit dem so gewonnenen Proteinhomogenat wurde eine wie in Kapitel 2.1.4 beschriebene *Western-Blot*-Analyse durchgeführt. Dabei kam als primärer Antikörper ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen Puromycin (1:2000 verdünnt) zum Einsatz. Als sekundärer Antikörper wurden Peroxidase-gekoppelte Anti-Maus-Antikörper (1:10.000 verdünnt) eingesetzt. Die Intensität der Peroxidase-Reaktion wurde durch auflegen eines Röntgenfilms sichtbar gemacht, wobei die Stärke der Filmschwärzung als Indikator für die Proteinsynthese densitometrisch bestimmt wurde. Die densitometrische Auswertung erfolgte dabei mithilfe des *Fiji*-Klons des *ImageJ*-Programms.

2.2.2.2 Click-IT® HPG Alexa Fluor® 488 Protein Synthesis Assay Kit

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Experimenten mit dem *SunSET*-Verfahren, wurde der Einfluss von Antiseren gegen verschiedene *Chlamydia*-Spezies auf die Proteinbiosynthese auch durch einen kommerziell erhältlichen *Assay* untersucht. Hierfür wurden HIBCPP-Zellen auf Deckgläschen (ThermoFisher-Menzel, Braunschweig, Deutschland) ausgesät und bei niedriger Serumkonzentration mit den Antiseren gegen Chlamydien (10 µg/ml α -CT oder α -CS) für 24 Stunden vorbehandelt. Die Antiseren wurden vorher mittels Mikrodialyse (*Amicon-Ultra filter units*, Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland) von Natriumazid, das der Konservierung diente, befreit. Die Färbung der Zellen mit dem *Click-iT® HPG Alexa Fluor® 488 Protein Synthesis Assay Kit* (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Dadurch entsteht in den Zellen eine fluoreszierende Markierung, die anschließend mit dem *Axiophot*-Mikroskop (Carl Zeiss, Jena Deutschland) dokumentiert werden konnte. Die Intensität des Fluoreszenzsignals diente dabei als Indikator für die Proteinsyntheseaktivität und wurde anschließend densitometrisch ausgewertet. Dabei kam erneut der *FiJi*-Klon des *ImageJ*-Programms zum Einsatz.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Die Wechselwirkung zwischen Antiseren gegen *Neisseria gonorrhoeae* und dem SNARE-Komplex-Protein Snap23 führt in SH-SY5Y-Zellen zu einer Beeinträchtigung von Exozytose und Membrantranslokation

3.1.1 Nachweis und funktionelle Charakterisierung der Interaktion zwischen Snap23 und α -NG

Durch die Inkubation des *hEXselect* MPA mit Antiseren gegen *Neisseria gonorrhoeae* konnte zunächst eine größere Anzahl an Interaktionspartnern nachgewiesen werden (Siehe Almamy et al. 2017a, Abbildung 1). Für die weitere Analyse wurde aus diesen das Protein Snap23 ausgewählt, da für dieses Protein bereits zuvor ein Zusammenhang mit Schizophrenie nachgewiesen wurde (Hemby et al. 2002). Neben Snap23 gab es weitere Interaktionspartner, die mit einer Schizophrenieerkrankung assoziiert sind. Die Bedeutung dieser Proteine für die Schizophrenie wird in nachfolgenden Kapiteln erläutert. Im Rahmen einer *Western-Blot*-Analyse konnte die Proteinspezifität der Interaktion zwischen α -NG und Snap23 anhand einer kommerziell erhältlichen Proteinprobe bestätigt werden, während eine solche Probe für das nahe verwandte Protein Snap25 keine derartige Interaktion aufwies (Siehe Almamy et al. 2017a, Abbildung 3).

Für die funktionelle Charakterisierung der Interaktion von α -NG mit Snap23 wurde zum einen die insulinabhängige Translokation des Glucose-Transporters GLUT-4 an die Zellmembran untersucht, und zum anderen der Einfluss auf die insulinabhängige Bildung intrazelluläre Vesikel durch Anfärbung mit dem fluoreszierenden Farbstoff FM1-43 sichtbar gemacht. Bei beiden zellulären Mechanismen spielt Snap23 eine wichtige Rolle (Grusovin und Macaulay 2003; Lang und Jahn 2008; Zylbersztejn und Galli 2011; Grassi et al. 2015).

Im Rahmen des *Assays* mit dem Einsatz von FM1-43 unter Insulineinfluss zeigte sich bei den Zellen mit einer Vorbehandlung mit Antiseren gegen *Neisseria gonorrhoeae* eine verminderte Integration des Farbstoffes im Vergleich zu Zellen ohne Vorbehandlung. Dies dient als indirekter Hinweis für eine verminderte Aktivität der Exozytose, da FM1-43 im Rahmen des *Membran-Recyclings* in zytoplasmatischen Vesikeln integriert wird. Auch Zellen, die mit Antikörpern gegen Snap23 (α -Snap23) vorinkubiert wurden, zeigten eine verminderte Integration von FM1-43 (Siehe Almamy et al. 2017a, Abbildung 4).

Snap23 spielt eine wichtige Rolle bei der Membrantranslokation des insulinabhängigen Glukose-Transporters GLUT-4 (Foster et al. 1999; Kawanishi et al. 2000). Die Inkubation mit Insulin führte in Zellen ohne Vorbehandlung mit Antikörpern zu einem immunzytochemisch vermehrten Nachweis von GLUT-4 auf der Zellmembran, während die Inkubation mit Antikörpern gegen NG oder Snap23 zu einem immunzytochemisch verminderten Nachweis von GLUT-4 auf der Zellmembran führte (Siehe Almamy et al. 2017a, Abbildung 5). Somit ist anzunehmen, dass die Funktion von Snap23 durch diese Interaktion beeinträchtigt und die Translokation von GLUT-4 an die Zellmembran gestört wird. In einem weiteren Experiment mit einem ähnlichen Ansatz konnte die verminderte Aktivität der Translokation von Proteinen zur Zellmembran bestätigt werden. Hierbei wurde statt der Immunzytochemie eine differenzielle Proteinfractionierung vor und nach einer Insulinbehandlung von SH-SY5Y-Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich mit Hilfe der *Western-Blot*-Analyse ein verminderter Nachweis von GLUT-4 in der Membranfraktion von Zellen mit einer Vorinkubation mit Antikörpern gegen NG oder Snap23 nach Insulinbehandlung im Vergleich zu Zellen ohne Vorinkubation mit Antikörpern (Siehe Almamy et al. 2017a, Abbildung 6).

Ein vorbeschriebener Effekt bei Autoimmunerkrankungen ist die kompensatorische Hochregulation der mRNA des Zielantigens. So zeigten die Untersuchungen von Guyon et al. (1998) eine Hochregulation der mRNA von Acetylcholin-Rezeptor bei Myasthenia gravis. Im Rahmen der aktuellen Studie konnte mithilfe einer RT-PCR-Untersuchung eine diskrete Hochregulation der mRNA des Proteins Snap23 in Zellen mit einer Vorinkubation mit Antikörpern gegen NG im Vergleich zu einer unveränderten Expression des *Housekeeping*-Gens *GAPDH* nachgewiesen werden (Siehe Almamy et al. 2017a, Abbildung 7).

In der Zusammenschau der Ergebnisse konnte mithilfe von mehreren voneinander unabhängigen Methoden zum einen die Interaktion von α -NG und Snap23 und zum anderen eine Beeinträchtigung der Funktion von Snap23 durch diese Interaktion nachgewiesen werden. Allerdings stellt sich die Frage, ob es sich hierbei um eine spezifische Reaktion handelt. Für die spezifische Interaktion sprechen mehrere Beobachtungen. Verglichen mit Antikörpern gegen das verwandte Bakterium *Neisseria meningitidis* (α -NM) zeigte sich ein komplett anderes Interaktionsmuster im Rahmen des *multiprotein Membran Assays* sowie bei der *Western-Blot*-Analyse mit den kommerziell erwerblichen Proteinen (Snap23 und Snap25, siehe Almamy et al. 2017a, Abbildung 2). Hierbei zeigte α -NM keine Interaktion mit Snap23. Auch Antikörper gegen *Chlamydia trachomatis* und *Toxoplasma gondii* zeigten keine solche Interaktion (Siehe Almamy et al. 2017a, Abbildung 3). Außerdem zeigte sich im Rahmen der funktionellen Tests keine Beeinträchtigung der Funktion von Snap23 bei einer Inkubation mit Antikörpern gegen *Neisseria meningitidis* (Siehe Almamy et al. 2017a, Abbildungen 4-7). Zusätzlich konnte eine Interaktion von Antikörpern gegen *Neisseria gonorrhoeae* mit dem mit Snap23

verwandten Protein Snap25 ausgeschlossen werden (Siehe Almamy et al. 2017a, Abbildung 3).

3.1.2 Die Bedeutung der Interaktionen zwischen α -NG und Snap23 während der Gehirnentwicklung für die Entstehung schizophrener Psychosen

Für eine weitere detailliertere Untersuchung wurde aus den hier anhand des *hEXselect* MPA identifizierten Interaktionspartnern von Antikörpern gegen *Neisseria gonorrhoeae* das Protein Snap23 ausgesucht, da für dieses Protein bereits in zuvor durchgeführten Studien eine Assoziation mit schizophrenen Psychosen gezeigt worden ist (Hemby et al. 2002). Die hier gezeigte Beeinträchtigung der Funktion von Snap23, insbesondere, wenn sie während der embryonalen Entwicklung wirksam würde, könnte die Entstehung einer schizophrenen Psychose im späteren Leben begünstigen. Bei dem *Synaptosomal-associated protein 23* (Snap23) handelt es sich um ein Protein aus der Familie der SNARE-Komplexproteine, die bei der Exozytose die Interaktion zwischen Vesikel-assoziierten Membranproteinen (VAMPs), wie Synaptobrevin und Zellmembran-assoziierten Proteinen, wie Syntaxin, regulieren. Diese Interaktion ermöglicht die Fusion der Membran intrazellulärer Vesikel mit der Zellmembran, wie sie einerseits bei der Translokation membrangebundener Transporter andererseits aber auch bei der Exozytose ablaufen (Grusovin und Macaulay 2003; Lang und Jahn 2008; Zylbersztejn und Galli 2011; Grassi et al. 2015). In ähnlicher Weise spielt Snap23 auch eine wichtige Rolle beim Recycling von Rezeptoren an der Postsynapse glutamaterger Synapsen (Suh et al. 2010). Ein Mangel an Snap23 in bestimmten Neuronen kann so zu einer verminderten Verfügbarkeit von NMDA-Rezeptoren an der Postsynapse führen. Dies wiederum beeinträchtigt dann die NMDA-abhängige synaptische Übertragung (Suh et al. 2010). Ein solcher Mechanismus könnte auch eine Rolle für die Entstehung schizophrener Psychosen beim Erwachsenen spielen, denn bei betroffenen Patienten konnte bereits vorangegangenen Studien eine verminderte Expression von Snap23 in postmortal untersuchten Gehirnproben des entorhinalen Kortex nachgewiesen werden (Hemby et al. 2002).

Neben seiner Beteiligung an der synaptischen Übertragung spielt Snap23 auch eine wichtige Rolle bei der insulinabhängigen Membrantranslokation des Glukose-Transporters GLUT-4 (Foster et al. 1999; Kawanishi et al. 2000), die sowohl in Skelett- und Herzmuskelzellen als auch im Gehirn gezeigt worden ist (Kobayashi et al. 1996; El Messari et al. 1998; Strauss et al. 2016). Ein Mangel an der insulinabhängigen GLUT-4-Translokation im Gehirn geht mit einer verminderten Plastizität betroffener Neurone einher (Vannucci et al. 1998). Infolgedessen kann es u.a. zu kognitiver Dysfunktion kommen (Winocur et al. 2005). Die insulinabhängigen Translokation von GLUT-4 an die Zellmembranen findet auch in SH-SY5Y-Zellen statt (Benomar et al. 2006) Dementsprechend wurden diese Zellen für die vorliegende Arbeit ausgewählt, um die

Interaktion zwischen α -NG und Snap23 zu untersuchen. Interessant in diesem Zusammenhang ist auch die Tatsache, dass viele von Schizophrenie betroffene Patienten im Laufe Ihrer Erkrankung eine Insulinresistenz und damit einen Diabetes mellitus Typ II entwickeln (Collins 1957; Schimmelbusch et al. 1971). Für lange Zeit galt dies als eine Nebenwirkung der neuroleptischen Medikation (Melkersson et al. 1999; Lindenmayer et al. 2001), allerdings zeigen neuere Studien, dass diese Insulinresistenz auch in Patienten ohne neuroleptische Medikation vorkommt (Verma et al. 2009).

Wie die Untersuchungen von Suh et al. (2010) zeigen konnten spielt Snap23 eine zentrale Rolle bei der Integration und dem *Recycling* von NMDA-Rezeptoren an der Postsynapse glutamaterger Synapsen. Durch einen Mangel an Snap23 kann es demnach zu einer verminderten Expression von NMDA-Rezeptoren und dadurch zu einer gestörten synaptischen Übertragung kommen (Suh et al. 2010). In diesem Zusammenhang könnte man demnach die Hypothese wagen, dass Interaktionen zwischen α -NG und Snap23 beim Vorliegen einer maternalen Infektion mit *Neisseria gonorrhoeae* während der frühen neuronalen Entwicklung die Bildung adäquat funktionierender glutamaterger Synapsen stören könnten und dass solche Störungen bei einem betroffenen Kind im Laufe des späteren Lebens das Auftreten einer Schizophrenie bzw. einer schizophrenen Psychose begünstigen könnten. Zur Sicherung einer solchen Hypothese bedarf es allerdings noch zahlreicher weiterer Untersuchungen (Almamy et al. 2017a).

3.1.3 Die mögliche Bedeutung einiger weiterer Interaktionspartner von α -NG für die Entstehung neuropsychiatrischer Erkrankungen

Wie der Abbildung 1 in Almamy et al. (2017a) zu entnehmen zeigten neben Snap23 noch zahlreiche weitere Proteine eine Bindungsaffinität zu den antibakteriellen Antiseren gegen *Neisseria gonorrhoeae*. Unter diesen Proteinen befinden sich, wie eine Literaturrecherche zeigt, noch weitere Kandidaten, die ebenfalls mit der Ausbildung einer schizophrenen Psychose in Verbindung stehen. Dabei handelt es sich z.B. um die Proteine Selenoprotein H (Ripke et al. 2014), Tetraspanin-7 (Tspan7, Piton et al. 2011) und das *Kelch-like-ECH-associated protein 1* (Keap1, Zhang et al. 2018), die ebenfalls von dem Antiserum gegen *Neisseria gonorrhoeae* gebunden wurden.

Als Selenoprotein wird molekularbiologisch jedes Protein bezeichnet, das die Aminosäure Selenocystein enthält. Bei den Selenoproteinen handelt es sich z.B. um antioxidativ wirkende Enzyme oder um Enzyme, die eine wichtige Rolle im Stoffwechsel der Schilddrüsenhormone spielen. Andere Selenoproteine sind wiederum wichtig beim Transport von Selen oder bei der Entgiftung von Schwermetallen. (Rayman 2000; Saito und Takahashi 2002; Kryukov et al. 2003; Burk und Hill 2005; Köhrle 2005). Bei dem in der vorliegenden Arbeit gefundenen Selenoprotein H als Interaktionspartner für α -NG handelt es sich um eine Oxidoreductase (Novoselov et al. 2007), die eine wichtige Rolle

für den Erhalt neuronaler Zellen bei oxidativem Stress spielt (Ben Jilani et al. 2007). Weiterhin sind Genpolymorphismen des Selenoprotein-H-Locus am Chromosom 11q12.1 mit einem erhöhten Schizophrenie-Risiko assoziiert (Ripke et al. 2014).

Das Protein Tspan7 gehört zur Familie der sog. Tetraspanin-Proteine. Dabei handelt es sich um Proteine, die mit Membranproteinen interagieren und hiermit sogenannte *tetraspanin-enriched microdomains* bilden (Hemler 2005). Im Hinblick auf die Gehirnentwicklung zeigen die Untersuchungen von Bassani et al. (2012), dass Tspan7 eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Dendriten und bei der Expression von AMPA-Rezeptoren in Neuronen des Hippocampus spielt. Mutationen des *TSPAN7*-Gens führen zu bestimmten Formen der mentalen Retardierung (Zemni et al. 2000). Interessanterweise wurde Tspan7 wiederum ebenfalls als Antigen von Autoantikörpern identifiziert, die zur Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 1 führen können (McLaughlin et al. 2016). Weiterhin sind bestimmte Genvarianten des *TSPAN7*-Gens mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Schizophrenie assoziiert (Piton et al. 2011).

Ein weiteres Protein, das in Zusammenhang mit Schizophrenie steht und von den Antiseren gegen NG gebunden wurde, ist das *Kelch-like-ECH-associated protein 1* (Keap1). Auch dieses Protein spielt zusammen mit dem Transkriptionsfaktor *Nuclear factor like 2* (Nrf2) eine wichtige Rolle bei der zellulären Bekämpfung von oxidativem Stress. So wird im Falle eines oxidativen Stresses Nrf2 aus seinem Regulator Keap1 gelöst. Nrf2 aktiviert anschließend die Transkription bestimmter Gene, die für das Überleben der Zelle wichtig sind (Suzuki et al. 2013). Die Untersuchungen von Zhang et al. (2018) zeigten eine verminderte Expression von Keap1 und Nrf2 in postmortal untersuchten Proben des Parietalkortex bei Patienten mit Schizophrenie, Bipolarer Störung und Depression.

Auch wenn die Untersuchung der hier gefundenen Proteine als mögliche Antigene für bakteriell verursachte Autoantikörper und die Bedeutung einer solchen Interaktion für die Entstehung schizophrener Psychosen den Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit übersteigen, kann die vorliegende Arbeit eine Grundlage dafür liefern, immunologische Prozesse, die letztlich von einer maternalen bakteriellen Infektion zur Entstehung einer psychischen Erkrankung betroffener Kinder führen können, umfassender zu untersuchen.

3.1.4 Interaktionspartner von α -NM und ihre Bedeutung für neuropsychiatrische Erkrankungen

Auch bei der Inkubation der MPAs mit Antiseren gegen *Neisseria meningitidis* ergab sich eine Vielzahl gebundener Proteine (Siehe Almamy et al. 2017a, Abbildung 2). Darunter befanden sich ebenfalls Proteine, die im Zusammenhang mit der Entstehung von Schizophrenie und anderen psychotischen Erkrankungen zu stehen scheinen. Dabei handelt es sich um die beiden Proteine *neurogenic locus notch homolog 4* (Notch4) und

activating molecule in beclin-1-regulated autophagy (Ambra1). Das Protein Notch4 ist Teil einer komplexen intrazellulären Signalkaskade, die im Rahmen des Differenzierungsstopps von Stammzellen eine Rolle spielt (Fiúza und Arias 2007). Dadurch übernimmt Notch4 eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung und dabei insbesondere bei der Entwicklung des Nervensystems (Mokhtari und Lachman 2016). Mehrere genomweite Assoziationsstudien zeigen, dass bestimmte Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, engl. für *Single Nucleotide Polymorphism*) des *NOTCH4*-Gens mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Schizophrenie einhergehen (Mokhtari und Lachman 2016). Der Zusammenhang zwischen Ambra1 und Schizophrenie wurde ebenfalls im Rahmen einer genomweiten Assoziationsstudie nachgewiesen (Rietschel et al. 2012). Durch die Aktivierung der Beclinvermittelten Autophagie spielt Ambra1 eine wichtige Rolle für das Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und dem programmierten Zelltod, der Apoptose. Dieses Gleichgewicht ist für eine gesunde embryonale Entwicklung essentiell. So resultiert ein Mangel an Ambra1 in einer Fehlbildung des Neuralrohrs, und damit auch des Gehirns, aufgrund eines gestörten Wachstumsgleichgewichts (Fimia et al. 2007).

3.2 Die Wechselwirkung zwischen Chlamydien-Antiseren und dem ribosomalen Protein Rps27a führt zu einer gestörten Proteinbiosynthese in Zellen des *Plexus choroideus*

3.2.1 Nachweis und funktionelle Charakterisierung der Interaktion zwischen Rps27a und α -CT

Die Inkubation des *hEXselect multiprotein arrays* (MPA) mit den Antiseren gegen *Chlamydia trachomatis* ergab im Gegensatz zu der Inkubation mit den Antiseren gegen *Neisseria gonorrhoeae* und *meningitidis* lediglich zwei Bindungspartner (Siehe Almamy et al. 2017b, Abbildung 1). Diese sind zum einen das ribosomale Protein Rps27a und zum anderen Albumin. Aufgrund des möglichen Zusammenhangs zwischen Rps27a-Autoantikörpern und systemischem *Lupus erythematoses* (Gutjahr et al. 2005) wurde Rps27a für die weitere Analyse und für die Bestätigung der spezifischen Wechselwirkung ausgewählt. Eine *Western-Blot*-Analyse mit kommerziell erhältlichen Proteinen (Rps27a und Rps30) konnte die spezifische Wechselwirkung zwischen Rps27a und Antiseren gegen Chlamydien bestätigen. Hierbei zeigte das verwandte ribosomale Protein Rps30 keine Wechselwirkung mit diesen Antikörpern (Siehe Almamy et al. 2017b, Abbildung 3). Zwecks der Lokalisierung von möglichen Antigenen von Antikörpern gegen Chlamydien in HIBCPP-Zellen wurde eine immunzytochemische Untersuchung durchgeführt. Hierbei zeigte sich intrazellulär eine granuläre Anfärbung (Siehe Almamy et al. 2017b, Abbildung 4). Die angefärbten Strukturen könnten allerdings auch

Ribosomen am rauen endoplasmatischen Retikulum darstellen. Zur Bestimmung der molekularen Größe der Antigene wurde eine *Western-Blot*-Analyse eines Zelllysats von HIBCPP-Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich eine immunreaktive Bande auf der Höhe zwischen 20 und 54 kDA (Siehe Almamy et al. 2017b, Abbildung 4). Diese Höhe entspricht ungefähr der Höhe der Bande des kommerziell erhältlichen Proteins Rps27a. Mithilfe der 2D-Gelelektrophorese konnte das Protein Rps27a auch an der ausgeschnittenen Membranstelle mit der höchsten Immunreaktivität mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden (Siehe Almamy et al. 2017b, Abbildung 5).

Für die Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen Rps27a und Antikörpern gegen Chlamydien und für die Bestimmung der funktionellen Konsequenzen dieser Wechselwirkung wurden zwei voneinander unabhängige Methoden angewandt, die die Intensität der Proteinsynthese ermitteln. Sowohl die *surface sensing of translation*-Methode (*SUnSET*) als auch das kommerziell erhältliche Kit *Click-IT HPG Alexa Fluor® Protein Synthesis Assay* zeigten eine signifikante antikörperabhängige Verminderung der Intensität der Proteinsynthese in HIBCPP-Zellen (Siehe Almamy et al. 2017b, Abbildungen 6 und 7). Der Ansatz der beiden Experimente ist ähnlich. Bei beiden werden bestimmte Substanzen im Rahmen der Proteinsynthese in neu synthetisierte Proteine integriert und im Anschluss werden diese Substanzen mittels *Western-Blot*-Analyse oder Immunfluoreszenz nachgewiesen. Das Ausmaß der Integration der jeweiligen Substanzen wird als Maß für die Aktivität der Proteinsynthese interpretiert. Im Rahmen des *SUnSET*-Experiments wurde das Antibiotikum Puromycin in neu synthetisierte Proteine eingebaut. Das Ausmaß des Einbaus von Puromycin in neu synthetisierte Proteine wurde dann mittels spezifischer Antikörper durch eine *Western-Blot*-Analyse mit densitometrischer Auswertung quantifiziert. Dabei kamen monoklonale Antikörper gegen Puromycin als primäre Antikörper zum Einsatz. Im Rahmen der *Click-IT HPG Alexa Fluor® Protein Synthesis Assay* erfolgte die Integration einer fluoreszierenden Substanz in neu synthetisierte Proteine. Das Ausmaß der Integration wurde mithilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops visualisiert und anschließend densitometrisch quantifiziert.

Zusammen betrachtet zeigen die durchgeführten Experimente, dass es eine Wechselwirkung zwischen Rps27a und Antikörpern gegen Chlamydien gibt und dass diese Wechselwirkung zu einer verminderten Proteinsyntheseaktivität führt (Almamy et al. 2017b). Dabei stellt sich die Frage, inwiefern es sich um eine spezifische Interaktion handelt. Dafür sprechen die Tatsache, dass die Inkubation der MPA mit den Chlamydien-Antikörpern im Vergleich zu der Inkubation mit Antikörpern gegen Neisserien ein völlig anderes Bindungsmuster zeigte, sowie die Tatsache, dass im Rahmen der *Western-Blot*-Analyse mit kommerziell erwerblichen Proteinen lediglich eine Wechselwirkung zwischen Chlamydien-Antikörper und Rps27a nachzuweisen war. Mit dem verwandten Protein Rps30 zeigte sich keinerlei Wechselwirkung.

3.2.2 Die Bedeutung der Interaktion zwischen Rps27a und α -CT für den Neuropsychiatrischen Systemischen *Lupus Erythematoses* (NPSLE) und weitere Erkrankungen

Das Protein Rps27a ist ein ribosomales Protein der kleinen 40-S-Untereinheit eukaryotischer Ribosomen (Redman und Rechsteiner 1989). Rps27a entsteht als Fusionsprotein mit Ubiquitin (Komander et al. 2009). Wie andere ribosomale Proteine beschränken sich die Funktionen des Proteins Rps27a nicht nur auf ribosomale Funktionen, wie die Translation, und somit die Synthese von Proteinen. Stattdessen beteiligt sich Rps27a auch als ein sog. *moonlighting protein* an weiteren Mechanismen, wie beispielsweise Immunsignalkaskaden und der Regulation der Tumorgenese (Mukhopadhyay et al. 2009; Xiong et al. 2011; Wang et al. 2014). Untersuchungen von Gutjahr et al. (2005) konnten Rps27a als ein Antigen in einem SLE-Mausmodell nachweisen.

Mithilfe der funktionellen Tests konnte gezeigt werden, dass die Wechselwirkung zwischen Antikörpern gegen Chlamydien und RpsS27a zu einer verminderten Proteinsynthese in Zellen des *Plexus choroideus* führt. Der *Plexus choroideus* ist für die Produktion des *Liquor cerebrospinalis* verantwortlich (Johanson et al. 2011). Dieser versorgt Zellen des Nervensystems mit wichtigen Substanzen, wie Nährstoffen, Hormonen und Wachstumsfaktoren (Johanson et al. 2011; Damkier et al. 2013). Gleichzeitig sorgt der *Plexus choroideus* für die Entgiftung des *Liquor cerebrospinalis* und somit für die Elimination giftiger Stoffe aus dem ZNS (Strazielle und Ghersi-Egea 1999). Eine Beteiligung des *Plexus choroideus* bei Patienten mit NPSLE ist bereits vorbeschrieben (Gershwin et al. 1975; Amaro und Scheinberg 2009). Eine Störung der Proteinsynthese in Zellen des *Plexus choroideus* könnte zu einer Beeinträchtigung der Funktion des *Plexus choroideus* führen und somit zu einer insuffizienten Versorgung und Entgiftung des zentralen Nervensystems (Almamy et al. 2017b).

Das Protein Rps27a spielt zusätzlich eine Rolle in der Pathogenese weiterer Erkrankungen. So ist nachgewiesen worden, dass bei Patienten mit Asthenozoospermie eine herabgesetzte Expression des *RPS27A*-Gens vorliegt (Bansal et al. 2015). Im selben Gen und in weiteren Genen ribosomaler Proteine wurden Mutationen bei Patienten mit dem seltenen Krankheitsbild der Diamond-Blackfan-Anämie festgestellt (Gazda et al. 2008). In einer weiteren Studie wurde eine Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* im Knochenmark von zwei Patienten mit einer chronischen Anämie unklarer Ursache nachgewiesen (Nebe et al. 2005). Außerdem zeigen aktuelle Untersuchungen eine Assoziation zwischen Infektionen mit Chlamydien und der Entwicklung von Zervikalkarzinom (Zhu et al. 2016). Dabei spielt die MDM2-p53-Signalkaskade für diese Assoziation eine wesentliche Rolle (Gagnaire et al. 2017). Eine Beteiligung von Rps27a in dieser Signalkaskade ist schon bekannt (Xiong et al. 2011).

3.2.3 Mögliche Bedeutung von Albumin für die Entstehung neuropsychiatrischer Erkrankungen

Erniedrigte Werte des Serumalbumins dienen als Indikator für den Schweregrad der Erkrankung bei Patienten mit systemischem *Lupus erythematoses* (Yip et al. 2010). Die erniedrigten Werte können entweder durch eine vermehrte renale Ausscheidung im Rahmen einer Proteinurie bei einer Nierenbeteiligung (Batlle-Gualda et al. 1997) oder im Rahmen eines autoimmunen Zerfalls des Proteins ausgelöst werden. Dies wird bei manchen SLE-Patienten durch Albumin-Autoantikörper induziert (Padjas et al. 2007). Der *Plexus choroideus* dient als ein wichtiger Ort der extrahepatischen Albuminproduktion, insbesondere während der Phase der neuronalen Entwicklung (Aleshire et al. 1983). Die Untersuchungen von Urowitz et al. (2008) zeigten ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von neurokognitiven Störungen bei Nachkommen von Müttern mit einer SLE-Erkrankung. Eine autoimmune Störung der Albuminproduktion in Zellen des *Plexus choroideus* könnte für die Entstehung solcher Störungen der neuronalen Embryogenese verantwortlich sein. Allerdings müsste eine solche Wechselwirkung genauer untersucht werden (Almamy et al. 2017b).

3.3 Kritische Betrachtung der Ergebnisse und möglicher Fehlerquellen

3.3.1 Methodische Grenzen einer *multiprotein-array*-Analyse

Die Proteine auf dem hier verwendeten *multiprotein array* wurden durch *in vitro* Translation von Klonen einer cDNA-Bank hergestellt, die aus dem frontalen Cortex zweier humaner fetaler Gehirne des ersten Schwangerschaftsdrittels gewonnen wurden. Sie stammen damit letztlich aus einem Material, das aus einem Schwangerschaftsabbruch stammt, was letztlich die Frage aufwirft, ob es überhaupt ethisch vertretbar ist, dass man einen derartigen *Assay* für wissenschaftliche Zwecke verwenden darf. Aufgrund der zu erwartenden Ergebnisse und deren Bedeutung für die Aufklärung neuropsychiatrischer Erkrankungen wie des SLE und der schizophrenen Psychosen sowie potentiell für weitere neurologische und/oder neuropsychiatrische Erkrankungen, haben wir uns für die Verwendung des Materials entschieden.

Zudem ist zu klären, inwieweit ein solcher *multiprotein array* die Expression entsprechender Proteine *in vivo* abbilden kann. Dazu ist in Betracht zu ziehen, dass die Proteine auf der Membran des *multiprotein arrays* mit Hilfe eines *in vitro* Translationssystems hergestellt worden sind. Von daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich diese Proteine, insbesondere hinsichtlich verschiedener post-translationaler Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierungen oder Glykosylierungen, von

Proteinen, die aus intakten lebenden Zellen stammen, unterscheiden können. Solche Unterschiede können sich demnach auch auf die Immunogenität der Proteine auswirken. Deshalb ist damit zu rechnen, dass nicht alle Wechselwirkungen von Antikörpern mit Proteinen eines *in vitro* Systems auch *in vivo* nachgewiesen werden können. Umgekehrt können auch Antikörper, die auf dem *multiprotein array* keine Interaktion zeigen, eine Wechselwirkung *in vivo* aufweisen.

Eine weitere Einschränkung der Aussagekraft der Untersuchungen an dem hier verwendeten *multiprotein array* ergibt sich aus der Tatsache, dass es sich bei den Gehirnen aus denen die RNA für die cDNA-Klonierung stammt, um fetale Gehirne handelt, deren Genexpression sich vermutlich von der Expression im adulten Gehirn unterscheidet. Von daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei der Untersuchung der Wechselwirkung antibakterieller Antiseren mit Proteinen aus dem Gehirn adulter Individuen zusätzliche Interaktionspartner gefunden werden können, die von den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit nicht miterfasst werden.

Trotz solcher methodischer Einschränkungen ist der hier verwendete *multiprotein array* als ein gutes Werkzeug zur Identifizierung von Proteinen als potentielle Interaktionspartner von antibakteriellen Antikörpern bei der Entstehung bakteriell ausgelöster Autoimmunerkrankungen des sich entwickelnden Gehirns zu werten. Diese Aussage findet darin Bestätigung, dass Effekte auf die Funktionen von Snap23 und Rps27a aufgrund deren Interaktion mit den antibakteriellen Antikörpern in Zellkulturen gezeigt werden konnten.

3.3.2 Inwiefern spiegeln die hier verwendeten Antiseren aus dem Kaninchen die Situation im menschlichen Immunsystem wider?

Die Frage nach der *in vivo* Relevanz muss natürlich auch hinsichtlich der hier verwendeten antibakteriellen Antiseren gestellt werden. Diese Antiseren stammen aus dem Kaninchen und können von daher eine Immunantwort im menschlichen Organismus letztlich nur modellhaft abbilden. Da jedoch entsprechende Versuche beim Menschen aus ethischen Gründen nicht möglich sind, stellt die Verwendung von Antiseren aus dem Tier eine gute Möglichkeit dar, einen experimentellen Zugang zur Fragestellung der Wechselwirkung antibakterieller Antikörper mit Proteinen des humanen fetalen und adulten Gehirns zu bekommen. Natürlich müssen die erwähnten Einschränkungen bei der Beurteilung der erhaltenen Ergebnisse Berücksichtigung finden. Trotz Unterschieden hinsichtlich der Immunantwort in Mensch und Kaninchen zeigen Studien, dass das Kaninchen ein hinreichend guter Modellorganismus für die Untersuchung verschiedener immunologischer Vorgänge ist und dass die erhaltenen Ergebnisse die Verhältnisse beim Menschen näherungsweise widerspiegeln können (Esteves et al. 2018).

3.3.3 Kann man von funktionellen *In-vitro*-Untersuchungen auf die Rolle eines möglichen Autoantikörpers *in vivo* schließen?

In gleicher Weise muss man auch die funktionellen Tests hinterfragen, die in der vorliegenden Arbeit gemacht worden sind. Denn die hier praktizierte einmalige Zugabe der Antiseren zum Zellkulturmedium spiegelt die Verhältnisse im lebenden menschlichen bzw. tierischen Körper, wo Antikörper von den Plasmazellen ja fortwährend gebildet werden, nur unvollkommen wider. Wir konnten dennoch signifikante Effekte einer solchen Einmalexposition auf verschiedene funktionelle Parameter nachweisen. Dennoch wird für eine Klärung der *in vivo*-Relevanz der gezeigten Effekte die Durchführung entsprechender Tierversuche unerlässlich sein, wofür die vorliegenden Untersuchungen eine gute experimentelle Basis liefern können.

3.3.4 Wechselwirkung von Antikörpern im Serum mit intrazellulären Proteinen

Eine wichtige Frage, die sich bei manchen der detektierten Interaktionspartner stellt, resultiert aus der Tatsache, dass es sich bei diesen um intrazelluläre Proteine handelt, für die eine direkte Interaktion mit bakteriell ausgelösten Autoantikörpern zunächst nicht möglich erscheint. Dem gegenüber steht die Tatsache, dass bei einigen klinisch manifesten Autoimmunerkrankungen intrazelluläre Proteine sehr wohl als Autoantigene eine Rolle spielen können (Iorio und Lennon 2012).

Eine der Möglichkeiten, wie auch intrazelluläre Proteine an der Entstehung einer Autoimmunkrankheit beteiligt sein könnten, stellt Ihre Rolle bei der Auslösung einer T-Zell-vermittelten Immunantwort dar. Dabei werden durch die Aktivierung unterschiedlicher T-Zell-Typen entweder zytotoxische T-Zellen aktiviert oder es kommt zur Reifung korrespondierender Plasmazellen. Es können durch diese Prozesse also letztlich sowohl eine zelluläre als auch eine humorale Immunantwort ausgelöst werden. Dabei wird das entsprechende Antigen von Antigen-präsentierenden Zellen zusammen mit dem MHC-Komplex auf deren Oberfläche präsentiert und das Antigen kann so von den korrespondierenden T-Zellen erkannt werden. Die zytotoxischen T-Zellen können dann Nervenzellen angreifen, die das Autoantigen oder Fragmente davon auf ihrer Oberfläche präsentieren, und so zu einer Schädigung des Gehirns beitragen (Pedemonte et al. 2006; Melzer et al. 2012; Melzer et al. 2013). Wie man sich die Wirkung entsprechender Antikörper gegen intrazelluläre Antigene vorstellen muss ist dagegen noch nicht abschließend geklärt. Es wird aber vermutet, dass entsprechende Transporter existieren, über die die Antikörper in die Zelle aufgenommen werden und so ihr Zielantigen erreichen. Eine wichtige Rolle scheint dabei der Antikörper-Rezeptor TRIM21 zu spielen (McEwan und James 2015; Rhodes und Isenberg 2017). Ob TRIM21 eine Rolle für die Aufnahme von Antikörpern gegen das ribosomale Protein Rps27a

spielt, für das wir eine Interaktion mit Antiseren gegen verschiedene Chlamydienarten gezeigt haben, muss erst noch gezeigt werden. Solche Mechanismen wurden allerdings schon für andere ribosomale Proteine wie die ribosomalen P-Proteine, die als Antigene bei SLE-Patienten nachgewiesen wurden, vorbeschrieben (Koren et al. 1992; Wang et al. 2015).

3.3.5 Sind die gefundenen Interaktionsmuster antikörperspezifisch oder bakterienspezifisch?

Eine wichtige Frage ist zudem, ob die beobachteten Interaktionsmuster mit den Proteinen auf dem hier verwendeten *multiprotein array* für jedes verwendete Antiserum grundsätzlich verschieden, also Antikörperspezifisch ausfallen, oder ob dieses Muster eine gewisse Bakterienspezifität aufweist, also auch bei Verwendung von Antiseren unterschiedlicher Herkunft, ähnliche Interaktionsmuster nachgewiesen werden können. Wir haben einen solchen Versuch für die Wechselwirkung von verschiedenen Antiseren gegen *Neisseria gonorrhoeae* gemacht und mit Ausnahme weniger Unterschiede mit allen verwendeten Antiseren ein fast identisches Interaktionsmuster gefunden. In eine ähnliche Richtung weisen auch die Ergebnisse für die Antiseren gegen verschiedene Chlamydienarten, die ebenfalls jeweils mit den identischen Proteinen Wechselwirkungen aufweisen. Auf ein mögliches Krankheitsgeschehen bezogen bedeutet dies, dass die Infektion mit einer bestimmten Bakterienart vermutlich immer mit einem ähnlichen Spektrum an Autoimmunkrankheiten assoziiert sein würde.

3.3.6 Sind die gefundenen Effekte spezifisch oder durch toxische Effekte des Na-Azids verursacht?

Eine mögliche Fehlerquelle bei den funktionellen Tests mit den hier verwendeten antibakteriellen Antiseren besteht darin, dass diese vom Hersteller durch Zugabe von Na-Azid vor dem Verderb durch Mikroorganismen geschützt werden. Wir haben aus diesem Grunde die Antikörper vor der Verwendung in funktionellen Tests stets durch Mikrodialyse gereinigt, wobei jedoch nicht auszuschließen ist, dass noch kleine Restmengen dieses Giftstoffes in den Antiseren verbleiben. Wir haben versucht die eigentliche Antikörperwirkung von möglichen negativen Effekten solcher Restmengen dadurch zu unterscheiden, dass wir die funktionellen Tests immer mit Antikörpern gegen verschiedene bakterielle Erreger durchgeführt haben, die jedoch immer die gleiche Menge Na-Azid enthielten. War die Wirkung bei einem solchen Experimente für die verschiedenen Antiseren unterschiedlich, dann zeigt dies, dass zumindest diese Unterschiede in der Wirkung auf einen antikörperabhängigen Effekt zurückgehen und nicht auf toxische Effekte des Na-Azids, das in den verschiedenen Antikörpern in gleicher Konzentration vorkommt.

4 Zusammenfassung

Neisseria gonorrhoeae und *Chlamydia trachomatis* sind die bakteriellen Erreger der weltweit häufigsten sexuell übertragbaren Infektionen. Die Manifestation und die Klinik der Infektionen sind vielfältig und abhängig vom betroffenen Organ und dem Serotyp des jeweiligen Bakteriums. Die Infektionen betreffen nicht nur die Genitalorgane, sondern können auch die Augenbindehaut und die inneren Organe befallen. Eine Chronifizierung der Erkrankung ist ebenso möglich. Durch immunologische Prozesse kann es zusätzlich zu einer Gelenkbeteiligung durch Immunkomplexablagerungen kommen. Die Infektion verläuft häufig asymptomatisch. Dies stellt eine Hauptursache für die hohe Zahl an Neuinfektionen dar. Beide Bakterien sind in der Lage eine starke Immunantwort auszulösen, bei der es auch zur Schädigung körpereigenen Gewebes kommen kann.

Die Schädigung körpereigenen Gewebes durch das eigene Immunsystem bezeichnet man als Autoimmunreaktion. Für die Entstehung solcher Reaktionen existieren verschiedene Hypothesen. Neben der bewiesenen genetischen Prädisposition autoimmuner Erkrankungen besteht heute ein wissenschaftlicher Konsens darüber, dass Umweltfaktoren für die Auslösung autoimmuner Erkrankungen eine wesentliche Rolle spielen. Zu diesen Umweltfaktoren zählen bakterielle Infektionen. Es wird vermutet, dass durch molekulare Mimikry humane körpereigene Proteine durch strukturelle Ähnlichkeit zu bakteriellen Proteinen von Antikörpern gebunden werden, die eigentlich bakterielle Proteine erkennen sollten. Dadurch wird eine Autoimmunreaktion ausgelöst. Eine besondere Gruppe der Patienten stellen schwangere Frauen im ersten Schwangerschaftsdrittel dar. Epidemiologische Untersuchungen zeigen dabei ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer psychiatrischen Erkrankung bei den Nachkommen der betroffenen Mütter. Dabei wird vermutet, dass eine Autoimmunreaktion, vermittelt durch plazentagängige Autoantikörper, die neuronale Entwicklung des Embryos stören kann.

Die vorliegende Arbeit hat sich zur Aufgabe gesetzt, mögliche humane Interaktionspartner der antibakteriellen Antikörper zu identifizieren. Dafür wurde die Kreuzreaktivität antibakterieller Antiseren gegen die Bakterien *Neisseria gonorrhoeae* und *Chlamydia trachomatis* mit Proteinen eines *multiprotein arrays* pränataler menschlicher Gehirne aus dem ersten Schwangerschaftsdrittel untersucht. Wie diese Untersuchungen zeigen, interagieren dabei Antiseren gegen *Neisseria gonorrhoeae* u. a. auch mit Proteinen wie Snap23, Tspan7 und Selenoprotein H, für die bereits gezeigt wurden, dass sie eine Rolle bei der Entstehung schizophrener Psychosen spielen. Im Gegensatz dazu zeigten Antiseren gegen *Chlamydia trachomatis* und andere

Chlamydienarten deutlich weniger Interaktionspartner, von denen das ribosomale Protein Rps27a eine mögliche Rolle bei der Entstehung neuropsychiatrischer Störungen des systemischen *Lupus erythematoses* spielen könnte. Es folgte anschließend die Bestätigung und Charakterisierung dieser Wechselwirkung sowie die Untersuchung der Konsequenzen dieser Wechselwirkung auf die Hauptfunktionen der Interaktionspartner Snap23 und Rps27a an Zellkulturmodellen des Zentralnervensystems (SH-SY5Y) und des *Plexus choroideus* (HIBCPP). Anhand dieser *In-vitro*-Untersuchungen zeigte sich eine Beeinträchtigung der Funktionen beider Proteine. Durch die Störung der Funktion von Snap23 als Regulator für die Membrantranslokation in neuronalen Zellen und die Störung der Funktion von Rps27a in der Proteinsynthese in Zellen des *Plexus choroideus* und somit der Beeinträchtigung des Versorgungs- und Entgiftungsorgans des Zentralnervensystems ist zu vermuten, dass daraus eine Störung der neuronalen Entwicklung resultieren kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen bislang unbekannte Interaktionen und liefern so eine gute experimentelle Grundlage für eine weitere Erforschung einer möglichen autoimmun-entzündlichen Komponente psychiatrischer Krankheiten. Die durch *In-vitro*-Modelle festgestellten Effekte müssen allerdings noch durch weitere *In-vivo*-Studie auf ihre klinische Relevanz hin geprüft werden.

5 Literaturverzeichnis

ACR Ad Hoc Committee on Neuropsychiatric Lupus Nomenclature (1999): The American College of Rheumatology nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes. *Arthritis Rheum* 42, 599–608

Adams DD, Knight JG, Ebringer A (2012): The autoimmune model of schizophrenia. *ISRN Psychiatry* 2012, 758072

Aleshire SL, Bradley CA, Richardson LD, Parl FF (1983): Localization of human prealbumin in choroid plexus epithelium. *J Histochem Cytochem* 31, 608–612

Almamy A, Schwerk C, Schrotten H, Ishikawa H, Asif AR, Reuss B (2017a): Crossreactivity of an Antiserum Directed to the Gram-Negative Bacterium *Neisseria gonorrhoeae* with the SNARE-Complex Protein Snap23 Correlates to Impaired Exocytosis in SH-SY5Y Cells. *J Mol Neurosci* 62, 163–180

Almamy A, Schwerk C, Schrotten H, Ishikawa H, Asif AR, Reuss B (2017b): Interactions of antisera to different *Chlamydia* and *Chlamydophila species* with the ribosomal protein RPS27a correlate with impaired protein synthesis in a human choroid plexus papilloma cell line. *Immunol Res* 65, 1110–1123

Amaro E, Scheinberg M (2009): Onset of cognitive dysfunction in systemic lupus erythematosus and selective involvement of the choroid plexus. *J Rheumatol* 36, 2554–2555

Babulas V, Factor-Litvak P, Goetz R, Schaefer CA, Brown AS (2006): Prenatal exposure to maternal genital and reproductive infections and adult schizophrenia. *Am J Psychiatry* 163, 927–929

Bachmaier K, Penninger JM (2005): *Chlamydia* and antigenic mimicry. *Curr Top Microbiol Immunol* 296, 153–163

Baker K, Gordon SL, Melland H, Bumbak F, Scott DJ, Jiang TJ, Owen D, Turner BJ, Boyd SG, Rossi M, et al. (2018): SYT1-associated neurodevelopmental disorder: a case series. *Brain* 141, 2576–2591

Ban N, Beckmann R, Cate JHD, Dinman JD, Dragon F, Ellis SR, Lafontaine DLJ, Lindahl L, Liljas A, Lipton JM, et al. (2014): A new system for naming ribosomal proteins. *Curr Opin Struct Biol* 24, 165–169

- Bansal SK, Gupta N, Sankhwar SN, Rajender S (2015): Differential Genes Expression between Fertile and Infertile Spermatozoa Revealed by Transcriptome Analysis. *PLoS ONE* 10, e0127007
- Bassani S, Cingolani LA, Valnegri P, Folci A, Zapata J, Gianfelice A, Sala C, Goda Y, Passafaro M (2012): The X-linked intellectual disability protein TSPAN7 regulates excitatory synapse development and AMPAR trafficking. *Neuron* 73, 1143–1158
- Bassett AS, Hodgkinson K, Chow EW, Correia S, Scutt LE, Weksberg R (1998): 22q11 deletion syndrome in adults with schizophrenia. *Am J Med Genet* 81, 328–337
- Batlle-Gualda E, Martínez AC, Guerra RA, Pascual E (1997): Urinary albumin excretion in patients with systemic lupus erythematosus without renal disease. *Ann Rheum Dis* 56, 386–389
- Ben Jilani KE, Panee J, He Q, Berry MJ, Li P-A (2007): Overexpression of selenoprotein H reduces Ht22 neuronal cell death after UVB irradiation by preventing superoxide formation. *Int J Biol Sci* 3, 198–204
- Ben-Hur H, Gurevich P, Elhayany A, Avinoach I, Schneider DF, Zusman I (2005): Transport of maternal immunoglobulins through the human placental barrier in normal pregnancy and during inflammation. *Int J Mol Med* 16, 401–407
- Benomar Y, Naour N, Aubourg A, Bailleux V, Gertler A, Djiane J, Guerre-Millo M, Taouis M (2006): Insulin and leptin induce Glut4 plasma membrane translocation and glucose uptake in a human neuronal cell line by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Endocrinology* 147, 2550–2556
- Berer K, Krishnamoorthy G (2014): Microbial view of central nervous system autoimmunity. *FEBS Lett* 588, 4207–4213
- Blackwood DH, Fordyce A, Walker MT, St Clair DM, Porteous DJ, Muir WJ (2001): Schizophrenia and affective disorders – cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family. *Am J Hum Genet* 69, 428–433
- Boda B, Mas C, Muller D (2002): Activity-dependent regulation of genes implicated in X-linked non-specific mental retardation. *Neuroscience* 114, 13–17
- Borchers AT, Aoki CA, Naguwa SM, Keen CL, Shoenfeld Y, Gershwin ME (2005): Neuropsychiatric features of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 4, 329–344
- Boucheix C, Duc GH, Jasmin C, Rubinstein E (2001): Tetraspanins and malignancy. *Expert Rev Mol Med* 2001, 1–17
- Boyd KN, Mailman RB (2012): Dopamine receptor signaling and current and future antipsychotic drugs. *Handb Exp Pharmacol* 212, 53–86

- Brandén E, Gnarp J, Hillerdal G, Orre L, Sköld CM, Löfdahl M, Koyi H, Tornling G (2007): Detection of *Chlamydia pneumoniae* on cytospin preparations from bronchoalveolar lavage in COPD patients and in lung tissue from advanced emphysema. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2, 643–650
- Burk RF, Hill KE (2005): Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annu Rev Nutr* 25, 215–235
- Büssow K, Cahill D, Nietfeld W, Bancroft D, Scherzinger E, Lehrach H, Walter G (1998): A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library. *Nucleic Acids Res* 26, 5007–5008
- Caponi L, Chimenti D, Pratesi F, Migliorini P (2002): Anti-ribosomal antibodies from lupus patients bind DNA. *Clin Exp Immunol* 130, 541–547
- Carter JD, Hudson AP (2017): Recent advances and future directions in understanding and treating *Chlamydia*-induced reactive arthritis. *Expert Rev Clin Immunol* 13, 197–206
- CDC/ Bill Schwartz (1971): Gram-stained photomicrograph of *Neisseria gonorrhoeae* PHIL 15018. Online verfügbar: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=15018>; abgerufen am 06.06.2019
- CDC/ Dr. Wiesner, Dr. Kaufman (1973): Photomicrograph of *Chlamydia trachomatis* PHIL 2295. Online verfügbar: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=2295>; abgerufen am 06.06.2019
- Centers for Disease Control and Prevention: Sexually Transmitted Disease Surveillance 2017. US Department of Health and Human Services, Atlanta 2018
- Chang C, Gershwin ME (2010): Drugs and autoimmunity – a contemporary review and mechanistic approach. *J Autoimmun* 34, J266-275
- Chaplin DD (2010): Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 125, S3-23
- Chen J, Berry MJ (2003): Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J Neurochem* 86, 1–12
- Churchward CP, Calder A, Snyder LAS (2018): Mutations in *Neisseria gonorrhoeae* grown in sub-lethal concentrations of monocaprin do not confer resistance. *PLoS ONE* 13, e0195453
- Collins J (1957): Insulin resistance in schizophrenia. *Med J Aust* 44, 467–470
- Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Parks CG, Gilkeson GS (1998): Hormonal, environmental, and infectious risk factors for developing systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 41, 1714–1724

- Costenbader KH, Kim DJ, Peerzada J, Lockman S, Nobles-Knight D, Petri M, Karlson EW (2004): Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Arthritis Rheum* 50, 849–857
- Curtis AH (1930): A cause of adhesions in the right upper quadrant. *JAMA* 94, 1221–1222
- Dalmau J, Geis C, Graus F (2017): Autoantibodies to Synaptic Receptors and Neuronal Cell Surface Proteins in Autoimmune Diseases of the Central Nervous System. *Physiol Rev* 97, 839–887
- Dankner HH, Brown PD, Praetorius J (2013): Cerebrospinal fluid secretion by the choroid plexus. *Physiol Rev* 93, 1847–1892
- Danchenko N, Satia JA, Anthony MS (2006): Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus* 15, 308–318
- Dann J, DeLisi LE, Devoto M, Laval S, Nancarrow DJ, Shields G, Smith A, Loftus J, Peterson P, Vita A, et al. (1997): A linkage study of schizophrenia to markers within Xp11 near the MAOB gene. *Psychiatry Res* 70, 131–143
- Darling EK, McDonald H (2010): A meta-analysis of the efficacy of ocular prophylactic agents used for the prevention of gonococcal and chlamydial ophthalmia neonatorum. *J Midwifery Womens Health* 55, 319–327
- Deapen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, Roy-Burman P, Walker A, Mack TM (1992): A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 35, 311–318
- Desbos A, Gonzalo P, Monier JC, Tebib J, Reboud JP, Perrier H, Bienvenu J, Fabien N (2002): Autoantibodies directed against ribosomal proteins in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: a comparative study. *Autoimmunity* 35, 427–434
- Deutsche STI-Gesellschaft (2016): AWMF S2k-Leitlinie: Infektionen mit *Chlamydia trachomatis*. Online verfügbar: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/059-005.html>; abgerufen am 03.06.2019
- Deutsche STI-Gesellschaft (2018): AWMF S2k-Leitlinie: Diagnostik und Therapie der Gonorrhoe. Online verfügbar: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/059-004.html>; abgerufen am 02.06.2019
- Dudareva-Vizule S, Haar K, Sailer A, Wisplinghoff H, Wisplinghoff F, Marcus U, PARIS study group (2014): Prevalence of pharyngeal and rectal *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections among men who have sex with men in Germany. *Sex Transm Infect* 90, 46–51

- Duprez T, Nzeusseu A, Peeters A, Houssiau FA (2001): Selective involvement of the choroid plexus on cerebral magnetic resonance images: a new radiological sign in patients with systemic lupus erythematosus with neurological symptoms. *J Rheumatol* 28, 387–391
- Edwards JL, Apicella MA (2004): The molecular mechanisms used by *Neisseria gonorrhoeae* to initiate infection differ between men and women. *Clin Microbiol Rev* 17, 965–981
- El Messari S, Leloup C, Quignon M, Brisorgueil MJ, Penicaud L, Arluison M (1998): Immunocytochemical localization of the insulin-responsive glucose transporter 4 (Glut4) in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 399, 492–512
- Elwell C, Mirrashidi K, Engel J (2016): *Chlamydia* cell biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 14, 385–400
- Ercolini AM, Miller SD (2009): The role of infections in autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 155, 1–15
- Esteves PJ, Abrantes J, Baldauf H-M, BenMohamed L, Chen Y, Christensen N, González-Gallego J, Giacani L, Hu J, Kaplan G, et al. (2018): The wide utility of rabbits as models of human diseases. *Exp Mol Med* 50, 66
- Farrell MS, Werge T, Sklar P, Owen MJ, Ophoff RA, O'Donovan MC, Corvin A, Cichon S, Sullivan PF (2015): Evaluating historical candidate genes for schizophrenia. *Mol Psychiatry* 20, 555–562
- Fellerhoff B, Laumbacher B, Mueller N, Gu S, Wank R (2007): Associations between *Chlamydomytila* infections, schizophrenia and risk of HLA-A10. *Mol Psychiatry* 12, 264–272
- Fimia GM, Stoykova A, Romagnoli A, Giunta L, Di Bartolomeo S, Nardacci R, Corazzari M, Fuoco C, Ucar A, Schwartz P, et al. (2007): Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* 447, 1121–1125
- Fitz-Hugh T (1934): Acute gonococcal peritonitis of the right upper quadrant in women. *JAMA* 102, 2094–2096
- Fiúza U-M, Arias AM (2007): Cell and molecular biology of Notch. *J Endocrinol* 194, 459–474
- Foschi C, Salvo M, Cevenini R, Parolin C, Vitali B, Marangoni A (2017): Vaginal Lactobacilli Reduce *Neisseria gonorrhoeae* Viability through Multiple Strategies: An in Vitro Study. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 502

- Foster LJ, Yaworsky K, Trimble WS, Klip A (1999): SNAP23 promotes insulin-dependent glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes: possible interaction with cytoskeleton. *Am J Physiol* 276, C1108-1114
- Fujita M, Hatachi S, Yagita M (2009): Acute *Chlamydia pneumoniae* infection in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Lupus* 18, 164–168
- Gagnaire A, Nadel B, Raoult D, Neefjes J, Gorvel J-P (2017): Collateral damage: insights into bacterial mechanisms that predispose host cells to cancer. *Nat Rev Microbiol* 15, 109–128
- Gannon NP, Conn CA, Vaughan RA (2015): Dietary stimulators of GLUT4 expression and translocation in skeletal muscle: a mini-review. *Mol Nutr Food Res* 59, 48–64
- Gazda HT, Sheen MR, Vlachos A, Choemsel V, O'Donohue M-F, Schneider H, Darras N, Hasman C, Sieff CA, Newburger PE, et al. (2008): Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Am J Hum Genet* 83, 769–780
- Gershwin ME, Hyman LR, Steinberg AD (1975): The choroid plexus in CNS involvement of systemic lupus erythematosus. *J Pediatr* 87, 588–590
- Ghanem KG: Gonorrhoea. In: Bope ET, Kellerman RD, Rakel RE (Hrsg.): *Conn's Current Therapy 2011*. Elsevier, Philadelphia 2010, 764-766
- Ghirardello A, Caponi L, Franceschini F, Zampieri S, Quinzanini M, Bendo R, Bombardieri S, Gambari PF, Doria A (2002): Diagnostic tests for antiribosomal p protein antibodies: a comparative evaluation of immunoblotting and ELISA assays. *J Autoimmun* 19, 71–77
- Giusti-Rodríguez P, Sullivan PF (2013): The genomics of schizophrenia: update and implications. *J Clin Invest* 123, 4557–4563
- Glatt SJ, Everall IP, Kremen WS, Corbeil J, Sásik R, Khanlou N, Han M, Liew C-C, Tsuang MT (2005): Comparative gene expression analysis of blood and brain provides concurrent validation of SELENBP1 up-regulation in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 15533–15538
- Grassi D, Plonka FB, Oksdath M, Guil AN, Sosa LJ, Quiroga S (2015): Selected SNARE proteins are essential for the polarized membrane insertion of igf-1 receptor and the regulation of initial axonal outgrowth in neurons. *Cell Discov* 1, 15023
- Greenlee J, Clawson S, Wood B, Hill K, Clardy S, Carlson N (2016): Neuronal Uptake of Paraneoplastic IgG Autoantibodies Reactive with Intracellular Antigens Requires the Fc Portion of the IgG Molecule and Can Be Competitively Inhibited by Normal IgG (P5.295). *Neurology* 86, P5.295

- Grusovin J, Macaulay SL (2003): Snares for GLUT4 – mechanisms directing vesicular trafficking of GLUT4. *Front Biosci* 8, d620-641
- Guerra SG, Vyse TJ, Cunninghame Graham DS (2012): The genetics of lupus: a functional perspective. *Arthritis Res Ther* 14, 211
- Gutjahr C, Murphy D, Lueking A, Koenig A, Janitz M, O'Brien J, Korn B, Horn S, Lehrach H, Cahill DJ (2005): Mouse protein arrays from a TH1 cell cDNA library for antibody screening and serum profiling. *Genomics* 85, 285–296
- Guyon T, Wakkach A, Poea S, Mouly V, Klingel-Schmitt I, Levasseur P, Beeson D, Asher O, Tzartos S, Berrih-Aknin S (1998): Regulation of acetylcholine receptor gene expression in human myasthenia gravis muscles. Evidences for a compensatory mechanism triggered by receptor loss. *J Clin Invest* 102, 249–263
- Harland R, Antonova E, Owen GS, Broome M, Landau S, Deeley Q, Murray R (2009): A study of psychiatrists' concepts of mental illness. *Psychol Med* 39, 967–976
- Harrison PJ (1999): The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 122, 593–624
- Hatfield DL, Carlson BA, Xu X-M, Mix H, Gladyshev VN (2006): Selenocysteine incorporation machinery and the role of selenoproteins in development and health. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 81, 97–142
- Hemby SE, Ginsberg SD, Brunk B, Arnold SE, Trojanowski JQ, Eberwine JH (2002): Gene expression profile for schizophrenia: discrete neuron transcription patterns in the entorhinal cortex. *Arch Gen Psychiatry* 59, 631–640
- Hemler ME (2005): Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 801–811
- Henkel AW, Bieger SC (1994): Quantification of proteins dissolved in an electrophoresis sample buffer. *Anal Biochem* 223, 329–331
- Hoffman TA, Damus AJ, Sands L (1979): Evaluation of a gonococcal serologic test. *Am J Clin Pathol* 71, 184–189
- Holmes C, Cotterell D (2009): Role of infection in the pathogenesis of Alzheimer's disease: implications for treatment. *CNS Drugs* 23, 993–1002
- Hook EWI, Handsfield HH: Gonococcal infections in the adult. In: Holmes KK, Sparling FP, Stamm WE, et al. (Hrsg.): *Sexually Transmitted Diseases*, 4. Auflage. McGraw Hill Medical, New York 2008, 627–646

- Horn S, Lueking A, Murphy D, Staudt A, Gutjahr C, Schulte K, König A, Landsberger M, Lehrach H, Felix SB, Cahill DJ (2006): Profiling humoral autoimmune repertoire of dilated cardiomyopathy (DCM) patients and development of a disease-associated protein chip. *Proteomics* 6, 605–613
- Hosák L, Silhan P, Hosáková J (2012): Genome-wide association studies in schizophrenia, and potential etiological and functional implications of their results. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 55, 3–11
- Iorio R, Lennon VA (2012): Neural antigen-specific autoimmune disorders. *Immunol Rev* 248, 104–121
- Ishiwata I, Ishiwata C, Ishiwata E, Sato Y, Kiguchi K, Tachibana T, Hashimoto H, Ishikawa H (2005): Establishment and characterization of a human malignant choroids plexus papilloma cell line (HIBCPP). *Hum Cell* 18, 67–72
- Johanson CE, Stopa EG, McMillan PN (2011): The blood-cerebrospinal fluid barrier: structure and functional significance. *Methods Mol Biol* 686, 101–131
- Kahn RS, Sommer IE (2015): The neurobiology and treatment of first-episode schizophrenia. *Mol Psychiatry* 20, 84–97
- Kanazawa T, Glatt SJ, Faraone SV, Hwu H-G, Yoneda H, Tsuang MT (2009): Family-based association study of SELENBP1 in schizophrenia. *Schizophr Res* 113, 268–272
- Kawaguchi T, Tamori Y, Kanda H, Yoshikawa M, Tateya S, Nishino N, Kasuga M (2010): The t-SNAREs syntaxin4 and SNAP23 but not v-SNARE VAMP2 are indispensable to tether GLUT4 vesicles at the plasma membrane in adipocyte. *Biochem Biophys Res Commun* 391, 1336–1341
- Kawanishi M, Tamori Y, Okazawa H, Araki S, Shinoda H, Kasuga M (2000): Role of SNAP23 in insulin-induced translocation of GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. Mediation of complex formation between syntaxin4 and VAMP2. *J Biol Chem* 275, 8240–8247
- Kayser MS, Dalmau J (2016): Anti-NMDA receptor encephalitis, autoimmunity, and psychosis. *Schizophr Res* 176, 36–40
- Khandaker GM, Zimbron J, Lewis G, Jones PB (2013): Prenatal maternal infection, neurodevelopment and adult schizophrenia: a systematic review of population-based studies. *Psychol Med* 43, 239–257
- Kim H-Y, Gladyshev VN (2007): Methionine sulfoxide reductases: selenoprotein forms and roles in antioxidant protein repair in mammals. *Biochem J* 407, 321–329
- Kobayashi M, Nikami H, Morimatsu M, Saito M (1996): Expression and localization of insulin-regulatable glucose transporter (GLUT4) in rat brain. *Neurosci Lett* 213, 103–106
- Kohl RL, Perez-Polo JR, Quay WB (1980): Effect of methionine, glycine and serine on

- serine hydroxymethyltransferase activity in rat glioma and human neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* 5, 271–280
- Köhrle J (2005): Selenium and the control of thyroid hormone metabolism. *Thyroid* 15, 841–853
- Komander D, Clague MJ, Urbé S (2009): Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 550–563
- Koren E, Reichlin MW, Koscec M, Fugate RD, Reichlin M (1992): Autoantibodies to the ribosomal P proteins react with a plasma membrane-related target on human cells. *J Clin Invest* 89, 1236–1241
- Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigó R, Gladyshev VN (2003): Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300, 1439–1443
- Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN (2007): The Sep15 protein family: roles in disulfide bond formation and quality control in the endoplasmic reticulum. *IUBMB Life* 59, 1–5
- Lang T, Jahn R (2008): Core proteins of the secretory machinery. *Handb Exp Pharmacol* 107–127
- Lee S-A, Suh Y, Lee S, Jeong J, Kim SJ, Kim SJ, Park SK (2017): Functional expression of dopamine D2 receptor is regulated by tetraspanin 7-mediated postendocytic trafficking. *FASEB J* 31, 2301–2313
- Li S, Yu Y, Yue Y, Zhang Z, Su K (2013): Microbial Infection and Rheumatoid Arthritis. *J Clin Cell Immunol* 4, 174
- Libbey JE, Cusick MF, Fujinami RS (2014): Role of pathogens in multiple sclerosis. *Int Rev Immunol* 33, 266–283
- Ligon BL (2005): Albert Ludwig Sigismund Neisser: discoverer of the cause of gonorrhea. *Semin Pediatr Infect Dis* 16, 336–341
- Lindenmayer JP, Nathan AM, Smith RC (2001): Hyperglycemia associated with the use of atypical antipsychotics. *J Clin Psychiatry* 62 Suppl 23, 30–38
- Lisnevskaja L, Murphy G, Isenberg D (2014): Systemic lupus erythematosus. *Lancet* 384, 1878–1888
- Liu Y, Perez J, Hammer LA, Gallagher HC, De Jesus M, Egilmez NK, Russell MW (2018): Intravaginal Administration of Interleukin 12 during Genital Gonococcal Infection in Mice Induces Immunity to Heterologous Strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *mSphere* 3, e00421–17
- Lupus Nomenclature: s. ACR Ad Hoc Committee on Neuropsychiatric Lupus Nomenclature

- MacDonald N, Mailman T, Desai S (2008): Gonococcal infections in newborns and in adolescents. *Adv Exp Med Biol* 609, 108–130
- Malhotra M, Sood S, Mukherjee A, Muralidhar S, Bala M (2013): Genital *Chlamydia trachomatis*: an update. *Indian J Med Res* 138, 303–316
- Mayor MT, Roett MA, Uduhiri KA (2012): Diagnosis and management of gonococcal infections. *Am Fam Physician* 86, 931–938
- McEwan WA, James LC (2015): TRIM21-dependent intracellular antibody neutralization of virus infection. *Prog Mol Biol Transl Sci* 129, 167–187
- McLaughlin KA, Richardson CC, Ravishankar A, Brigatti C, Liberati D, Lampasona V, Piemonti L, Morgan D, Feltbower RG, Christie MR (2016): Identification of Tetraspanin-7 as a Target of Autoantibodies in Type 1 Diabetes. *Diabetes* 65, 1690–1698
- Melkersson KI, Hulting AL, Brismar KE (1999): Different influences of classical antipsychotics and clozapine on glucose-insulin homeostasis in patients with schizophrenia or related psychoses. *J Clin Psychiatry* 60, 783–791
- Meltzer HY, Stahl SM (1976): The dopamine hypothesis of schizophrenia: a review. *Schizophr Bull* 2, 19–76
- Melzer N, Meuth SG, Wiendl H (2012): Neuron-directed autoimmunity in the central nervous system: entities, mechanisms, diagnostic clues, and therapeutic options. *Curr Opin Neurol* 25, 341–348
- Melzer N, Meuth SG, Wiendl H (2013): Paraneoplastic and non-paraneoplastic autoimmunity to neurons in the central nervous system. *J Neurol* 260, 1215–1233
- Meszaros ZS, Perl A, Faraone SV (2012): Psychiatric symptoms in systemic lupus erythematosus: a systematic review. *J Clin Psychiatry* 73, 993–1001
- Mokhtari R, Lachman HM (2016): The Major Histocompatibility Complex (MHC) in Schizophrenia: A Review. *J Clin Cell Immunol* 7, 479
- Mukai J, Liu H, Burt RA, Swor DE, Lai W-S, Karayiorgou M, Gogos JA (2004): Evidence that the gene encoding ZDHHC8 contributes to the risk of schizophrenia. *Nat Genet* 36, 725–731
- Mukhopadhyay R, Jia J, Arif A, Ray PS, Fox PL (2009): The GAIT system: a gatekeeper of inflammatory gene expression. *Trends Biochem Sci* 34, 324–331
- Muller S, Briand JP, Van Regenmortel MH (1988): Presence of antibodies to ubiquitin during the autoimmune response associated with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 8176–8180
- Murray RM, O’Callaghan E, Castle DJ, Lewis SW (1992): A neurodevelopmental approach to the classification of schizophrenia. *Schizophr Bull* 18, 319–332

- Nagata C, Fujita S, Iwata H, Kurosawa Y, Kobayashi K, Kobayashi M, Motegi K, Omura T, Yamamoto M, Nose T (1995): Systemic lupus erythematosus: a case-control epidemiologic study in Japan. *Int J Dermatol* 34, 333–337
- Nathans D (1964): Puromycin inhibition of protein synthesis: Incorporation of puromycin into peptide chains. *Proc Natl Acad Sci USA* 51, 585–592
- Nebe CT, Rother M, Brechtel I, Costina V, Neumaier M, Zentgraf H, Böcker U, Meyer TF, Szczepek AJ (2005): Detection of *Chlamydomphila pneumoniae* in the bone marrow of two patients with unexplained chronic anaemia. *Eur J Haematol* 74, 77–83
- Neisser A (1879): Ueber eine der Gonorrhoe eigentümliche Microccenform. *Centralbl Med Wiss (Berlin)* 17, 497–500
- Noll R (2004): Historical review: Autointoxication and focal infection theories of dementia praecox. *World J Biol Psychiatry* 5, 66–72
- Noll R (2007): Kraepelin's „lost biological psychiatry“? Autointoxication, organotherapy and surgery for dementia praecox. *Hist Psychiatry* 18, 301–320
- Novoselov SV, Kryukov GV, Xu X-M, Carlson BA, Hatfield DL, Gladyshev VN (2007): Selenoprotein H is a nucleolar thioredoxin-like protein with a unique expression pattern. *J Biol Chem* 282, 11960–11968
- Oldstone MBA (2014): Molecular mimicry: its evolution from concept to mechanism as a cause of autoimmune diseases. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* 33, 158–165
- Oldstone MBA, von Herrath M, Lewicki H, Hudrisier D, Whitton JL, Gairin JE (1999): Use of a high-affinity peptide that aborts MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte activity against multiple viruses in vitro and virus-induced immunopathologic disease in vivo. *Virology* 256, 246–257
- Olney JW, Farber NB (1995): NMDA antagonists as neurotherapeutic drugs, psychotogens, neurotoxins, and research tools for studying schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 13, 335–345
- Ossewaarde JM, Rieffe M, Rozenberg-Arska M, Ossenkoppele PM, Nawrocki RP, van Loon AM (1992): Development and clinical evaluation of a polymerase chain reaction test for detection of *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol* 30, 2122–2128
- Ota VK, Bellucco FT, Gadelha A, Santoro ML, Noto C, Christofolini DM, Assunção IB, Yamada KM, Ribeiro-dos-Santos AK, Santos S, et al. (2014): PRODH polymorphisms, cortical volumes and thickness in schizophrenia. *PLoS ONE* 9, e87686
- Paavonen J, Eggert-Kruse W (1999): *Chlamydia trachomatis*: impact on human reproduction. *Hum Reprod Update* 5, 433–447

- Padjas A, Undas A, Swadzba J, Musiał J (2007): Antibodies to N-homocysteinylated albumin in patients with systemic lupus erythematosus. *Pol Arch Med Wewn* 117, 20–25
- Panee J, Stoytcheva ZR, Liu W, Berry MJ (2007): Selenoprotein H is a redox-sensing high mobility group family DNA-binding protein that up-regulates genes involved in glutathione synthesis and phase II detoxification. *J Biol Chem* 282, 23759–23765
- Papiol S, Malzahn D, Kästner A, Sperling S, Begemann M, Stefansson H, Bickeböller H, Nave K-A, Ehrenreich H (2011): Dissociation of accumulated genetic risk and disease severity in patients with schizophrenia. *Transl Psychiatry* 1, e45
- Park M-H, Kwon Y-J, Jeong H-Y, Lee H-Y, Hwangbo Y, Yoon H-J, Shim S-H (2012): Association between Intracellular Infectious Agents and Schizophrenia. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 10, 117–123
- Pedemonte E, Mancardi G, Giunti D, Corcione A, Benvenuto F, Pistoia V, Uccelli A (2006): Mechanisms of the adaptive immune response inside the central nervous system during inflammatory and autoimmune diseases. *Pharmacol Ther* 111, 555–566
- Pillai R, Uyehara-Lock JH, Bellinger FP (2014): Selenium and selenoprotein function in brain disorders. *IUBMB Life* 66, 229–239
- Piton A, Gauthier J, Hamdan FF, Lafrenière RG, Yang Y, Henrion E, Laurent S, Noreau A, Thibodeau P, Karemera L, et al. (2011): Systematic resequencing of X-chromosome synaptic genes in autism spectrum disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 16, 867–880
- Pitts MW, Byrns CN, Ogawa-Wong AN, Kremer P, Berry MJ (2014): Selenoproteins in nervous system development and function. *Biol Trace Elem Res* 161, 231–245
- Popescu A, Kao AH (2011): Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Curr Neuropharmacol* 9, 449–457
- Prinz M, Priller J (2017): The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease. *Nat Neurosci* 20, 136–144
- Puolakkainen M, Campbell LA, Kuo CC, Leinonen M, Grönhagen-Riska C, Saikku P (1996): Serological response to *Chlamydia pneumoniae* in patients with sarcoidosis. *J Infect* 33, 199–205
- Racanelli V, Prete M, Musaraj G, Dammacco F, Perosa F (2011): Autoantibodies to intracellular antigens: generation and pathogenetic role. *Autoimmun Rev* 10, 503–508
- Ramakrishnan V (2002): Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* 108, 557–572
- Ramsby ML, Makowski GS, Khairallah EA (1994): Differential detergent fractionation of isolated hepatocytes: biochemical, immunochemical and two-dimensional gel

- electrophoresis characterization of cytoskeletal and noncytoskeletal compartments. *Electrophoresis* 15, 265–277
- Rayman MP (2000): The importance of selenium to human health. *Lancet* 356, 233–241
- Redman KL, Rechsteiner M (1989): Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a. *Nature* 338, 438–440
- Ren Q, Zhang W, Zhao X-F, Wang J-X (2008): Gene cloning and expression analysis of ubiquitin derived from *Musca domestica*. *Arch Insect Biochem Physiol* 68, 89–99
- Rhodes DA, Isenberg DA (2017): TRIM21 and the Function of Antibodies inside Cells. *Trends Immunol* 38, 916–926
- Rietschel M, Mattheisen M, Degenhardt F, Genetic Risk and Outcome in Psychosis (GROUP Investigators), Mühleisen TW, Kirsch P, Esslinger C, Herms S, Demontis D, Steffens M, et al. (2012): Association between genetic variation in a region on chromosome 11 and schizophrenia in large samples from Europe. *Mol Psychiatry* 17, 906–917
- Ripke S, Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, (300 Collaborators) (2014): Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 511, 421–427
- Saito Y, Takahashi K (2002): Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein. *Eur J Biochem* 269, 5746–5751
- Schiller M, Bekeredjian-Ding I, Heyder P, Blank N, Ho AD, Lorenz H-M (2008): Autoantigens are translocated into small apoptotic bodies during early stages of apoptosis. *Cell Death Differ* 15, 183–191
- Schimmelbusch WH, Mueller PS, Sheps J (1971): The positive correlation between insulin resistance and duration of hospitalization in untreated schizophrenia. *Br J Psychiatry* 118, 429–436
- Schmidt EK, Clavarino G, Ceppi M, Pierre P (2009): SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat Methods* 6, 275–277
- Selgrade MK, Cooper GS, Germolec DR, Heindel JJ (1999): Linking environmental agents and autoimmune disease: an agenda for future research. *Environ Health Perspect* 107 Suppl 5, 811–813
- Sher JH, Pertschuk LP (1974): Immunoglobulin G deposits in the choroid plexus of a child with systemic lupus erythematosus. *J Pediatr* 85, 385–387
- Simeone JC, Ward AJ, Rotella P, Collins J, Windisch R. (2015): An evaluation of variation in published estimates of schizophrenia prevalence from 1990–2013: a systematic literature review. *BMC Psychiatry*. 2015; 15: 193.

- Sørensen HJ, Mortensen EL, Reinisch JM, Mednick SA (2009): Association between prenatal exposure to bacterial infection and risk of schizophrenia. *Schizophr Bull* 35, 631–637
- Stamm WE (1999): *Chlamydia trachomatis* infections: progress and problems. *J Infect Dis* 179 Suppl 2, S380-383
- Strauss JA, Shaw CS, Bradley H, Wilson OJ, Dorval T, Pilling J, Wagenmakers AJM (2016): Immunofluorescence microscopy of SNAP23 in human skeletal muscle reveals colocalization with plasma membrane, lipid droplets, and mitochondria. *Physiol Rep* 4
- Strazielle N, Ghersi-Egea JF (1999): Demonstration of a coupled metabolism-efflux process at the choroid plexus as a mechanism of brain protection toward xenobiotics. *J Neurosci* 19, 6275–6289
- Suay-García B, Pérez-Gracia MT (2018): Future Prospects for *Neisseria gonorrhoeae* Treatment. *Antibiotics (Basel)* 7, 49
- Suh YH, Terashima A, Petralia RS, Wenthold RJ, Isaac JTR, Roche KW, Roche PA (2010): A neuronal role for SNAP-23 in postsynaptic glutamate receptor trafficking. *Nat Neurosci* 13, 338–343
- Suvisaari J, Mantere O (2013): Inflammation theories in psychotic disorders: a critical review. *Infect Disord Drug Targets* 13, 59–70
- Suzuki T, Motohashi H, Yamamoto M (2013): Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway. *Trends Pharmacol Sci* 34, 340–346
- Swanborg RH, Boros DL, Whittum-Hudson JA, Hudson AP (2006): Molecular mimicry and horror autotoxicus: do chlamydial infections elicit autoimmunity? *Expert Rev Mol Med* 8, 1–23
- Tan J-Y, Chen J-L, Huang X, Yuan C-L (2015): Screening and verification of proteins that interact with HSPC238. *Oncol Rep* 34, 3097–3103
- Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS (2009): Schizophrenia, „just the facts“ 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophr Res* 110, 1–23
- Toubi E, Shoenfeld Y (2007): Clinical and biological aspects of anti-P-ribosomal protein autoantibodies. *Autoimmun Rev* 6, 119–125
- Urowitz MB, Gladman DD, MacKinnon A, Ibañez D, Bruto V, Rovet J, Silverman E (2008): Neurocognitive abnormalities in offspring of mothers with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 17, 555–560
- Vadacca M, Buzzulini F, Rigon A, Coppolino G, Palma Modoni A, Massa R, Afeltra A (2006): Neuropsychiatric lupus erythematosus. *Reumatismo* 58, 177–186
- Vannucci SJ, Koehler-Stec EM, Li K, Reynolds TH, Clark R, Simpson IA (1998):

- GLUT4 glucose transporter expression in rodent brain: effect of diabetes. *Brain Res* 797, 1–11
- Verma SK, Subramaniam M, Liew A, Poon LY (2009): Metabolic risk factors in drug-naive patients with first-episode psychosis. *J Clin Psychiatry* 70, 997–1000
- von Prowazek S, Halberstädter L (1907): Über Zelleinschlüsse parasitärer Natur beim Trachom. *Arbeit Kaiserl Gesundheitsamt* 26, 44–47.
- Wahren-Herlenius M, Dörner T (2013): Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. *Lancet* 382, 819–831
- Walther D, Eugster A, Jergens S, Gavrisan A, Weinzierl C, Teliëps T, Winkler C, Ziegler AG, Bonifacio E (2016): Tetraspanin 7 autoantibodies in type 1 diabetes. *Diabetologia* 59, 1973–1976
- Wang H, Yu J, Zhang L, Xiong Y, Chen S, Xing H, Tian Z, Tang K, Wei H, Rao Q, et al. (2014): RPS27a promotes proliferation, regulates cell cycle progression and inhibits apoptosis of leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 446, 1204–1210
- Wang SP, Grayston JT (1970): Immunologic relationship between genital TRIC, lymphogranuloma venereum, and related organisms in a new microtiter indirect immunofluorescence test. *Am J Ophthalmol* 70, 367–374
- Wang W, Nag S, Zhang X, Wang M-H, Wang H, Zhou J, Zhang R (2015): Ribosomal proteins and human diseases: pathogenesis, molecular mechanisms, and therapeutic implications. *Med Res Rev* 35, 225–285
- Wang Y, Tang BL (2006): SNAREs in neurons – beyond synaptic vesicle exocytosis (Review). *Mol Membr Biol* 23, 377–384
- Ward ME: Mechanisms of *Chlamydia*-Induced Disease. In: Stephens RS (Hrsg.): *Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis, And Immunity*. ASM Press, Washington, DC 1999, 171–210
- West SK (2004): Trachoma: new assault on an ancient disease. *Prog Retin Eye Res* 23, 381–401
- White JA (2009): Manifestations and management of lymphogranuloma venereum. *Curr Opin Infect Dis* 22, 57–66
- Williams HJ, Owen MJ, O'Donovan MC (2007): Is COMT a susceptibility gene for schizophrenia? *Schizophr Bull* 33, 635–641
- Winocur G, Greenwood CE, Piroli GG, Grillo CA, Reznikov LR, Reagan LP, McEwen BS (2005): Memory impairment in obese Zucker rats: an investigation of cognitive function in an animal model of insulin resistance and obesity. *Behav Neurosci* 119, 1389–1395

- Wirth EK, Conrad M, Winterer J, Wozny C, Carlson BA, Roth S, Schmitz D, Bornkamm GW, Coppola V, Tessarollo L, et al. (2010): Neuronal selenoprotein expression is required for interneuron development and prevents seizures and neurodegeneration. *FASEB J* 24, 844–852
- Wool IG, Chan YL, Glück A (1995): Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins. *Biochem Cell Biol* 73, 933–947
- World Health Organization: Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections, 2008. World Health Organization, Genf 2012
- Xiong X, Zhao Y, He H, Sun Y (2011): Ribosomal protein S27-like and S27 interplay with p53-MDM2 axis as a target, a substrate and a regulator. *Oncogene* 30, 1798–1811
- Yip J, Aghdassi E, Su J, Lou W, Reich H, Bargman J, Scholey J, Gladman DD, Urowitz MB, Fortin PR (2010): Serum albumin as a marker for disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 37, 1667–1672
- Zabel C, Klose J (2009): Protein extraction for 2DE. *Methods Mol Biol* 519, 171–196
- Zabriskie JB, Freimer EH (1966): An immunological relationship between the group. A streptococcus and mammalian muscle. *J Exp Med* 124, 661–678
- Zeidler H, Kuipers J, Köhler L (2004): *Chlamydia*-induced arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 16, 380–392
- Zemni R, Bienvenu T, Vinet MC, Sefiani A, Carrié A, Billuart P, McDonnell N, Couvert P, Francis F, Chafey P, et al. (2000): A new gene involved in X-linked mental retardation identified by analysis of an X;2 balanced translocation. *Nat Genet* 24, 167–170
- Zhang J-C, Yao W, Dong C, Han M, Shirayama Y, Hashimoto K (2018): Keap1-Nrf2 signaling pathway confers resilience versus susceptibility to inescapable electric stress. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 268, 865–870
- Zhu H, Luo H, Yan M, Zuo X, Li Q-Z (2015): Autoantigen Microarray for High-throughput Autoantibody Profiling in Systemic Lupus Erythematosus. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 13, 210–218
- Zhu H, Shen Z, Luo H, Zhang W, Zhu X (2016): *Chlamydia Trachomatis* Infection-Associated Risk of Cervical Cancer: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)* 95, e3077
- Zylbersztejn K, Galli T (2011): Vesicular traffic in cell navigation. *FEBS J* 278, 4497–4505

6 Publikationen

Grundlage dieser publikationsbasierten Dissertation sind folgende veröffentlichte Arbeiten:

- **Almamy A**, Schwerk C, Schrotten H, Ishikawa H, Asif AR, Reuss B (2017a): Crossreactivity of an Antiserum Directed to the Gram-Negative Bacterium *Neisseria gonorrhoeae* with the SNARE-Complex Protein Snap23 Correlates to Impaired Exocytosis in SH-SY5Y Cells. *J Mol Neurosci* 62, 163–180
PMID: 28462458 DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28462458>
- **Almamy A**, Schwerk C, Schrotten H, Ishikawa H, Asif AR, Reuss B (2017b): Interactions of antisera to different Chlamydia and Chlamydophila species with the ribosomal protein RPS27a correlate with impaired protein synthesis in a human choroid plexus papilloma cell line. *Immunol Res* 65, 1110–1123
PMID: 28913776 DOI: 10.1007/s12026-017-8952-9 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28913776>
- Reuss B, Asif AR, **Almamy A**, Schwerk C, Horst Schrotten, Ishikawa H, Drummere C, Behr R (2016): Antisera against *Neisseria gonorrhoeae* cross-react with specific brain proteins of the common marmoset monkey and other nonhuman primate species. *Brain Research*
PMID: 27765579 DOI: 10.1016/j.brainres.2016.10.012 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27765579>



Crossreactivity of an Antiserum Directed to the Gram-Negative Bacterium *Neisseria gonorrhoeae* with the SNARE-Complex Protein Snap23 Correlates to Impaired Exocytosis in SH-SY5Y Cells

A. Almamy¹ · C. Schwerk² · H. Schrotten² · H. Ishikawa³ · A. R. Asif⁴ · B. Reuss¹

Received: 19 August 2016 / Accepted: 10 April 2017 / Published online: 1 May 2017
© Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract Early maternal infections with *Neisseria gonorrhoeae* (NG) correlate to an increased lifetime schizophrenia risk for the offspring, which might be due to an immune-mediated mechanism. Here, we investigated the interactions of polyclonal antisera to NG (α -NG) with a first trimester prenatal brain multiprotein array, revealing among others the SNARE-complex protein Snap23 as a target antigen for α -NG. This interaction was confirmed by Western blot analysis with a recombinant Snap23 protein, whereas the closely related Snap25 failed to interact with α -NG. Furthermore, a polyclonal antiserum to the closely related bacterium *Neisseria meningitidis* (α -NM) failed to interact with both proteins. Functionally, in SH-SY5Y cells, α -NG pretreatment interfered with both insulin-induced vesicle recycling, as revealed by uptake of the fluorescent endocytosis marker FM1-43, and insulin-dependent membrane translocation of the glucose transporter GluT4. Similar effects could be observed for an antiserum raised directly to Snap23, whereas a serum to Snap25 failed to do so. In conclusion, Snap23 seems to be a possible immune target for anti-gonococcal antibodies, the interactions of which seem at least in vitro to interfere with vesicle-associated exocytosis. Whether these changes contribute to the correlation between

maternal gonococcal infections and psychosis in vivo remains still to be clarified.

Keywords *Neisseria gonorrhoeae* · *Neisseria meningitidis* · Snap23 · Exocytosis · GluT4 · SH-SY5Y cells

Introduction

Together with several other conditions such as mania and depression, schizophrenia forms a group of neuropsychiatric disorders which are believed to be not exclusively attributable to nonbiological psychodynamic effects but to be caused in addition by changes in organic brain function and structure (Harland et al. 2009; Kahn and Sommer 2015). According to this, schizophrenia, which hits on average around 1% of the general population at least once in a lifetime (Cannon and Jones 1996), is now widely believed to be a multifactorial disease characterized predominantly by changes in cognition and emotion, including both negative (i.e., avolition, alogia, apathy, poor or nonexistent social functioning) and positive (presence of hallucinations, delusions) symptoms (Tandon et al. 2009). These behavioral symptoms could be correlated to specific changes in brain macro- and microstructure (Harrison 1999), whereas the nature of the underlying molecular mechanisms has not yet been fully clarified.

Despite this, effective pharmacological treatment strategies for schizophrenia are available consisting in the application of the so-called neuroleptic drugs like haloperidol, risperidone, clozapine, and olanzapine. These drugs are known to interact with several aminergic neurotransmitter receptors, of which the dopamine type 2 receptor seems to be the most effective one (Boyd and Mailman 2015). This provides the basis of the “dopamine hypothesis” of schizophrenia, which suggests altered dopaminergic neurotransmission to be responsible for

✉ B. Reuss
breuss@gwdg.de

¹ Institute for Neuroanatomy, University Medical Center Göttingen, Kreuzberggring 36, 37075 Göttingen, Federal Republic of Germany

² University Children’s Hospital Mannheim, Pediatric Infectious Diseases, Heidelberg University, Heidelberg, Germany

³ The Nippon Dental University, Tokyo, Japan

⁴ Institute for Clinical Chemistry, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany

disease pathology (Meltzer and Stahl 1976). However, again, the exact mechanisms leading to perturbed dopaminergic transmission in the schizophrenic brain have still not been identified.

A possible explanation is provided by the so-called neurodevelopmental hypothesis for schizophrenia (Murray et al. 1992), suggesting the disease to start long before the brain reaches its mature adult state and most probably already during prenatal development in utero—especially during the first or early second trimester of pregnancy. Both genetic and environmental factors have been investigated, such that in the past decades a great number of schizophrenia candidate genes and proteins have been described (Hosák et al. 2012; Giusti-Rodríguez and Sullivan 2013). With respect to environmental factors, infections as well as pre- and perinatal complications have been supposed to play a role in schizophrenia pathology. Especially pre- and perinatal infections by viral pathogens like influenza or herpes simplex viruses, as well as by eukaryotic parasites like *Toxoplasma gondii*, have already been investigated in more detail (Khandaker et al. 2013).

In recent times, bacterial infections that have already for a long time been suspected to be able to elicit psychosis (Noll 2004, 2007) have come again into the focus of scientific interest and are therefore considered as a possible cause for the changes in brain development and structure, leading in the end to psychosis (Khandaker et al. 2013). According to this, several population genetic studies have demonstrated that prenatal maternal infections during the first trimester of pregnancy with the Gram-negative bacterium *Neisseria gonorrhoeae* (NG) correlated to an increased schizophrenia lifetime risk in the affected children (Babulas et al. 2006: odds ratio 5.03, 95% confidence interval 2.00–12.64; Sørensen et al. 2009: odds ratio 3.41, 95% confidence interval 1.36–8.57). NG is widely known as a common cause for clinical and subclinical reproductive tract infections in women and men (Edwards and Butler 2011), and in these cases, antibodies directed to NG-specific epitopes are a common feature of the blood serum of NG-infected women (Hoffman et al. 1979). Due to the fact that antibodies of the IgG subtype are able to pass the placental barrier (Ben-Hur et al. 2005), this opens the possibility that cross-reactivity of NG-specific antibodies with specific structures of the embryonic or fetal brain could be responsible for perturbed brain development following exposure during early pregnancy.

This raised for us the question for possible functional effects of this, and we therefore performed several in vitro studies investigating interactions of polyclonal antibacterial antibodies with neural antigens. As we could demonstrate (Reuss 2014; Reuss and Asif 2014), an NG-specific polyclonal antiserum from rabbit (α -NG) was able to impair neuronal differentiation of both rat PC-12 cells and human NTera2/D1 cells, and Hsp60, a mitochondrial heat shock protein, could be

identified as interaction partner in NTera2/D1 cells (Reuss and Asif 2014). Also in HIBCPP cells, a cell culture model of choroid plexus epithelium, interaction of α -NG with Hsp60 could be confirmed, in conjunction with the ATP-binding protein ATPB, and these interactions probably lead to impaired mitochondrial functioning (Reuss et al. 2015).

However, a major drawback of these previous studies might be that interactions with strongly expressed proteins, like Hsp60 or ATPB, could mask interactions of α -NG with other weaker expressed but probably functionally and pathogenically more important proteins. In order to solve this problem, we decided now to use a commercially available multiprotein array (hEXselect, Engine, Berlin, Germany) derived from 22,000 expression clones of a complementary DNA (cDNA) library representing around 10,000 different proteins coded by the transcriptome of two late first trimester human fetal brains (Büssow et al. 1998). This protein array has been already successfully used to investigate antibody-antigen interactions (Holt et al. 2000; Cepok et al. 2005; Kijanka and Murphy 2009), and we therefore used it also here to identify potential interaction partners of α -NG in the human prenatal fetal proteome, of which the SNARE-complex protein Snap23 seemed to us the most promising candidate for a further functional analysis in human-derived SH-SY5Y neuroblastoma cells.

Transport and exocytosis of secretory vesicles includes the interaction of vesicle-associated membrane proteins (VAMPs) like synaptobrevin with cell membrane-associated proteins like syntaxin (Lang and Jahn 2008). In neuronal synapses, SNARE-complex proteins like Snap25 (synaptosome-associated protein of 25 kDa) are promoting these interactions by forming a complex, which serves as a binding site for the general membrane fusion machinery (Wang and Tang 2006). In non-neuronal cells, this function is provided by Snap23, a structurally and functionally related protein which binds also tightly to multiple syntaxins and synaptobrevin types. By this, Snap23 is an important component of the high affinity receptor for the general membrane fusion machinery and is an important regulator of transport vesicle docking and fusion (Zylbersztejn and Galli 2011). Besides exocytosis, fusion of intracellular vesicles with the cell membrane is also important for membrane integration of cell surface proteins like receptors and transporters (Grusovin and Macaulay 2003; Grassi et al. 2015).

Snap23 is now also known to play a role in neuronal synaptic transmission, where it seems to be involved in receptor trafficking and recycling at the postsynaptic side of glutamatergic synapses (Suh et al. 2010). Accordingly, Snap23 is enriched in dendritic spines, where it colocalizes with constituents of the postsynaptic density, where a loss of Snap23 is obviously able to impair NMDA receptor surface expression and by this also NMDA receptor-dependent neural synaptic transmission (Suh et al. 2010). Further along this line, gene

expression of Snap23 has also been shown to be altered in stellate neurons of schizophrenic patients as analyzed from postmortem brain material of the entorhinal cortex (Hemby et al. 2002).

Another functionally important cellular process, where Snap23-dependent exocytosis is involved, is the insulin-dependent membrane translocation of glucose transporter GluT4 (Foster et al. 1999; Kawanishi et al. 2000), which is primarily expressed in adipose tissue and striated skeletal and heart muscle fibers, but can be also found in the brain (Strauss et al. 2016; Kobayashi et al. 1996; El Messari et al. 1998). At low insulin plasma levels, GluT4 is stored in intracellular vesicles, whereas an increase in insulin plasma levels results in a translocation of GluT4 to the plasma membrane. By this, a substantial increase of glucose uptake into the cytoplasm, due to the facilitated diffusion of glucose along its concentration gradient, is achieved (Gannon et al. 2015). An important step in GluT4 membrane translocation is tethering and fusion of the transporter-containing vesicles to the plasma membrane (Kawaguchi et al. 2010). Insulin-dependent GluT4 translocation occurs also in SH-SY5Y cells where it has been shown to activate glucose uptake (Benomar et al. 2006), and we therefore used these cells to test for a possible functional interference of α -NG with exocytosis of GluT4 during membrane translocation and with the resulting vesicle recycling.

Taken all these facts together, the aims of the present study were to investigate which proteins interacted with α -NG in the first trimester prenatal human brain by exposing the hEXselect multiprotein array to this antiserum, and to confirm interaction of α -NG with at least one of the identified candidates, the human SNARE-complex protein Snap23, by Western blot analysis using recombinant samples of this protein. Further along this line, we wanted to elucidate the functional effects of the interaction of α -NG with Snap23 for vesicle exocytosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by two different exocytosis assays. In order to confirm specificity of these actions, we wanted to perform similar experiments with an antiserum raised directly to Snap23 (α -Snap23). Finally, we wanted to verify direct interactions of α -NG with Snap23 by testing its effects on messenger RNA (mRNA) expression of both Snap23 and GluT4 in our cell culture model.

Materials and Methods

Antibodies and Recombinant Proteins

The following antibodies and recombinant proteins were used in this study: rabbit anti-*Neisseria gonorrhoeae* (α -NG; Antikoerper-online.de, cat. no. ABIN285584); rabbit anti-*Neisseria meningitidis* (α -NM; Antikoerper-online.de, cat. no. ABIN285585); rabbit anti-*Chlamydia trachomatis*

(α -CT; Antikoerper-online.de, cat. no. ABIN285169); rabbit anti-*Toxoplasma gondii* (α -TG; Antikoerper-online.de, cat. no. ABIN288491); rabbit anti-Snap23 (α -Snap23; Antikoerper-online.de, cat. no. ABIN1987784); rabbit anti-Snap25 (α -Snap25; Antikoerper-online.de, cat. no. ABIN3187009); rabbit anti-glucose transporter 4 (α -GluT4; Sigma-Aldrich, cat. no. G4048); goat anti-rabbit IgG, peroxidase coupled (Sigma-Aldrich, cat. no. A9169); goat anti-rabbit IgG, biotin coupled (Sigma-Aldrich, cat. no. B8895); recombinant human Snap23 (Antikoerper-online.de, cat. no. ABIN666820); and recombinant human Snap25 (Antikoerper-online.de, cat. no. ABIN667088).

hEXselect Multiprotein Array Analysis

A commercial high-density multiprotein array (MPA) (hEXselect, Engine, Berlin, Germany, cat. no. 1003) derived from a cDNA bank of two first trimester human fetal brain samples, containing 22,000 *Escherichia coli* expression clones representing a total of 10,000 human proteins (Büssow et al. 1998, Horn et al. 2006), was incubated with α -NG according to the manufacturer's protocol. Prior to the first use of the array, protein spots were fixed on the polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane for 10 min with 70% ethanol and rinsed twice with distilled water. Excess protein material was removed from the PVDF membranes with tissue paper and Tris-buffered saline (TBS) supplemented with 0.05% Tween-20 and 0.5% Triton X-100 (TBS-TT). After three 10-min washing steps with TBS-TT, the MPA was rinsed two times for 10 min with TBS alone, followed by a 2-h blocking step with 3% milk powder in TBS. After adding α -NG at a dilution of 1:2000, the MPA was incubated overnight at 4 °C on a rocking stage. On the following day, the MPA was washed three times for 10 min in TBS containing 0.05% Tween-20 (TBS-T) and, after adding secondary antibodies at 1:10,000, was incubated for 2 h at room temperature. After four washes with TBS-T and two washes with TBS, the location of immunoreactive spots was visualized by exposing the membrane to SuperRX medical X-ray films (Fuji, Düsseldorf, Germany), during the application of a peroxidase chemiluminescence substrate (0.1 mol/l Tris-HCl (pH 8.6), 0.25 mg/ml luminol, 0.2 mg/ml *p*-hydroxycoumaric acid, and 0.1% H₂O₂) in a dark room cabinet. For reprobing, MPA membrane was stripped with 1 mol/l NaOH for 40 min and then processed for a second round of immunodetection as described. All experiments were repeated in duplicate.

Western Blot Analysis

Western blot analysis was performed as described previously (Dahm et al. 2010), with either 5 μ g of total cellular protein, 500 ng of human recombinant proteins, or 3 μ g of either the

cytoplasmic or membrane protein fraction being electrophoretically size separated on an 8.5% SDS polyacrylamide gel (Laemmli 1970) using a Mini Protean Gel System (Bio-Rad, München, Germany). After tank-blot Western transfer onto a PVDF membrane (Roth, Karlsruhe, Germany), blocking occurred for 1 h at 4 °C in 3% (w/v) nonfat dry milk in TBS with 0.01% Tween-20 (TBST). Blots were then incubated overnight at 4 °C with primary antibodies (as listed above), diluted 1:2000 in TBST with 0.1% nonfat dry milk. After washing, rabbit-specific peroxidase-coupled secondary antibodies (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), diluted at 1:10,000 in TBST, with 0.1% non-fat dry milk, were applied for 90 min at room temperature. Subsequent visualization occurred by exposing SuperRX medical X-ray films (Fuji, Düsseldorf, Germany), during the application of a peroxidase chemiluminescence substrate (0.1 mol/l Tris-HCl (pH 8.6), 0.25 mg/ml luminol, 0.2 mg/ml *p*-hydroxycoumaric acid, and 0.1% H₂O₂) to the blots. For reprobing, blots were stripped with 1 mol/l NaOH for 15 min and then processed for a second round of immunodetection as described. Each blot was repeated three times.

Cell Culture

SH-SY5Y cells were maintained in DMEM-F12 supplemented with 15% FCS, 5 µg/ml insulin, and penicillin/streptomycin, in an incubator at 37 °C and under a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The medium was exchanged every other day, and shortly before reaching confluency, cell monolayers were washed with phosphate buffered saline (PBS), then mobilized by incubation with trypsin/EDTA (0.05%/0.02%, respectively), and finally seeded at a lower density either on 12-mm glass coverslips (Menzel, Braunschweig, Germany) in a 24-well plastic multiwell plate (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) for immunocytochemistry or on 6-well plastic multiwell plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany), for Western blot analysis. For antibody treatment, upon reaching the requested density, cells were preincubated for 4 h in serum- and insulin-free DMEM-F12 and subsequently for 12 h with 10 µg/ml of each antiserum, the sodium azide of which has been removed by microdialysis (Amicon-Ultra filter units, Millipore).

Hex>Select αNG

- snap23*** (Synaptosomal-associated protein 23)
- c11orf31*** (Selenoprotein H)
- sgcb** (Beta-sarcoglycan)
- ac087749.12** (Unconventional myosin-15B)
- chmp1a** (Charged multivesicular body protein 1a)
- pld3** (Phospholipase D3)
- syt1** (Synaptotagmin-1)
- tspan7*** (Tetraspanin-7)
- cadm3** (Cell adhesion molecule 3 Precursor)
- c17orf32** (Transmembrane protein 199)
- keep1*** (Kelch-like ECH-associated protein 1)
- serp2** (Stress-associated endoplasmic reticulum protein 2)
- snrnp70** (U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa)
- ccdc109b** (Coiled-coil domain-containing protein 109B)
- nes** (Nestin)
- prkar1b** (cAMP-dependent protein kinase type I-beta regulatory subunit)
- arl8a** (ADP-ribosylation factor-like protein 8A)
- chmp5** (Charged multivesicular body protein 5)
- ctnnbip1** (Beta-catenin-interacting protein 1)
- cxcl12** (Stromal cell-derived factor 1)
- jmjd8** (Jumonji domain-containing protein 8)
- lman2** (Lectin mannose-binding protein 2)
- mccc1** (Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha)
- nefl** (Neurofilament light polypeptide)
- por** (NADPH-cytochrome P450 reductase)
- pqlc2** (PG-hoop repeat-containing protein 2)
- rps15** (40S ribosomal protein S15)
- sptan1** (Spectrin alpha chain)
- stx10** (Syntaxin10)
- vgll4** (Transcription cofactor vestigial-like protein 4)

Intensity:
 high ■ ■ ■ ■ ■ low

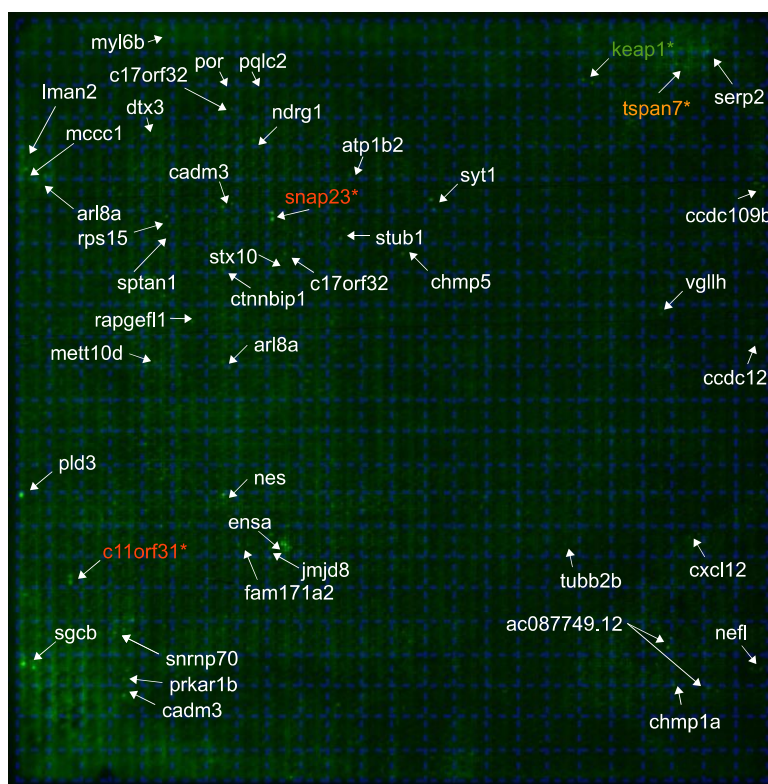


Fig. 1 Interactions of antibodies directed to the Gram-negative bacterium *Neisseria gonorrhoeae* (α-NG) with specific protein spots on the hEXselect multiprotein array (MPA). This array contains 22,000 spots of both full-length and shorter protein fragments, expressed in an *E. coli* system, representing a total of around 10,000 different proteins of two late first trimester human fetal brains (Büssow et al. 2000). As

revealed by the green-stained false color image of an X-ray film exposed to the immune incubation of a hEXselect MPA as visualized by ECL detection, a number of pairwise immunoreactive spots revealed immunoreactivity with α-NG, which subsequently could be identified according to their membrane location as 30 different proteins and classified by their staining intensities (see table on the left)

Immunocytochemistry

Immunocytochemistry was performed as described earlier (Dahm et al. 2010). In brief, cells on glass coverslips (see above) were washed with PBS and fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS. After washing, cells were permeabilized for 10 min with a mixture of acetone/methanol (1:1) at -20°C . Following three washes with PBS, cells were blocked for 1 h with goat serum (GS) diluted 1:50 in PBS (PBS-GS). Primary antibodies diluted 1:50 in PBS-GS were applied overnight at 4°C , followed by three washes with PBS and a 90-min incubation with biotin-coupled secondary antibodies (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), diluted 1:400 in PBS-GS at 37°C . After three washes with PBS, peroxidase-labeled streptavidin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), diluted 1:400 in PBS, was applied for 90 min at room temperature. After washing with PBS, sections were stained with diaminobenzidine (DAB) and, after three washes with PBS, were covered with a commercially available mounting medium (DAKO, Glostrup, Denmark) under standard coverslips (Menzel, Braunschweig, Germany). Imaging was performed using an Axiocam digital camera system, mounted on an Axiophot microscope (Zeiss, Jena, Germany).

Assay for Membrane Vesicle Recycling

Effects of α -NG and α -Snap23 on insulin-elicited exocytosis vesicle recycling were visualized by staining with the fluorescent dye FM1-43 (Chowdhury et al. 2005; Gaffield and Betz 2006). Cells with or without a 12-h pretreatment with different antisera were incubated for 10 min with $10\ \mu\text{mol/l}$ of FM1-43 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) in the presence or absence of $1\ \mu\text{mol/l}$ insulin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). After rinsing the extracellular excess of FM1-43 off the cells by PBS, fluorescence intensity (as a measure for the amount of membrane vesicle recycling) was detected photographically using an Axiophot microscope equipped with epifluorescence (Zeiss, Jena, Germany).

Differential Protein Fractionation

To assess membrane translocation of the insulin-dependent glucose transporter GluT4 in SH-SY5Y cells, cytoplasmic and membrane proteins of these cells were separated by differential protein fractionation (Ramsby et al. 1994; Zabel and Klose 2009), as follows: confluent cell cultures on 6-well plastic cell culture plates (see above) were washed with PBS and then homogenized in extraction buffer (EB) ($50\ \text{mmol/l}$ Tris-HCl, pH 8.0; $10\ \text{mmol/l}$ EDTA; $2\ \text{mmol/l}$ EGTA; 5% β -mercaptoethanol). After transferring into a 1.5-ml Eppendorf cup and 15 min incubation on ice, the homogenate was centrifuged for 10 min at $10,000g$ at 4°C . To the supernatant (containing cytoplasmic proteins), trichloro-acetic acid

(15% w/v) was added, and after a 15-min incubation on ice, the mixture was centrifuged for 10 min at $10,000g$ at 4°C . After discarding the resulting supernatant, the remaining pellet was washed with acetone (80%) and (after air drying) dissolved in $5\times$ Laemmli sample buffer ($0.5\ \text{mmol/l}$ Tris HCl pH 6.8, 2% SDS (w/w), 10% glycerol (v/v)) for Western blot analysis. The pellet of the first round of centrifugation

Table 1 Functional classification of proteins with cross-reactivity with α -NG as identified by the hEXselect multiprotein array

1. Synaptic proteins	snap23* (synaptosomal-associated protein 23)
	syt1 (synaptotagmin-1)
	stx10 (syntaxin10)
2. Protein sorting	chmp1a (charged multivesicular body protein 1a)
	chmp5 (charged multivesicular body protein 5)
3. Neurite outgrowth	tspan7* (tetraspanin-7)
4. Neurofilaments	nes (nestin)
	nefl* (neurofilament light polypeptide)
5. Cell adhesion	cadm3 (cell adhesion molecule 3 precursor)
	c17orf32 (transmembrane protein 199)
	ctnmbip1 (beta-catenin-interacting protein 1)
	sptan1 (spectrin alpha chain)
6. Intracellular signaling	pld3 (phospholipase D3)
	keap1* (kelch-like ECH-associated protein 1)
	serp2 (stress-associated endoplasmic reticulum protein 2)
	ccdc109b (coiled-coil domain-containing protein 109B)
	prkar1b (cAMP-dependent protein kinase type I-beta regulatory subunit)
	arl8a (ADP-ribosylation factor-like protein 8A)
	cxcl12 (stromal cell-derived factor 1)
	pqlc2 (PQ-loop repeat-containing protein 2)
7. Transcription factors	vgl14 (transcription cofactor vestigial-like protein 4)
8. Ribosomal proteins	snrnp70 (U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa)
	rps15 (40S ribosomal protein S15)
9. Mitochondrial proteins	mccc1 (methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha)
	por (NADPH-cytochrome P450 reductase)
10. Other proteins	c11orf31* (selenoprotein H)
	sgcb (beta-sarcoglycan)
	ac087749.12 (unconventional myosin-15B)
	jmjd8 (Jumonji domain-containing protein 8)
	lman2 (lectin mannose-binding protein 2)

(containing the membrane proteins) was further washed two times with EB and then also dissolved in 5× Laemmli sample buffer (see above). For both fractions (cytoplasmic and membrane proteins), concentration was determined densitometrically (Henkel and Bieger 1994), and 3 µg per lane was used for Western blot detection of GluT4 as described above.

RNA Isolation and Semiquantitative RT-PCR

Effects of a 12-h pretreatment with either α-NG or α-NM on relative expression of Snap23 or GluT4 mRNA in SH-SY5Y cells were analyzed by a semiquantitative RT-PCR assay as follows: total cellular RNA of SH-SY5Y cells, treated for 12 h with 10 µg of either α-NG or α-NM and the corresponding control cultures with no antibody pretreatment, was isolated using a high pure RNA isolation kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer’s instructions. Three micrograms of total RNA for each sample was then reversely transcribed with random hexamer primers using a transcriptor high fidelity cDNA synthesis kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the

manufacturer’s instructions. For each sample, 2.5 µl of the resulting cDNA mix was amplified by PCR using a combination of two primer pairs in the same sample tube with specificity to either Snap23 (forward primer: ccgcatagaagaaggcttga; reverse primer: ctgttggtgcagccttgc) or GluT4 (forward primer: actctccacgctctgggtat; reverse primer: gtaaccggggctctatt), together with primers specific for the housekeeping gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; forward primer: ctttgcgtgccagccg; reverse primer: ggatctcgtcctggaagatgg) as a reference product for relative quantification. Amplification was performed with a PCR-cycler (Mastercycler personal, Eppendorf, Hamburg, Germany) using the following parameters: after starting the PCR reaction with an initial round of 2 min at 94 °C (hotstart), 29 cycles consisting each of a 30-s denaturation step at 94 °C, followed by a 45-s annealing step at 56 °C and a 30-s elongation step at 72 °C were performed. The reaction was then terminated with a final 2-min elongation step at 72 °C, followed by a holding temperature of 4 °C until removal of the samples from the cycler. Ten microliters of each sample was then mixed with 2 µl of a 6× loading dye and

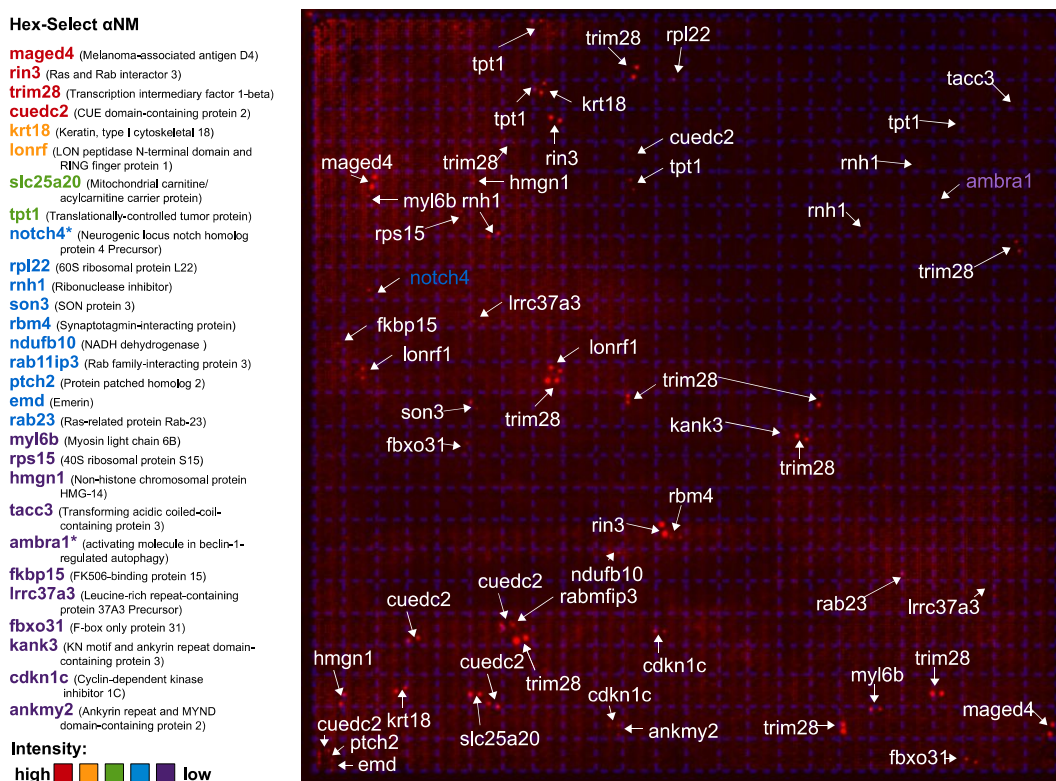


Fig. 2 Interactions of antibodies directed to *Neisseria meningitidis* (α-NM), a bacterium closely related to *Neisseria gonorrhoeae*, with specific protein spots on the hEXselect multiprotein array (MPA). This MPA contains 22,000 spots of both full-length and shorter protein fragments, expressed in an *E. coli* system, representing a total of around 10,000 different proteins of two late first trimester human fetal brains (Büssow

et al. 2000). As revealed by the red-stained false color image of an X-ray film exposed to the immune incubation of a hEXselect MPA as visualized by ECL detection, a number of pairwise immunoreactive spots revealed immunoreactivity with α-NM, which subsequently could be identified according to their membrane location as 29 different proteins and classified by their staining intensities (see table on the left)

electrophoretically size separated on a 2% agarose gel in TBE buffer (Tris-HCl 89 mmol/l, boric acid 89 mmol/l, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 2 mmol/l). After 15 min staining in ethidium bromide (2 µg/ml in water) and a 45-min destaining step in water, PCR bands were visualized on a UV transilluminator stage equipped with a dark room cabinet together with a CCD camera and a BioCapt V10 video gel documentation system (Vilber-Lourmat, Marne La Vallée, France).

Table 2 Functional classification of proteins with cross-reactivity with α -NM as identified by the hEXselect multiprotein array

1. Transcription
trim28 (transcription intermediary factor 1-beta)
rbm4 (RNA-binding protein 14)
son3 (SON protein 3)
kank3 (KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 3)
2. Membrane receptors
notch4* (neurogenic locus notch homolog protein 4 precursor)
pch2 (protein patched homolog 2)
lrrc37a3 (leucine-rich repeat-containing protein 37A3 precursor)
ankmy2 (ankyrin repeat and MYND domain-containing protein 2)
3. Intracellular signaling
cuedc2 (CUE domain-containing protein 2)
rin3 (Ras and Rab interactor 3)
rab23 (Ras-related protein Rab-23)
rab11ip3 (Rab family-interacting protein 3)
fbxo31 (F-box only protein 31)
cdkn1c (cyclin-dependent kinase inhibitor 1C)
ambra1* (activating molecule in beclin-1-regulated autophagy)
4. Cytoskeleton
krt18 (keratin, type I cytoskeletal 18)
myl6b (myosin light chain 6B)
5. Ribosomal proteins
rpl22 (60S ribosomal protein L22)
rps15 (40S ribosomal protein S15)
6. Mitochondrial proteins
slc25a20 (mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier protein)
ndufb10 (NADH dehydrogenase)
7. Nuclear proteins
emd (emerin)
hmg1 (nonhistone chromosomal protein HMG-14)
tacc3 (transforming acidic coiled-coil-containing protein 3)
8. Other proteins
lonrf1 (LON peptidase N-terminal domain and RING finger protein 1)
tpt1 (translationally controlled tumor protein)
rnhl (ribonuclease inhibitor)
rbm4 (synaptotagmin-interacting protein)
fkbp15 (FK506-binding protein 15)

Densitometry and Statistical Evaluation

Densitometric assessment was performed using the Fiji clone of the open access image analysis program ImageJ (<https://fiji.sc/>), followed by statistical evaluation using the statistical functions of the spreadsheet program of the open source office suite OpenOffice (<https://www.openoffice.org/de/>).

Results

In order to identify interaction partners for α -NG in the first trimester human fetal brain independent of their expression strength, the hEXselect MPA was incubated with this antiserum and immunoreactive spots were identified according to

Table 3 Schizophrenia candidate proteins as identified by the hEXselect multiprotein array

(a) Proteins with reactivity to α -NG
snap23 (synaptosomal-associated protein 23, 211 aa, 23.3 kDa)
Essential component of the high affinity receptor for the general membrane fusion machinery, important regulator of transport vesicle docking and fusion
Expressed in neurons and astrocytes
tspan7 (tetraspanin-7, 249 aa, 27.6 kDa)
Cell surface glycoprotein
Regulates cell development, activation, growth and motility, control of neurite outgrowth
Forms complexes with integrins => synaptogenesis
Associated with X-linked mental retardation, Huntington's chorea, fragile X syndrome, and myotonic dystrophy
nefl (neurofilament light polypeptide, 543 aa, 61.5 kDa)
Intermediate filament protein component
Cerebral cortex development
keap1 (kelch-like ECH-associated protein 1, 624 aa, 69.7 kDa)
Inhibits Nrf2, the master regulator of the antioxidant response
c11orf31 (selenoprotein H, 122 aa, 13.5 kDa)
Prevents cell senescence due to oxidative stress
Induces mitosis
Knockdown of selenoprotein P => degeneration of PV-positive GABAergic interneurons
(b) Proteins with reactivity to α -NM
notch4 (neurogenic locus notch homolog protein 4 precursor)
(3 isoforms: IF1: 2003 aa/200.6 kDa, IF2: 589 aa/61.3 kDa, IF3: 377 aa/39.6 kDa)
Intracellular signaling protein controlling cell fate decisions
Upregulated after hypoxia
Mutations in the notch4 gene may be associated with susceptibility to schizophrenia in some cases
ambra1 (activating molecule in beclin-1-regulated autophagy, 1298 aa, 142.5 kDa)
Activator of beclin-mediated autophagy
Control of neural tube development

the manufacturer's instructions. In addition, as a control for specificity, an identical MPA was incubated with an antiserum directed to the closely related bacterium *N. meningitidis* (α -NM). For α -NG (Fig. 1), a set of 30 different proteins revealed a pair of distinctly cross-reactive protein spots that could be assigned to proteins belonging to 8 different functional groups (Table 1). For α -NM (Fig. 2), 29 proteins revealed distinct immunoreactive spots that could also be assigned to different functional groups (Table 2). For both α -NG and α -NM, several established schizophrenia candidate proteins revealed cross-reactivity with either of these antibodies such as Snap23, selenoprotein H, tspan7, and keap1 for α -NG as well as notch4 and ambra1 for α -NM (Table 3).

Due to its special relevance as a schizophrenia candidate and its functional importance for vesicle fusion, we selected here the interaction of α -NG with the human SNARE-complex protein Snap23 for further analysis. For this, we tried first to confirm the interaction of α -NG with Snap23 independently by testing the interaction of α -NG with a commercially available Snap23 protein sample by a series of Western blot experiments. As shown in Fig. 3a, α -NG revealed again cross-reactivity with Snap23, demonstrating a distinct immunoreactive band at a molecular weight shortly above 20 kDa. In contrast to this, the closely related SNARE-complex pro-

Fig. 4 Effects of α -NG and α -NM, as well as of α -Snap23 and α -Snap25, on insulin-dependent exocytosis vesicle recycling in SH-SY5Y cells, as revealed by life staining with the fluorescent dye FM1-43. **a** Fluorescence image of vesicular membrane staining by FM1-43 in a control culture of SH-SY5Y cells. **b** Fluorescence image of vesicular membrane staining by FM1-43 in a culture of SH-SY5Y cells treated for 12 h with 10 μ g/ml α -NG. **c** Fluorescence image of vesicular membrane staining by FM1-43 in a culture of SH-SY5Y cells treated for 10 min with 1 μ mol/l insulin. **d** Fluorescence image of vesicular membrane staining by FM1-43 in a culture of SH-SY5Y cells treated for 12 h with 10 μ g/ml α -NG followed by a 10-min pulse of 1 μ mol/l insulin. **e** Diagram of the densitometric evaluation of a series of experiments as shown in **a–d** demonstrating both the insulin-dependent increase of FM1-43 fluorescence in vesicular membranes and the α -NG-dependent inhibition of this effect in SH-SY5Y cells to be statistically significant. **f** Diagram of the densitometric evaluation of a similar series of experiments as shown in **a–e**, however, in this case, with a treatment of 10 μ g/ml of α -NM instead, demonstrating again the insulin-dependent increase of FM1-43 fluorescence in SH-SY5Y cells to be statistically significant. However, in this case, no α -NM dependent inhibition of this latter effect could be observed. **g** Diagram of the densitometric evaluation of a similar series of experiments as shown in **a–d**, however, in this case, with a treatment of 10 μ g/ml of α -Snap23 instead, demonstrating both the insulin-dependent increase of FM1-43 fluorescence in vesicular membranes and the α -Snap23-dependent inhibition of this effect in SH-SY5Y cells to be statistically significant. **h** Diagram of the densitometric evaluation of a similar series of experiments as shown in **a–e**, however, in this case, with a treatment of 10 μ g/ml of α -Snap25 instead, demonstrating again the insulin-dependent increase of FM1-43 fluorescence in SH-SY5Y cells to be statistically significant. However, in this case, no α -Snap25-dependent inhibition of the latter effect could be observed. ****** $p < 0.01$

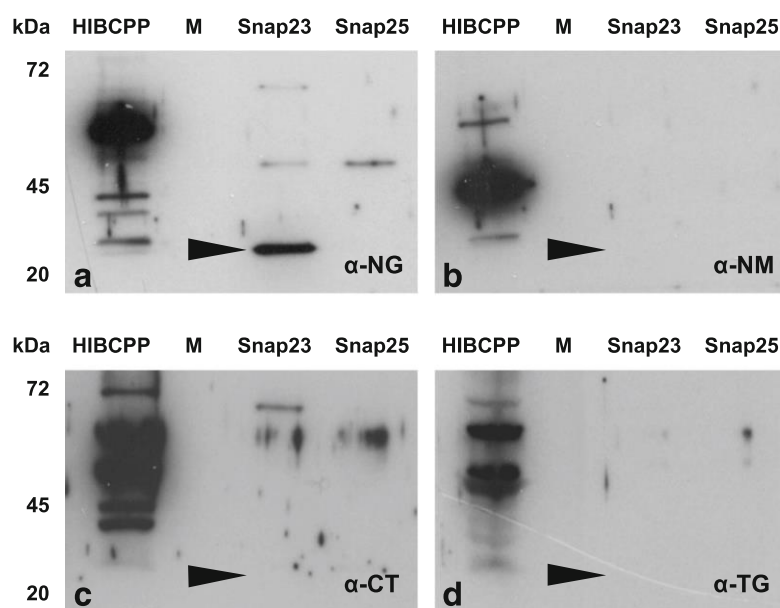
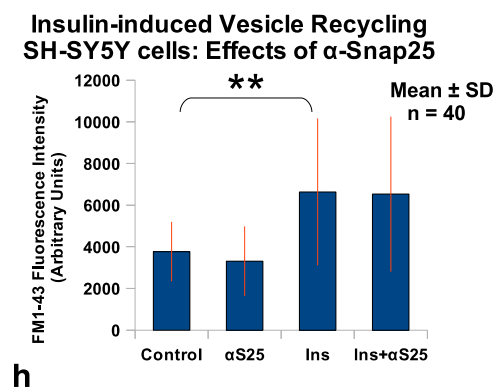
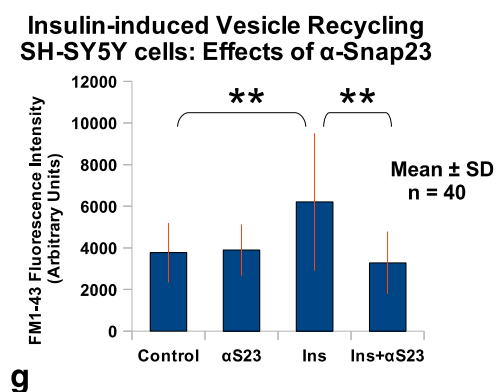
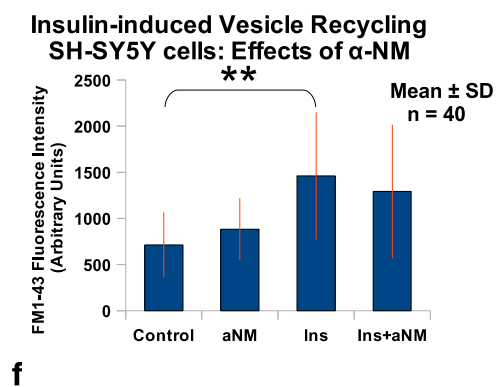
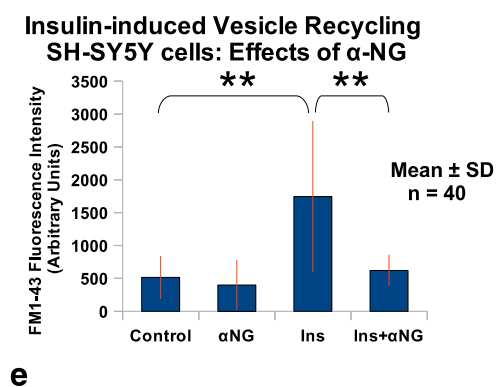
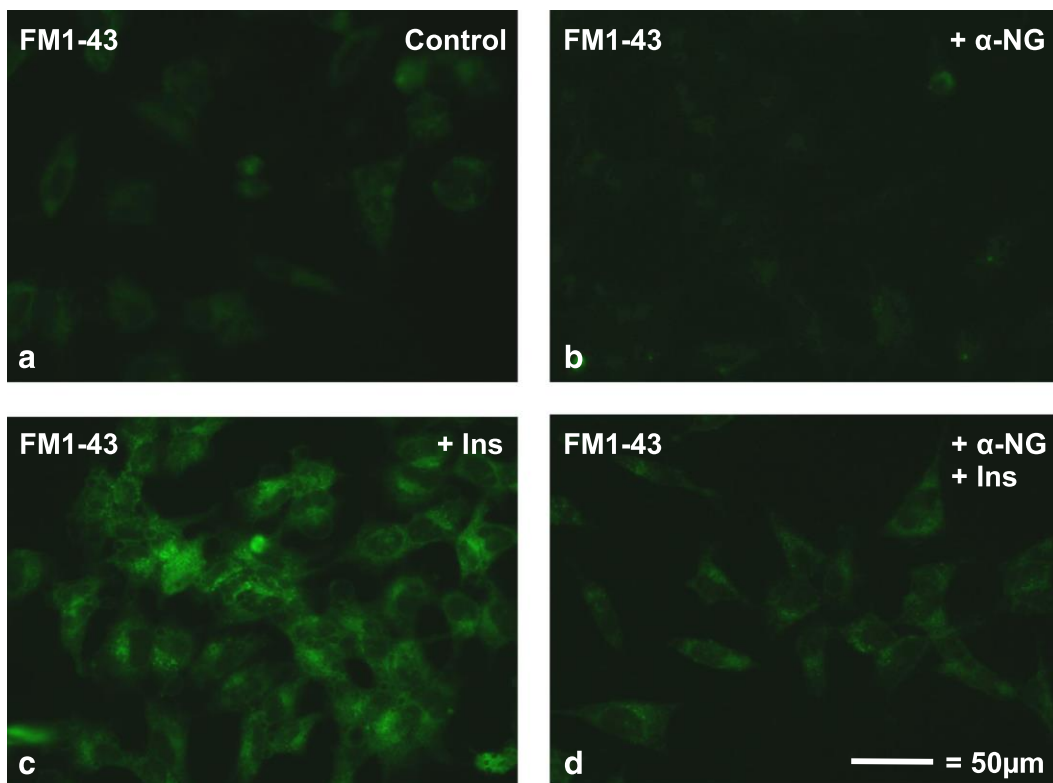


Fig. 3 Crossreactivity of antibodies directed to *Neisseria gonorrhoeae* (α -NG), *Neisseria meningitidis* (α -NM), *Chlamydia trachomatis* (α -CT), and *Toxoplasma gondii* (α -TG) with recombinant samples of the SNARE-complex proteins Snap23 and Snap25, as revealed by Western blot analysis. **a** Western blot of an HIBCPP cell extract together with commercial samples of Snap23 and Snap25 with α -NG revealing an immunopositive band only

for Snap23, whereas Snap25 revealed no such band. **b** A similar blot as shown in **a**, however, in this case incubated with an antiserum directed to α -NM, which failed to interact with samples of both proteins, Snap23 and Snap25. **c** Also α -CT revealed no interaction with both SNARE-complex proteins on the blotting membrane. **d** The same holds true for α -TG, for which also no interactions with both Snap23 and Snap25 could be observed



tein Snap25 revealed no such interaction. Further along this line, antibody specificity of the interaction of α -NG with Snap23 could be confirmed also by the fact that antisera directed to other bacterial or protozoan organisms such as *N. meningitidis* (α -NM, Fig. 3b), *C. trachomatis* (α -CT, Fig. 3c), or *T. gondii* (α -TG, Fig. 3d) failed to interact with samples of both Snap23 or Snap25 proteins.

An established method for the detection of exocytosis is provided by staining of the cells with the fluorescent dye FM1-43. One has to note that staining with FM1-43 gives an indirect estimate for exocytosis activity of a given cell since it is specifically incorporated into membrane vesicles forming after exocytosis, when the vesicle membrane is recycled back into the cytoplasm for a new round of exocytosis. We used this method here to visualize the effects of α -NG on exocytosis in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y (Fig. 4). By this, one can see that in control cells (Fig. 4a) or cells treated with α -NG alone (Fig. 4b), almost no incorporation of FM1-43 into cytoplasmic vesicles can be observed. In contrast to that, a 10-min treatment with insulin leads to a clearly visible increase in integration of FM1-43 into cytoplasmic vesicles (Fig. 4c), that was not observed in cells treated with insulin after a 12-h pretreatment with α -NG (Fig. 4d). These findings could be further confirmed by statistical evaluation of a series of such experiments (Fig. 4e), and in addition, as a control for antibody specificity of this effect, it could be shown that a similar pretreatment with α -NM was not able to abolish insulin-dependent increase in membrane vesicle recycling (Fig. 4f). Further along this line, a similar series of experiments, however, in this case with a polyclonal antiserum raised specifically to Snap23 (α -Snap23) revealed that also α -Snap23 was able to interfere with insulin-induced membrane recycling (Fig. 4g). In contrast to that, incubation with an antibody raised to the closely related SNARE-complex protein Snap25 (α -Snap25) was not able to interfere with this process (Fig. 4h).

Since Snap23 is also known to be involved in membrane translocation of receptor proteins such as the insulin-dependent glucose transporter GluT4 (Foster et al. 1999; Kawanishi et al. 2000), we tried to elucidate whether pretreatment with α -NG could also interfere with this process. As shown in Fig. 5 by immunocytochemistry in SH-SY5Y cells, this was indeed the case. Thus, both control cultures (Fig. 5a) and cultures treated with α -NG alone revealed GluT4 immunoreactivity primarily in intracellular storage vesicles, whereas the cell membrane was only weakly stained. In contrast to that, cells treated for 10 min with insulin in the absence of α -NG (Fig. 5c) revealed strong labeling of the whole plasma membrane, which was able to cover staining in the intracellular storage vesicles almost entirely. In contrast to this, a 12-h pretreatment with 10 μ g/ml α -NG was able to prevent insulin-dependent membrane translocation nearly complete, and therefore, in this case, staining in the plasma

membrane is distinctly less intense, whereas the intracellular storage vesicles are again clearly visible. A similar effect could be observed for α -Snap23, which on its own had no influence on the distribution of GluT4 in SH-SY5Y cells (Fig. 5e), whereas a 12-h pretreatment with α -Snap23 was able to interfere with the insulin-induced translocation of GluT4 to the cell membrane (Fig. 5f) as shown above. In contrast to that, α -Snap25 which alone did not affect GluT4 distribution in SH-SY5Y cells (Fig. 5g) was not able to interfere with insulin-induced membrane translocation of GluT4 in SH-SY5Y cells (Fig. 5h).

In order to further confirm the results about the effects of α -NG and α -NM on insulin-dependent membrane translocation of GluT4 revealed by immunocytochemistry, we applied differential protein fractionation, a technique allowing the separation of whole cell protein samples into a fraction containing proteins located at the cell membrane, and a second fraction of proteins being stored in the cytoplasm. As shown in Fig. 6, these different protein fractions were then analyzed for each treatment by Western blotting, revealing for SH-SY5Y cells clearly visible bands for GluT4 in both cytoplasmic and membrane protein fractions. In addition (Fig. 6a), levels of GluT4 immunoreactivity in the membrane fraction were distinctly increased in insulin-treated cells as compared to control cultures or cultures treated with α -NG alone. In contrast to this, when the cells were pretreated for 12 h with α -NG prior to acute exposure to insulin, such an increase could not be observed (Fig. 6a). For loading control, blots were stripped and reincubated with an antibody directed to β -actin, revealing a predominant membrane-associated location of this protein (Fig. 6b) probably due to its function in the cytocortex. In contrast to α -NG, pretreatment with α -NM was not able to abolish the effect of acute insulin exposure on GluT4 localization in SH-SY5Y cells (Fig. 6c), and again blots were reincubated with β -actin-specific antibodies as a loading control (Fig. 6d). Both the effects of α -NG on insulin-dependent GluT4 membrane translocation (Fig. 6e) and the lack of this effect for α -NM (Fig. 6f) could be confirmed by statistical evaluation of a set of four independent experiments. As revealed by the statistical evaluation of a similar series of experiments, however, in this case, with an antiserum directly raised against Snap23 (α -Snap23), similar effects of α -Snap23 on insulin-induced membrane translocation of GluT4 in SH-SY5Y cells could be observed as for α -NG (Fig. 6g), whereas an antiserum raised to the closely related SNARE-complex protein Snap25 (α -Snap25) failed to interfere with the insulin-induced membrane translocation of GluT4 in SH-SY5Y cells.

A common finding in human autoimmune disorders is a compensatory upregulation of the mRNA coding for the affected protein (Guyon et al. 1998). This raised for us the question whether a similar upregulation could be also observed for Snap23 mRNA in SH-SY5Y cells as a result of its interaction

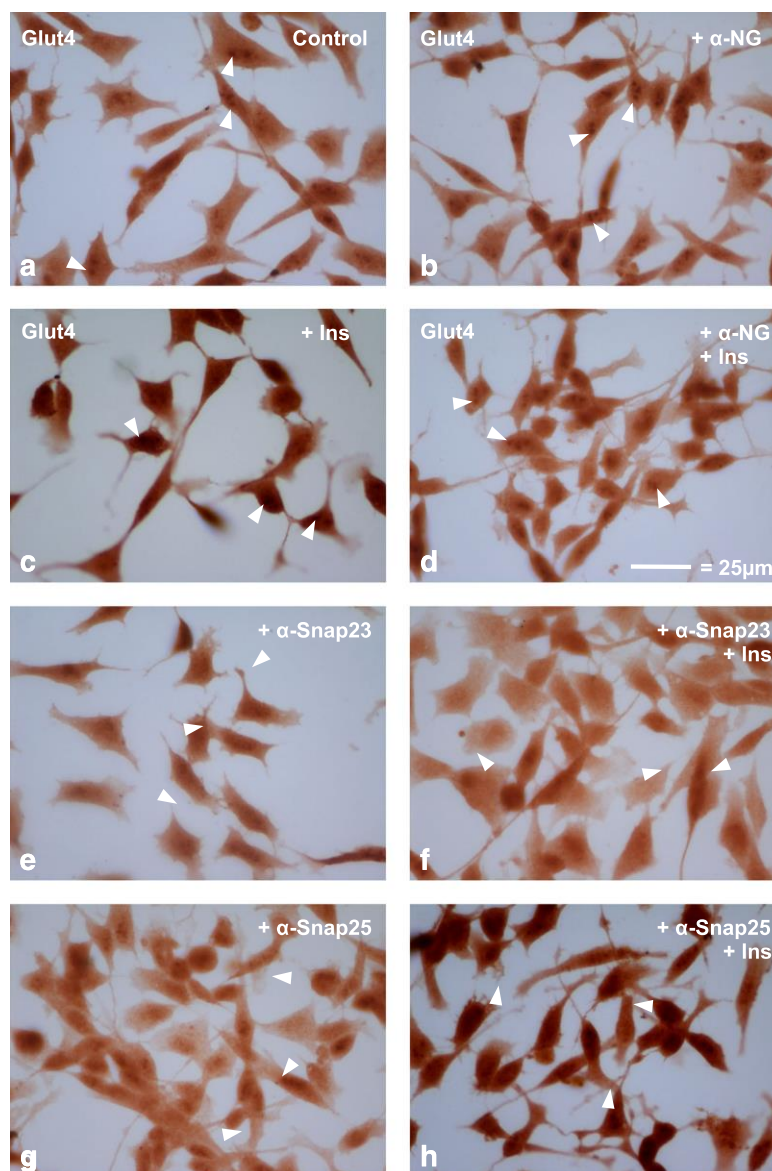
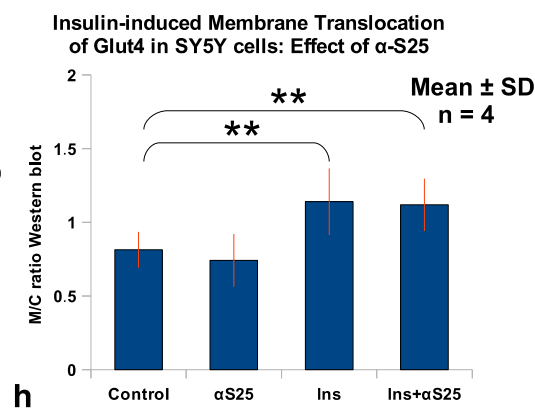
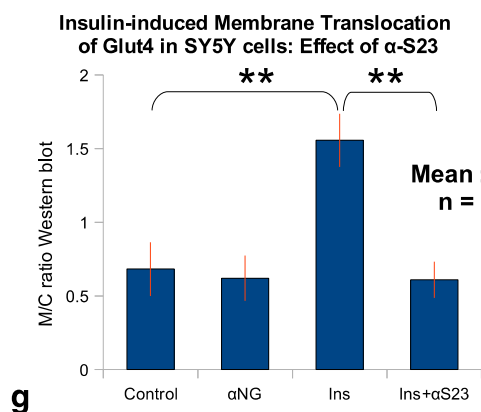
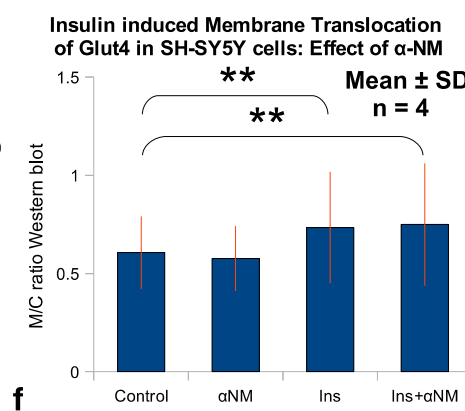
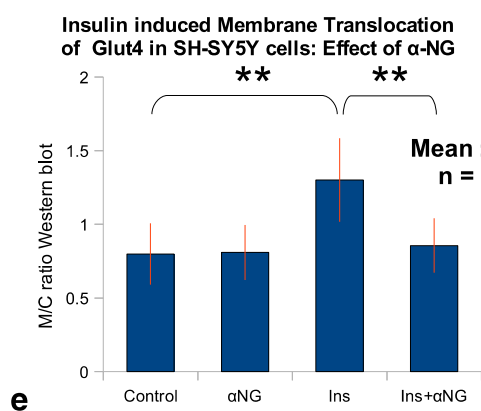
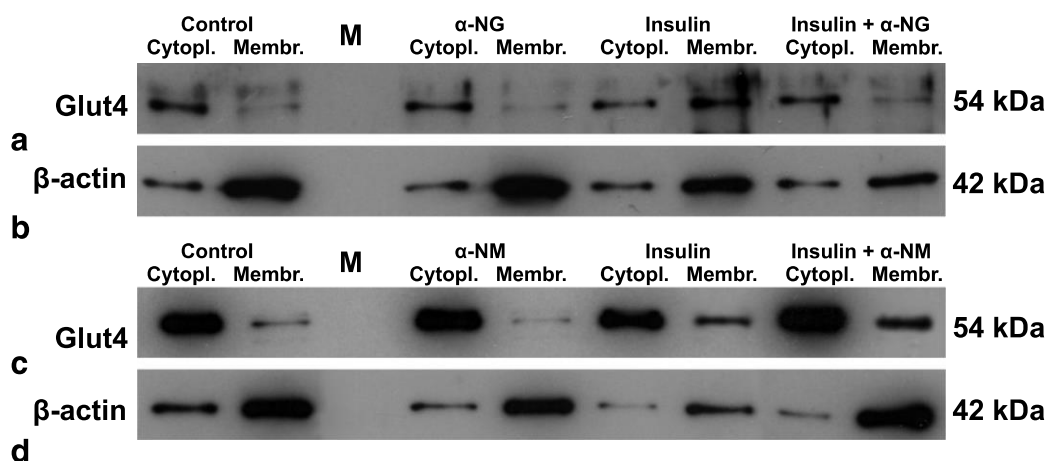


Fig. 5 Effects of α -NG and α -NM, as well as of α -Snap23 and α -Snap25, on insulin-dependent membrane translocation of GluT4 in SH-SY5Y cells as revealed by immunocytochemistry. **a** Microscopic image of a control culture of SH-SY5Y cells, revealing GluT4 immunoreactivity in distinct intracellular storage vesicles (*small arrowheads*). **b** Microscopic image of SH-SY5Y cells pretreated overnight with 10 μ g/ml α -NG, in which GluT4 immunoreactivity is located also primarily in intracellular storage vesicles. **c** Microscopic image of SH-SY5Y cells without α -NG pretreatment, however, in this case, exposed to a short 10-min pulse of 1 μ mol/l insulin. Under these conditions, GluT4 immunoreactivity is found primarily in the cell membrane, thereby covering mostly staining of intracellular storage vesicles. **d** Microscopic image of SH-SY5Y cells after pretreatment with 10 μ g/ml α -NG overnight and a short 10-min pulse of 1 μ mol/l insulin. Under these conditions, GluT4 immunoreactivity is again detected only in

intracellular storage vesicles, whereas the cell membrane remains mostly unstained. **e** Microscopic image of SH-SY5Y cells pretreated overnight with 10 μ g/ml α -Snap23, in which GluT4 immunoreactivity is located also primarily in intracellular storage vesicles. **f** Microscopic image of SH-SY5Y cells after pretreatment with 10 μ g/ml α -Snap23 overnight and a 10-min pulse of 1 μ mol/l insulin. Also under these conditions, GluT4 immunoreactivity is detected only in intracellular storage vesicles, whereas the cell membrane remains only weakly stained. **g** Microscopic image of SH-SY5Y cells pretreated overnight with 10 μ g/ml α -Snap25, in which GluT4 immunoreactivity is located primarily in intracellular storage vesicles. **h** Microscopic image of SH-SY5Y cells pretreated overnight with 10 μ g/ml α -Snap25 and an additional 10-min pulse of 1 μ mol/l insulin. Under these conditions, GluT4 immunoreactivity is found again primarily in the cell membrane, where it is able to mostly cover staining of intracellular storage vesicles

with α -NG. As shown in Fig. 7a, this was indeed the case, since in cells treated for 12 h with α -NG, a distinct

upregulation of Snap23 mRNA as revealed by RT-PCR could be observed, whereas in cells treated with α -NM, no such



increase was detectable. In contrast to this, expression of the housekeeping gene GAPDH was not changed at all by either of the antibody treatments as compared to control cells. As shown in Fig. 7b, the diagram of the statistical evaluation of a series of experiments as shown in Fig. 7a revealed the increase in Snap23 mRNA expression by α-NG pretreatment to be statistically significant. In contrast to this, expression of the mRNA coding for GluT4 was not changed by α-NG pretreatment and also α-NM elicited no expression changes in this

gene. This could be confirmed by the statistical evaluation of a series of such experiments, the diagram of which is shown in Fig. 7d.

Discussion

In the present study, a cDNA-based multiprotein array (MPA), derived from two human first trimester fetal brains, was used

Fig. 6 Effects of α -NG and α -NM, as well as of α -Snap23 and α -Snap25, on insulin-dependent membrane translocation of GluT4 in SH-SY5Y cells, as revealed by differential extraction of cytoplasmic and membrane-bound proteins, followed by Western blot analysis. **a** Western blot analysis for expression of GluT4 in cytoplasmic and membrane-bound protein fractions of either control cells or cells treated for 12 h with α -NG (10 μ g/ml) alone, 10 min with insulin (1 μ mol/l) alone, or for 12 h α -NG (10 μ g/ml) followed by 10 min insulin (1 μ mol/l), demonstrating a clear increase in GluT4 immunoreactivity in the membrane fraction of cells treated with insulin alone, whereas after pretreatment with α -NG, no such increase can be observed. **b** Western blot analysis for the expression of β -actin on the same membrane as shown in **a** for loading control, demonstrating most of the β -actin being associated with the cell membrane, whereas in the cytoplasm, only small amounts of β -actin are detectable. **c** Western blot analysis for expression of GluT4 in cytoplasmic and membrane-bound protein fractions of either control cells or cells treated for 12 h with α -NM (10 μ g/ml) alone, 10 min with insulin (1 μ mol/l) alone, or for 12 h α -NM (10 μ g/ml) followed by 10 min insulin (1 μ mol/l), demonstrating also a clear increase in GluT4 immunoreactivity in the membrane fraction of cells treated with insulin alone, however, in this case, pretreatment with α -NM was not able to prevent this increase. **d** Western blot analysis for the expression of β -actin on the same membrane as shown in **c** for loading control, demonstrating most of the β -actin to be associated with the cell membrane, whereas in the cytoplasm, only small amounts of β -actin can be detected. **e** Diagram of the densitometric evaluation of a series of experiments as shown in **a** demonstrating both the insulin-dependent increase of GluT4 in the cell membrane and the α -NG-dependent inhibition of this effect in SH-SY5Y cells to be statistically significant. **f** Diagram of the densitometric evaluation of a series of experiments as shown in **c** demonstrating the insulin-dependent increase of GluT4 in the cell membrane of SH-SY5Y cells to be statistically significant. An α -NM-dependent inhibition of this effect cannot be observed. **g** Diagram of the densitometric evaluation of a similar series of experiments as shown in **a–d**, however, in this case, with a treatment of 10 μ g/ml of α -Snap23 instead, demonstrating also a significant insulin-dependent increase in GluT4 in the membrane protein fraction, as well as a significant inhibition of this latter effect by α -Snap23 in SH-SY5Y cells. **h** Diagram of the densitometric evaluation of a similar series of experiments as shown in **a–d**, however, in this case, with a treatment of 10 μ g/ml of α -Snap25 instead, demonstrating again a significant insulin-dependent increase of GluT4 in the cell membrane of SH-SY5Y cells. However, in this case, an α -Snap25-dependent inhibition of this effect cannot be observed. ***p* < 0.01

to screen for interaction partners of a polyclonal antiserum directed to the Gram-negative bacterium *N. gonorrhoeae* (α -NG) in order to identify possible causative factors for a previously documented (Babulas et al. 2006; Sørensen et al. 2009) correlation of first trimester prenatal maternal gonococcal infections with an increased schizophrenia lifetime risk in the affected offspring. By this, we could show for the first time that α -NG is able to bind to at least 30 different interaction partners, whereas incubation with an antiserum directed to the closely related bacterium *N. meningitidis* (α -NM) revealed 29 mostly different interaction partners. Only rps15, a ribosomal protein and a component of the 40S ribosomal subunit, was bound by both antisera, whereas all the other proteins revealed no overlap in their interactions with either of both antisera.

For α -NG, the proteins interacting with this antiserum belonged to a wide variety of different functional groups including synaptic proteins like synaptotagmin and syntaxin10,

proteins involved in intracellular sorting like chmp1a and chmp5, proteins involved in the regulation of neurite outgrowth like tetraspanin-7, neurofilaments like nestin and the light form of the neurofilament protein, cell adhesion molecules like cadm3 and sptan, intracellular signaling molecules like phospholipase D3 and arl8a, transcription factors like vestigial-like protein 4, ribosomal proteins like snrp70 and rps15, as well as mitochondrial and other proteins. Also for α -NM, proteins of different functional groups were bound, such as transcription factors like trim28 or kank3, membrane receptors like notch4 and patched homolog 2, intracellular signaling molecules like rin3 or fbxo31, cytoskeleton proteins like keratin18, ribosomal proteins rpl22 and rps15, mitochondrial proteins like NADH dehydrogenase, and finally nuclear proteins like emerlin.

An important question with regard to the results obtained by the microarray analysis in the present study was to select the important candidates for schizophrenia pathology from the great variety of proteins with binding affinity to antibacterial antibodies. The first choice for this was to look for schizophrenia candidate genes, which have already been identified by population genetic studies. Following this strategy, several α -NG reactive schizophrenia candidate proteins could be selected such as selenoprotein H (Ripke et al. 2014), tspan7 (Piton et al. 2011), and keap1 and, surprisingly to us, also the α -NM reactive proteins notch4 and ambral1. The much more difficult task, however, remains which is to analyze all the other proteins for a putative role in schizophrenia pathology. The most probable candidates will be the proteins located at or within the cell membrane, since they have the highest probability to get into direct contact with circulating immunoglobulins. However, in the end, also intracellular proteins could act as autoantigens, at least if one assumes a T-cell-mediated mechanism (Iorio and Lennon 2012).

Selenoproteins include antioxidant enzymes, enzymes involved in thyroid hormone metabolism, and proteins with a functional role in selenium transport and heavy metal detoxification (Burk and Hill 2005; Kohrle 2005; Kryukov et al. 2003; Rayman 2000; Saito and Takahashi 2002). Selenoprotein H is a small nucleolar oxidoreductase and probably a sensor and regulator of redox-dependent processes in this compartment (Novoselov et al. 2007). In the nervous system, it is able to prevent damage by oxidative stress, as revealed by the fact that its overexpression is able to reduce apoptotic cell death in Ht22 neurons as elicited by UV irradiation (Ben Jilani et al. 2007). In the end, several gene polymorphisms at the locus of selenoprotein H on chromosome 11q12.1 are associated with an increased schizophrenia risk (Ripke et al. 2014).

Another interaction partner of α -NG detected on the hEXselect MPA, and a schizophrenia candidate protein (Piton et al. 2011), is tetraspanin-7. Members of the tetraspanin protein family are known to interact with membrane proteins like

integrins and, by this, are thought to organize the so-called tetraspanin-enriched microdomains (Hemler 2005). Mutations in the gene coding for tetraspanin-7 (TSPAN7) seem to be causal for some forms of X-linked mental retardation. According to this, overexpression of the TSPAN7 gene product promotes the formation of filopodia and dendritic spines in cultured rat embryonic hippocampal neurons, whereas silencing of the gene reduces head size and spine stability, as well as AMPA receptor currents (Bassani et al. 2012). As mentioned above, several gene variants in the *tspan7* gene have been already found to be associated with an increased schizophrenia risk (Piton et al. 2011).

However, to us, one of the most interesting interaction partners for α -NG on the hEXselect MPA, and also a candidate gene for schizophrenia pathology, seemed to be Snap23. Snap23, together with the closely related protein Snap25, is a member of the family of the so-called SNARE-complex proteins, which are involved in membrane fusion and exocytosis of vesicles in mammalian cells. Vesicular exocytosis and thereby SNARE-complex proteins play a key role in many fundamental cellular processes like synaptic transmission or membrane translocation of transporters and receptor molecules, and genetic ablation of Snap23 in mice leads to preimplantation lethality (Suh et al. 2011).

An important physiological process where Snap23 seems to play a key role is insulin-dependent glucose transport by GluT4 (Foster et al. 1999). GluT4 is found primarily in nonneuronal cell types like adipocytes and striated muscle fibers (Strauss et al. 2016; Kobayashi et al. 1996); however, it has been found also in neurons and the brain (Strauss et al. 2016; Kobayashi et al. 1996; El Messari et al. 1998). At low insulin plasma levels, GluT4 is stored intracellularly and, after insulin release from the pancreas, is translocated to the plasma membrane (Cannon and Jones 1996). By this, a substantial increase in glucose uptake to the cytoplasm is achieved (Bogan 2012). An important step in GluT4 membrane translocation is tethering and fusion of the transporter-containing vesicles to the plasma membrane (Kawaguchi et al. 2010). Insulin-dependent GluT4 translocation occurs also in SH-SY5Y cells where it has been shown to activate glucose uptake (Benomar et al. 2006), and we therefore used these cells to test for a possible functional interference of α -NG with exocytosis of GluT4 during membrane translocation and with the resulting vesicle recycling.

Expression of the insulin-regulatable glucose transporter GluT4 has been demonstrated also in the rat brain (Kobayashi et al. 1996; El Messari et al. 1998), where GluT4 is located primarily in special subregions like the hippocampus. According to this, impairment of insulin-stimulated trafficking of GluT4 in the hippocampus results in decreased metabolic activity and altered plasticity of hippocampal neurons (Vannucci et al. 1998). In the end, this can lead to depression-like behavior and to cognitive

dysfunction (Winocur et al. 2005). Altered methylation patterns in glucose transporter 4 gene have been recently associated with major depression in human patients (Kahl et al. 2016).

With regard to schizophrenia, insulin resistance and resulting type II diabetes has been long known as a key feature even in drug-naïve patients (Collins 1957; Schimmelbusch et al. 1971). However, these early findings were covered for several decades by the more prominent effects of neuroleptic drugs, which are also able to increase diabetes risk in schizophrenic patients (Melkersson et al. 1999; Lindenmayer et al. 2001). Only in recent years, the significance of altered glucose metabolism in drug-naïve schizophrenic patients has come again into the focus of scientific interest (Verma et al. 2009).

Another important functional role for Snap23 is postsynaptic membrane integration of neurotransmitter receptors such as glutamate receptors in chemical synapses (Suh et al. 2010). Thus, glutamate receptors stored in mobile transport packets are recruited rapidly to newly formed synapses by exocytosis, mediated by a Snap23-dependent mechanism (Washbourne et al. 2004). According to this, a loss of Snap23 leads to decreased NMDA receptor expression and diminished NMDA receptor currents (Suh et al. 2010). Snap23 has also been found in astrocytes together with other synaptic proteins such as syntaxin, synaptobrevin, and cellubrevin, suggesting that astrocytes are able to release excitatory amino acids by a vesicular mechanism, involving SNARE-complex proteins (Hepp et al. 1999). The findings of the present study open the possibility that even these processes could be changed in the course of maternal gonococcal infections; however, this needs further studies in the future.

One of the key factors for the exocytotic release of von Willebrand factor (vWF) by endothelial cells during vascular thrombosis and inflammation is also Snap23 (Zhu et al. 2015). This suggests that antibodies interacting with Snap23 such as α -NG could interfere also with this process leading to altered blood coagulation. According to such a hypothesis, changes in the concentration of vWF have already been detected in schizophrenic patients, where increased levels of this factor have been detected by ELISA (Hope et al. 2009), and further along this line, markers for a pathological activation of blood clotting and fibrinolysis, as well as activation of thrombocytes, have already been demonstrated in unmedicated patients with acute psychosis (Masopust et al. 2011).

With regard to the results of the present study, the question for the specificity of the effects of α -NG on Snap23 functioning must be discussed in more detail. We have tried to clarify this by a series of control experiments, the most important result of which might be the lack of effect of α -NM directed to the closely related member of the Neisseriaceae family, *N. meningitidis*, in any of the investigated settings. This is in accordance to our findings that α -NM interacts with an almost entirely different set of proteins as revealed in the MPA

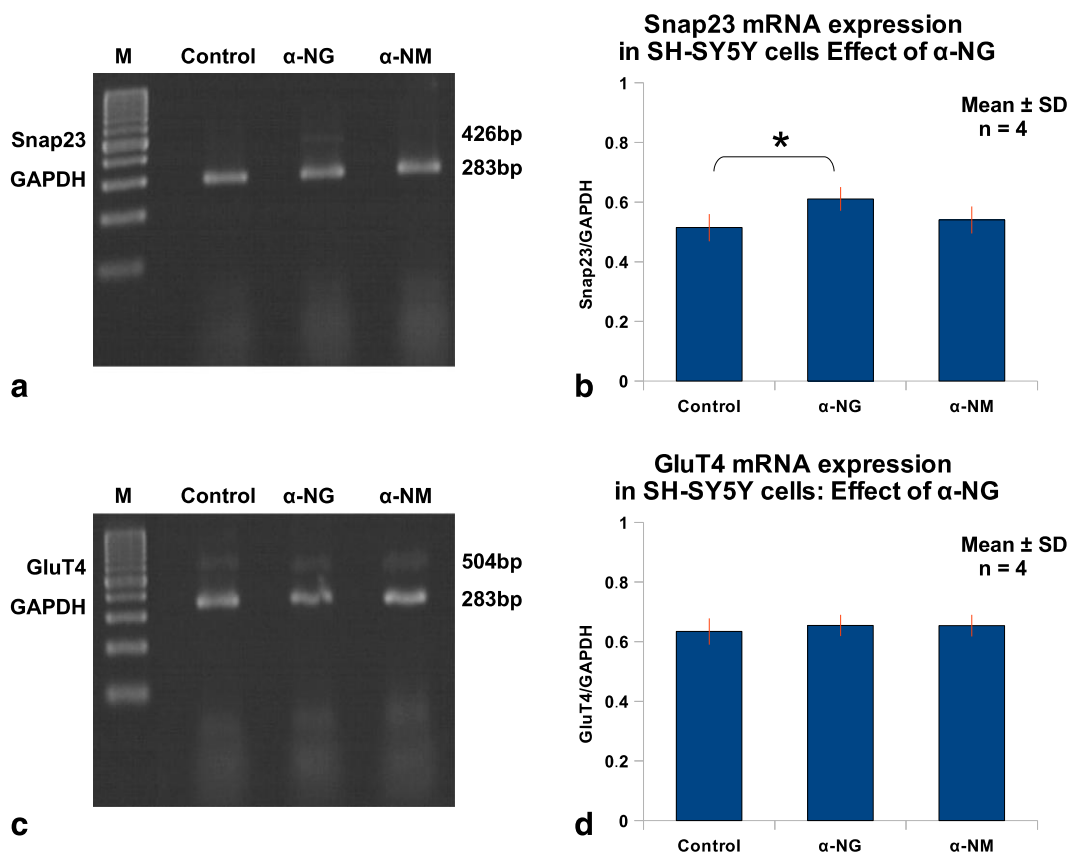


Fig. 7 Effects of α -NG and α -NM on expression of Snap23 and GluT4 mRNA, as revealed by semiquantitative RT-PCR. **a** Representative picture of ethidium bromide-stained RT-PCR products for Snap23 and GAPDH on a 2% agarose electrophoresis gel, revealing specific bands for both products amplified, of which Snap23 revealed a distinct increase in α -NG-treated cells as compared to cells treated with control cultures. Cells treated with α -NM, however, revealed no such change. **b** Diagram of the densitometric evaluation of a series of experiments shown in **a**, demonstrating a significant increase in expression of Snap23 mRNA in SH-SY5Y cells treated with α -NG as compared to

control cultures, whereas cells treated with α -NM revealed no such change. **c** Picture of the ethidium bromide-stained RT-PCR products for GluT4 and GAPDH, size separated on a 2% agarose gel, revealing specific bands for both products amplified, however, in this case, no changes in mRNA expression are detectable in neither α -NG- nor α -NM-treated cells, as compared to control cultures. **d** Diagram of the densitometric evaluation of a series of experiments shown in **c** demonstrating no significant changes in expression of GluT4 mRNA in SH-SY5Y cells treated with either α -NG or α -NM as compared to control cultures. *M* marker (100 bp ladder). * $p < 0.05$

analysis. Towards a similar direction point also the experiments performed with antisera directed specifically to Snap23 (α -Snap23) and Snap25 (α -Snap25) of which the latter one revealed none of the effects observed for α -Snap23, providing an additional confirmation for the specificity of the effects observed for α -Snap23. Also, our finding of an increased expression rate of the Snap23 mRNA in SH-SY5Y cells treated with α -NG can be interpreted as a hint for a direct interaction of α -NG with this protein, since in contrast to this, the mRNA for GluT4 revealed no changes in expression strength. Similar mechanisms have been described for autoimmune disorders like myasthenia gravis, where autoantibodies interacting with the muscular acetylcholine receptor lead to a compensatory upregulation of the corresponding mRNA (Guyon et al. 1998).

With regard to a previous study (Reuss et al. 2015), where we have demonstrated the mitochondrial 60-kDa heat shock protein Hsp60 as an important interaction partner of α -NG in the human choroid plexus papilloma cell line HIBCPP, we could not confirm this result in the present study, due to a lack of interaction of α -NG with Hsp60 on the hEXselect MPA. Several differences between the whole cell protein extracts used in our previous study (Reuss et al. 2015) and the spots on the MPA used in the present study may be responsible for this. First, the spots on the microarray used here are not always full-length clones; however, in some cases, they contain only partial sequences of the respective protein. If then the domain responsible for antibody binding is missing, no interaction between the antibody and this protein takes place. Second, proteins and protein fragments on the hEXselect MPA used

in the present study were translated using a bacterial (*E. coli*) in vitro translation system, and therefore, the protein structure might not be 100% identical to that of a protein synthesized by a eukaryotic cell in vivo. Finally, it cannot be excluded that the previously reported effects of α -NG on mitochondrial functioning in HIBCPP cells (Reuss et al. 2015) could also be at least partially caused by an indirect effect due to the impaired glucose uptake shown here.

In conclusion, the results of the present study confirm and extend previous findings on interactions of antibodies directed to the Gram-negative bacterium *N. gonorrhoeae* with human cellular proteins and, thereby, open the possibility that also changes in cellular exocytosis could be involved in the changes observed in neuropsychiatric disorders like schizophrenia. Especially the finding that interactions of α -NG with the SNARE-complex protein Snap23 are able to impair insulin-dependent membrane translocation of the GluT4 glucose transporter could provide a possible explanation for some of the most frequent comorbidities of schizophrenia pathology like insulin resistance and changes in blood coagulation. Nevertheless, despite these promising functional correlations, one has to keep in mind that our understanding for the role of bacteria-elicited changes in immune function for the etiopathology of neurological and neuropsychiatric disorders is still at the beginning, and therefore, much more experimental work needs to be done in the future.

Acknowledgments We would like to thank the University Medicine Göttingen (UMG) for persistent and reliable support of our work.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no competing interests.

References

- Babulas V, Factor-Litvak P, Goetz R, Schaefer CA, Brown AS (2006) Prenatal exposure to maternal genital and reproductive infections and adult schizophrenia. *Am J Psychiatry* 163:927–929
- Bassani S, Cingolani LA, Valnegri P, Folci A, Zapata J, Gianfelice A, Sala C, Goda Y, Passafaro M (2012) The X-linked intellectual disability protein TSPAN7 regulates excitatory synapse development and AMPAR trafficking. *Neuron* 73:1143–1158
- Ben-Hur H, Gurevich P, Elhayany A, Avinoach I, Schneider DF, Zusman I (2005) Transport of maternal immunoglobulins through the human placental barrier in normal pregnancy and during inflammation. *Int J Mol Med* 16:401–407
- Ben Jilani KE, Panee J, He Q, Berry MJ, Li PA (2007) Overexpression of selenoprotein H reduces Ht22 neuronal cell death after UVB irradiation by preventing superoxide formation. *Int J Biol Sci* 3:198–204
- Benomar Y, Naour N, Aubourg A, Bailleux V, Gertler A, Djiane J, Guerre-Millo M, Taouis M (2006) Insulin and leptin induce Glut4 plasma membrane translocation and glucose uptake in a human neuronal cell line by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Endocrinology* 147:2550–2556
- Bogan JS (2012) Regulation of glucose transporter translocation in health and diabetes. *Annu Rev Biochem* 81:507–532
- Boyd KN, Mailman RB (2015) Dopamine receptor signaling and current and future antipsychotic drugs. *Handb Exp Pharmacol* 212:53–86
- Burk RF, Hill KE (2005) Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annu Rev Nutr* 25:215–235
- Büssow K, Cahill D, Nietfeld W, Bancroft D, Scherzinger E, Lehrach H, Walter G (1998) A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library. *Nucleic Acids Res* 26:5007–5008
- Büssow K, Nordhoff E, Lübbert C, Lehrach H, Walter G (2000) A human cDNA library for high-throughput protein expression screening. *Genomics* 65:1–8
- Cannon M, Jones P (1996) Schizophrenia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 60:604–613
- Cepok S, Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Stei S, Büssow K, Sommer N, Hemmer B (2005) Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 115:1352–1360
- Chowdhury HH, Jevsek M, Kreft M, Mars T, Zorec R, Grubic Z (2005) Insulin-induced exocytosis in single, in vitro innervated human muscle fibres: a new approach. *Pflugers Arch* 450:131–135
- Collins J (1957) Insulin resistance in schizophrenia. *Med J Aust* 44:467–470
- Dahm L, Klugmann F, Gonzalez-Algaba A, Reuss B (2010) Tamoxifen and raloxifene modulate gap junction coupling during early phases of retinoic acid-dependent neuronal differentiation of Ntera2/D1 cells. *Cell Biol Toxicol* 26:579–591
- Edwards JL, Butler EK (2011) The pathobiology of *Neisseria gonorrhoeae* lower female genital tract infection. *Front Microbiol* 2:102
- El Messari S, Leloup C, Quignon M, Brisorgueil MJ, Penicaud L, Arluison M (1998) Immunocytochemical localization of the insulin-responsive glucose transporter 4 (GluT4) in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 399:492–512
- Foster LJ, Yaworsky K, Trimble WS, Klip A (1999) SNAP23 promotes insulin-dependent glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes: possible interaction with cytoskeleton. *Am J Phys* 276:C1108–C1114
- Gaffield MA, Betz WJ (2006) Imaging synaptic vesicle exocytosis and endocytosis with FM dyes. *Nat Protocols* 1:2916–2921
- Gannon NP, Conn CA, Vaughan RA (2015) Dietary stimulators of GLUT4 expression and translocation in skeletal muscle: a mini-review. *Mol Nutr Food Res* 59:48–64
- Giusti-Rodríguez P, Sullivan PF (2013) The genomics of schizophrenia: update and implications. *J Clin Invest* 123:4557–4563
- Grassi D, Plonka FB, Oksdath M, Guil AN, Sosa LJ, Quiroga S (2015) Selected SNARE proteins are essential for the polarized membrane insertion of igf-1 receptor and the regulation of initial axonal outgrowth in neurons. *Cell Discov* 1:15023
- Grusovin J, Macaulay SL (2003) Snares for GLUT4—mechanisms directing vesicular trafficking of GLUT4. *Front Biosci* 8:d620–d641
- Guyon T, Wakkach A, Poëa S, Mouly V, Klingel-Schmitt I, Levasseur P, Beeson D, Asher O, Tzartos S, Berrich-Aknin S (1998) Regulation of acetylcholine receptor gene expression in human myasthenia gravis muscles. Evidences for a compensatory mechanism triggered by receptor loss. *J Clin Invest* 102:249–263
- Harland R, Antonova E, Owen GS, Broome M, Landau S, Deeley Q, Murray R (2009) A study of psychiatrists' concepts of mental illness. *Psychol Med* 39:967–976
- Harrison PJ (1999) The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 122:593–624
- Hemby SE, Ginsberg SD, Brunk B, Arnold SE, Trojanowski JQ, Eberwine JH (2002) Gene expression profile for schizophrenia: discrete neuron transcription patterns in the entorhinal cortex. *Arch Gen Psychiatry* 59:631–640


- Hemler ME (2005) Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:801–811
- Henkel AW, Bieger SC (1994) Quantification of proteins dissolved in an electrophoresis sample buffer. *Anal Biochem* 223:329–331
- Hepp R, Perraut M, Chasserot-Golaz S, Galli T, Aunis D, Langley K, Grant NJ (1999) Cultured glial cells express the SNAP-25 analogue SNAP-23. *Glia* 27:181–187
- Hoffman TA, Damus AJ, Sands L (1979) Evaluation of a gonococcal serologic test. *Am J Clin Pathol* 71:184–189
- Holt LJ, Büssov K, Walter G, Tomlinson IM (2000) By-passing selection: direct screening for antibody-antigen interactions using protein arrays. *Nucleic Acids Res* 28:E72
- Hope S, Melle I, Aukrust P, Steen NE, Birkenaes AB, Lorentzen S, Agartz I, Ueland T, Andreassen OA (2009) Similar immune profile in bipolar disorder and schizophrenia: selective increase in soluble tumor necrosis factor receptor I and von Willebrand factor. *Bipolar Disord* 11:726–734
- Horn S, Lueking A, Murphy D, Staudt A, Gutjahr C, Schulte K, König A, Landsberger M, Lehrach H, Felix SB, Cahill DJ (2006) Profiling humoral autoimmune repertoire of dilated cardiomyopathy (DCM) patients and development of a disease-associated protein chip. *Proteomics* 6:605–613
- Hosák L, Silhan P, Hosáková J (2012) Genome-wide association studies in schizophrenia, and potential etiological and functional implications of their results. *Acta Med (Hradec Kralove)* 55:3–11
- Iorio R, Lennon VA (2012) Neural antigen-specific autoimmune disorders. *Immunol Rev* 248:104–121
- Kahl KG, Georgi K, Bleich S, Muschler M, Hillemacher T, Hilfiker-Kleinert D, Schweiger U, Ding X, Kotsiari A, Frieling H (2016) Altered DNA methylation of glucose transporter 1 and glucose transporter 4 in patients with major depressive disorder. *J Psychiatr Res* 76:66–73
- Kahn RS, Sommer IE (2015) The neurobiology and treatment of first-episode schizophrenia. *Mol Psychiatry* 20:84–97
- Kawaguchi T, Tamori Y, Kanda H, Yoshikawa M, Tateya S, Nishino N, Kasuga M (2010) The t-SNAREs syntaxin4 and SNAP23 but not v-SNARE VAMP2 are indispensable to tether GLUT4 vesicles at the plasma membrane in adipocyte. *Biochem Biophys Res Commun* 391:1336–1341
- Kawanishi M, Tamori Y, Okazawa H, Araki S, Shinoda H, Kasuga M (2000) Role of SNAP23 in insulin-induced translocation of GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. Mediation of complex formation between syntaxin4 and VAMP2. *J Biol Chem* 275:8240–8247
- Khandaker GM, Zimbron J, Lewis G, Jones PB (2013) Prenatal maternal infection, neurodevelopment and adult schizophrenia: a systematic review of population-based studies. *Psychol Med* 43:239–257
- Kijanka G, Murphy D (2009) Protein arrays as tools for serum autoantibody marker discovery in cancer. *J Proteome* 72:936–944
- Kobayashi M, Nikami H, Morimatsu M, Saito M (1996) Expression and localization of insulin-regulatable glucose transporter (GLUT4) in rat brain. *Neurosci Lett* 213:103–106
- Kohrle J (2005) Selenium and the control of thyroid hormone metabolism. *Thyroid* 15:841–853
- Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lebanov AV, Zehab O, Guigo R, Gladyshev VN (2003) Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300:1439–1443
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Lang T, Jahn R (2008) Core proteins of the secretory machinery. *Handb Exp Pharmacol* 184:107–127
- Lindenmayer JP, Nathan AM, Smith RC (2001) Hyperglycemia associated with the use of atypical antipsychotics. *J Clin Psychiatry* 62(Suppl 23):30–38
- Masopust J, Malý R, Andrýs C, Vališ M, Bažant J, Hosák L (2011) Markers of thrombogenesis are activated in unmedicated patients with acute psychosis: a matched case control study. *BMC Psychiatry* 11:2/1–2/5
- Melkersson KI, Hulting AL, Brismar KE (1999) Different influences of classical antipsychotics and clozapine on glucose-insulin homeostasis in patients with schizophrenia or related psychoses. *J Clin Psychiatry* 60:783–791
- Meltzer HY, Stahl SM (1976) The dopamine hypothesis of schizophrenia: a review. *Schizophr Bull* 2:19–76
- Murray RM, O'Callaghan E, Castle DJ, Lewis SW (1992) A neurodevelopmental approach to the classification of schizophrenia. *Schizophr Bull* 18:319–332
- Noll R (2004) Historical review: autointoxication and focal infection theories of dementia praecox. *World J Biol Psychiatry* 5:66–72
- Noll R (2007) Kraepelin's 'lost biological psychiatry'? Autointoxication, organotherapy and surgery for dementia praecox. *Hist Psychiatry* 18:301–320
- Novoselov SV, Kryukov GV, Xu XM, Carlson BA, Hatfield DL, Gladyshev VN (2007) Selenoprotein H is a nucleolar thioredoxin-like protein with a unique expression pattern. *J Biol Chem* 282:11960–11968
- Piton A, Gauthier J, Hamdan FF, Lafreniere RG, Yang Y, Henrion E, Laurent S, Noreau A, Thibodeau P, Karemera L, Spiegelman D, Kuku F, Duguay J, Destroismaisons L, Jolivet P, Cote M, Lachapelle K, Diallo O, Raymond A, Marineau C, Champagne N, Xiong L, Gaspar C, Riviere JB, Tarabeux J, Cossette P, Krebs MO, Rapoport JL, Addington A, DeLisi LE, Mottron L, Joobar R, Fombonne E, Drapeau P, Rouleau GA (2011) Systematic resequencing of X-chromosome synaptic genes in autism spectrum disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 16:867–880
- Ramsby ML, Makowski GS, Khairallah EA (1994) Differential detergent fractionation of isolated hepatocytes: biochemical, immunochemical and two-dimensional gel electrophoresis characterization of cytoskeletal and noncytoskeletal compartments. *Electrophoresis* 15:265–277
- Rayman MP (2000) The importance of selenium to human health. *Lancet* 356:233–241
- Reuss B (2014) Antibodies directed to *Neisseria gonorrhoeae* impair nerve growth factor-dependent neurite outgrowth in rat PC12 cells. *J Mol Neurosci* 52:353–365
- Reuss B, Asif AR (2014) Antibodies directed to the gram-negative bacterium *Neisseria gonorrhoeae* cross-react with the 60 kDa heat shock protein and lead to impaired neurite outgrowth in NTERA2/D1 cells. *J Mol Neurosci* 54:125–136
- Reuss B, Schrotten H, Ishikawa H, Asif AR (2015) Cross-reactivity of antibodies directed to the gram-negative bacterium *Neisseria gonorrhoeae* with heat shock protein 60 and ATP-binding protein correlates to reduced mitochondrial activity in HIBCPP choroid plexus papilloma cells. *J Mol Neurosci* 57:123–138
- Ripke S et al., (2014) Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 511:421–427
- Saito Y, Takahashi K (2002) Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein. *Eur J Biochem* 269:5746–5751
- Schimmelbusch WH, Mueller PS, Sheps J (1971) The positive correlation between insulin resistance and duration of hospitalization in untreated schizophrenia. *Br J Psychiatry* 118:429–436
- Sørensen HJ, Mortensen EL, Reinisch JM, Mednick SA (2009) Association between prenatal exposure to bacterial infection and risk of schizophrenia. *Schizophrenia Bull* 35:631–637
- Strauss JA, Shaw CS, Bradley H, Wilson OJ, Dorval T, Pilling J, Wagenmakers AJ (2016) Immunofluorescence microscopy of SNAP23 in human skeletal muscle reveals colocalization with plasma membrane, lipid droplets, and mitochondria. *Physiol Rep* 4:e12662
- Suh YH, Terashima A, Petralia RS, Wenthold RJ, Isaac JT, Roche KW, Roche PA (2010) A neuronal role for SNAP-23 in postsynaptic glutamate receptor trafficking. *Nat Neurosci* 13:338–343

- Suh YH, Yoshimoto-Furusawa A, Weih KA, Tessarollo L, Roche KW, Mackem S, Roche PA (2011) Deletion of SNAP-23 results in pre-implantation embryonic lethality in mice. *PLoS One* 6:e18444
- Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS (2009) Schizophrenia, “just the facts” 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophr Res* 110: 1–23
- Vannucci SJ, Koehler-Stec ME, Li K, Reynolds HR, Clark R, Simpson IA (1998) GluT4 glucose transporter expression in rodent brain: effect of diabetes. *Brain Res* 797:1–11
- Verma SK, Subramaniam M, Liew A, Poon LY (2009) Metabolic risk factors in drug-naive patients with first-episode psychosis. *J Clin Psychiatry* 70:997–1000
- Wang Y, Tang BL (2006) SNAREs in neurons—beyond synaptic vesicle exocytosis. *Mol Membr Biol* 23:377–384
- Washbourne P, Liu XB, Jones EG, McAllister AK (2004) Cycling of NMDA receptors during trafficking in neurons before synapse formation. *J Neurosci* 24:8253–8264
- Winocur G, Greenwood CE, Piroli GG, Grillo CA, Reznikov LR, Reagan LP, McEwen BS (2005) Memory impairment in obese Zucker rats: an investigation of cognitive function in an animal model of insulin resistance and obesity. *Behav Neurosci* 119:1389–1395
- Zabel C, Klose J (2009) Protein extraction for 2DE. *Methods Mol Biol* 519:171–196
- Zhu QM, Yamakuchi M, Lowenstein CJ (2015) SNAP23 regulates endothelial exocytosis of von Willebrand factor. *PLoS One* 10: e0118737
- Zylbersztein K, Galli T (2011) Vesicular traffic in cell navigation. *FEBS J* 278:4497–4505



ORIGINAL ARTICLE

Interactions of antisera to different *Chlamydia* and *Chlamydophila* species with the ribosomal protein RPS27a correlate with impaired protein synthesis in a human choroid plexus papilloma cell line

Abdullah Almamy¹ · Christian Schwerk² · Horst Schrotten² · Hiroshi Ishikawa³ · Abdul Rahman Asif⁴ · Bernhard Reuss^{1,5} 

Published online: 14 September 2017
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

Abstract *Chlamydia trachomatis* (CT) and the *Chlamydophila* species (CS) *Chlamydophila pneumoniae* (CPn), and *Chlamydophila psittaci* (CPs) are suggested to induce autoantibodies causative of several human autoimmune disorders like rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus (SLE). The aim of the present study was therefore to identify cellular protein interaction partners with antisera to CT (α -CT) or CS (α -CS) and to identify functional consequences of such interaction in vitro. As detected with a commercial first trimester human prenatal brain multiprotein array (hEXselect, Engine, Germany), the most frequent interaction partner with both α -CT and α -CS was the ribosomal small subunit protein RPS27a. This could be confirmed by Western blot analysis with a recombinant RPS27a sample. In addition, immunocytochemistry with both antisera in the human choroid plexus papilloma cell line HIBCPP revealed a granular cytoplasmic staining, and Western blot analysis with whole-cell protein samples of HIBCPP cells revealed both

antisera to label protein bands of different molecular weights and intensity. By 2D Western blot analysis and mass spectrometry, one of the protein spots interacting with α -CT could be identified as the RPS27a. Finally, two different methods for the detection of protein synthesis activity, the SUNSET technique and an HPG fluorescence assay revealed both antisera to cause reduced translational activity in HIBCPP cells. Together with previous findings of RPS27a as an autoimmune target in a mouse model of systemic lupus erythematosus (SLE), these results suggest that infections with CT and/or CS could induce SLE-associated immune modifications. However, direct evidence for a pathogenic role of these interactions for SLE demands further investigations.

Keywords *Chlamydia* · *Chlamydophila* · RPS27a · Protein synthesis · Choroid plexus · HIBCPP cells · Lupus · NPSLE

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12026-017-8952-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Bernhard Reuss
breuss@gwdg.de

¹ Neuroanatomy, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany

² Pediatric Infectious Diseases, University Children's Hospital Mannheim, Heidelberg University, Heidelberg, Germany

³ The Nippon Dental University, Tokyo, Japan

⁴ Clinical Chemistry, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany

⁵ Institute for Neuroanatomy, University Medical Center Göttingen, Kreuzberggring 36, 37075 Göttingen, Federal Republic of Germany

Introduction

Bacterial infections, probably due to molecular mimicry mechanisms, are able to induce self-reactive antibodies, and through this, they can cause a wide variety of severe autoimmune pathologies like rheumatoid arthritis as well as several neurological and neuropsychiatric conditions [1–3]. The obligate intracellular Gram-negative bacteria *Chlamydia trachomatis* (CT) and the closely related *Chlamydophila* species (CS), *Chlamydophila pneumoniae* (CPn), and *Chlamydophila psittaci* (CPs) are considered to be major suspects to exploit such mechanisms [4] to induce post-infectious secondary autoimmune disorders like chronic obstructive pulmonary disease [5] and inflammatory arthritis [4, 6, 7]. By the induction of neuroreactive antibodies, the chlamydiales are thought also to be able to induce neurological diseases like multiple sclerosis [8], sporadic Alzheimer's disease [9], and

systemic lupus erythematosus (SLE) [10]. Since the cellular targets and molecular antigens being prone to such an interaction are largely unknown, we have tried here to identify possible candidates by investigating interactions of α -CT and α -CS with protein spots on a fetal brain multiprotein array (hEXselect, Engine, Berlin, Germany) [11], followed by further identification with recombinant protein samples and identification and functional characterization in a human choroid plexus papilloma cell line (HIBCPP) [12].

Cells of the choroid plexus epithelium are a likely cellular target for bacteria-induced autoantibodies, since at their basolateral pole, they are directly exposed to the blood serum and thereby to circulating antibodies [13]. The choroid plexus consists of a highly capillarized epithelial network in the ventricles of the brain, the primary role of which is production of the cerebrospinal fluid (CSF) [14] and also to filter the CSF by removing drugs, catabolites, and other adverse substances, thereby protecting brain cells from autointoxication [15]. In addition, the choroid plexus is one of the so-called neurohemal regions, where the capillary endothelium is of the fenestrated type. This provides direct access of the blood serum to the basolateral pole of the choroid plexus epithelial cells making it a preferred target for autoimmune conditions. In order to maintain its functional properties, i.e., production and filtration of the CSF, the choroid plexus needs a functional protein synthesis machinery for which ribosomes play a central role. Four ribosomal RNA (rRNA) species and 79 ribosomal proteins (RP) are involved in the formation of ribosomes [16]. Interestingly, the function of these proteins is not exclusively limited to protein synthesis; however, many of them as the so-called moonlighting proteins serve also extra-ribosomal functions such that they are involved amongst others in immune signaling [17], regulation of tumorigenesis [18, 19], and development [20].

Antibodies directed towards ribosomal proteins have been described earlier to play a pathogenic role for autoimmune diseases such as SLE. According to this, sera of patients with SLE have been shown to contain oligoclonal IgG autoantibodies that bind to the ribosomal protein L7 [21]. Also, the ribosomal proteins P0, P1, and P2 can be recognized by the so-called anti-ribosomal P antibodies [22, 23], which are also present in the serum of patients with SLE at different disease stages [24]. After binding to the P0 phosphoprotein, anti-ribosomal P antibodies penetrate the cells [25] and by this, they are translocated to the cytoplasm and the nucleus, where they have been shown to inhibit protein synthesis, and they cause cellular dysfunctioning [26]. Anti-ribosomal P antibodies are correlated with a specific clinical subtype of SLE, i.e., SLE with neuropsychiatric symptomatology (NPSLE) [27]. Although they have not yet been demonstrated in the serum of SLE patients, autoantibodies to RPS27a have been detected in a

mouse model of SLE and therefore could play also a role for this disease [28].

The etiopathogenesis behind SLE is not fully understood, and therefore, SLE is thought to be a multifactorial disease. Both genetic and environmental factors have been shown to induce changes in the immune system. Some of the main gene candidates with a specific pattern of mutations in SLE patients include the integrin α M, the Fc- γ -receptor for immunoglobulins, the PRDM1-ATG5 intergenic region, and the tumor necrosis factor- α -induced protein 3 (see also [29] for an overview). These mutations are thought to lead to the production of autoantibodies, such as anti-cardiolipin antibodies, antinuclear antibodies, and anti-DNA antibodies, causing systemic inflammatory responses. By this, they induce the depletion of immune complexes within tissues by several inflammatory factors, including the B lymphocyte stimulators type-I interferon and the tumor necrosis factor [30].

A large majority of SLE patients suffer also from neuropsychiatric symptoms, and the most common of which include cognitive dysfunction in around 80% and depression in more than 40% of all SLE patients [31]. Neuropsychiatric involvement in SLE patients is mainly diagnosed by exclusion diagnosis and clinical presentation [32]. Various mechanisms can lead to unspecific neurological symptoms. These include antibody-dependent inflammation, causing vasculitis, thrombosis, and hemorrhage in the affected areas [33]. There are 19 different neurological and psychiatric syndromes of SLE classified by the American College of Rheumatology (ACR). This classification covers central syndromes as well as peripheral syndromes. Examples of the central syndromes include cerebrovascular disease, headache, anxiety disorder, and psychosis. Guillain-Barré syndrome (acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy), polyneuropathy, and myasthenia gravis, amongst others, are considered peripheral syndromes of SLE [34]. In NPSLE also, changes in choroid plexus functioning are an emerging feature [35–37]. Immune dysregulation similar to NPSLE has been described also in other neuropsychiatric conditions like schizophrenia, where autoantibodies directed towards cardiolipin and nuclear antigens like DNA have been documented [31].

In the present study, we have now tried to identify possible cellular and molecular targets of CT- and CS-specific antibodies, by testing the interactions of two polyclonal rabbit antisera directed either towards CT (α -CT) or to both CPn and CPs (α -CS), with protein spots on a first trimester prenatal brain multiprotein array (hEXselect, Engine, Berlin). This multiprotein array (MPA) has been already successfully used to identify antibody interaction partners in the human fetal brain [11, 38], and also, we have used this earlier to identify protein interaction partners for the Gram-negative bacteria

Neisseria (N.) gonorrhoeae and *N. meningitidis* [39]. The spots on this MPA represent more than 10,000 proteins as encoded by 23,806 expression clones derived from a cDNA library of two late first trimester human fetal brains [11]. The unique pattern of these spots allows a rapid localization and thus identification of the proteins [40].

The protein interactions identified by the MPA analysis were further tested by Western blotting using protein extracts of HIBCPP, a well-known and widely used cell culture model to study functional properties of the choroid plexus in vitro [41]. These cells were derived from a choroid plexus papilloma, a rare, in most cases, benign tumor of the human choroid plexus [12]. They have been shown to share most of the properties of normal choroid plexus epithelial cells and therefore have been already previously used to study effects of bacterial infections on the integrity of the blood-CSF barrier [42, 43]. In the present study, we used them as a model to characterize functional effects of antibodies directed towards CT and the closely related CS CPn and CPs. The results demonstrate that both α -CT and α -CS are able to interact with the ribosomal small subunit component RPS27a, a protein that has been previously demonstrated in a mouse model as a putative auto-immune target in SLE [28].

Results

Detection of proteins with cross-reactivity to α -CT and α -CS on the hEXselect multiprotein array

In order to identify possible interaction partners for α -CT and α -CS in the first trimester human fetal brain, a high-density multiprotein array (hEXselect, Engine, Berlin, Germany) was incubated with these antisera, and immunoreactive spots were then visualized and identified according to the manufacturer's instructions. For α -CT (Fig. 1), several distinct pairs of immunoreactive protein spots could be identified, representing with the albumin precursor (ALB) and the ribosomal small subunit protein RPS27a, two structurally and functionally unrelated protein types (see the inset in Fig. 1). A similar pattern could be detected for α -CS (Fig. 2), where the cross-reactive pairs of protein spots represented also the albumin precursor (ALB) and the ribosomal small subunit protein RPS27a. However, in this case, immunoreactivity for RPS27a was detected in only three instead of four homologous pairs of protein spots.

Identification of specific interactions between commercially available RPS27a and α -CT/ α -CS by Western blot analysis

Due to the labeling of several pairs of RPS27a protein spots on the hEXselect multiprotein array, and its putative

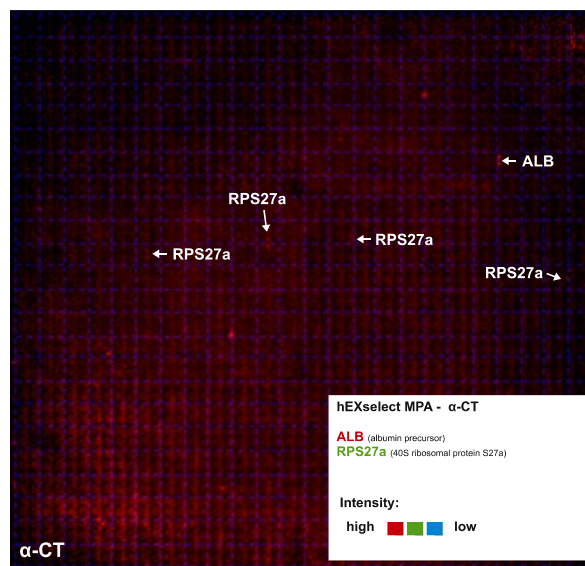


Fig. 1 Interactions of antibodies directed towards the obligate endobacterium *Chlamydia trachomatis* (α -CT) with specific protein spots on the hEXselect multiprotein array. This array contains 23,806 spots of both full-length and shorter protein fragments, expressed in an *E. coli* system, representing a total number of around 10,000 different human proteins [100]. As revealed by the red stained false color image of an X-ray film exposed to the immune incubation of an hEXselect multiprotein array visualized by ECL-detection, a number of pairwise immunoreactive spots revealed immunoreactivity with α -CT, which subsequently could be identified according to their membrane location as at least two different proteins (see inset)

relevance as a candidate autoantigen for SLE [28], we selected this protein for further analysis. For this, we tried to confirm the interactions of α -CT and α -CS with RPS27a by an independent experimental setup, testing interactions of these antisera with recombinant samples of RPS27a and the closely related ribosomal protein RPS30 by a series of Western blots (Fig. 3). As one would have expected, α -CT revealed also cross-reactivity with recombinant RPS27a, revealing a distinct immunoreactive band of around 27 kDa (Fig. 3a). In contrast, recombinant RPS30 failed to do so, underlining thereby the protein- and antibody-specificity of these reactions (Fig. 3a). Furthermore, the identity of the recombinant RPS27a protein sample was confirmed also by cross-reactivity with α -RPS27a, a protein-specific antiserum (Fig. 3b). Also, the yellow color in the false color overlay image for α -CT (red) and α -RPS27a (green) revealed the detected protein bands to run at the same size and therefore probably to be identical (Fig. 3c). In a similar series of Western blots (Fig. 3d), also α -CS revealed cross-reactivity with recombinant RPS27a, but not with RPS30 (Fig. 3d). Identity of this protein could be further confirmed by incubation with α -RPS27a (Fig. 3e), and the pink staining on the false color overlay of the images for α -CS (blue)

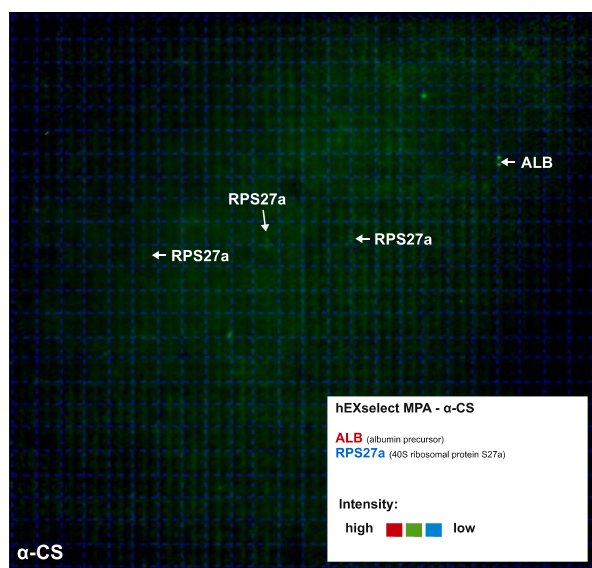


Fig. 2 Interactions of antibodies directed towards the obligate endobacteria *Chlamydomphila pneumoniae* and *C. psittaci* (α -CS) with specific protein spots on the hEXselect multiprotein array. This array contains 23,806 spots of both full-length and shorter protein fragments, expressed in an *E. coli* system, representing a total number of around 10,000 different human proteins [100]. As revealed by the green stained false color image of an X-ray film exposed to the immune incubation of an hEXselect multiprotein array visualized by ECL-detection, a number of pairwise immunoreactive spots revealed immunoreactivity with α -CT, which subsequently could be identified according to their membrane location as two different proteins (see inset)

and α -RPS27a (red) (Fig. 3f) revealed the size similarity of both bands.

Cellular distribution and molecular weight of the epitopes cross-reacting with α -CT and α -CS in cultured HIBCPP cells as revealed by immunocytochemistry and Western blot analysis

To investigate the relevance of the observed interactions of α -CT and α -CS in living cells, cellular distribution and molecular weights of the epitopes with cross-reactivity to these antisera were investigated by immunocytochemistry and Western blot as shown in Fig. 4. First of all, control staining with secondary antibodies only (SAO, Fig. 4a, b) revealed only a very weak background labeling. In contrast to that incubation with α -CT (Fig. 4c, d) demonstrated a granular staining pattern in the whole cytoplasm of HIBCPP cells, typical for intracellular organelles, whereas cell nuclei remained mostly unstained (Fig. 4c, d). Although distinctly weaker, also α -CS (Fig. 4e, f) showed a granular cytoplasmic staining in HIBCPP cells and a lack of staining in the cell nuclei (Fig. 4e, f). The spotty cytoplasmic staining by both α -CT and α -CS suggests their localization in intracellular organelles such as free

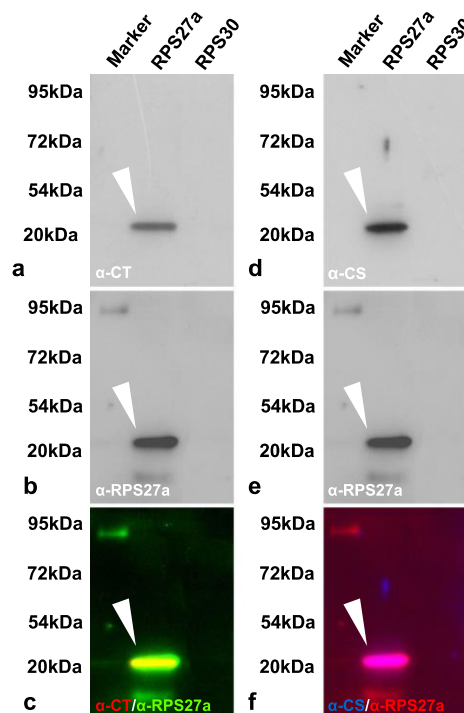


Fig. 3 Cross-reactivity of antibodies directed towards either *Chlamydia trachomatis* (α -CT) or to the *Chlamydomphila* species *Chlamydomphila pneumoniae* and *C. psittaci* (α -CS), with recombinant protein samples of RPS27a and the closely related ribosomal protein RPS30, as revealed by Western blot analysis. **a** Western blot of recombinant protein samples of RPS27a and RPS30 with α -CT revealing an immunopositive band only for RPS27a, whereas RPS30 revealed no such band. **b** A similar blot as shown in (a), however, in this case incubated with an antiserum directed towards RPS27a, revealing a similar interaction pattern, showing immunopositive bands for RPS27a, whereas RPS30 failed to reveal such a band. **c** The false color overlay image of the blots shown in (a) and (b) confirms the bands stained by α -CT (red) and α -RPS27a (green) to run at the same size. **d** Western blot of recombinant protein samples of RPS27a and RPS30 with α -CS revealing an immunopositive band only for RPS27a, whereas RPS30 revealed no such band. **e** A similar blot as shown in (d), however, in this case incubated with an antiserum directed towards RPS27a, revealing a similar interaction pattern showing immunopositive bands for RPS27a, whereas RPS30 failed to reveal such a band. **f** The false color overlay image of the blots shown in (d) and (e) confirms the bands stained by α -CS (blue) and α -RPS27a (red) to run at the same size

ribosomes in the cytoplasm or ribosomes bound to the rough endoplasmic reticulum, both preferred localizations for RPS27a. In order to further characterize the proteins in HIBCPP cells with cross-reactivity to either α -CT or α -CS with regard to their molecular weights, Western blot analysis was performed. As shown in Fig. 4g, with total cell protein extracts of cultured HIBCPP cells, both α -CT and α -CS revealed a typical pattern with a prominent immunoreactive band at a molecular weight above 20 kDa and below 54 kDa and two weaker bands of distinctly lower molecular weights.

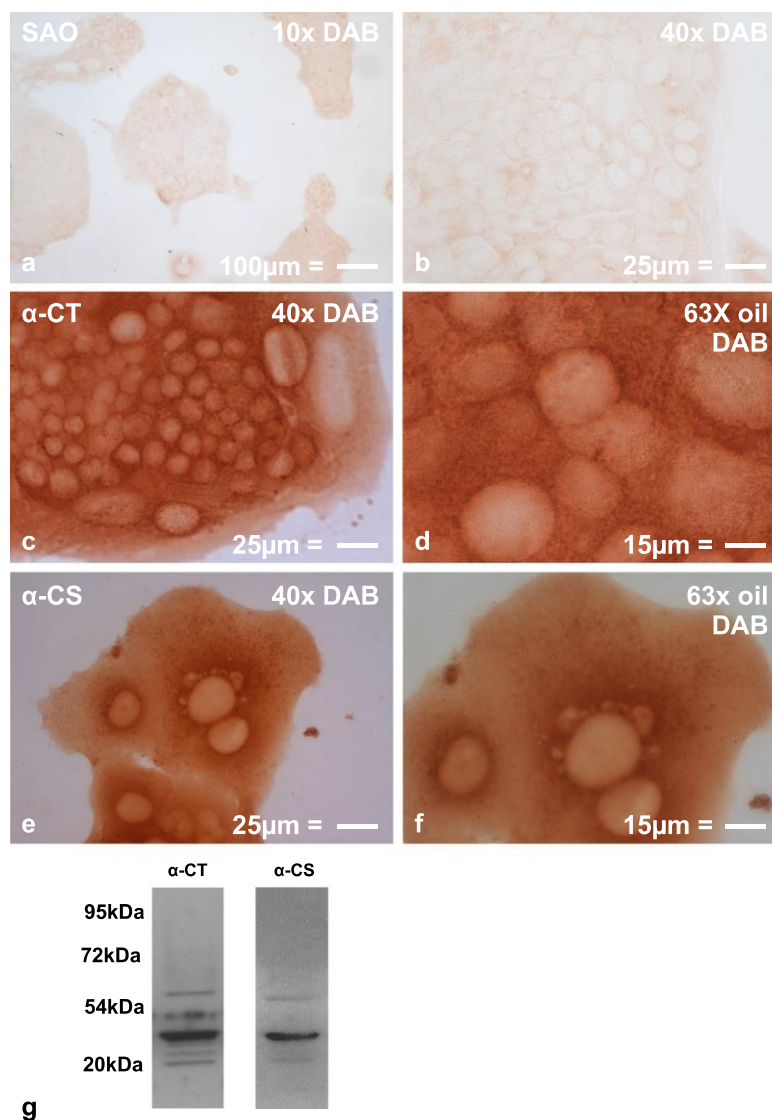


Fig. 4 Cellular distribution of the epitopes labeled by α -CT and α -CS in HIBCPP cells, as revealed by immunocytochemistry and further molecular characterization by Western blot analysis. **a** Overview image (10 \times) of HIBCPP cells incubated with secondary antibodies only (SAO) followed by visualization by DAB-staining. **b** A similar staining as shown in (a), however, in this case at higher magnification (40 \times). **c** Overview image (40 \times) of HIBCPP cells incubated with α -CT, visualized by DAB-

staining. **d** Higher magnification image (63 \times oil) of HIBCPP cells incubated with α -CT, visualized by DAB-staining. **e** Overview image (40 \times) of HIBCPP cells incubated with α -CS, visualized by DAB-staining. **f** Higher magnification image (63 \times oil) of HIBCPP cells incubated with α -CS, as visualized by DAB-staining. **g** Western blot analysis of total cell protein extracts of cultured HIBCPP cells showing prominent immunoreactive bands with both α -CT and α -CS

Identification of 2D Western blot analysis and their subsequent identification by MALDI-TOF mass spectrometry

In a next step, we identified the cellular proteins with cross-reactivity to α -CT in HIBCPP cells at a molecular level by 2D Western blot analysis and subsequent mass spectrometric analysis (Fig. 5). For this purpose, whole-cell protein extracts of HIBCPP cells were separated on a 2D polyacrylamide gel,

according to their isoelectric point for the first dimension and to their molecular weight for the second dimension. The proteins of this gel were then blotted by Western transfer onto a PVDF-membrane, which was then immune incubated with α -CT in order to detect cross-reactive protein spots. Seven distinct immunoreactive spots could be detected (Fig. 5a, white circles) and were then excised for mass spectrometric analysis, results of which are listed in Fig. 5b. By this, the interaction of α -CT with proteins like RPS27a and the albumin precursor

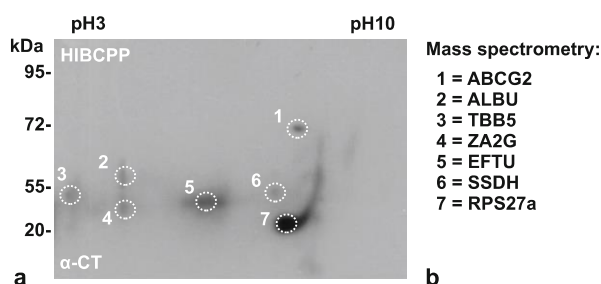


Fig. 5 Protein identification of molecules interacting with α -CT by 2D Western blot analysis followed by mass spectrometric analysis of excised membrane spots. **a** Radiography of the ECL-detection of the Western blot of a 2D gel electrophoresis of an HIBCPP total cell extract with α -CT revealing at least seven distinctly immunopositive spots (numbered circles). **b** List of the numbered immunoreactive spots shown in (a), as identified by mass spectrometric analysis (see also supplementary table 1)

(ALB) could be confirmed, together with several other proteins like ABCG2, TBB5, ZA2G, EFTU, and SSDH which revealed also cross-reactivity with this antiserum (for more details see also supplementary table 1).

Functional effects of the interactions of either α -CT or α -CS with RPS27a in HIBCPP cells as revealed by different protein synthesis assays

To further investigate the functional effects of the interactions of α -CT and α -CS antisera with RPS27a, two independent assay methods for protein synthesis detection were applied. These included, on the one hand, the surface sensing of translation (SUnSET) technique (Fig. 6), an established bench-top method [44], and on the other hand as shown in Fig. 7, the Click-IT HPG Alexa Fluor® Protein Synthesis Assay, performed with a commercial Kit (Roche, Mannheim, Germany). Both methods revealed similar results with a significant antibody-dependent decrease in protein synthesis activity (Figs. 6 and 7). For the SUnSET method, the incorporation of puromycin into newly synthesized proteins was detected by Western blot analysis with a puromycin-specific monoclonal antibody from mouse (α -PMY, Fig. 6a), and the diagram of the statistical evaluation of a series of five such experiments revealed both the α -CT- and the α -CS-dependent decrease in protein synthesis activity to be statistically significant (Fig. 6b). Likewise, the fluorescence intensity of the protein synthesis-dependent reaction product in control cultures of HIBCPP cells, as it has been visualized by the Click-IT HPG Alexa Fluor® Protein Synthesis Assay Kit (Fig. 7a), was distinctly reduced in either HIBCPP cells treated with α -CT (Fig. 7b) and in similar cultures treated with α -CS (Fig. 7c). The diagram of a series of 40 such experiments revealed the decrease in protein synthesis activity as elicited by either α -CT or α -CS to be statistically significant (Fig. 7d).

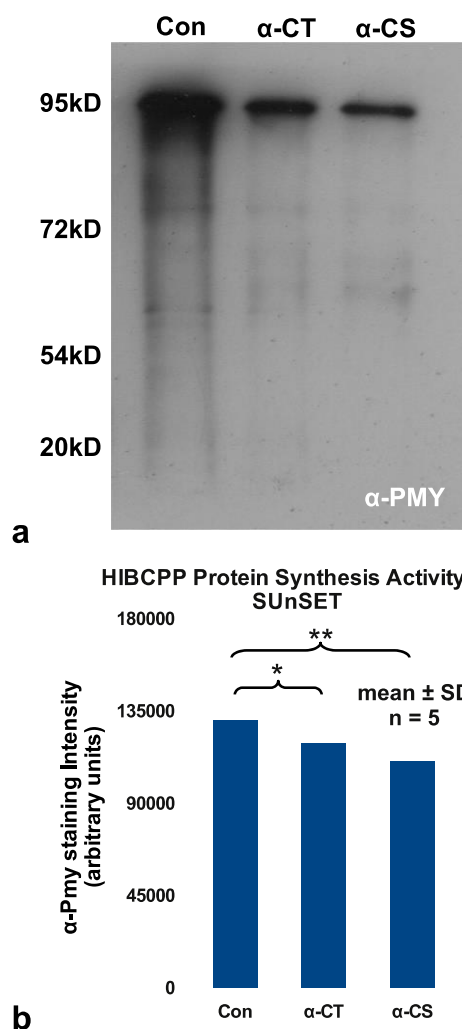


Fig. 6 Functional effects of antibodies directed towards *Chlamydia trachomatis* (α -CT) or *Chlamydia pneumoniae* and *C. psittaci* (α -CS) on protein synthesis in HIBCPP cells as revealed by the SUnSET technique. **a** Western blot of the whole-cell protein extracts of puromycin-incubated HIBCPP cells incubated with a puromycin-specific antibody (α -PMY) in order to detect differences in protein synthesis activity upon treatment with α -CT or α -CS as compared to control conditions. **b** Diagram of the statistical evaluation of a series of five experiments as shown in (a) demonstrating the antibody-dependent reduction in protein synthesis activity shown in these experiments to be statistically significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Discussion

Bacterial infections play a major role in the development of autoimmune diseases through various mechanisms including molecular mimicry. In the latter case, structural similarities between bacterial and eukaryotic proteins, in the case of B or T cell activation, can lead to cross-reactive identification of self-antigens by anti-bacterial antibodies and, by this, to the induction of autoimmune diseases [45]. Both CT and CPn have been previously shown to be associated with post-

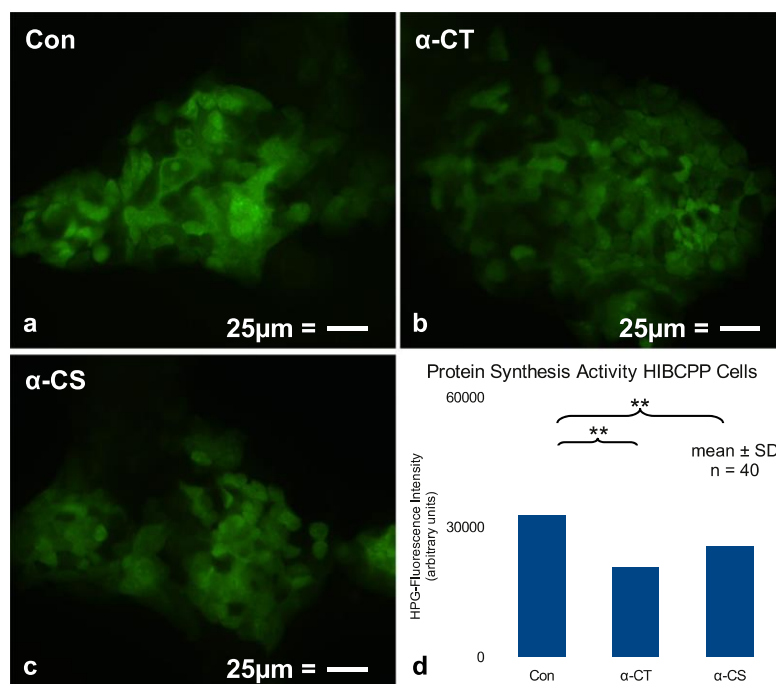


Fig. 7 Functional effects of antibodies directed towards either *Chlamydia trachomatis* (α -CT) or *Chlamydomphila pneumoniae* and *C. psittaci* (α -CS) on protein synthesis activity as revealed by the Click-IT HPG Alexa Fluor® Protein Synthesis Assay Kit. **a** Fluorescence Image of the detection of the protein synthesis activity by the Click-IT HPG Alexa Fluor® Protein Synthesis Assay Kit in a non-treated control culture of HIBCPP cells. **b** Fluorescence Image of the detection of the protein synthesis activity by the Click-IT HPG Alexa Fluor® Protein Synthesis

Assay Kit in a culture of HIBCPP cells treated for 12 h with 10 μ g/ml α -CT. **c** Fluorescence Image of the detection of the protein synthesis activity by the Click-IT HPG Alexa Fluor® Protein Synthesis Assay Kit in a culture of HIBCPP cells treated in this case for 12 h with 10 μ g/ml α -CS. **d** Diagram of the statistical evaluation of a series of 40 experiments as shown in (a–c) demonstrating the antibody-dependent reduction in protein synthesis activity shown in these experiments to be statistically significant. $**p < 0.01$

infection secondary autoimmune disorders such as sarcoidosis [46], chronic obstructive pulmonary disease [47, 48], and inflammatory arthritis [49, 50]. Also, several neurological disorders can be caused by either of these pathogenic agents, probably by the induction of neuroreactive antibodies: For CPn, this has been shown for multiple sclerosis, sporadic Alzheimer's disease, and SLE (for an overview, see [51]). Also in schizophrenic patients, previous studies have demonstrated significantly higher serum rates of CT-positive IgG antibodies [52]. With regard to possible molecular targets, it has been already demonstrated that molecular mimicry during CT infections can lead to the production of autoantibodies against the human heat-shock protein HSP60 and human ribosomal protein RPL7 [53, 54]. With RPS27a and the albumin precursor protein ALB, the present study is now able to add two new targets to this list.

An important point regarding the interactions of α -CT and α -CS with RPS27a and ALB revealed in the present study is the question for their specificity. To control for this, we have used different antisera directed either towards CT or both of the closely related *Chlamydomphila* species CPn and CPs. However, both antisera revealed a highly similar pattern of interaction with RPS27a and ALB proteins, which at the first

glance could be contradictory to bacterial specificity of the observed patterns. However, this could be explained by the close relationship of these bacteria species, an interpretation that is further corroborated by the findings of a previous study, where antibodies directed towards *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis* revealed distinctly different patterns of cross-reactive proteins [39]. Also, at the functional level, bacterial specificity can be demonstrated, and this has been analyzed in the choroid plexus papilloma derived cell line HIBCPP [12]. This cell line has been already previously used to identify autoantigens of antisera directed towards other bacterial species [55] like *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*, and together with these previous findings, our study underlines the bacterial specificity of cellular interaction patterns of the antisera used for these studies. In addition, these findings open the possibility that these specific patterns are of importance for the different pathogenic outcomes, which become manifest in different neurological and/or neuropsychiatric disorders such as schizophrenia and NPSLE.

Protein arrays are a widely used tool for the identification of possible targets for self-reacting antibodies in various autoimmune disorders [56], and therefore, we have decided to use here a commercial high-density multiprotein array (MPA)

derived from a cDNA bank of two first trimester human fetal brain samples [11] to identify candidate proteins with cross-reactivity to anti-chlamydial and anti-*Chlamydothila* antibodies. Similar MPAs have been used also previously to identify candidate proteins with cross-reactivities to other anti-bacterial antibodies directed in this case towards *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. As one would expect, the obtained results revealed for both antisera almost entirely different patterns of interactive proteins [39], underlining the bacterial specificity of such interactions. However, despite such promising results, the MPA used here might suffer from some downsides that should be also discussed here: thus, due to differences in some post-translational modifications between prokaryotes and eukaryotes [57], the bacterially translated proteins of this MPA could differ from the native human proteins, leading in the end to either false positive or negative results. In addition, despite the comparably large number of the around 10,000 developmentally expressed proteins covered by this MPA, another probably even larger number of proteins, expressed either postnatally or in the adult brain, might still remain unrecognized.

Children born to mothers with SLE seem to have a potentially increased risk of neurodevelopmental disorders compared to children born to healthy women [58]. Recent experimental data suggest in utero exposure to maternal antibodies and cytokines as important risk factors for neurodevelopmental disorders [59]. Interestingly, patients with SLE display high levels of autoantibodies and cytokines, which have been shown, in animal models, to alter fetal brain development and induce behavioral anomalies in offspring [60, 61]. Furthermore, subjects with SLE and neurodevelopmental disorders share a common genetic predisposition, which could impair the fetal immune response to in utero immunologic insults [62]. According to this, SLE pregnancies are at increased risk of adverse obstetrical outcomes and medication exposures, which have been implicated as potential risk factors for neurodevelopmental disorders [58, 63]. This opens the possibility that the mechanisms observed in the present study could also play a role for such neurodevelopmental pathology. A similar mechanism has also been described for schizophrenia, where children of mothers with gonococcal infections reveal a significantly increased disease risk [64, 65]. Supportive of this latter possibility are also the increased frequencies of chlamydial infections in serum samples of schizophrenic patients, especially with *C. psittaci* [66].

Immunocytochemistry revealed a distinct cytoplasmic and perinuclear staining for both α -CT- and α -CS antisera, which seems to match the expected intracellular localizations of RPS27a as a typical ribosomal constituent [67]. In the corresponding Western blot analysis with protein samples of HIBCPP cells, several immunoreactive bands were detected that were further characterized by 2D gel electrophoresis (2-DGE), where one of the most prominent spots was identified

by mass spectrometry also as RPS27a. Specificity of the interactions of α -CT- and α -CS with RPS27a was further confirmed by Western blot using commercial samples of both RPS27a and the closely related ribosomal protein RPS30. Both antisera revealed prominent immunoreactive bands with RPS27a, whereas RPS30 remained negative. Also on the functional level, using the SUnSET technique and the commercial Click-iT® HPG Kit, the interactions of the anti-chlamydial antibodies with RPS27a resulted in impaired protein synthesis. The SUnSET technique is a nonradioactive protein labeling and detection assay [44], which has already previously demonstrated to provide reliable information about protein synthesis in different tissues and cell culture systems [68]. This seems to be also the case in the present study, despite the fact that the changes detected by the Click-iT® HPG Kit were stronger than the ones revealed by the SUnSET technique. This could be explained by a minor inhibitory effect of puromycin on translation on its own, which might not happen with the Click-It® HPG method.

What could be the functional consequences of impaired protein synthesis in the choroid plexus epithelium at a wider range? The major task of the choroid plexus is production of the cerebrospinal fluid (CSF [14], providing thereby neuronal and glial cells in the brain with a wide variety of macro- and micronutrients [69–72], as well as with relevant hormones and growth factors [14]. Hints for a role of the choroid plexus in the pathogenesis of NPSLE were known for several decades [73, 74], being mainly characterized by immunoglobulin deposits at the basolateral side of choroid plexus epithelial cells [35, 75]. Also, more recent studies could confirm these early findings and demonstrate that they correlate with the disease-associated cognitive decline found in NPSLE patients [37] that could be explained by an earlier report on hippocampal damage in human patients and a mouse model of SLE [76]. Thereby, impaired protein synthesis in choroid plexus epithelial cells could directly impair the described choroid plexus supply functions. Also, the important detoxifying function of the choroid plexus for the cerebrospinal fluid [15] could contribute to these deficits, however, in this case in a more indirect manner of action.

In the literature, RPS27a is described as a ribosomal protein and as a component of the 40S subunit of the eukaryote ribosome forming a C-terminal extension protein of ubiquitin (Ub) [77]. After cleavage of the Ub-RPS27a fusion protein [78], RPS27a is located in several cellular compartments including the cytoplasm [67]. This raises the question, how possible autoreactive antibodies could reach this protein inside the cytoplasm? Two options could explain this, including on the one hand the possibility that either during synthesis or degradation the whole protein or fragments of it are transported to the cell membrane. On the other hand, RPS27a-specific antibodies could enter the cell via an endocytotic pathway. For other ribosomal proteins, both

mechanisms have been already described [79, 80]. Thus, ribosomal P proteins tagged by autoantibodies found frequently in SLE patients, were detected at the cell surface of human neuroblastoma cell lines, as demonstrated by both immunofluorescence and by an EM immunogold analysis [79]. In addition, the finding that several ribosomal proteins as the so-called moonlighting proteins can serve additional extra-ribosomal functions [80] opens to the possibility that they can reach the cell surface and thereby become exposed to possible autoantibodies. Due to these aspects, the question for the impact of the interactions shown in the present study on such extra-ribosomal functions of RPS27a remains an intriguing question for the future.

Besides the putative role of interaction of *Chlamydia* and *Chlamydothila*-specific antibodies with RPS27a in SLE [28], changes in this protein have been detected also in other diseases [81–83] and, therefore, the interactions shown in the present study could play a role in their etiology as well. Thus, RPS27a seems to be involved in certain forms of male infertility, since expression of this protein was changed along with several other ribosomal proteins insofar that it was upregulated in sperm of normozoospermic controls, but downregulated in patients suffering from asthenozoospermia [81]. Also, patients suffering from Diamond-Blackfan anemia, a rare disorder characterized by a congenital pure red cell aplasia in association with several other developmental disturbances, revealed mutations in RPS27a [84] and other ribosomal proteins [82]. Together with these findings, as well as the detection of a persistent infection with CPn in bone marrow biopsies of two anemic patients [83], results of the present study suggest that *Chlamydia* and *Chlamydothila* infections and the resulting bacteria-specific antibodies could account for at least some cases of idiopathic anemia. Recent studies showed an association between chlamydial infections and the development of certain types of cancer diseases [85]. Interestingly, the proposed mechanisms involving the association between *C. trachomatis* infection and cervical cancer include the involvement of the MDM2-p53-axis [18, 86]. Interactions with the very same protein by RPS27a have been already described [18, 19]. Therefore, although highly speculative at the moment, in the future, our findings could provide a functional link between the association between *C. trachomatis* infections and the development of cervical cancer.

Although we have not analyzed this interaction in detail, binding of α -CT and α -CS to the albumin precursor protein ALB could be of course of importance for SLE pathology. Several previous studies are suggestive of such a possibility [87–89] demonstrating, amongst others that in patients with SLE, higher disease pathology indices are associated with lower serum albumin levels [87]. This could be on the one hand due to a loss of albumin at the renal filter unit due to

a mild proteinuria [88]; however, also albumin-specific autoantibodies have been reported for at least a subset of SLE patients [89], suggesting that an immune-mediated degradation of this protein could be responsible as well. Especially during brain development, the choroid plexus has been demonstrated to be a major extra-hepatic source for albumin synthesis [90, 91] and according to this, high levels of plasma proteins like alpha fetoprotein, transferrin, and albumin can be found in the CSF of fetal rats [92]. An immune-mediated impairment of albumin synthesis or transport by choroid plexus epithelial cells could therefore also be responsible for the neurodevelopmental changes observed in children of mothers suffering from NPSLE and schizophrenia [58, 66]. Nevertheless, considering the complex pattern of immunological and cellular changes being associated with SLE pathology, findings of the present study are able to explain only a small subset of the disease-associated symptoms.

In conclusion our study demonstrate for the first time direct interactions of antibodies directed against *Chlamydia* and *Chlamydothila* species with the ribosomal small subunit protein RPS27a and the albumin precursor protein ALB, which could be of importance for a mechanistic link between chlamydial infections and at least some of the immune changes associated with systemic lupus erythematosus.

Materials and methods

Antibodies and recombinant proteins

The following antibodies and recombinant proteins were used in this study: anti-*C. trachomatis* (α -CT): rabbit polyclonal, Antikoerper-online.de, Aachen, Germany, Cat. Nr. ABIN285169; anti-*Chlamydia* species (α -CS): rabbit polyclonal, Antikoerper-online.de, Aachen, Germany, Cat. Nr. ABIN345968; anti-ribosomal protein S27a (α -RPS27a): mouse monoclonal, Antikoerper-online.de, Aachen, Germany, Cat. Nr. ABIN562738; anti-rabbit IgG, goat polyclonal, peroxidase coupled, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany, Cat. Nr. A9169; anti-rabbit IgG, goat polyclonal, biotin-coupled, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany, Cat. Nr. B8895; anti-mouse IgG, goat polyclonal, peroxidase coupled, Abcam, Cambridge, UK, Cat. Nr. ab6728-1; anti puromycin (α -PMY), mouse monoclonal (clone PMY-2A4, the Developmental Studies Hybridoma Bank at the University of Iowa, Iowa City, USA); recombinant human ribosomal protein S27a (RPS27a), Acris Antibodies, Herford, Germany, Cat. Nr. TP760193; recombinant human ribosomal protein S27a (RPS27a), Antikoerper-online.de, Aachen, Germany, Cat. Nr. ABIN1318790; recombinant human FAU protein/ribosomal protein S30 (RPS30), Antikoerper-online.de, Aachen, Germany, Cat. Nr. ABIN1353688.

hEXselect multiprotein array analysis

A high-density multiprotein array (MPA) (hEXselect, Engine, Berlin, Germany, Order No. 1003) derived from a cDNA bank of two first trimester human fetal brain samples, containing 23,806 *Escherichia coli* expression clones representing a total of 10,000 human proteins [11, 93], was incubated with α -CT or α -CS according to the manufacturer's protocol. In brief, prior to the first use of the array, protein spots were fixed on the PVDF-membrane for 10 min with 70% ethanol and rinsed twice with distilled water. After removing excess protein material with tissue paper and Tris-buffered saline (TBS) supplemented with 0.05% Tween-20 and 0.5% Triton X-100 (TBS-TT), the MPA was washed three times for 10 min with TBS-TT and rinsed twice for 10 min with TBS alone, followed by a 2-h blocking step with 3% milk powder in TBS. The MPA was then incubated overnight with the respective primary antibody at a dilution of 1:2000 at 4 °C on a rocking stage. On the following day, the MPA was washed three times for 10 min in TBS, containing 0.05% Tween-20 (TBS-T), before incubating it with appropriate secondary antibodies at a dilution of 1:10,000 for 2 h at room temperature. After four washes with TBS-T and two washes with TBS, location of immunoreactive spots was visualized by exposing the membrane to a SuperRX medical X-ray film (Fuji, Düsseldorf, Germany), during the application of a chemiluminescent peroxidase substrate (0.1 mol/l Tris-HCl (pH 8.6), 0.25 mg/ml luminol, 0.2 mg/ml *p*-hydroxycoumaric acid, and 0.1% H₂O₂) in a dark room cabinet. For reprobing, the MPA membrane was stripped with 1 mol/l NaOH for 40 min and then processed for a second round of immunodetection as described. All experiments were repeated in duplicate.

Cell culture

HIBCPP cells [12] were maintained in DMEM-F12 supplemented with 15% FCS, 5 μ g/ml insulin and penicillin/streptomycin, in an incubator at 37 °C and under a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Medium was exchanged every other day, and shortly before reaching confluency, cell monolayers were washed with phosphate-buffered saline (PBS), then mobilized by incubation with trypsin/EDTA (0.05%/0.02%, respectively) and finally seeded at a lower density either on 12-mm glass coverslips (Menzel, Braunschweig, Germany) in a 24-well plastic multiwell plate (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) for immunocytochemistry or on 6-well plastic multiwell plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany), for Western blot analysis. For antibody treatment, upon reaching the required density, cells were preincubated for 4 h in serum- and insulin-free DMEM-F12 and subsequently for 12 h with 10 μ g/ml of each antiserum, sodium-azide of which has been removed by microdialysis (Amicon-Ultra filter units, Merck-Millipore, Darmstadt, Germany).

Immunocytochemistry

Immunocytochemistry was performed as described earlier [94]. In brief, cells on glass coverslips (see above) were washed with PBS and fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS. After washing, cells were permeabilized for 10 min with a mixture of acetone/methanol (1:1) at – 20 °C. Following three washes with PBS, cells were blocked for 1 h with goat serum (GS) diluted 1:50 in PBS (PBS-GS). Primary antibodies diluted 1:50 in PBS-GS were applied overnight at 4 °C, followed by three washes with PBS and a 90-min incubation with biotin-coupled secondary antibodies (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), diluted 1:400 in PBS-GS at 37 °C. After three washes with PBS, peroxidase-labeled streptavidin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), diluted 1:400 in PBS, was applied for 90 min at room temperature. Afterwards, the cells were washed with PBS, before staining with di-amino-benzidine (DAB). Following three washes with PBS, the cells were then covered with a commercial mounting medium (DAKO, Glostrup, Denmark) under standard coverslips (ThermoFisher-Menzel, Braunschweig, Germany). Imaging was performed using an Axiocam digital camera system, mounted on an Axiophot microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Western blot analysis

Western blot analysis was performed as described previously [94], with either 5 μ g of total cellular protein, or 500 ng of human recombinant proteins being electrophoretically size separated on an 8.5% SDS-polyacrylamide gel [95] using a Mini-Protean Gel System (Biorad, München, Germany). After tank-blot Western transfer onto a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF; Roth, Karlsruhe, Germany), blocking occurred for 1 h at 4 °C in 3% (*w/v*) nonfat dry milk in TBS with 0.01% Tween-20 (TBS-T). Blots were then incubated overnight at 4 °C with primary antibodies (as listed above), diluted 1:2000 in TBS-T with 0.1% nonfat dry milk. After washing, rabbit-specific peroxidase-coupled secondary antibodies (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany), diluted at 1:10,000 in TBS-T, with 0.1% nonfat dry milk, were applied for 90 min at room temperature. Subsequent visualization occurred by exposing SuperRX medical X-ray films (Fuji, Düsseldorf, Germany), during the application of a peroxidase chemiluminescence substrate (0.1 mol/l Tris-HCl (pH 8.6), 0.25 mg/ml luminol, 0.2 mg/ml *p*-hydroxycoumaric acid, and 0.1% H₂O₂) to the blots. For reprobing, blots were stripped with 1 mol/l NaOH for 15 min and then processed for a second round of immunodetection as described. Each blot was repeated three times.

Surface sensing of translation

Protein synthesis activity was monitored by surface sensing of translation (SUnSET), as previously published [44], a non-radioactive protein labeling and detection assay. In brief, cells were incubated with 20 µg/ml puromycin for 30 min and were subsequently harvested in 5× Laemmli sample buffer. After the densitometric determination of the protein concentration, 5 µg of total cellular protein was separated by polyacrylamide gel electrophoresis (8.5%). Following the tank-blot Western-transfer on PVDF membranes, they were blocked with dry milk and incubated with α-PMY at a dilution of 1:2000 at 4 °C overnight. After washing, mouse-specific peroxidase-coupled secondary antibodies (1:10.000) were applied for 90 min at RT, and after washing again, ECL-detection was performed for visualization as described above. The intensity of the achieved ECL signal as an indicator for protein synthesis activity was densitometrically evaluated using the Fiji clone of the open source image analysis software ImageJ (<https://fiji.sc/>).

Click-iT® HPG Alexa Fluor® 488 Protein Synthesis Assay Kit

As an alternative assay for the detection of protein synthesis activity, low-density cultures of HIBCPP cells on glass coverslips (ThermoFisher-Menzel, Braunschweig, Germany) were maintained under low serum conditions and then treated for 24 h with 10 µg/ml α-CT or α-CS. The Na-azide of these antisera was removed by microdialysis using Amicon-Ultra filter units (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer's instructions. Cells were then stained using the Click-iT® HPG Alexa Fluor® 488 Protein Synthesis Assay Kit (ThermoFisher, Weltham, MA, USA), according to the manufacturer's protocol, and after transfer into PBS, green fluorescence of the reaction product was photographically documented using an Axiophot microscope equipped with epifluorescence (Carl Zeiss, Jena Germany). Fluorescence intensity as an indicator for protein synthesis activity was densitometrically evaluated using the Fiji clone of the open source image analysis software ImageJ (<https://fiji.sc/>).

2D gel electrophoresis

Isoelectric focusing and 2D gel electrophoresis were performed according to a previously described method [96, 97] using a Mini-Protean Gel System (Biorad, München, Germany). In brief, after cultivation on a 6-well plastic multiwell plate (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and before reaching confluency, cells were harvested in 2× sample collecting buffer (8 mol/l urea, 2% Triton X-100, 1% 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol-blue), containing also 2.4% of a commercial ampholyte solution (pH 3.5–10; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Protein concentration

of the homogenate was determined densitometrically [98], and for isoelectric focusing, 30 µg of total cellular protein were loaded on 5% polyacrylamide gel slices with 2.4% ampholytes (pH 3.5–10) containing also 50% urea for protein denaturation. Gel slices were then run for 30 min at 150 V followed by 2.5 h at 200 V. After equilibrating the slices for 30 min in electrophoresis sample buffer, they were located on top of an 8% SDS-polyacrylamide gel followed by electrophoretic separation of the proteins according to their molecular weight. After this secondary run, Western transfer onto PVDF-membrane was performed by tank-blot, and the obtained membrane was immunostained with the respective antiserum at a dilution of 1:2000. After photographic documentation, an overlay of the immunoblot with the obtained X-ray film was performed in order to identify the protein spot corresponding to the antibody-specific signal on the X-ray film. Protein spots were then excised from the PVDF-membrane and further processed for mass spectrometric analysis.

Nano-LC-MS/MS analysis

Mass spectrometric analysis and protein identification was done as described previously [99], after enriching the samples on self-packed pre- and analytical-reversed phase-C18 nanocolumns. The eluent was analyzed on a Q Exactive hybrid quadrupole/orbitrap mass spectrometer (ThermoFisher Scientific, Dreieich, Germany) equipped with a FlexIon nanoSpray source and operated under Excalibur 2.4 software using a data-dependent acquisition method. Protein identification was achieved using the MASCOT software (Matrixscience, London, UK), SwissProt 2015_10 (549,646 sequences; 195,983,064 residues). The search was performed with trypsin as enzyme (up to two missed cleavages) and iodoacetamide and methionine oxidation as a variable modification allowed. Search tolerances were set to 10 ppm for the precursor mass and 15 mmu for fragment masses and ESI-QUAD-TOF specified as the instrument type.

Acknowledgements We would like to thank the proteomics core unit of the Institute for Clinical Chemistry of the University Medical Center Göttingen (UMG) for the excellent performance in the generation of the MS/MS analysis data of this study and also the medical faculty at the UMG for the persistent and reliable financial support of our work.

Authors' Contributions AA performed most of the experimental work like immunocytochemistry, Western blot, and 2D Western blot analysis, as well as functional assays like the Click-iT® HPG Alexa Fluor® 488 Protein Synthesis Assay, and the SUnSET technique. In addition, he was also substantially involved in the writing process for this paper. CS, HS, and HI contributed the HIBCPP cell line and were also substantially involved in the writing and proofreading process. ARA performed together with his whole team the mass spectrometric analysis of the protein spots obtained by 2D Western blot analysis. In addition, he also contributed substantially to the writing and proofreading process of this manuscript. BR initiated and coordinated this study and established most of the

experimental methods. He was also involved in the final proofreading process of this paper. All authors read and approved the final manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interests.

References

- Oldstone MB, von Herrath M, Lewicki H, Hudrisier D, Whitton JL, Gairin JE. Use of a high-affinity peptide that aborts MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte activity against multiple viruses in vitro and virus-induced immunopathologic disease in vivo. *Virology*. 1999;256(2):246–57.
- Li S, Yu Y, Yue Y, Zhang Z, Su K. Microbial infection and rheumatoid arthritis. *J Clin Cell Immunol*. 2013;4(6):174–80.
- Berer K, Krishnamoorthy G. Microbial view of central nervous system autoimmunity. *FEBS Lett*. 2014;588(22):4207–13.
- Swanborg RH, Boros DL, Whittum-Hudson JA, Hudson AP. Molecular mimicry and horror autotoxicus: do chlamydial infections elicit autoimmunity? *Expert Rev Mol Med*. 2006;8(29):1–23.
- Brandén E, Gnarp J, Hillerdal G, Orre L, Sköld CM, Löfdahl M, et al. Detection of Chlamydia pneumoniae on cytospin preparations from bronchoalveolar lavage in COPD patients and in lung tissue from advanced emphysema. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2007;2(4):643–50.
- Carter JD, Hudson AP. Recent advances and future directions in understanding and treating Chlamydia-induced reactive arthritis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2017;13(3):197–206.
- Bachmaier K, Penninger JM. Chlamydia and antigenic mimicry. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;296:153–63.
- Libbey JE, Cusick MF, Fujinami RS. Role of pathogens in multiple sclerosis. *Int Rev Immunol*. 2014;33(4):266–83.
- Holmes C, Cotterell D. Role of infection in the pathogenesis of Alzheimer's disease: implications for treatment. *CNS Drugs*. 2009;23(12):993–1002.
- Fujita M, Hatachi S, Yagita M. Acute Chlamydia pneumoniae infection in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Lupus*. 2009;18(2):164–8.
- Büssow K, Cahill D, Nietfeld W, Bancroft D, Scherzinger E, Lehrach H, et al. A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library. *Nucleic Acids Res*. 1998;26(21):5007–8.
- Ishiwata I, Ishiwata C, Ishiwata E, Sato Y, Kiguchi K, Tachibana T, et al. Establishment and characterization of a human malignant choroid plexus papilloma cell line (HIBCPP). *Hum Cell*. 2005;18(1):67–2.
- Engelhardt B, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H. Involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation. *Microsc Res Tech*. 2001;52(1):112–29.
- Johanson CE, Stopa EG, McMillan PN. The blood-cerebrospinal fluid barrier: structure and functional significance. *Methods Mol Biol*. 2011;686:101–31.
- Strazielle N, Ghersi-Egea JF. Demonstration of a coupled metabolism-efflux process at the choroid plexus as a mechanism of brain protection toward xenobiotics. *J Neurosci*. 1999;19(15):6275–89.
- Zhou X, Liao W, Liao J, Liao P, Lu H. Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome. *J Mol Cell Biol*. 2015;7(2):92–104.
- Mukhopadhyay R, Jia J, Arif A, Ray PS, Fox PL. The GAIT system: a gatekeeper of inflammatory gene expression. *Trends Biochem Sci*. 2009;34(7):324–31.
- Xiong X, Zhao Y, He H, Sun Y. Ribosomal protein S27-like and S27 interplay with p53-MDM2 axis as a target, a substrate and a regulator. *Oncogene*. 2011;30(15):1798–811.
- Wang H, Yu J, Zhang L, Xiong Y, Chen S, Xing H, et al. RPS27a promotes proliferation, regulates cell cycle progression and inhibits apoptosis of leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;446(4):1204–10.
- Wool IG. Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem Sci*. 1996;21(5):164–5.
- Donauer J, Wochner M, Witte E, Peter HH, Schlesier M, Krawinkel U. Autoreactive human T cell lines recognizing ribosomal protein L7. *Int Immunol*. 1999;11(2):125–32.
- Elkon KB, Parnassa AP, Foster CL. Lupus autoantibodies target ribosomal P proteins. *J Exp Med*. 1985;162(2):459–71.
- Viana VT, Durcan L, Bonfa E, Elkon KB. Ribosomal P antibody: 30 years on the road. *Lupus*. 2017;26(5):453–62.
- Toubi E, Shoenfeld Y. Clinical and biological aspects of anti-P-ribosomal protein autoantibodies. *Autoimmun Rev*. 2007;6(3):119–25.
- Koscec M, Koren E, Wolfson-Reichlin M, Fugate RD, Trieu E, Targoff IN, et al. Autoantibodies to ribosomal P proteins penetrate into live hepatocytes and cause cellular dysfunction in culture. *J Immunol*. 1997;159(4):2033–41.
- Reichlin M. Cellular dysfunction induced by penetration of autoantibodies into living cells: cellular damage and dysfunction mediated by antibodies to dsDNA and ribosomal P proteins. *J Autoimmun*. 1998;11(5):557–61.
- Koffler D, Miller TE, Lahita RG. Studies on the specificity and clinical correlation of antiribosomal antibodies in systemic lupus erythematosus sera. *Arthritis Rheumat*. 1979;22(5):463–70.
- Gutjahr C, Murphy D, Lueking A, Koenig A, Janitz M, O'Brien J, et al. Mouse protein arrays from a TH1 cell cDNA library for antibody screening and serum profiling. *Genomics*. 2005;85(3):285–96.
- Lisnevskaja L, Murphy G, Isenberg D. Systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 2014;384(9957):1878–88.
- Popescu A, Kao AH. Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Curr Neuropharmacol*. 2011;9(3):449–57.
- Meszáros ZS, Perl A, Faraone SV. Psychiatric symptoms in systemic lupus erythematosus: a systematic review. *J Clin Psychiatry*. 2012;73(7):993–1001.
- Borchers AT, Aoki CA, Naguwa SM, Keen CL, Shoenfeld Y, Gershwin ME. Neuropsychiatric features of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. 2005;4(6):329–44.
- Vadacca M, Buzzulini F, Rigon A, Coppolino G, Palma Modoni A, Massa R, et al. Neuropsychiatric lupus erythematosus. *Reumatismo*. 2006;58(3):177–86.
- ACR Ad Hoc Committee on Neuropsychiatric Lupus Nomenclature. The American College of Rheumatology nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes. *Arthritis Rheum*. 1999;42(4):599–608.
- Sher JH, Pertschuk LP. Immunoglobulin G deposits in the choroid plexus of a child with systemic lupus erythematosus. *J Pediatr*. 1974;85(3):385–7.
- Duprez T, Nzeusseu A, Peeters A, Houssiau FA. Selective involvement of the choroid plexus on cerebral magnetic resonance images: a new radiological sign in patients with systemic lupus erythematosus with neurological symptoms. *J Rheumatol*. 2001;28(2):387–91.
- Amaro E Jr, Scheinberg M. Onset of cognitive dysfunction in systemic lupus erythematosus and selective involvement of the choroid plexus. *J Rheumatol*. 2009;36(11):2554–5.

38. Holt LJ, Büssow K, Walter G, Tomlinson IM. By-passing selection: direct screening for antibody-antigen interactions using protein arrays. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(15):e72.
39. Almamy A, Schwerk C, Schrotten H, Ishikawa H, Asif AR, Reuss B. Crossreactivity of an antiserum directed to the gram-negative bacterium *Neisseria gonorrhoeae* with the SNARE-complex protein Snap23 correlates to impaired exocytosis in SH-SY5Y cells. *J Mol Neurosci.* 2017;62(2):163–80.
40. Dervan EW, Chen H, Ho SL, Brummel N, Schmid J, Toomey D, et al. Protein microarray profiling of serum autoantibodies in pseudoexfoliation glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(6):2968–75.
41. Dinner S, Borkowski J, Stump-Guthier C, Ishikawa H, Tenenbaum T, Schrotten H, et al. A choroid plexus epithelial cell-based model of the human blood-cerebrospinal fluid barrier to study bacterial infection from the basolateral side. *J Vis Exp.* 2016;111:e54061.
42. Schwerk C, Papandreou T, Schuhmann D, Nickol L, Borkowski J, Steinmann U, et al. Polar invasion and translocation of *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus suis* in a novel human model of the blood-cerebrospinal fluid barrier. *PLoS One.* 2012;7(1):e30069.
43. Gründler T, Quednau N, Stump C, Orian-Rousseau V, Ishikawa H, Wolburg H, et al. The surface proteins InlA and InlB are interdependently required for polar basolateral invasion by *Listeria monocytogenes* in a human model of the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Microbes Infect.* 2013;15(4):291–301.
44. Schmidt EK, Clavarino G, Ceppi M, Pierre P. SUNSET, a non-radioactive method to monitor protein synthesis. *Nat Meth.* 2009;6(4):275–7.
45. Ercolini AM, Miller SD. Role of immunologic cross-reactivity in neurological diseases. *J Neurol Res.* 2005;27(7):726–33.
46. Puolakkainen M, Campbell LA, Kuo CC, Leinonen M, Grönhagen-Riska C, Saikku P. Serological response to *Chlamydia pneumoniae* in patients with sarcoidosis. *J Inf Secur.* 1996;33(3):199–205.
47. Paran H, Heimer D, Sarov I. Serological, clinical and radiological findings in adults with bronchopulmonary infections caused by *Chlamydia trachomatis*. *Isr J Med Sci.* 1986;22(11):823–7.
48. Beaty CD, Grayston JT, Wang SP, Kuo CC, Reto CS, Martin TR. *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR, infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis.* 1991;144(6):1408–10.
49. Keat AC, Maini RN, Nkwazi GC, Pegrum GD, Ridgway GL, Scott JT. Role of *Chlamydia trachomatis* and HLA-B27 in sexually acquired reactive arthritis. *Br Med J.* 1978;1(6113):605–7.
50. Saario R, Toivanen A. *Chlamydia pneumoniae* as a cause of reactive arthritis. *Br J Rheumatol.* 1993;32(12):1112.
51. Contini C, Seraceni S, Cultrera R, Castellazzi M, Granieri E, Fainardi E. *Chlamydia pneumoniae* infection and its role in neurological disorders. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2010;273573.
52. Park MH, Kwon YJ, Jeong HY, Lee HY, Hwangbo Y, Yoon HJ, et al. Association between intracellular infectious agents and schizophrenia. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 2012;10(2):117–23.
53. Hemmerich P, Neu E, Macht M, Peter HH, Krawinkel U, von Mikecz A. Correlation between chlamydial infection and autoimmune response: molecular mimicry between RNA polymerase major sigma subunit from *Chlamydia trachomatis* and human L7. *Eur J Immunol.* 1998;28(11):3857–66.
54. Cappello F, Conway de Macario E, Di Felice V, Zummo G, Macario AJ. *Chlamydia trachomatis* infection and anti-Hsp60 immunity: the two sides of the coin. *PLoS Pathog.* 2009;5(8):e1000552.
55. Reuss B, Schrotten H, Ishikawa H, Asif AR. Cross-reactivity of antibodies directed to the gram-negative bacterium *Neisseria gonorrhoeae* with heat shock protein 60 and ATP-binding protein correlates to reduced mitochondrial activity in HIBCPP choroid plexus papilloma cells. *J Mol Neurosci.* 2015;57(1):123–38.
56. Zhu H, Luo H, Yan M, Zuo X, Li QZ. Autoantigen microarray for high-throughput autoantibody profiling in systemic lupus erythematosus. *Genom Proteom Bioinf.* 2015;13(4):210–8.
57. Dell A, Galadari A, Sastre F, Hitchen P. Similarities and differences in the glycosylation mechanisms in prokaryotes and eukaryotes. *Int J Microbiol.* 2010;148178.
58. Vinet E, Pineau CA, Clarke AE, Fombonne E, Platt RW, Bernatsky S. Neurodevelopmental disorders in children born to mothers with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2014;23(11):1099–104.
59. Braunschweig D, Van de Water J. Maternal autoantibodies in autism. *Arch Neurol.* 2012;69(6):693–9.
60. Wang L, Zhou D, Lee J, Niu H, Faust TW, Frattini S, et al. Female mouse fetal loss mediated by maternal autoantibody. *J Exp Med.* 2012;209(6):1083–9.
61. Smith SE, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci.* 2007;27(40):10695–702.
62. Warren RP, Singh VK, Averett RE, Odell JD, Maciulis A, Burger RA, et al. Immunogenetic studies in autism and related disorders. *Mol Chem Neurobiol.* 1996;28(1–3):77–81.
63. Lampi KM, Lehtonen L, Tran PL, Suominen A, Lehti V, Banerjee PN, et al. Risk of autism spectrum disorders in low birth weight and small for gestational age infants. *J Pediatr.* 2012;161(5):830–6.
64. Babulas V, Factor-Litvak P, Goetz R, Schaefer CA, Brown AS. Prenatal exposure to maternal genital and reproductive infections and adult schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 2006;163(5):927–9.
65. Sørensen HJ, Mortensen EL, Reinisch JM, Mednick SA. Association between prenatal exposure to bacterial infection and risk of schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2009;35(3):631–7.
66. Fellerhoff B, Laumbacher B, Mueller N, Gu S, Wank R. Associations between *Chlamydia pneumoniae* infections, schizophrenia and risk of HLA-A10. *Mol Psychiatry.* 2007;12(3):264–72.
67. Tan J, Chen J, Huang X, Yuan C. Screening and verification of proteins that interact with HSPC238. *Oncology Rep.* 2015;34(6):3097–103.
68. Goodman CA, Mabrey DM, Frey JW, Miu MH, Schmidt EK, Pierre P, et al. Novel insights into the regulation of skeletal muscle protein synthesis as revealed by a new nonradioactive in vivo technique. *FASEB J.* 2011;25(3):1028–39.
69. Damkier HH, Brown PD, Praetorius J. Cerebrospinal fluid secretion by the choroid plexus. *Physiol Rev.* 2013;93(4):1847–92.
70. Gordon N. Cerebral folate deficiency. *Dev Med Child Neurol.* 2008;51(3):180–2.
71. Spector R, Johanson CE. The origin of deoxynucleosides in brain: implications for the study of neurogenesis and stem cell therapy. *Pharm Res.* 2007;24(5):859–67.
72. Spector R, Johanson CE. Vitamin transport and homeostasis in mammalian brain, focus on vitamins B and E. *J Neurochem.* 2007;103(2):425–38.
73. Atkins CJ, Kondon JJ, Quismorio FP, Friou GJ. The choroid plexus in systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med.* 1972;76(1):65–72.
74. Gershwin ME, Hyman LR, Steinberg AD. The choroid plexus in CNS involvement of systemic lupus erythematosus. *J Pediatr.* 1975;87(4):588–90.
75. Lampert PW, Garrett RS, Oldstone MB. Immune complex deposits in the choroid plexus. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1978;14(5):237–44.

76. Ballok DA, Woulfe J, Sur M, Cyr M, Sakic B. Hippocampal damage in mouse and human forms of systemic autoimmune disease. *Hippocampus*. 2004;14(5):649–61.
77. Redman KL, Rechsteiner M. Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a. *Nature*. 1989;338(6214):438–40.
78. Komander D, Clague MJ, Urbé S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(8):550–63.
79. Koren E, Reichlin MW, Koscec M, Fugate RD, Reichlin M. Autoantibodies to the ribosomal P proteins react with a plasma membrane-related target on human cells. *J Clin Invest*. 1992;89(4):1236–41.
80. Wang W, Nag S, Zhang X, Wang MH, Wang H, Zhou J, et al. Ribosomal proteins and human diseases: pathogenesis, molecular mechanisms, and therapeutic implications. *Med Res Rev*. 2015;35(2):225–85.
81. Bansal SK, Gupta N, Sankhwar SN, Rajender S. Differential genes expression between fertile and infertile spermatozoa revealed by transcriptome analysis. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127007.
82. Hoefele J, Bertrand AM, Stehr M, Leblanc T, Tchernia G, Simansour M, et al. Disorders of sex development and Diamond-Blackfan anemia: is there an association? *Pediatr Nephrol*. 2010;25(7):1255–61.
83. Nebe CT, Rother M, Brechtel I, Costina V, Neumaier M, Zentgraf H, et al. Detection of *Chlamydomyces pneumoniae* in the bone marrow of two patients with unexplained chronic anaemia. *Eur J Haematol*. 2005;74(1):77–83.
84. Gazda HT, Sheen MR, Vlachos A, Choesme V, O'Donohue MF, Schneider H, et al. Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Am J Hum Genet*. 2008;83(6):769–80.
85. Zhu H, Shen Z, Luo H, Zhang W, Zhu X. Chlamydia trachomatis infection-associated risk of cervical cancer: meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(13):e3077.
86. Gagnaire A, Nadel B, Raoult D, Neeffjes J, Gorvel JP. Collateral damage: insights into bacterial mechanisms that predispose host cells to cancer. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(2):109–28.
87. Yip J, Aghdassi E, Su J, Lou W, Reich H, Bargman J, et al. Serum albumin as a marker for disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2010;37(8):1667–72.
88. Battle-Gualda E, Martínez AC, Guerra RA, Pascual E. Urinary albumin excretion in patients with systemic lupus erythematosus without renal disease. *Ann Rheum Dis*. 1997;56(6):386–9.
89. Padjas A, Undas A, Swadźba J, Musiał J. Antibodies to N-homocysteinylated albumin in patients with systemic lupus erythematosus. *Pol Arch Med Wewn*. 2007;117(3):80–5.
90. Murakami T, Yasuda Y, Mita S, Maeda S, Shimada K, Fujimoto T, et al. Prealbumin gene expression during mouse development studied by in situ hybridization. *Cell Differ*. 1978;22(1):1–9.
91. Aleshire SL, Bradley CA, Richardson LD, Parl FF. Localization of human prealbumin in choroid plexus epithelium. *J Histochem Cytochem*. 1983;31(5):608–12.
92. Dziegielewska KM, Evans CA, New H, Reynolds ML, Saunders NR. Synthesis of plasma proteins by rat fetal brain and choroid plexus. *Int J Dev Neurosci*. 1984;2(3):215–22.
93. Horn S, Lueking A, Murphy D, Staudt A, Gutjahr C, Schulte K, et al. Profiling humoral autoimmune repertoire of dilated cardiomyopathy (DCM) patients and development of a disease-associated protein chip. *Proteomics*. 2006;6(2):605–13.
94. Dahm L, Klugmann F, Gonzalez-Algaba A, Reuss B. Tamoxifen and raloxifene modulate gap junction coupling during early phases of retinoic acid-dependent neuronal differentiation of Ntera2/D1 cells. *Cell Biol Toxicol*. 2010;26(6):579–91.
95. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–5.
96. BollagDM, EdelsteinSJ. Isoelectric focusing and two dimensional gel electrophoresis. Chapter 7 in. protein methods 1994;Wiley-Liss Inc. qp551.e23 1990.
97. Reuss B, Asif AR. Antibodies directed to the gram-negative bacterium *Neisseria gonorrhoeae* cross-react with the 60 kDa heat shock protein and lead to impaired neurite outgrowth in Ntera2/D1 cells. *J Mol Neurosci*. 2014;54(1):125–36.
98. Henkel AW, Bieger SC. Quantification of proteins dissolved in an electrophoresis sample buffer. *Anal Biochem*. 1994;223(2):329–31.
99. Khan N, Lenz C, Binder L, Pantakani DV, Asif AR. Active and repressive chromatin-associated proteome after MPA treatment and the role of midkine in epithelial monolayer permeability. *Int J Mol Sci*. 2016;17(4):e597.
100. Büssov K, Nordhoff E, Lübbert C, Lehrach H, Walter G. A human cDNA library for high-throughput protein expression screening. *Genomics*. 2000;65(1):1–8.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernhard Reuss für die hervorragende, kontinuierliche und intensive Betreuung dieser Dissertation ganz herzlich bedanken. Vor allem bedanke ich mich dafür, dass ich bei ihm promovieren durfte und so wissenschaftliche Erfahrungen in der experimentellen Medizin sammeln konnte, sowie für seine Unterstützung und Motivation zur wissenschaftlichen Veröffentlichung.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Abdul Rahman Asif sowie seiner Arbeitsgruppe für die freundliche und zuverlässige Kooperation sowie für seine konstruktiven Anregungen herzlich bedanken.

Außerdem bedanke ich mich sehr bei meinem Gefährten Manuel Altherr für seine Anregungen und für die vielen Stunden Korrekturlesen.